

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR
D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI
NATURAL



Análisis de determinantes de localización subcelular en el supresor del silenciamiento por RNA codificado por el virus del arabesco del *Pelargonium*

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: M^a del Pilar Fajardo Flores

TUTORA: Prof. Dña. M^a Desamparados Pascual-Ahuir

COTUTORA: Dña. Carmen Hernández Fort

Curso Académico: 2013-2014

VALENCIA, 1 de Septiembre 2014

Licencia Creative Commons





**ESCUELA
TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL
MEDIO NATURAL**

**Ficha resumen del Trabajo Fin
de Grado**

Datos personales

Nombre y apellidos: María del Pilar Fajardo Flores

Datos del trabajo de fin de grado

Título del TFG: "Análisis de determinantes de localización subcelular en el supresor del silenciamiento por RNA codificado por el virus del arabesco del *Pelargonium*"

Lugar de realización: IBMCP Localidad y fecha: Valencia, Septiembre 2014

Titulación: Grado en Biotecnología

Cotutora externa: Dña. Carmen Hernández Fort

Tutor/a Académico: Prof. Dña. M^a Desamparados Pascual-Ahuir

Resumen

En plantas, el silenciamiento por RNA constituye un potente mecanismo de defensa antiviral. Este mecanismo es activado por RNAs virales de doble cadena, producidos en el curso de la infección, que son reconocidos por RNAsas III de tipo Dicer, cuya acción genera pequeños RNAs (*small RNAs*, sRNAs) de entre 20 y 24 nt. A continuación, una de las cadenas de esos sRNAs es incorporada a un complejo multiproteico conocido como RISC (*RNA-induced silencing complex*), cuyo componente principal es una endonucleasa de la familia de las Argonautas. Una vez activado, RISC es dirigido por el sRNA asociado hasta RNAs de secuencia complementaria provocando su degradación. Con el fin de evadir este mecanismo de defensa, los virus codifican proteínas conocidas como supresores del silenciamiento por RNA (*viral RNA silencing suppressors*, VSRs). Los VSRs son muy diversos en cuanto a tamaño y secuencia, y las bases moleculares de su actividad no se conocen con precisión en la gran mayoría de los casos.

Este trabajo se ha centrado en el estudio del VSR codificado por el virus del arabesco del *Pelargonium* (*Pelargonium line pattern virus*, PLPV), un miembro de la familia *Tombusviridae* que causa infecciones frecuentes en geranio. Experimentos anteriores habían permitido identificar a la proteína de cubierta viral (CP o p37) como el VSR del PLPV y habían mostrado que p37 se localiza en el citoplasma, núcleo y nucleolo de células vegetales. Como ocurre con otras proteínas, el examen de la localización subcelular de los VSRs puede aportar datos significativos acerca de su modo de acción, de modo que nos propusimos investigar posibles motivos/regiones de p37 involucrados en su distribución intracelular. Como en otras CPs de especies de la familia *Tombusviridae*, en la proteína p37 del PLPV se pueden predecir tres dominios estructurales, denominados R, S y P. Un análisis *in silico* de p37 no reveló la presencia de señales de localización nuclear o nucleolar canónicas en la molécula aunque sí que permitió el reconocimiento de una posible señal de exportación nuclear (*nuclear export signal*, NES) en el dominio S.

Mediante ensayos de expresión transitoria de fusiones de los distintos dominios con la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) y observación al microscopio confocal, se ha podido determinar que el dominio R es el responsable de la localización nucleolar de p37. Además, la modificación de la NES potencial mediante mutagénesis dirigida y el análisis de la distribución subcelular de la correspondiente proteína mutada (fusionada a GFP) han puesto de manifiesto que la NES predicha no es funcional *in vivo* ya que su alteración no provoca cambios en el patrón de distribución de p37. Sin embargo, ensayos de supresión han mostrado que la modificación de la putativa NES da lugar a una pérdida de la capacidad de p37 para inhibir el silenciamiento, lo que indica que el dominio S contribuye a la función como VSR de este producto viral. El bioensayo de un PLPV mutante con la putativa NES alterada ha permitido corroborar que la actividad

VSR es indispensable para que el virus pueda multiplicarse de forma efectiva en plantas, subrayando la necesidad del patógeno de contrarrestar los mecanismos de defensa del huésped para asegurar su supervivencia.

Palabras clave

PLPV, supresor viral, localización subcelular, nucleolo, NES.

Abstract

In plants, RNA silencing acts as a potent antiviral defense mechanism. This type of mechanism is triggered by viral-derived double-stranded RNAs produced during the infection, which are recognized by Dicer-like RNase III-related enzymes, whose action produce small RNAs (sRNAs) of 20-24 nt. Then, one strand of sRNA is incorporated into a multiprotein complex known as RISC (*RNA-induced silencing complex*), whose core component is an endonuclease protein from the Argonaute family. Once RISC is activated, the sRNA strand acts as guide to bring the RISC complex into contact with complementary RNAs, thereby causing their degradation. To counteract this host defense mechanism, viruses encode suppressors of RNA silencing (VSR). The VSRs are very diverse in size and sequence, and the molecular bases of their activity are not well known in most cases.

This work has focused on the study of the VSR encoded by *Pelargonium line pattern virus* (PLPV), a member of the family *Tombusviridae* that causes frequent infections in geranium. Previous experiments have allowed the identification of the coat protein (CP or p37) as the VSR of PLPV, and have also shown that p37 localizes in the cytoplasm, nucleus and nucleolus of plant cells. As for other proteins, the study of the subcellular localization of VSRs can provide valuable information about its mode of action, we decided to investigate possible motifs or regions of p37 involved in its subcellular distribution. As in other CPs encoded by species of the *Tombusviridae* family, three structural domains can be predicted in PLPV p37, called R, S and P. An *in silico* analysis of p37 did not reveal the presence of canonical nuclear or nucleolar localization signals in the molecule although it did recognize the presence of a potential nuclear export signal (NES) in the S domain.

Transient expression assays with the different domains fused to the green fluorescent protein (GFP) and subsequent observations with confocal microscope have revealed that the R domain is the responsible of the nucleolar localization of p37. Furthermore, modification of the potential NES, using site-directed mutagenesis, and analysis of the subcellular distribution of the corresponding mutant protein (fused to GFP) have shown that the putative NES is not functional *in vivo* because its modification does not change the subcellular distribution of p37. However, suppression assays have shown that the alteration of the putative NES results in a loss of the ability of p37 to inhibit RNA silencing, supporting that the S domain contributes to the VSR function of p37. The bioassay of a mutant PLPV with modifications in the putative NES has corroborated that the VSR activity is required for effective viral multiplication in plants, stressing the need of the pathogen to counteract the host defense mechanism to ensure its survival.

Key words

PLPV, viral suppressor, subcellular localization, nucleolus, NES

Quiero mostrar mi más sincero agradecimiento:

A Carmen, por permitirme hacer este trabajo, por todo el apoyo y ayuda que me ha brindado durante mi tiempo en el laboratorio.

A mis compañeras de laboratorio, Miryam y Marta, por echarme una mano siempre que lo he necesitado y por hacerme sentirme una más.

A mis amigos, de Sevilla y Valencia, por estar siempre ahí. Por animarme desde el principio y no haber permitido que me rindiese.

A mi familia, por haber confiado en mí y en mis decisiones y por darme la oportunidad de estudiar.

Índice

ÍNDICE GENERAL:

1. Introducción.....	1-10
1.1. Respuesta de las plantas al ambiente: generalidades	1
1.2. El silenciamiento por RNA	1
1.3. Los virus como inductores y diana del silenciamiento por RNA.....	3
1.4. Estrategias de supresión del silenciamiento	4
1.5. El virus del arabesco del <i>Pelargonium</i>	6
1.5.1. Propiedades biológicas	6
1.5.2. Propiedades moleculares	7
1.5.3. p37 como proteína supresora del silenciamiento por RNA	9
1.5.3.1. Localización subcelular de la proteína p37.....	10
2. Objetivos	11
3. Material y métodos.....	12-18
3.1. Construcciones de DNA.....	12
3.2. Ensayos de agroinfiltración.....	14
3.2.1. Ensayos de expresión transitoria de proteínas mediante agroinfiltración y observación de fluorescencia mediante lupa o microscopio confocal	15
3.2.2. Agroinoculación de virus.....	15
3.3. Extracción de RNA total, de viriones y análisis Northern	16
4. Resultados	19-31
4.1. Análisis <i>in silico</i> de la proteína p37 para la identificación de posibles señales relacionadas con la localización subcelular	19
4.2. Examen de la localización subcelular de formas truncadas de la proteína p37 y de una versión mutante de la misma con una putativa NES alterada	22
4.3. Estudio de la función supresora de la versión mutante de p37 con alteraciones en la putativa NES	28
4.4. Evaluación de la infectividad de un PLPV con mutaciones en la putativa NES de la proteína p37.....	30
5. Discusión	32-34
6. Conclusiones.....	35
7. Bibliografía.....	36-40

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Ruta general del silenciamiento génico post-transcripcional.....	2
Figura 2. Modelo del silenciamiento antiviral por RNA y de su supresión por distintos VSRs ..	5
Figura 3. Hoja de <i>P. zonale</i> infectada con PLPV	6
Figura 4. Representación de la organización genómica del PLPV	8
Figura 5. Representación gráfica de la CP (p37) del PLPV y de cada uno de los dominios que la componen	9
Figura 6. Esquema de las construcciones, basadas en el vector binario pMOG800, empleadas en este trabajo.....	18
Figura 7. Predicción informática de la localización subcelular de la proteína p37 del PLPV ...	21
Figura 8. Predicción informática de las posibles señales relacionadas con la localización subcelular de la proteína p37.....	22
Figura 9. (A) Representación esquemática de los dominios estructurales de p37.	
(B) Análisis de las amplificaciones por PCR de los distintos dominios de p37.....	23
Figura 10. Distribución subcelular de la proteína p37 silvestre y de cada dominio, fusionados en su extremo C-terminal a GFP	25
Figura 11. (A) y (B) Evaluación de la distribución subcelular de la proteína p37 silvestre y de su versión mutante, p37mut(NES), fusionadas a GFP en su extremo C-terminal, mediante el uso de dos marcadores de localización subcelular.....	27
Figura 12. Evaluación de la capacidad de inhibir el silenciamiento por RNA de la proteína p37 silvestre y de una versión mutante, p37mut(NES).....	29
Figura 13. Evaluación de la infectividad de PLPV y de una versión mutada del mismo mediante análisis Northern	30
Figura 14. Evaluación de la capacidad de formar viriones de PLPV y de su versión mutante, gPLPVmut(NES).....	31

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Parejas de oligonucleótidos utilizados para la generación de las construcciones.....	14
--	----

ABREVIATURAS:

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
AGO	Argonautas (<i>Argonaute</i>)
bp	Pares de bases
CMV	Virus del mosaico del pepino (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
cDNA	DNA complementario
CP	Proteína de cubierta (<i>coat protein</i>)
C-terminal	Carboxilo terminal
DCL	Dicer-like
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleósidos trifosfato
d.p.if.	Días post-infiltración
dsRNA	RNA de doble cadena (<i>double stranded RNA</i>)
ELV	Virus latente de la baya del saúco (<i>Elderberry latent virus</i>)
Fib	Fibrilarina
g	Gramos
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>green fluorescent protein</i>)
gRNA	RNA genómico (<i>genomic RNA</i>)
GTP	Guanosín trifosfato
h	Horas
HA	Hematoglutinina
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria Bertani
M	Molar
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MP	Proteína de movimiento (<i>movement protein</i>)
mRFP	Proteína fluorescente roja monomérica (<i>monomeric red fluorescent protein</i>)
mRNA	RNA mensajero (<i>messenger RNA</i>)

N-terminal	Amino terminal
N	Núcleo
NCP	Complejo del poro nuclear (<i>nuclear pore complex</i>)
NES	Señal de exportación nuclear (<i>nuclear export signal</i>)
ng	Nanogramos
NLS	Señal de localización nuclear (<i>nuclear localization signal</i>)
nm	Nanometro
NoLS	Señal de localización nucleolar (<i>nucleolar localization signal</i>)
nt	Nucleótido
Nu	Nucleolo
ORF	Pauta abierta de lectura (<i>open reading frame</i>)
PCRPV	Virus de los anillos cloróticos del <i>Pelargonium</i> (<i>Pelargonium chlorotic ring pattern virus</i>)
PD	Plasmodesmos
PeIRSV	Virus de las manchas anulares del <i>Pelargonium</i> (<i>Pelargonium ringspot virus</i>)
PLPV	Virus del arabesco del <i>Pelargonium</i> (<i>Pelargonium line pattern virus</i>)
PoLV	Virus latente del Pothos (<i>Pothos latent virus</i>)
PoPit	Terminador del inhibidor II de la proteinasa de la patata (<i>Potato proteinase inhibitor terminator</i>)
PTGS	Silenciamiento génico post-transcripcional (<i>post-transcriptional gene silencing</i>)
RDR	RNA polimerasas dependientes de RNA (<i>RNA dependent-RNA polymerase</i>)
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RrLDV	Virus de la deformación rugosa de las hojas del rosal (<i>Rosa rugosa leaf distortion virus</i>)
seg	Segundos
sgRNA	RNA subgenómico (<i>subgenomic RNA</i>)
sRNA	Pequeño RNA (<i>small RNA</i>)
ssRNA	RNA de simple cadena (<i>single stranded RNA</i>)
ssRNA+	ssRNA de polaridad positiva
TCV	Virus del arrugamiento del nabo (<i>Turnip crinkle virus</i>)

TEV	Virus del grabado del tabaco (<i>Tobacco etch virus</i>)
TGS	Silenciamiento génico transcripcional (<i>transcriptional gene silencing</i>)
TLV TGP1	El virus de la lespedeza trepadora TGP1 (<i>Trailing lespedez virus TGP1</i>)
U	Unidades
UTR	Región no traducible (<i>unstranlated region</i>)
UV	Ultravioleta
V	Voltios
vsRNA	Pequeño RNA viral (<i>viral small RNA</i>)
VSR	Supresores virales del silenciamiento por RNA (<i>viral suppressors of RNA silencing</i>)
wt	Silvestre (<i>wild-type</i>)

Introducción

1. Introducción

1.1. Respuesta de las plantas al ambiente: generalidades

Las plantas se encuentran continuamente sometidas a situaciones ambientales cambiantes, por lo que han tenido que desarrollar todo un conjunto de estrategias para adaptarse a las nuevas circunstancias y para combatir o tolerar los distintos tipos de estrés con los que se pueden enfrentar (Bohnert *et al.*, 1995). Los factores estresantes pueden ser tanto de origen biótico como abiótico. Entre los factores abióticos se incluyen temperaturas altas o bajas, salinidad excesiva, escasez de agua, cambios en la intensidad de la luz, carencia de nutrientes, etc. Entre los factores bióticos se pueden mencionar viroides, virus, bacterias, hongos e insectos. De forma muy general, los mecanismos de adaptación de las plantas a condiciones ambientales adversas son controlados por redes moleculares implicadas en la percepción del estrés, en la transducción de señales y en la regulación de la expresión de genes efectores. La respuesta consiste, en última instancia, en cambios en el tipo, cantidad o actividad de determinadas proteínas de la planta, generando componentes útiles para las nuevas condiciones que ayudan a restablecer la homeostasis celular y a proteger y reparar biomoléculas y membranas dañadas (Fujita *et al.*, 2006). Además de este tipo de respuestas defensivas generales, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que las plantas poseen un mecanismo muy eficiente para combatir las infecciones virales, una de las clases de estrés biótico más frecuentes en especies vegetales silvestres y cultivadas. Este mecanismo está basado en procesos de silenciamiento por RNA y sus bases moleculares serán descritas a continuación.

1.2. El silenciamiento por RNA

El término silenciamiento por RNA engloba una serie de procesos por los cuales la expresión de genes se inhibe por el efecto de una molécula de RNA. Se trata de un sistema de inactivación génica específico de secuencia, que está conservado en eucariotas y que desempeña un papel esencial en distintos procesos biológicos incluyendo procesos de desarrollo, de respuesta a estrés, mantenimiento de la integridad genómica, control de transposones o modificación de la cromatina (Baulcombe, 2005). En plantas superiores e insectos, y en menor medida en hongos y probablemente en vertebrados, el silenciamiento por RNA también actúa como un mecanismo inducible de defensa antiviral (Ding, 2010; Ding y Voinnet, 2007).

El silenciamiento por RNA se puede dar a nivel transcripcional (*transcriptional gene silencing*, TGS) o post-transcripcional (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS), pero en ambos casos el silenciamiento se debe al reconocimiento específico de secuencias de DNA (TGS) o RNA (PTGS) por pequeñas moléculas de RNA (*small RNAs*, sRNAs).

A nivel molecular, el PTGS se desencadena a partir de RNAs de doble cadena (*double-stranded RNA*, dsRNA) o RNAs de cadena simple (*single-stranded RNAs*, ssRNAs) muy estructurados. Estos RNAs son procesados por la acción de una ribonucleasa de la familia de las RNasas tipo III, conocida como Dicer (*Dicer-like*, DCL), originando sRNAs de 21-24 nucleótidos (nt) (Hamilton y Baulcombe, 1999; Zamore *et al.*, 2000). Una de las dos hebras de estos sRNAs bicatenarios actúa como “hebra guía” y es incorporada a un complejo de silenciamiento inducido por RNA (*RNA-induced silencing complex*, RISC), cuyo componente principal es una endonucleasa de la familia de Argonautas (AGO) (Hammond *et al.*, 2000). Una vez activado, RISC es dirigido por el sRNA asociado hasta un RNA diana, de secuencia complementaria (Baulcombe, 2005), al que este complejo se une induciendo su degradación o, en algunos casos, bloqueando su traducción (Voinnet, 2008) (Fig. 1).

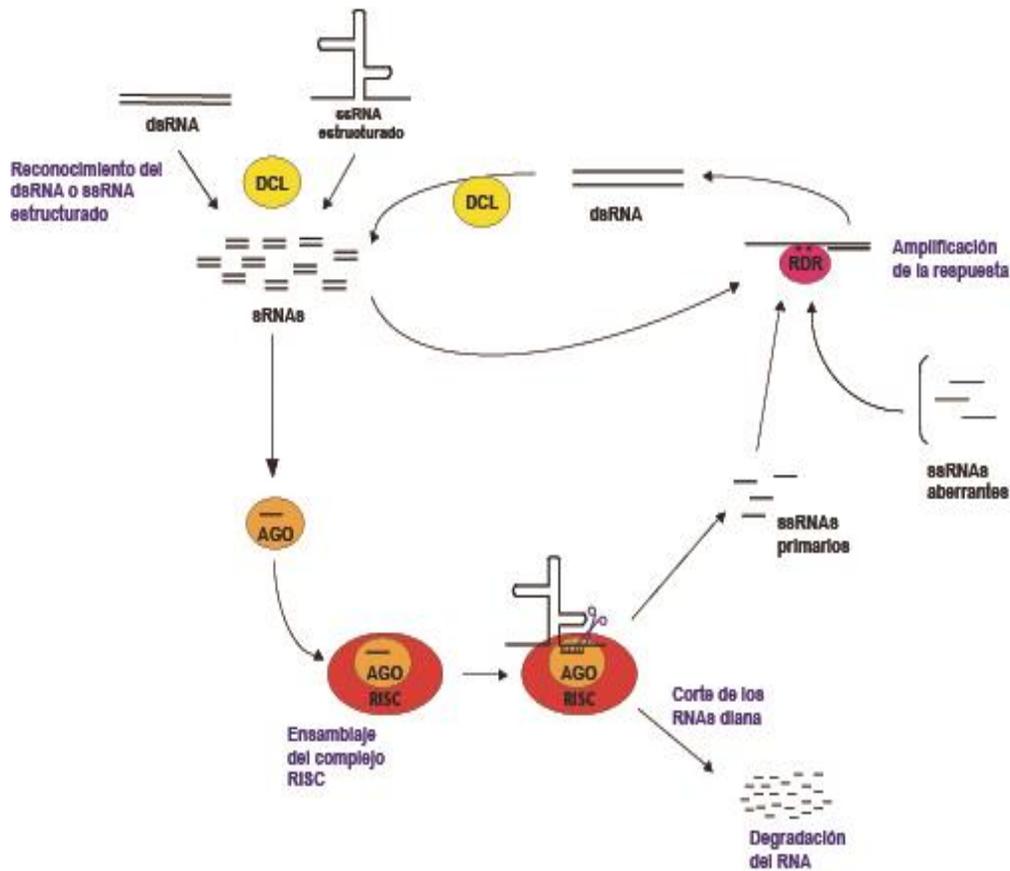


Figura 1. Ruta general del silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS).

Los dsRNAs o los ssRNAs muy estructurados, responsables del proceso de silenciamiento génico pueden originarse por transcripción en el núcleo, durante las infecciones virales, o bien por la acción de RNA polimerasas dependientes de RNA celulares (*RNA dependent-RNA polymerase*, RDR) que los sintetizan a partir de ssRNAs. Estas enzimas, además de participar en la generación de las moléculas inductoras, están involucradas en la amplificación de la respuesta de silenciamiento. Esta amplificación se consigue mediante la síntesis de nuevos dsRNAs por la acción de una RDR que utiliza como molde los ssRNAs primarios, ssRNAs generados tras el corte por parte del complejo efector RISC, u otros ssRNAs aberrantes. Se generarán así nuevos dsRNAs que serán procesados por las enzimas DCL produciendo sRNAs secundarios que reforzarán el proceso de silenciamiento (Voinnet, 2008) (Fig. 1).

1.3. Los virus como inductores y diana del silenciamiento por RNA

Los virus de plantas, como el resto de virus, son parásitos intracelulares capaces de multiplicarse utilizando la maquinaria traduccional y, a veces también la transcripcional, del organismo que infectan. La respuesta del huésped frente a la multiplicación de estos patógenos consiste en la activación de mecanismos para combatir la infección. Uno de los mecanismos mejor estudiados en los últimos años es el silenciamiento por RNA (Burguán y Halveda, 2011). Todos los tipos de virus generan en algún momento de su ciclo replicativo estructuras de dsRNA que pueden actuar como desencadenantes del PTGS, de modo que los virus se convierten, a la vez, en inductores y dianas de este proceso. El resultado va a ser la degradación de su genoma, siendo una de las marcas más claras de la eficiente activación del PTGS por parte de virus la gran acumulación de sRNAs virales (*viral sRNAs*, vsRNAs) que se observa habitualmente en tejido infectado (Ding y Voinnet, 2007).

Los dsRNAs de origen viral que disparan el PTGS pueden tener distintos orígenes. En el caso de los virus de RNA, su replicación y transcripción implica la formación de intermediarios de dsRNA que pueden desencadenar el proceso de silenciamiento (Ahlquist, 2006). En virus de DNA, estos dsRNAs pueden provenir de la transcripción bidireccional de su genoma, o alternativamente, corresponder a regiones con gran estructura secundaria de los transcritos virales. Para los virus de RNA, distintos datos indican que regiones altamente estructuradas del genoma actúan como dianas primarias del silenciamiento en muchos casos (Donaire *et al.*, 2009; Molnar *et al.*, 2005). Las RDRs celulares también podrían contribuir a disparar el silenciamiento mediante la generación de dsRNAs derivados de virus (Curaba y Chen, 2008). En cuanto a las enzimas de las rutas de silenciamiento implicadas en respuesta antiviral, estudios con la especie modelo *Arabidopsis thaliana* han puesto de manifiesto que: a) de las cuatro DCLs presentes en esta especie vegetal, DCL4 y, en menor medida, DCL2 seguida

de DCL3 participan en esta respuesta, b) AGO1 es, entre las diez proteínas codificadas por *A. thaliana*, la principal molécula efectora frente a virus y, c) RDR6 es, entre las seis RDRs de *A. thaliana*, la que participa más significativamente en defensa antiviral (Blevins *et al.*, 2006; Deleris *et al.*, 2006; Llave, 2010; Vaucheret, 2008; Voinnet, 2008).

1.4. Estrategias de supresión del silenciamiento

Para contrarrestar la respuesta defensiva de las plantas basada en silenciamiento por RNA, los virus han desarrollado proteínas capaces de inhibir este mecanismo que son conocidas como proteínas supresoras del silenciamiento (*viral suppressors of RNA silencing*, VSRs). Estas proteínas son normalmente esenciales para la acumulación del genoma viral en las células del huésped y para que el virus correspondiente pueda establecer una infección sistémica eficaz (Ding y Voinnet, 2007). El descubrimiento de los VSRs proporcionó una evidencia clara de la naturaleza antiviral del silenciamiento por RNA y reveló la estrategia de contradefensa del patógeno frente al mecanismo de silenciamiento del huésped (Voinnet *et al.*, 1999). Los datos disponibles por ahora indican que todos los virus de plantas codifican al menos un supresor, llegando en algunos casos a codificar hasta dos o más supresores (Burguán y Havelda, 2011).

Las proteínas supresoras son muy diversas y no presentan ningún tipo de similitud de secuencia o de estructura obvias ni siquiera dentro del mismo grupo viral, de modo que parece que han evolucionado de manera completamente independiente (Ding y Voinnet, 2007). A pesar de los años de investigación desde el descubrimiento del primer VSR a finales de los años 90 (Kasschau y Carrington, 1998), los mecanismos moleculares que subyacen a la acción de estos supresores no están claros en muchos casos. Estas dificultades vienen dadas, en gran parte, por la versatilidad de los VSRs, ya que suelen ser proteínas multifuncionales que, además de suprimir el silenciamiento, también desempeñan otras funciones esenciales durante el ciclo infeccioso del virus pudiendo actuar como proteínas de cubierta (*coat proteins*, CPs), replicasas, proteínas de movimiento (*movement proteins*, MPs), componentes auxiliares para la transmisión de virus, proteasas o reguladores de la transcripción (Burguán y Halveda, 2011).

La información derivada del estudio de distintos VSRs sugiere que éstos son capaces de afectar a diferentes etapas del proceso del silenciamiento, bien interfiriendo con moléculas de RNA involucradas en dicho proceso o bien interactuando con los componentes proteicos más relevantes del mismo. Una de las estrategias más utilizadas por los VSRs consiste en la unión a sRNAs (Lakatos *et al.*, 2006), lo que impide el ensamblaje del complejo RISC. Entre los VSRs que adoptan esta estrategia de supresión, se encuentran las proteínas codificadas por especies virales pertenecientes a géneros muy diversos, como la proteína p19 codificada por miembros del género *Tombusvirus* (familia *Tombusviridae*), probablemente el VSR mejor caracterizado

hasta el momento (Ye *et al.*, 2003). Otros supresores unen dsRNAs con independencia de su tamaño de modo que, además de ser capaces de secuestrar sRNAs, también son capaces de unirse a dsRNAs largos, compitiendo con las DCLs por su sustrato e impidiendo la formación de vsRNAs (Mériai *et al.*, 2005; 2006) (Fig. 2).

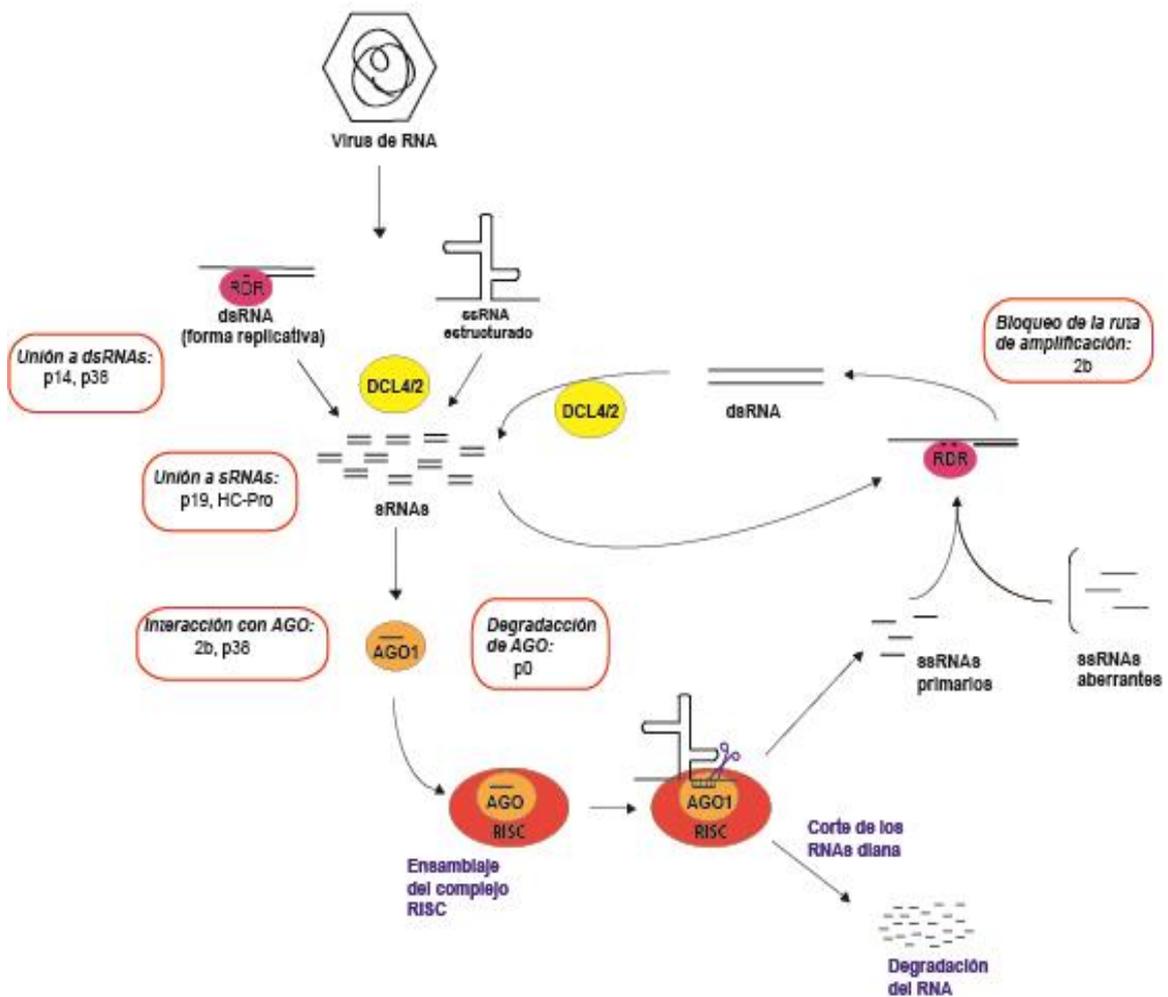


Figura 2. Modelo del silenciamiento antiviral por RNA y de su supresión por distintos VSRs. Los VSRs que aparecen son: **p14** del virus latente del Potho (*Pothos latent virus*, PoLV; género *Aureusvirus*, familia *Tombusviridae*); **p38** del virus del marchitamiento del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV; género *Carmovirus*, familia *Tombusviridae*); **p19** de los miembros del género *Tombusvirus* (familia *Tombusviridae*); **Hc-Pro** del virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV; género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*); **2b** del virus de mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV; género *Cucumovirus*, familia *Bromoviridae*); **p0** de los miembros del género *Polerovirus* (familia *Luteoviridae*).

Como se ha comentado anteriormente, los VSRs también pueden actuar sobre los componentes proteicos de la ruta de silenciamiento, destacando entre ellos las proteínas AGO. Distintos trabajos han puesto de manifiesto la interacción entre diversos VSRs y proteínas AGO lo que, en algunos casos, conduce a la degradación de estas últimas y, en otros, interfiere con el ensamblaje o la activación de RISC (Azevedo *et al.*, 2010; Baumberger *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006). Las enzimas DCL, las RDRs o proteínas asociadas necesarias para su función también se han descrito como dianas de algunos VSRs (Deleris *et al.*, 2006; Fukunaga y Doudna, 2009; Glick *et al.*, 2008) (Fig. 2).

En cualquier caso, aunque cada vez existen más datos que indican que un supresor puede hacer uso de diferentes estrategias y afectar a diferentes etapas de la ruta de silenciamiento (Burgyán y Halveda, 2011), las dianas primarias o más importante para la actividad de un VSR determinado no están, a menudo, bien determinadas.

1.5. El virus del arabesco del *Pelargonium*

1.5.1. Propiedades biológicas

La producción de geranios (*Pelargonium* ssp.), unas de las plantas ornamentales más populares para la decoración y con una posición relevante dentro de la industria floral nacional e internacional, se puede ver considerablemente afectada por la infección de diferentes patógenos entre los que destacan los de tipo viral. El virus del arabesco del *Pelargonium* (*Pelargonium line pattern virus*, PLPV; familia *Tombusviridae*) es el responsable de más del 50% de las infecciones encontradas en geranios en nuestro país, y probablemente, en otros países aunque los datos a este respecto son aún escasos (Alonso y Borja, 2005).

El PLPV fue descrito por primera vez en Gran Bretaña por Stone y Hollings (1971, 1976). Las infecciones del PLPV en *P. peltatum*, *P. glandiflorum* y *P. zonale*, sus huéspedes naturales, son generalmente asintomáticas (Alonso y Borja, 2005; Bouwen y Maat, 1992) aunque, dependiendo del aislado viral y de las condiciones ambientales, también pueden conducir a la aparición de manchas cloróticas y patrones de líneas en las hojas (Fig. 3), lo que puede ir acompañado de una disminución en el vigor de la planta y una pérdida de capacidad de enraizamiento (Nameth y Adkins, 1993).



Figura 3. Hoja de *P. zonale* infectada con el PLPV, en la cual se puede apreciar algunos síntomas (Alonso y Borja, 2005).

Aunque de forma natural el PLPV se ha encontrado hasta el momento sólo en especies del género *Pelargonium*, su gama de huéspedes experimentales incluye 37 especies distribuidas en 9 familias de plantas, incluyendo *Solanum lycopersicum*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *S. tuberosum* o *Vicia faba*, entre otros. La especie utilizada como huésped para el diagnóstico de este virus suele ser *Chenopodium quinoa* y como huéspedes de propagación se suelen emplear *Nicotiana benthamiana* y *N. clevelandii*. El PLPV se transmite mediante inoculación mecánica, por injerto o por contacto entre plantas, y hasta la fecha no hay evidencias de transmisión por ningún tipo de vector biológico (Brunt *et al.*, 1996).

1.5.2. Propiedades moleculares

El PLPV presenta viriones isométricos de 30 nm de diámetro y un pequeño genoma monopartido de RNA de simple cadena y polaridad positiva (ssRNA+) de aproximadamente unas 4 kb (Brunt *et al.*, 1996). Estas características junto con la determinación de su secuencia completa y de su organización genómica han permitido incorporarlo a la familia *Tombusviridae* (Castaño y Hernández, 2005; Castaño *et al.*, 2009). El RNA genómico (gRNA) del PLPV contiene 3883 nt y cinco pautas abiertas de lectura (*open reading frames*, ORFs), que se encuentran flanqueadas por una región no traducible (*untranslated region*, UTR) inusualmente corta en 5', compuesta por 6 nt, y por una 3' UTR de 246 nt (Castaño y Hernández, 2005; 2007). Las dos ORFs localizadas más cerca del extremo 5', ORFs 1 y 2, codifican dos proteínas implicadas en replicación, p27 y p87, esta última correspondiente a la RDR viral que es traducida por un mecanismo de lectura a través del codón de terminación ámbar del gen que codifica la proteína p27. En la región central se encuentran las ORFs 3 y 4, que codifican dos pequeñas MPs, p7 y p9.7, respectivamente. La ORF que se encuentra cerca del extremo 3' del genoma codifica una CP de 37 kDa (p37).

Las ORFs 1 y 2 son traducidas a partir del gRNA mientras que las ORFs 3, 4 y 5 lo hacen a partir de un RNA subgenómico (sgRNA) de 1.6 kb que es 3'-coterminales con el gRNA y que se genera en el curso de la infección (Castaño y Hernández, 2005; Castaño *et al.*, 2009) (Fig. 4).

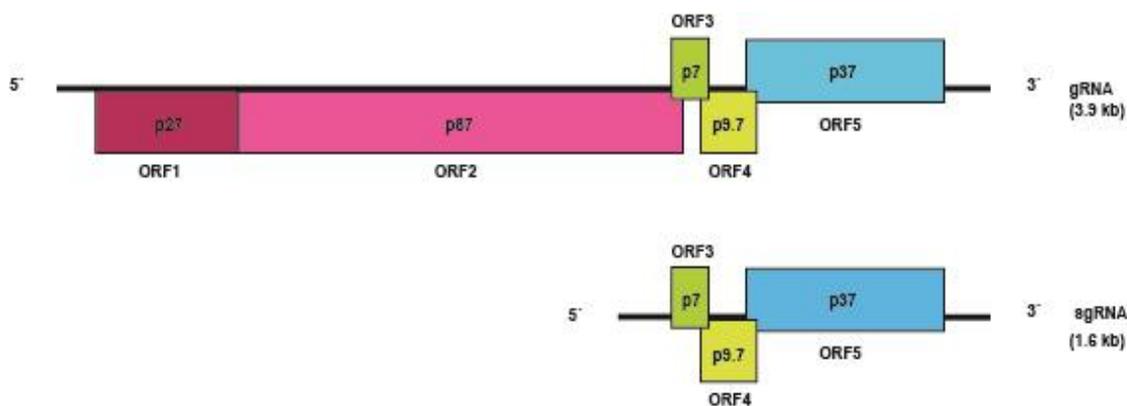


Figura 4. Representación de la organización genómica del PLPV. Las ORFs 1 y 2 codifican las proteínas implicadas en la replicación viral (p27 y p87) y se expresan a partir del gRNA. Las demás ORFs, 3, 4 y 5, se expresan a partir del sgRNA. Las ORFs 3 y 4 codifican proteínas responsables del movimiento (p7 y p9.7) y la ORF5 codifica la CP (p37).

A pesar de que la organización genómica del PLPV y las proteínas que codifica se asemejan notablemente a las de los miembros del género *Carmovirus*, el PLPV presenta particularidades que lo distinguen de estos últimos como son: a) la producción de un solo sgRNA para la expresión de sus ORFs internas en contraste con carmovirus que generan dos sgRNAs con la misma finalidad, b) la presencia de un condón de inicio no canónico (GUG) en el gen que codifica la MP2, a diferencia del codón AUG en el gen correspondiente de carmovirus y, c) la ausencia de codones AUG, en cualquier pauta de lectura, entre el codón de inicio del gen de la MP1 y del gen de la CP, mientras que los carmovirus presentan de 1 a 8 AUGs en la misma región.

Estas características son compartidas por otros cinco pequeños virus isométricos escasamente caracterizados: el virus de las manchas anulares del *Pelargonium* (*Pelargonium ringspot virus*, PelRSV), el virus de los anillos cloróticos del *Pelargonium* (*Pelargonium chlorotic ring pattern virus*, PCRPV), el virus latente de la baya del saúco (*Elderberry latent virus*, ELV), el virus de la deformación rugosa de las hojas del rosal (*Rosa rugosa leaf distortion virus*, RrLDV) y el virus de la lespedeza trepadora TGP1 (*Trailing lespedez virus* TGP1, TLV TGP1), por lo que se ha propuesto su inclusión en un nuevo género dentro de la familia *Tombusviridae* denominado provisionalmente *Pelarspovirus*, una propuesta apoyada por análisis filogenéticos (Castaño y Hernández, 2005; Castaño *et al.*, 2009; Kinard y Jordan, 2002; Scheets *et al.*, 2011).

1.5.3. p37 como proteína supresora del silenciamiento por RNA

Los datos disponibles acerca de la función de supresión dentro de la familia *Tombusviridae* indican que distintos géneros emplean distintas proteínas como VSRs. En el caso de miembros del género *Carmovirus* es la CP la que desempeña esa función (Genovés *et al.*, 2006; Martínez-Turiño y Hernández, 2009; Meng *et al.*, 2006). Sin embargo, las especies de los géneros *Tombusvirus* o *Aureusvirus* codifican pequeños polipéptidos no estructurales (p19/p20, p14) que presentan la actividad supresora (Hao *et al.*, 2011; Qu y Morris, 2002). En el caso de dianthovirus, se ha propuesto que el VSR está formado por distintos componentes incluyendo las replicasas y el RNA viral y que, además, la MP actuaría como VSR secundario (Takeda *et al.*, 2005; Powers *et al.*, 2008).

En lo que respecta al PLPV, estudios previos pusieron de manifiesto que su CP, la proteína p37, actúa como VSR y que, al menos en ensayos de expresión transitoria, muestra una capacidad supresora comparable con la de la proteína p19 de tombusvirus, un VSR potente y bien caracterizado (Pérez-Cañamás, 2012). En la mayoría de CPs de miembros de la familia *Tombusviridae*, se pueden distinguir tres dominios estructurales: a) el dominio R, en el extremo N-terminal, que contiene numerosos residuos cargados positivamente y se encuentra proyectado hacia el interior de la cápside y es el dominio responsable de la unión al RNA viral, b) el dominio S, que está conectado con el dominio R por una pequeña región flexible o brazo (*arm*, A) y adopta una estructura en forma de barril compuesta por láminas β constituyendo así el armazón de la cápside y, c) el dominio P, que se encuentra en el extremo C-terminal y es un dominio protuberante que se proyecta fuera de la cápside (Rochon *et al.*, 2012). Análisis comparativos de secuencia permiten predecir los mismos dominios estructurales en la CP de PLPV (Castaño y Hernández, 2005) (Fig. 5).

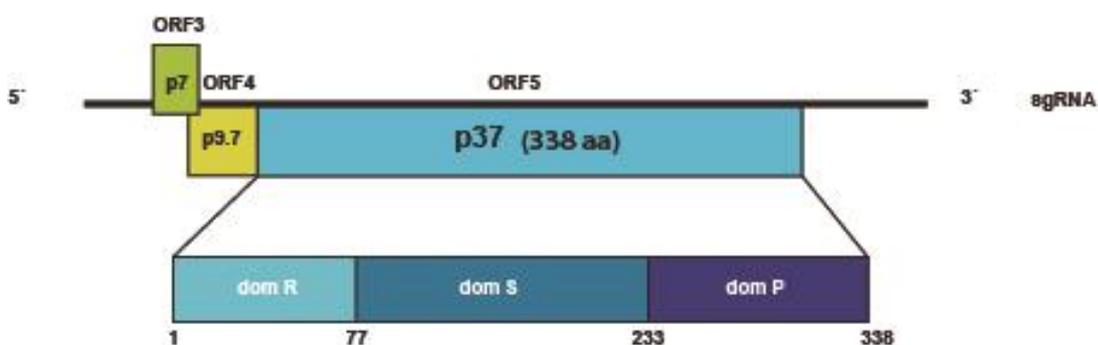


Figura 5. Representación gráfica de la CP (p37) del PLPV y cada uno de los dominios estructurales que la componen. Los números indican las posiciones de los aminoácidos del dominio correspondiente.

1.5.3.1. Localización subcelular de la proteína p37.

El estudio de la localización subcelular que presentan los VSRs puede aportar pistas relevantes acerca de su modo de acción y de las bases moleculares de su actividad. Un trabajo reciente en el que se han estudiado distintas características de la proteína p37, ha mostrado que este producto viral se localiza, a nivel subcelular, en el citoplasma y en el núcleo de células vegetales y que, dentro de éste último orgánulo, muestra una acumulación preferencial en el nucleolo (Pérez-Cañamás, 2012). Puesto que las dos funciones conocidas de esta proteína, supresión del silenciamiento y encapsidación, deben ser ejercidas fundamentalmente en el citoplasma celular, el significado biológico de su distribución nuclear/nucleolar está por determinar.

Objetivos

2. Objetivos

Como se ha indicado en la Introducción, en un estudio previo se vio que la proteína p37, fusionada a la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) para permitir su detección, se localizaba en el citoplasma, núcleo y nucleolo de células vegetales en ensayos de expresión transitoria. Este tipo de localización no ha sido descrita previamente para ningún ortólogo de la proteína y, en principio, su localización en núcleo/nucleolo no era esperable dado que las dos funciones conocidas de la proteína, encapsidación y supresión del silenciamiento inducido por el virus, deben ser desarrolladas básicamente en el citoplasma celular.

En el presente trabajo nos hemos propuesto obtener información adicional acerca de determinantes de localización subcelular de la proteína p37 del PLPV. Para ello se han planteado los siguientes objetivos parciales:

1. Análisis *in silico* de la proteína p37 para la identificación de posibles señales relacionadas con la localización subcelular.
2. Examen de la distribución subcelular de formas truncadas de la proteína p37 o con mutaciones en motivos potencialmente relevantes en localización.
3. Estudio de la importancia de motivos potencialmente implicados en la localización subcelular de p37 en la función supresora de la proteína y en la infectividad del virus.

Material y Métodos

3. Material y métodos

3.1. Construcciones de DNA

Los cDNAs que codifican cada uno de los dominios estructurales que conforman la proteína p37 (R, S y P) fueron amplificados a partir de una construcción basada en el plásmido pBluescript KS+ (Stratagene), que contenía el gen p37 del PLPV fusionado al gen de la GFP bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y del terminador del gen del inhibidor II de la proteinasa de la patata (*Potato proteinase inhibitor terminator*, PoPit), pBK35S-p37GFP-PoPit. Las amplificaciones se llevaron a cabo mediante PCR utilizando el kit “Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” (Thermo Scientific) y, como cebadores, los oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para cada dominio que contenían dianas para las enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI* en los extremos 5’ (Tabla 1). En un volumen final de 25 μ l se mezclaron el DNA plasmídico molde (pBK35S-p37GFP-PoPit) (10 ng), con 1.5 μ l de cada cebador (100 ng/ μ l), 0.5 μ l de dNTPs (10 mM cada uno), 5 μ l de tampón de PCR (“5X Phusion HF Buffer”) y 0.4 μ l de “Phusion DNA Polymerase” (2 U/ μ l). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador programado con las condiciones adecuadas para cada pareja de cebadores.

Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio (0.5 μ g/ μ l) en tampón TAE al 1X (0.04 M Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 7,2). Las alícuotas de las muestras se mezclaron con tampón de carga 6X (0.21 % azul de bromofenol, 0.21 % xilen cianol, 60 % glicerol estéril, 10 mM Tris-HCl, 60 mM EDTA, pH 8,0) y el voltaje empleado fue de 100 V. La visualización de los geles se llevó a cabo con la ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta (UV) y la estimación de la concentración se realizó por comparación con muestras estándar y/o espectofotométricamente. Las distintas bandas de agarosa con los ácidos nucleicos de interés fueron eluidas mediante el kit “GeneJET Gel Extraction Kit” (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del proveedor. Tras la recuperación de los productos, éstos se digirieron con las enzimas correspondientes, *NcoI* y *BamHI*, y se fusionaron en pauta con el gen GFP. Estas fusiones se clonaron bajo el control del promotor 35S del CaMV y del terminador PoPit en el plásmido pBluescript KS+, dando lugar a las construcciones pBK35S-domRGFP-PoPit, pBK35S-domSGFP-PoPit y pBK35S-domPGFP-PoPit.

Los cassettes de expresión 35S-dom(R/S/P)GFP-PoPit fueron escindidos de los plásmidos correspondientes mediante digestión doble con *SacI* y *KpnI* y clonados en el vector binario pMOG800 (Knoester *et al.*, 1998). A las construcciones resultantes se les denominó 35S-domRGFP, 35S-domSGFP y 35S-domPGFP (Fig. 6).

Los plásmidos pBK35S-p37:HA-PoPit (donde el gen p37 se encuentra fusionado a una secuencia que codifica una cola de hemaglutinina), pBK35S-gPLPV-PoPit (que contiene el cDNA completo de PLPV) y pBK35S-p37GFP-PoPit fueron usados como moldes para introducir mutaciones usando el kit “QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis” (Stratagene). Las mutaciones consistieron en el reemplazamiento de cinco aminoácidos (desde el residuo 221 hasta el residuo 225 de la proteína p37 correspondiente al motivo LFFEL) de una señal potencial de exportación nuclear (*nuclear export signal*, NES) presente en el dominio S por alaninas. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 1) que introdujeran los cambios pertinentes en las posiciones 3280-3300 del genoma de PLPV. Se llevó a cabo una reacción de PCR en un volumen final de 50 μ l, donde se mezclaron el DNA plasmídico molde (10 ng), con 1.25 μ l de cada oligonucleótido (100 ng/ μ l), 1 μ l de dNTPs (10 mM cada uno), 5 μ l de tampón de PCR y 1 μ l de “PFuUltra High Fidelity DNA polymerase” (2.5 U/ μ l). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador en el que se habían programado las condiciones adecuadas. Tras la PCR, los productos de la reacción fueron digeridos con la enzima *DpnI* con el fin de degradar el DNA parental y una alícuota de la digestión se empleó para transformar *Escherichia coli*.

Una vez recuperados los productos mutados, las unidades de transcripción 35S-p37mut(NES):HA-PoPit, 35S-gPLPVmut(NES)-PoPit y 35S-p37mut(NES)GFP-PoPit fueron escindidas mediante la digestión doble *SacI/KpnI* y clonadas en el vector binario pMOG800. Se obtuvieron así las construcciones 35S-p37mut(NES):HA, 35S-gPLPVmut(NES) y 35S-p37mut(NES)GFP (Fig. 6).

Al igual que se ha indicado anteriormente para los productos de PCR, los distintos plásmidos recombinantes obtenidos a lo largo del trabajo se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE 1X. Para los procedimientos de clonaje se emplearon células competentes de la cepa de *E. coli* DH5- α que fueron transformadas por choque térmico (Sambrook y Russel, 2001). Tras el proceso de transformación, las bacterias se incubaron en placa Petri con medio Luria Bertani (LB), agar con ampicilina o kanamicina (1 % bactotripton, 0.5 % extracto de levadura, 1 % NaCl, 1.5 % agar y 0.005 % antibiótico) para permitir la selección de colonias portadoras de plásmidos. A partir de estas colonias, se prepararon cultivos líquidos con LB y el antibiótico adecuado y la extracción del DNA plasmídico se realizó mediante el kit “GeneJET Plasmid Miniprep Kit” (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

En todos los casos, se comprobó la corrección de la construcción generada mediante secuenciación con oligonucleótidos apropiados y utilizando un secuenciador modelo ABI PRISM 377 (Perkin-Elmer) (Servicio de Secuenciación del IBMCP).

Tabla 1. Parejas de oligonucleótidos utilizados para la generación de las construcciones

Oligo	Posición ^a	Secuencia ^b	Construcción
CH362	2621-2647 (S)	5'-GTGGATCCATGGCGGCCAAGGATAATC-3'	(<i>Nco</i> I) 35S-domRGFP
CH530	2832-2850 (AS)	5'-GTCCATGGCTTTGGCATTACCCGGCTCTC-3'	(<i>Nco</i> I)
CH531	2851-2872(S)	5'-CCGGATCCATGGGCACCACCATAACCAAG -3'	(<i>Nco</i> I) 35S-domSGFP
CH532	3300-3320 (AS)	5'-GTCCATGGCGGTTGGTTCAGAAAACACG -3'	(<i>Nco</i> I)
CH533	3320-3336 (S)	5'-CCGGATCCATGTTCTGCACCCACCACTC-3'	(<i>Bam</i> HI) 35S-domPGFP
CH385	3615-3634 (AS)	5'-CCGGATCCCAGCTTGTGATGTAAGCTC-3'	(<i>Bam</i> HI)
CH526	3267-3309(S)	5'-CAGGCTCGGAGAAgcTgcCgcCG cGgcAACCATCGTGTTTTC-3'	35S-p37mut(NES)GFP 35S-p37mut(NES):HA
CH527	3267-3309(AS)	5'-GAAAACACGATGGTTgcCgcCG gcGgcAgcTTCTCCGAGCCTG-3'	35S-gPLPVmut(NES)

^a Posiciones del genoma de PLPV que abarcan los oligonucleótidos; (S) y (AS): sentido y antisentido.

^b Los sitios de restricción introducidos están subrayados. En minúsculas se encuentran los nucleótidos sustituidos en la secuencia silvestre del PLPV.

3.2. Ensayos de agroinfiltración

Células de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 se transformaron por choque térmico con las distintas construcciones obtenidas basadas en el vector binario pMOG800. Los cultivos de *A. tumefaciens* crecieron en medio LB con los antibióticos kanamicina (50 µg/ml), rifampicina (50 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml) a 28 °C durante 1 día. Para la infiltración, los diferentes cultivos se diluyeron en tampón de agroinfiltración (10 mM MES, 10 mM MgCl₂, pH 5,6) hasta una OD a 660 nm (OD₆₆₀) de 0.5. Tras incubar 3 horas en presencia de acetosiringona (150 µM), se infiltraron hojas de *N. benthamiana* por su cara abaxial usando una jeringa de 20 ml. Para facilitar la redacción, se denominará a cada cultivo bacteriano con el nombre de la construcción con el que ha sido transformado.

3.2.1. Ensayos de expresión transitoria de proteínas mediante agroinfiltración y observación de fluorescencia mediante lupa o microscopio confocal

Para los ensayos de localización subcelular se agroinfiltraron las construcciones 35S-domRGFP, 35S-domSGFP, 35S-domPGFP y 35S-p37mut(NES)GFP, y como controles se agroinfiltraron también las construcciones 35S-p37GFP y 35S-GFP (que permite la expresión de la GFP sin fusionar a ninguna otra proteína). En combinación a estas construcciones, se co-infiltró la construcción 35S-p19 (que permite la expresión de la proteína supresora de tombusvirus) con el objetivo de que el posible silenciamiento por RNA no interfiriese en los resultados y se pudiera observar claramente la distribución de la fluorescencia en todos los casos. Asimismo, se incorporó también en estos ensayos la construcción 35S-Fib:mRFP, que permite la expresión de fibrilarina, utilizada como marcador nucleolar, fusionada con la proteína fluorescente roja monomérica (*monomeric red fluorescent protein*, mRFP) (Kim *et al.*, 2007). En algunos experimentos, las hojas se infiltraron con azul de anilina (1 % en tampón fosfato sódico, pH 9,0) 10 min antes de su observación al microscopio confocal para poder visualizar los plasmodesmos. Para monitorizar y tomar imágenes de la localización subcelular de los dominios de p37 así como de la versión mutada p37mut(NES) se recogieron hojas a los 3 días post-infiltración (d.p.if.). La fluorescencia derivada de la GFP se visualizó con un microscopio confocal Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss Group, Jena, Alemania) con un láser de excitación de argón de 488 nm y un espectro de emisión de 500-650 nm. Para registrar la fluorescencia derivada de mRFP se empleó un láser de excitación de neón a 543 nm y un espectro de emisión de 600-650 nm. Para la detección de azul de anilina se hizo uso de un láser de excitación de argón de 405 nm y se recogió la emisión en una ventana de 460-535 nm.

Para los ensayos de supresión, en los que se evaluó la capacidad de inhibir el silenciamiento de la forma mutada p37mut(NES), se agroinfiltró la construcción 35S-GFP sola o en combinación con las construcciones 35S-p37, 35S-p37:HA (usadas ambas como control) o 35S-p37mut(NES):HA. Para monitorizar y tomar imágenes de los niveles de fluorescencia derivados de la GFP, se recogieron hojas a los 2-5 d.p.if. La fluorescencia se visualizó usando una lupa de fluorescencia MacroFluo (MZZ16F Leica) y las fotos fueron tomadas con una cámara digital (DFC300 FX Leica). Las hojas se guardaron a -20 °C para la posterior extracción de RNA y su análisis Northern.

3.2.2. Agroinoculación de virus

Para los ensayos de infectividad, se agroinocularon las construcciones 35S-gPLPV (control positivo) y 35S-gPLPVmut(NES) y se recogieron hojas locales a los 7 d.p.if. La

acumulación del virus se determinó mediante análisis Northern, usando RNA extraído de las muestras tomadas.

Para los ensayos de encapsidación, se agroinocularon también las construcciones 35S-gPLPV (control positivo) y 35S-gPLPVmut(NES), recogiendo hojas a los 3 d.p.if. A partir del material recogido se analizó tanto la acumulación del virus como su capacidad de formar viriones mediante extracción de RNA y de partículas víricas, respectivamente, y análisis Northern.

3.3. Extracción de RNA total, de viriones y análisis Northern

Para la extracción de RNA total se siguió el protocolo descrito por Verwoerd *et al.* (1989). Unos 0.2 g de hojas se homogenizaron en morteros enfriados con nitrógeno líquido hasta convertirlo en polvo fino y se transfirió a un eppendorf previamente enfriado. Se añadió 400 µl de tampón de extracción TEXT (0.35 M glicina, 0.048 M NaOH, 0.34 M EDTA y 4 % SDS) y 400 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). Tras agitar unos minutos con vórtex, se centrifugó 10 min a 13.000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se volvió a añadir 400 µl de fenol:cloroformo:isoamílico. Se agitó de nuevo con vórtex y se repitió la centrifugación. Las fases acuosas se pasaron a un nuevo eppendorf y se añadió 1/3 V de LiCl 8 M. Se dejó incubar a 4 °C durante toda la noche y, al día siguiente, se centrifugó durante 20 min a 13.000 rpm. El sobrenadante se descartó y se resuspendió el precipitado en 30 µl de agua bidestilada estéril.

La purificación de viriones se realizó esencialmente siguiendo el protocolo general descrito por Díez *et al.* (1998). Tejido de *N. benthamiana* infectado por el PLPV (20 g) se homogenizó en un mortero con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino. Se descongeló el homogenizado y se añadieron 2 V de acetato sódico 0.2 M (pH 5,0). Tras agitar 5 min con vórtex, se filtró a través de dos capas de Miracloth (Calbiochem) para eliminar los restos grandes de tejido y se centrifugó a 7.700 g durante 20 min. El sobrenadante se vertió sobre un lecho de sacarosa al 20 % en Tris-HCl 10 mM (pH 7,3) y se centrifugó a 146.000 g durante 2 h. El precipitado, ligeramente coloreado y opalescente, se secó y se resuspendió en 0.04 V de Tris-HCl 10 mM (pH 7,3).

La concentración de las muestras de RNA obtenidas y de los viriones purificados se estimó por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE 1X teñidos con bromuro de etidio y/o espectrofotométricamente. Las alícuotas de las muestras se mezclaron con tampón de carga 6X y el voltaje usado fue de 70 V.

Para el análisis Northern, 3 µg de los RNAs extraídos se desnaturalizaron por tratamiento con glioxal-dimetil sulfóxido en presencia de tampón fosfato sódico 15 mM (pH

6,5). Tras incubar una hora a 50 °C, se fraccionaron en geles de agarosa al 1 % con tampón fosfato sódico 15 mM a 70 V y, a continuación, se transfirieron a una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham) por capilaridad en presencia de tampón fosfato sódico 25 mM durante toda la noche. En el caso de los viriones, no se realizó el proceso de desnaturalización sino que directamente se fraccionaron en geles de agarosa al 1 %. Tras fijar los ácidos nucleicos a la membrana mediante un entrecruzamiento por irradiación con luz UV, las membranas incubaron a 70 °C durante al menos 2 h con solución de prehibridación (5X SSPE (3 M NaCl, 200 mM NaH₂PO₄, 30 mM EDTA, pH 7,4), 1 % SDS, 0.1 % ficoll, 0.1 % PVP, 50 % formamida y 20 µg/ml de DNA de esperma de salmón) y, a continuación, se añadió la sonda de RNA correspondiente y se continuó con la incubación a 70 °C durante al menos 16 h. Las sondas de RNA utilizadas fueron generadas por transcripción, en presencia de ATP- $\alpha^{32}\text{P}$, empleando como moldes plásmidos que contenían el gen de la proteína p37 del PLPV (posiciones 2621-3637 del genoma viral) o el gen de la GFP, ambos bajo el control del promotor de la RNA polimerasa del fago T7. Después de la hibridación se realizaron tres lavados a temperatura ambiente durante 15 min con 2X SSC (750 mM NaCl, 75 mM citrato sódico, pH 7,0) + 0.1 % SDS, y un último lavado a 55 °C durante 15 min con 0.1X SSC + 0.1 % SDS. Tras los lavados, la membrana se expuso a una película de rayos X y se reveló mediante autorradiografía.

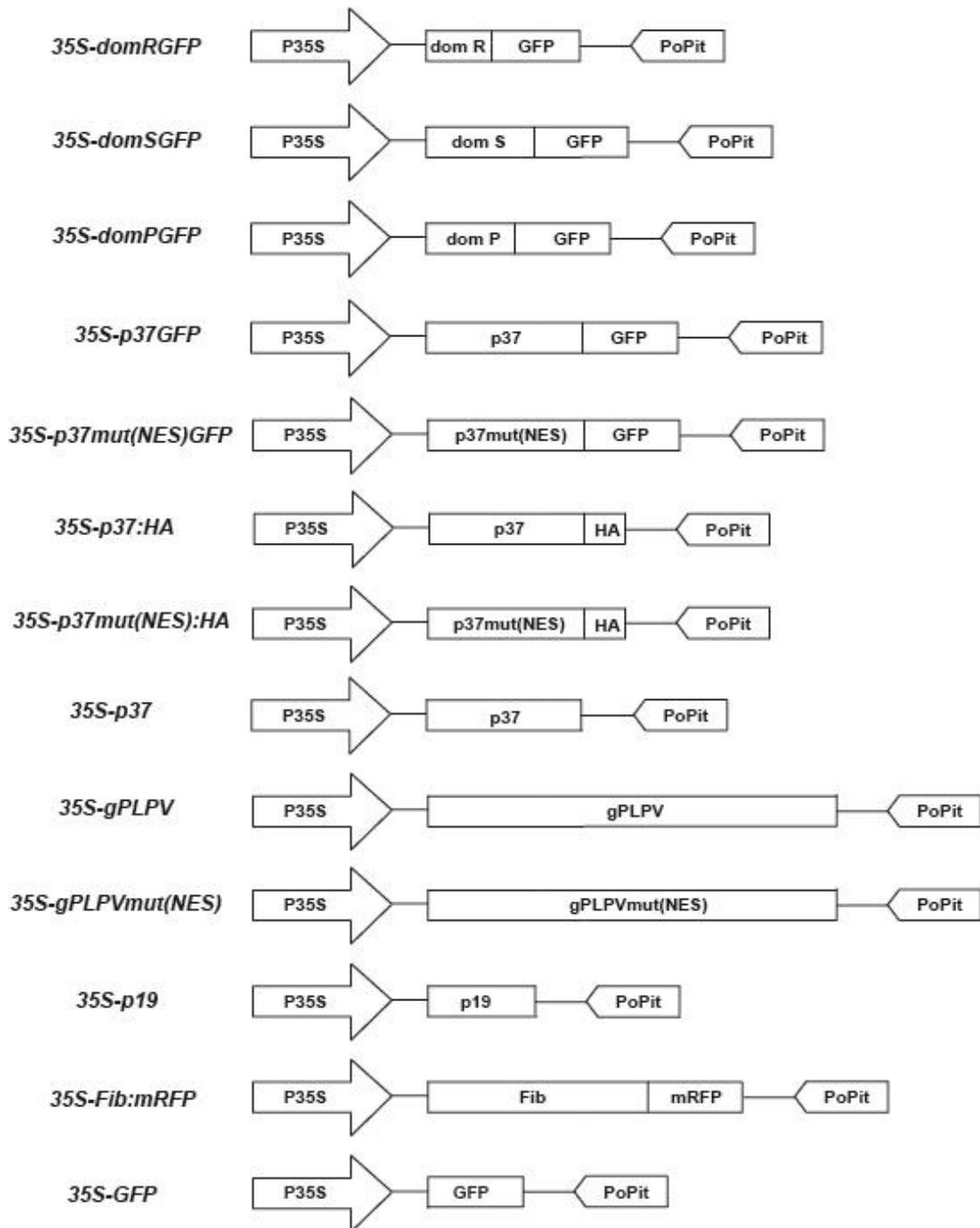


Figura 6. Esquema de las construcciones, basadas en el vector binario pMOG800, empleadas en este trabajo. La abreviación P35S corresponde al promotor 35S del CaMV y PoPit corresponde al terminador del gen del inhibidor II de la proteinasa de la patata.

Resultados

4. Resultados

4.1. Análisis *in silico* de la proteína p37 para la identificación de posibles señales relacionadas con la localización subcelular

Como se ha indicado en la Introducción, ensayos de expresión transitoria de la proteína p37 del PLPV fusionada a GFP han mostrado que este VSR se localiza en el citoplasma, núcleo y nucleolo de células vegetales. Esta observación sugería que p37 debe contener señales específicas que determinen su distribución intracelular.

El transporte de macromoléculas entre el citoplasma y el núcleo es fundamental para el mantenimiento de la vida celular eucariota ya que procesos fundamentales como la replicación, la transcripción o la traducción requieren la entrada y/o salida regulada de proteínas y/o ácidos nucleicos entre los dos compartimentos. Todas las moléculas transportadas bidireccionalmente entre el núcleo y el citoplasma deben atravesar la membrana nuclear a través del denominado complejo del poro nuclear (*nuclear pore complex*, NPC). Los NCPs (alrededor de 3.000 por célula) permiten la difusión pasiva de iones con diámetros de ~9 nm o proteínas de hasta ~40 kDa. Las moléculas que sobrepasen este límite de difusión son selectivamente transportadas en forma activa (dependiente de energía), por medio de un proceso en el que participan proteínas especializadas denominadas carioferinas (Chang *et al.*, 2012; Tamura *et al.*, 2014). Para que una proteína sea transportada al núcleo debe contener una señal de localización nuclear (*nuclear localization signal*, NLS) en su secuencia. La NLS es reconocida en el citoplasma por carioferinas, denominadas importinas, que son capaces de interactuar con elementos del NPC permitiendo así el paso de la molécula al interior. Este proceso implica un gasto de energía en forma de GTP. Existe también un sistema análogo para la salida de macromoléculas del núcleo hacia el citoplasma, donde participan carioferinas llamadas exportinas (en lugar de las importinas) y en este caso es necesario la presencia de señales de exportación nuclear (*nuclear export signal*, NES) para que se lleve a cabo este proceso (Chang *et al.*, 2012).

Las NLSs se componen por unos pocos aminoácidos, y aunque son variables, siempre son ricas en aminoácidos cargados positivamente. Diversos estudios han permitido determinar una secuencia consenso para las NLSs que se ajusta al motivo K-(K/R)-X-(K/R), en el que X puede corresponder a cualquier aminoácido. En algunos casos, la NLS puede ser bipartita comprendiendo dos secuencias de aminoácidos cargados positivamente separadas por 12 a 15 aminoácidos de secuencia variable (Lange *et al.*, 2007). En lo que se refiere a las NES, también están compuestas por pocos aminoácidos, en su mayoría hidrofóbicos. Tras el estudio de diferentes proteínas que contienen NESs identificadas, se ha conseguido determinar una

secuencia consenso para esta señal, concretamente, L-X-(L/I/V/F/M)-X-L-X-(L/I) (Fu *et al.*, 2011; la Cour *et al.*, 2003).

Por otra parte, algunas proteínas con localización nuclear muestran una acumulación preferencial en el nucleolo, una estructura sin membrana dentro del núcleo donde tiene lugar la biogénesis y el ensamblaje de ribosomas. Estudios recientes sugieren que el nucleolo está también involucrado en la biogénesis de complejos nucleoproteicos, en la regulación de la proliferación celular o en la respuesta de distintos tipos de estrés (Boisvert *et al.*, 2007). El mecanismo de direccionamiento al nucleolo de proteínas no está claro aunque se cree que está determinado por la interacción con ácidos nucleicos o proteínas de este compartimento nuclear. El análisis comparativo de proteínas con localización nucleolar apoya la presencia en las mismas de señales específicas o NoLSs (*nucleolar localization signals*) compuestas por un número variable de aminoácidos aunque con predominancia de los de carácter básico. A pesar de que esto les asemejaría a los NLSs, se ha sugerido que ambos tipos de señales podrían ser distinguibles en función de la longitud, identidad de aminoácidos y/o estructura secundaria (Scott *et al.*, 2010).

Dado que los resultados experimentales mostraban la presencia de la proteína p37 en el citoplasma, núcleo y nucleolo de células vegetales, la secuencia de esta proteína se sometió a análisis con programas predictivos de localización subcelular para ver si era posible detectar, al menos *in silico*, alguna señal específica que pudiera explicar su patrón de distribución intracelular. Los resultados obtenidos con los diferentes programas informáticos localizaban a p37 en el citoplasma celular o en la mitocondria (Fig. 7). Además ninguno de ellos fue capaz de detectar la presencia de alguna NLS o NoLS (Fig. 8, paneles A-C) en la secuencia de p37. Estos resultados fueron sorprendentes ya que no se correlacionaban con los datos de localización subcelular obtenidos de manera experimental con este VSR. Cabe señalar, no obstante, que uno de los programas informáticos empleados reconoció la presencia de una NES en la secuencia de p37. Concretamente, dicha NES potencial estaba situada en los aminoácidos 221-227 (LFFELTI) dentro del dominio S de la proteína p37 (Fig. 8D).

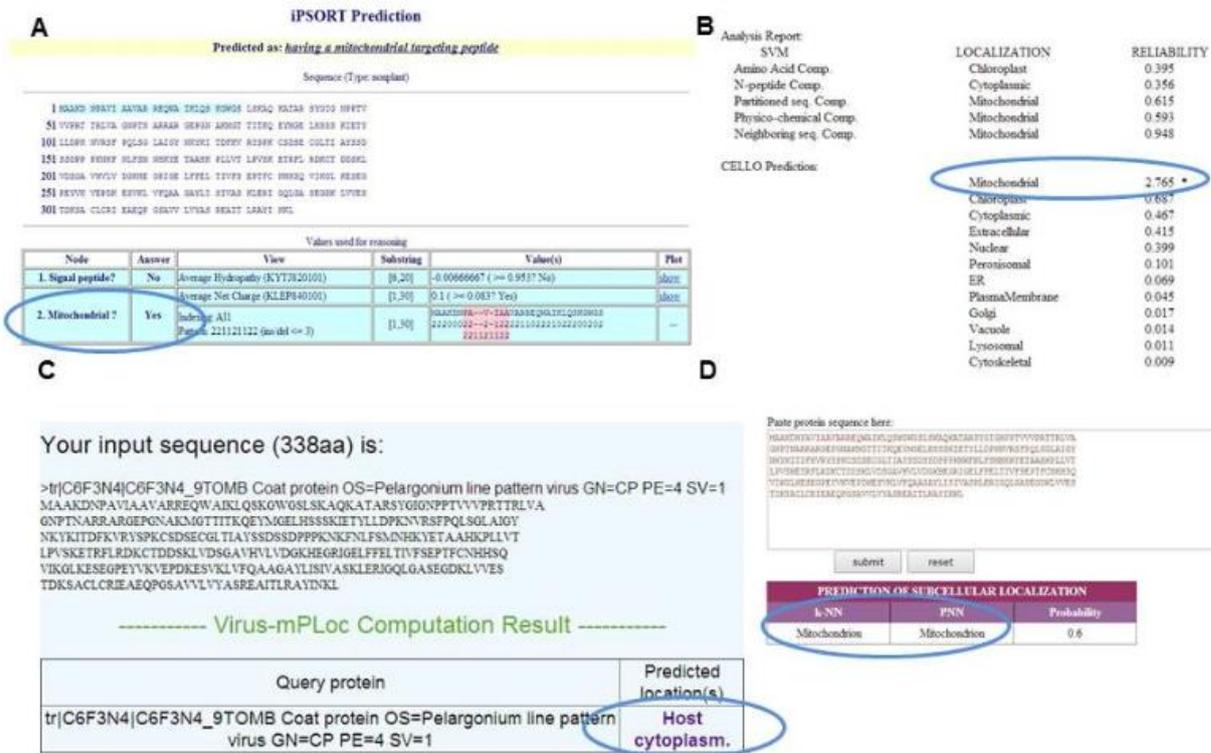


Figura 7. Predicción informática de la localización subcelular de la proteína p37 del PLPV. Los resultados obtenidos con los programas están rodeados con un círculo azul, y casi todos ellos localizan a la proteína p37 en la mitocondria celular. Los programas usados han sido: (A) iPSORT WWW Service (Bannai *et al.*, 2002) (<http://ipsort.hgc.jp/>); (B) CELLO v.2.5 (Yu *et al.*, 2006) (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>); (C) Virus-mPLOC (Shen y Chou, 2010) (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/virus-multi/>); (D) SubCellProt (Garg *et al.*, 2009) (<http://www.databases.niper.ac.in/SubCellProt/>).

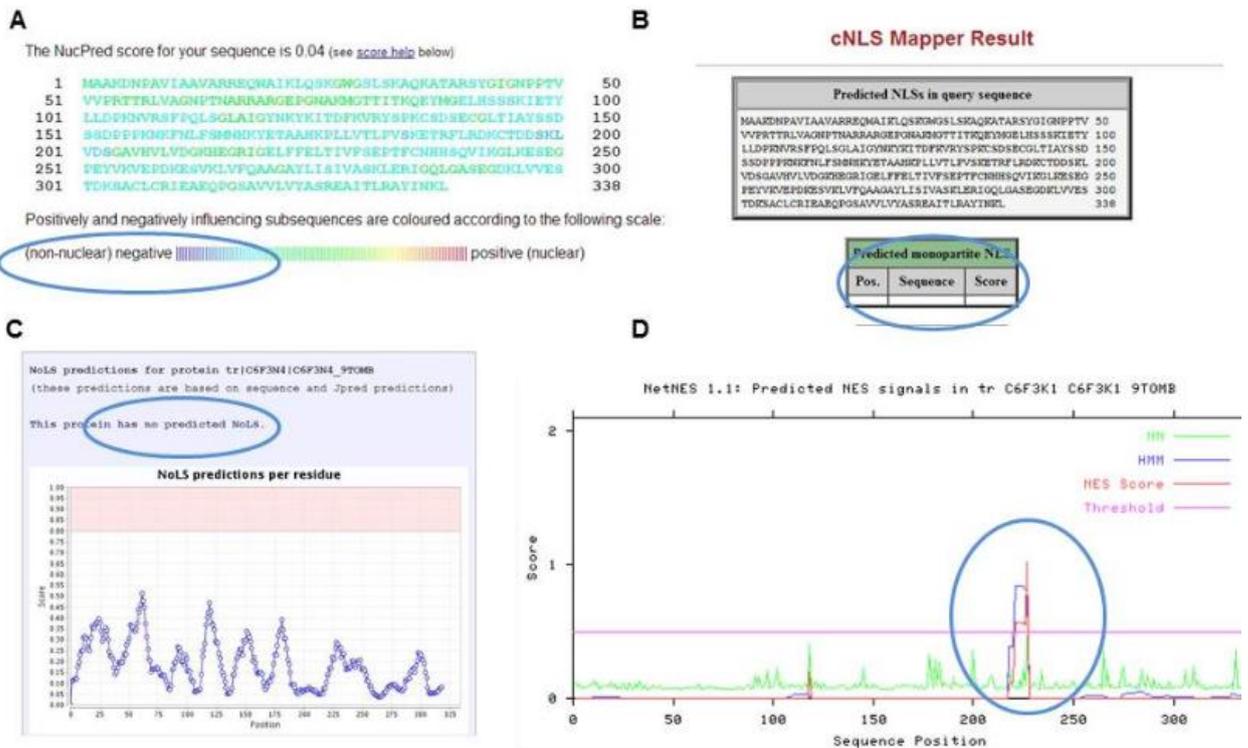


Figura 8. Predicción informática de las posibles señales relacionadas con la localización subcelular de la proteína p37. Los resultados se encuentran redondeados con un círculo azul, y los programas usados no son capaces de reconocer la presencia de ninguna señal NLS o NoLS pero si la presencia de una señal NES en el dominio S de p37. Los programas usados fueron: (A) NucPred; predicting nuclear localization of proteins (Brameir *et al.*, 2007) (<http://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/>), (B) cNLS mapper (Kosugi *et al.*, 2009) (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi), (C) NoD: Nucleolar localization sequence Detector (Scott *et al.*, 2011) (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-nod/>), (D) NetNES 1.1 Server (la Cour *et al.*, 2004) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>).

4.2. Examen de la localización subcelular de formas truncadas de la proteína p37 y de una versión mutante de la misma con una putativa NES alterada

A pesar de que los programas empleados en el anterior apartado para predecir localización subcelular no permitieron detectar ningún NLS o NoLS convencional en la proteína p37, estudios previos con una proteína de fusión p37GFP habían mostrado que el VSR de PLPV presenta una distribución citoplasmática, nuclear y nucleolar en células vegetales, tal como se ha indicado anteriormente. Además, un trabajo reciente ha puesto de manifiesto que la sustitución de algunos aminoácidos del dominio R por alanina, concretamente un triptófano en

la posición 28 o la mutación conjunta de dos argininas en posiciones 15 y 16 de la molécula, conduce a la pérdida de localización nucleolar de p37 aunque no altera su localización nuclear o citoplasmática (Pérez-Cañamás y Hernández, 2014).

Para tratar de acotar la región o regiones de p37 que influyen su patrón de distribución subcelular, nos planteamos la generación de formas truncadas de la proteína y el análisis posterior de su localización. Puesto que, como se ha mencionado en la Introducción, en esta proteína, al igual que en otras CPs de la familia *Tombusviridae*, se pueden predecir tres dominios estructurales (R, S y P), se diseñaron tres versiones truncadas que contenían, respectivamente, la secuencia de cada uno de estos dominios (Fig. 9A). Para poder estudiar la localización subcelular de los distintos dominios fue necesaria la fusión de los mismos a GFP. Para generar las construcciones pertinentes, en primer lugar se amplificó por PCR el fragmento de DNA correspondiente a cada dominio a partir del gen p37. Se diseñaron oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para cada dominio, y se optimizaron las condiciones del termociclador para conseguir una correcta amplificación. Una vez finalizada la reacción, los productos de la PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1 % (Fig. 9B) y, posteriormente, se procedió a su purificación y a su fusión, manteniendo la pauta de lectura, por el extremo C-terminal con el gen GFP y a su clonaje en un vector binario bajo el control del promotor 35S del CaMV, tal como se ha indicado en la sección de Materiales y Métodos.

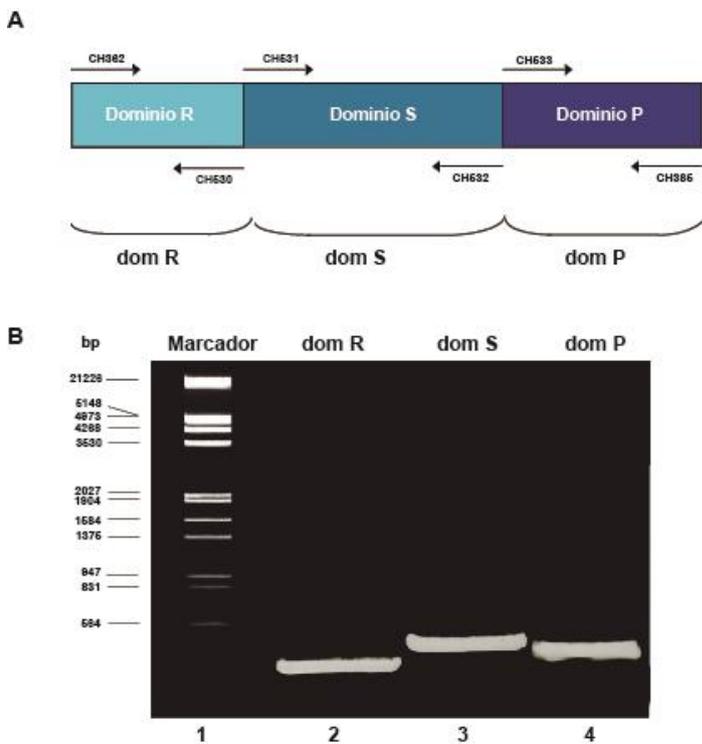


Figura 9. (A) Representación esquemática de los dominios estructurales que componen la proteína p37 del PLPV. Con flechas se indican las regiones que abarcan los oligonucleótidos sentido (parte superior) y antisentido (parte inferior) diseñados de manera específica para la amplificación de cada dominio. (B) Análisis de las amplificaciones por PCR de los distintos dominios de p37 mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % y tinción con bromuro de etidio. En el carril 1 aparece como marcador el patrón lambda DNA/*EcoRI* + *HindIII* (tamaño en bp). Carriles 2, 3 y 4: productos de la amplificación de los dominios R, S y P.

Las construcciones obtenidas, 35S-domRGFP, 35S-domSGFP y 35S-domPGFP, fueron agroinfiltradas en hojas de *N. benthamiana* para promover la expresión transitoria de las proteínas correspondientes. Como controles también se agroinfiltraron las construcciones 35S-p37GFP y 35S-GFP. La fluorescencia derivada de cada construcción se observó en el microscopio confocal a los 3 d.p.if. La fluorescencia derivada de la proteína de fusión p37GFP se encontraba distribuida en el citoplasma, núcleo y nucleolo (Fig. 10, paneles A1-A4), en línea con los resultados obtenidos previamente (Pérez-Cañamás, 2012). Se confirmó que la región brillante en el interior del núcleo era el nucleolo a través del uso del marcador nucleolar fibrilarina fusionada a mRFP. Este patrón de distribución contrastaba con el obtenido con GFP libre, donde la fluorescencia se detectaba en el citoplasma y en el núcleo, pero quedaba excluida del nucleolo (Fig. 10, paneles E1-E4). Cuando se expresó el dominio R fusionado a GFP, se observó como la fluorescencia se acumulaba en el citoplasma, núcleo y nucleolo, reproduciendo el patrón de la proteína p37 (Fig. 10, paneles B1-B4). Sin embargo, la fluorescencia de los dominios S y P, fusionados a GFP, se encontraba limitada a citoplasma y núcleo, sin que fuera detectable en el nucleolo (Fig. 10, paneles C1-D4).

Estos resultados indicaban que el determinante o los determinantes de localización nucleolar se encuentran exclusivamente dentro del dominio R y que los otros dos dominios de la proteína, S y P, no contribuyen a la acumulación del VSR en este compartimento nuclear.

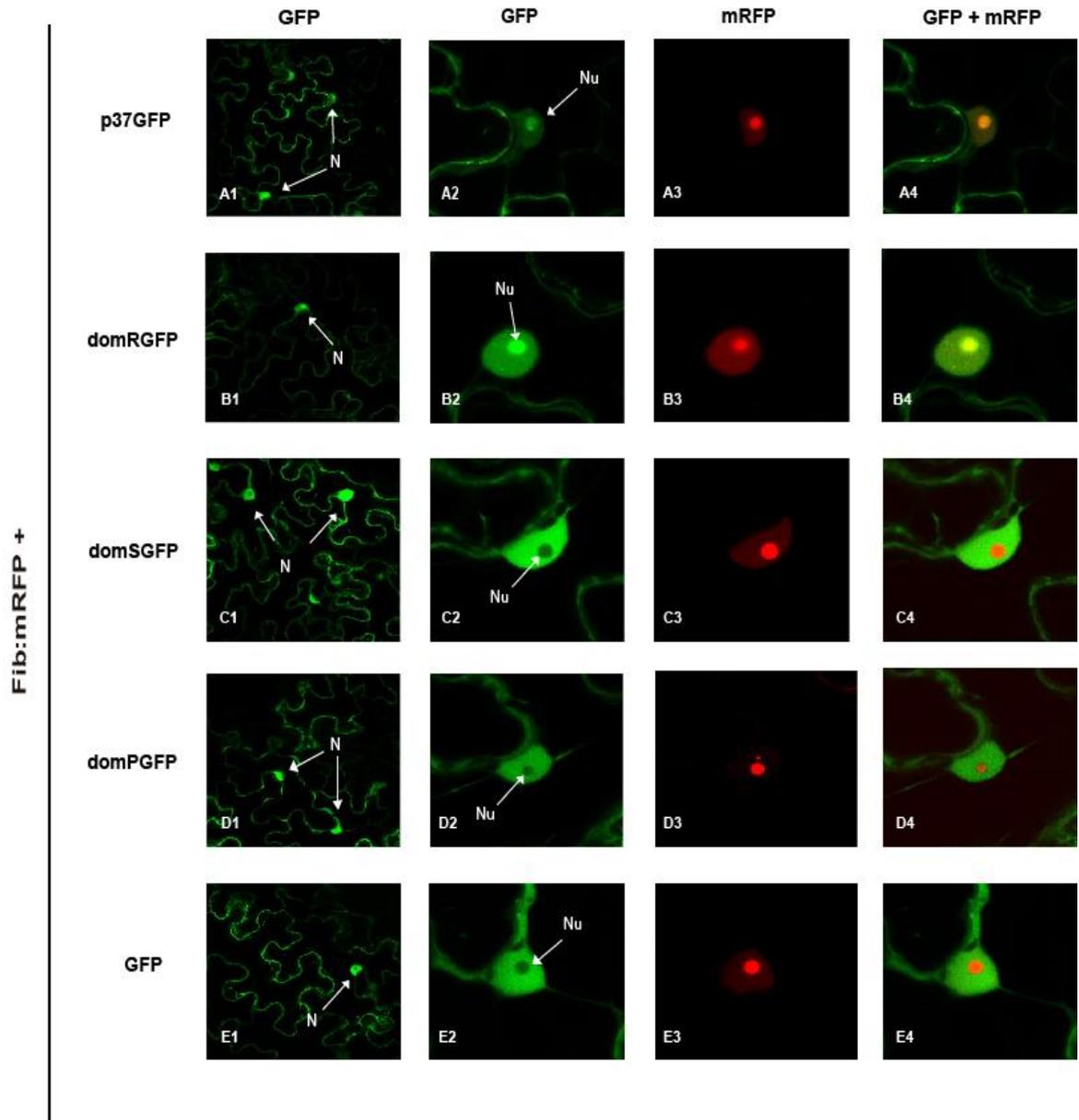


Figura 10. Distribución subcelular de la proteína p37 silvestre y de cada uno de los dominios que la componen, fusionados en su extremo C-terminal a GFP. Las construcciones 35S-domRGFP, 35S-domSGFP, 35S-domPGFP, 35S-p37GFP y 35S-GFP (estas últimas usadas como controles) fueron expresadas transitoriamente por agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* junto con la construcción 35S-Fib:mRFP (marcador de nucleolo). Las imágenes de la primera columna, comenzando por la izquierda, muestran una visión general de la fluorescencia derivada de GFP en células epidérmicas que expresan las diferentes construcciones. En la segunda y tercera columna se muestra una ampliación de la fluorescencia derivada de GFP y de mRFP, respectivamente, en células individuales. La última columna muestra la superposición de las señales de GFP y mRFP en esas células. Los núcleos (N) y nucleolos (Nu) se encuentran marcados con una flecha en las dos primeras columnas.

Por otro lado, también se quiso evaluar si la putativa NES de p37, detectada mediante programas predictivos, era efectivamente funcional y desempeñaba un papel en la distribución de la proteína. Con esta finalidad, se diseñó un alelo de p37 con una serie de mutaciones en la secuencia correspondiente a esa señal, concretamente se sustituyeron cinco aminoácidos (LFFEL, residuos 221-225 de la proteína p37) por alaninas. Para generar este nuevo alelo, se usó como molde la proteína p37 fusionada en su extremo C-terminal a la proteína GFP. Se diseñaron oligonucleótidos específicos sentido y antisentido que introdujeran los cambios necesarios en la secuencia de DNA y, mediante un protocolo de mutagénesis dirigida que incluye una reacción de PCR y la digestión posterior del molde con la enzima *DpnI* (que reconoce DNA metilado), se recuperó el DNA mutado que fue clonado en un vector binario bajo el control del promotor 35S del CaMV, siguiendo los pasos descritos en Materiales y Métodos.

La proteína p37 silvestre (wt) y la versión mutada de la misma, p37mut(NES), ambas fusionadas a la proteína GFP en su extremo C-terminal, fueron expresadas de manera transitoria en ensayos de agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*. Al igual que en el ensayo anterior, también se hizo uso del marcador nucleolar (fibrilarina) fusionado a mRFP. La observación de las muestras en el microscopio confocal a los 3 d.p.if. reveló que tanto la p37 wt como la versión mutante p37mut(NES) presentaban esencialmente el mismo patrón de distribución en citoplasma, núcleo y nucleolo (Fig. 11A, paneles a1-b4). Tampoco se detectaron cambios sustanciales en la proporción relativa de p37 entre núcleo y citoplasma cuando se comparó la fluorescencia derivada de las formas wt y mutante de la proteína. Estos resultados indicaron que la presunta NES no es realmente funcional ya que su alteración no conduce a ningún cambio significativo en el reparto de p37 entre citoplasma y núcleo/nucleolo.

Por último cabe señalar que algunas de las imágenes registradas en el anterior ensayo sugerían la acumulación preferencial de p37 (wt o mutante) en determinados puntos del citoplasma celular. Como esta localización había pasado inadvertida en un trabajo anterior (Pérez-Cañamás, 2012), se planteó la posibilidad de que estos sitios de acumulación preferencial pudieran corresponder a plasmodesmos. La localización en plasmodesmos ha sido descrita previamente para algunas CPs (ej: van der Wel *et al.*, 1998) y podría estar relacionada con un papel de p37 en el movimiento célula a célula del virus que, en plantas, tiene lugar a través de estas estructuras tubulares que atraviesan la pared de celular contiguas (Benítez-Alonso *et al.*, 2010). Para explorar esta posibilidad, se repitió el experimento tiñendo las muestras, previamente a la observación con el microscopio confocal, con un marcador de plasmodesmos, azul de anilina. Las imágenes tomadas mostraron que la fluorescencia derivada de la proteína p37 (wt o mutante) y la del marcador de plasmodesmos, en general, no colocalizaban (Fig. 11B,

paneles a1-b4), de modo que se pudo descartar que esta proteína tienda a acumularse de forma preferente en estos canales intercelulares.

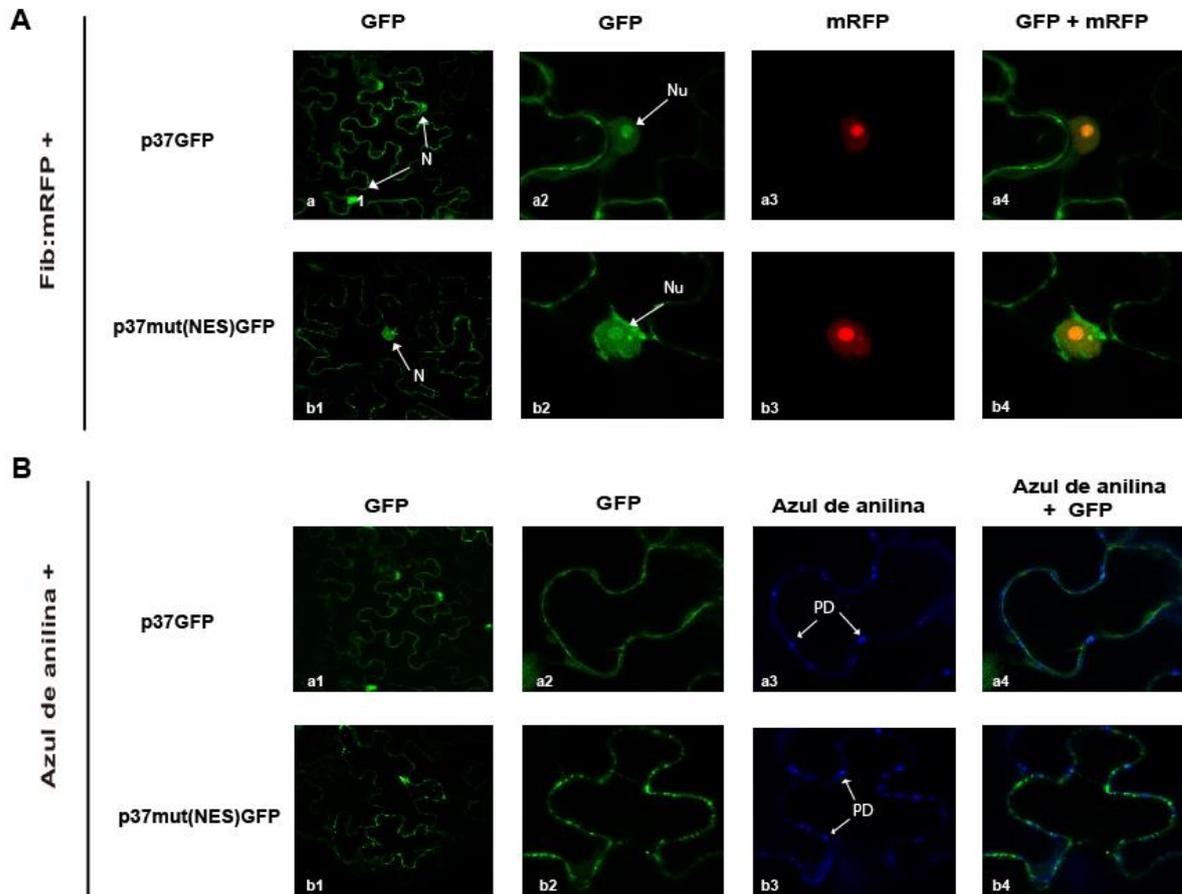


Figura 11. Evaluación de la distribución subcelular de la proteína p37 silvestre y de su versión mutante p37mut(NES), fusionadas ambas en su extremo C-terminal a GFP. Las construcciones 35S-p37GFP y 35S-p37mut(NES)GFP fueron agroinfiltradas en hojas de *N. benthamiana*, en combinación con el marcador nucleolar (35S-Fib:mRFP) (A) o con el marcador de plasmodesmos (azul de anilina) (B). Las imágenes de la primera columna, comenzando por la izquierda, muestran una visión general de la fluorescencia derivada de GFP en células epidérmicas que expresan las diferentes construcciones. En la segunda columna se muestra una ampliación de la fluorescencia derivada de GFP. En la tercera columna se muestra una ampliación de la fluorescencia derivada de mRFP (A) o de azul de anilina (B) en células individuales. La última columna muestra la superposición de las señales de GFP y mRFP (A) o azul de anilina (B) en esas células. Los núcleos (N) y nucleolos (Nu) en el panel A y los plasmodesmos (PD) en el panel B se encuentran marcados con flechas.

4.3. Estudio de la función supresora de la versión mutante de p37 con alteraciones en la putativa NES

Distintos estudios han puesto de manifiesto que mutaciones puntuales en VSRs pueden afectar de forma significativa e incluso de forma muy drástica su actividad supresora (ej: Azevedo *et al.*, 2010; Martínez-Turiño y Hernández, 2009). En el caso de p37, un estudio previo había mostrado que algunos cambios aminoacídicos en el dominio R anulaban su capacidad para inhibir el silenciamiento por RNA (Pérez-Cañamás y Hernández, 2014). Sin embargo, se desconocía si cambios en otras partes de la molécula podían también influenciar su función como VSR. Para explorar esta cuestión, se estimó oportuno utilizar la forma mutada p37mut(NES) que, como se ha indicado anteriormente, presentaba un reemplazamiento de cinco aminoácidos del dominio S por alaninas.

Para evaluar si la proteína p37 mutada era capaz de bloquear el silenciamiento se llevó a cabo un ensayo de supresión que ha sido ampliamente empleado para la identificación de VSRs (Johansen y Carrington, 2001). Dicho ensayo consiste en la expresión transitoria de proteínas mediante agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*. Normalmente, se co-expresa la proteína objeto de estudio con una proteína delatadora (normalmente GFP) y se evalúa la capacidad que tiene la proteína problema de mantener o aumentar los niveles de expresión del gen delatador que, en ausencia de un VSR, resulta silenciado por los mecanismos del huésped. En el caso de que la proteína sea capaz de bloquear el silenciamiento, la fluorescencia de la GFP se detectará fácilmente bajo luz UV.

Para poder realizar el ensayo de supresión se introdujeron las mutaciones puntuales del dominio S en una construcción en la que el gen de p37 se encontraba fusionado a una cola de hemaglutinina (p37:HA) y bajo el control del promotor 35S del CaMV. La construcción 35S-GFP se agroinfiltró sola o en combinación con las construcciones 35S-p37:HA, 35S-p37mut(NES):HA o 35S-p37 (que permite la expresión de la proteína p37 no fusionada a ninguna etiqueta) para la expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*. La observación mediante lupa de fluorescencia de las hojas agroinfiltradas mostró que a los 2 d.p.if. se podía detectar fluorescencia derivada de GFP en todos los casos (datos no mostrados). Sin embargo, a los 5 d.p.if., la fluorescencia no era ya detectable en las hojas que habían sido agroinfiltradas sólo con la construcción 35S-GFP (Fig. 12A), indicando que el gen GFP se había silenciado. En contraste, la co-infiltración de esta última construcción con las construcciones 35S-p37 y 35S-p37:HA permitió mantener unos niveles altos de fluorescencia a los 5 d.p.if. (Fig. 12A), en consistencia con la capacidad supresora de la p37 wt sin fusionar o fusionada a una etiqueta HA (Pérez-Cañamás y Hernández, 2014). Sin embargo, la co-expresión de la proteína mutada

p37mut(NES):HA no fue capaz de hacer perdurar la fluorescencia a partir de los 5 d.p.if. (Fig. 12A).

Para confirmar si las observaciones visuales obtenidas se correlacionaban con los niveles de expresión de GFP, se analizó la acumulación del mRNA de GFP en las hojas infiltradas a los 5 d.p.if. El análisis Northern mostró una baja acumulación de mRNA de GFP en hojas agroinfiltradas con 35S-GFP sólo o en combinación con 35-p37mut(NES):HA (Fig. 12B), mientras que la acumulación de dicho mRNA era muy elevada en hojas que co-expresaban GFP y p37 o p37:HA (Fig. 12B), en concordancia con los niveles de fluorescencia detectados en los distintos casos. Los resultados en su conjunto indicaban que la mutación de cinco aminoácidos del dominio S anula la capacidad supresora de la proteína p37.

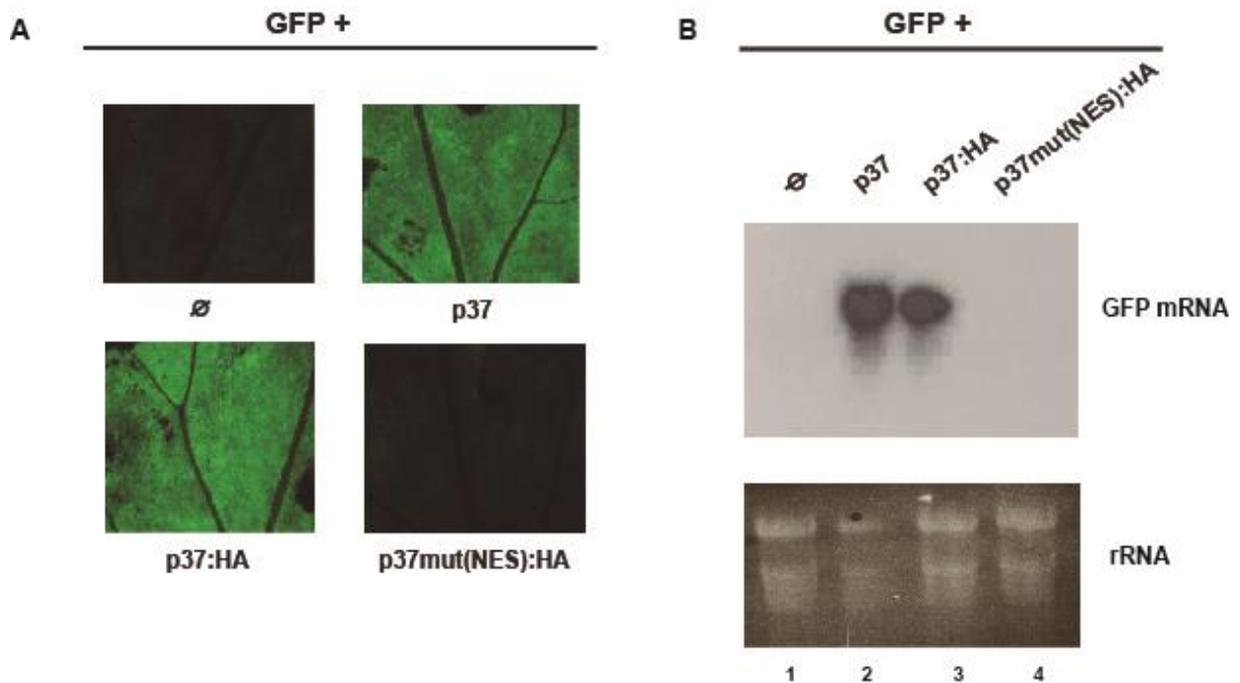


Figura 12. Evaluación de la capacidad de inhibir el silenciamiento por RNA de la proteína p37 silvestre (fusionada y sin fusionar a una cola de HA, p37:HA y p37, respectivamente) y de una versión mutada de la misma con cinco cambios de aminoácidos en el dominio S y fusionada a una cola de HA, p37mut(NES):HA. Plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con 35S-GFP sola (Ø) o en combinación con 35S-p37, 35S-p37:HA y 35S-p37mut(NES):HA. (A) Imágenes de la fluorescencia de GFP tomadas a los 5 d.p.if. (B) Análisis Northern de las hojas agroinfiltradas para la detección del mRNA de GFP. Las fracciones de RNA extraído fueron separadas en geles de agarosa al 1 %, transferidas a membranas e hibridadas con una sonda derivada del gen GFP marcada radiactivamente.

4.4. Evaluación de la infectividad de un PLPV con mutaciones en la putativa NES de la proteína p37

La ausencia de función supresora puede comprometer notablemente la capacidad infectiva de un virus (Azevedo *et al.*, 2010; Voinnet *et al.*, 1999). Con el objetivo de comprobar si las mutaciones introducidas en el dominio S de la proteína p37 (que, como se ha comentado en el apartado anterior, anulaban la actividad supresora de la molécula) afectaban a la infectividad del virus, dichas mutaciones fueron introducidas en el genoma del PLPV mediante un proceso de mutagénesis dirigida.

El cDNA mutado del PLPV se clonó en un vector binario bajo el control del promotor 35S del CaMV y la construcción resultante, 35S-gPLPVmut(NES), se agroinfiltró en plantas de *N. benthamiana*. En paralelo, se agroinfiltraron plantas con la construcción wt 35S-gPLPV, que sirvió como control positivo de infección. Las hojas locales fueron recogidas a los 7 d.p.if. y los RNAs totales extraídos a partir de las mismas se sometieron a análisis Northern con una sonda específica del PLPV. Este análisis reveló una gran acumulación de RNAs virales (genómico y subgenómico) en las plantas agroinoculadas con el virus wt (Fig. 13). Sin embargo, no pudo detectarse RNA viral en las hojas agroinoculadas con el virus mutado (Fig. 13). Estos resultados indicaron que la infectividad de PLPV se ve tremendamente afectada cuando se anula la capacidad supresora de la proteína p37, y que la función supresora es necesaria para que el virus se acumule a niveles significativos incluso en hojas locales.

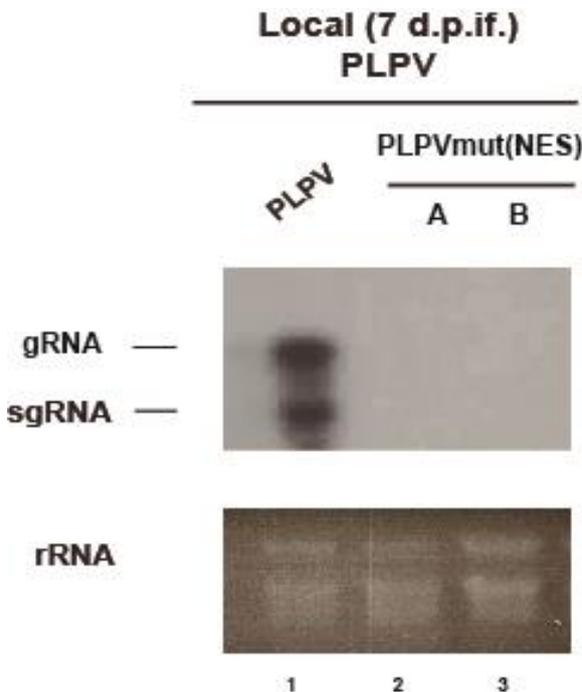


Figura 13. Evaluación de la infectividad de PLPV y de una versión mutada del mismo mediante análisis Northern. Plantas de *N. benthamiana* fueron agroinfiltradas con 35S-gPLPV y 35S-gPLPVmut(NES).

Preparaciones de RNA total fueron obtenidas a partir de hojas locales recogidas a los 7 d.p.if. Las fracciones de RNA fueron separadas en geles de agarosa al 1 %, transferidas a membranas e hibridadas con una sonda del PLPV marcada radioactivamente. A la izquierda se indica la posición del gRNA y sgRNA del PLPV.

Para tratar de determinar si el efecto tan drástico de las mutaciones introducidas en el dominio S sobre la infectividad del virus era el resultado, no sólo de la pérdida de función supresora de p37, sino también de una merma en su capacidad de encapsidación se diseñó un ensayo para evaluar esta última. Se pensó que el virus mutante PLPVMut(NES) podría acumularse a niveles detectables en los primeros días después de la agroinoculación, cuando el silenciamiento disparado en la planta por el virus todavía estaría en su fase inicial y la función del VSR podría ser parcialmente dispensable. Por ello se agroinocularon hojas de *N. benthamiana* con las construcciones silvestre y mutante del PLPV, se recogieron hojas a los 3 d.p.if., y se emplearon éstas tanto para una extracción de RNA total como para una purificación de partículas víricas. A continuación, las preparaciones de RNA y las de viriones se sometieron a análisis Northern para detectar el PLPV. Los resultados del análisis de las primeras mostraron que, a pesar de la recogida de material a tiempos tempranos, el virus mutante no se acumulaba a niveles detectables a diferencia del virus wt cuya presencia era claramente constatable (Fig. 14). Como era esperable en función de este resultado, sólo se aislaron viriones a partir del PLPV wt (Fig. 14). La falta de acumulación de PLPV mutado en el material de partida no permitió pues sacar conclusiones acerca de si la proteína p37mut(NES) mantiene la capacidad de formar partículas víricas.

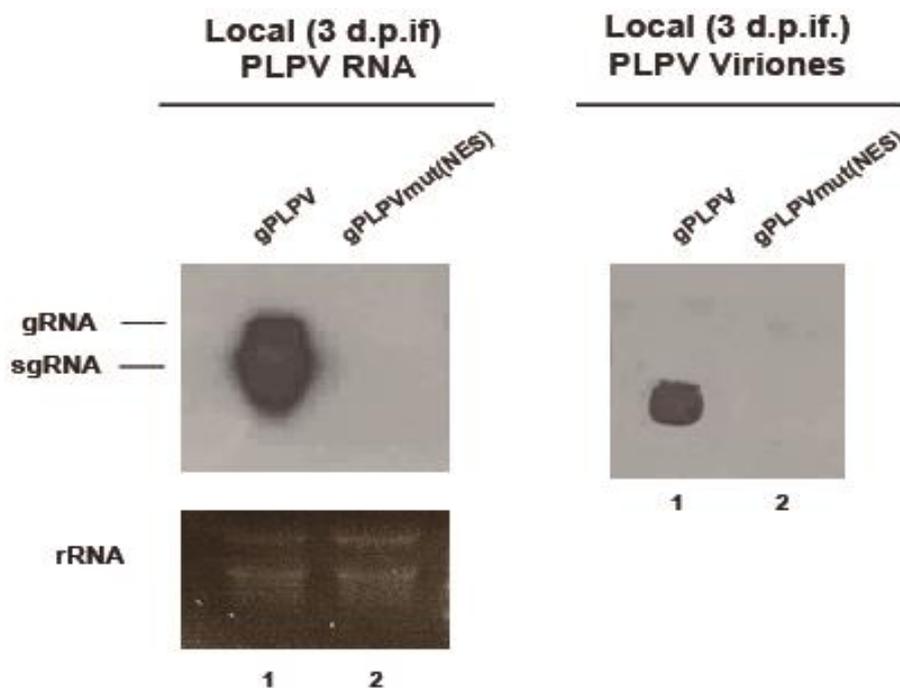


Figura 14. Evaluación de la capacidad de formar viriones de PLPV y de su versión mutante, PLPVMut(NES). Hojas de *N. benthamiana* fueron agroinfiltradas con 35S-gPLPV y 35S-gPLPVMut(NES) y las hojas locales fueron recogidas a los 3 d.p.if. La detección de RNAs derivados de PLPV así como la detección de partículas víricas se llevó a cabo mediante análisis Northern.

Discusión

5. Discusión

En un trabajo previo se había puesto de manifiesto que la proteína p37 se acumula en el citoplasma, núcleo y nucleolo de células vegetales (Pérez-Cañamás, 2012). La localización en núcleo y/o nucleolo era en principio inesperada ya que las dos funciones conocidas de p37, supresión del silenciamiento y encapsidación, deben desarrollarse fundamentalmente en el citoplasma de las células infectadas por el virus y, más aún, dicha localización no había sido descrita previamente para ningún ortólogo.

En este trabajo, nos planteamos obtener algo más de información acerca de esta propiedad de la proteína. Con esta finalidad, en primer lugar sometimos su secuencia a programas predictivos para ver si eran capaces de detectar señales que ayudaran a identificar determinantes de localización subcelular. Este análisis *in silico* no permitió reconocer ningún NLS o NoLS canónico en la proteína. Mediante el uso de fusiones de los distintos dominios de p37 a GFP, hemos podido concluir que el dominio R contiene las señales necesarias para la localización de p37 en nucleolo y que los otros dos dominios son dispensables para la acumulación en este compartimento nuclear. Estos resultados son consistentes con resultados recientes que han revelado que algunas mutaciones en el dominio R conducen a la pérdida de la localización nucleolar de la proteína (Pérez-Cañamás y Hernández, 2014). Además, aunque los programas informáticos no detectaron un NoLS en la molécula, este tipo de señales se caracterizan por su elevado contenido en aminoácidos básicos, lo que es congruente con la naturaleza del dominio R que, como se ha mencionado en la Introducción y queda patente en el Anexo 1, es rico en aminoácidos con carga positiva (18.2 %). A pesar de que existen distintos trabajos centrados en este tema, el reconocimiento de NoLSs y su distinción con NLSs no es una cuestión sencilla ya que ambas se caracterizan por una alta abundancia de aminoácidos básicos (Scott *et al.*, 2010). Factores como el espaciado entre dichos aminoácidos, su identidad, su grado de repetición o, incluso, alguna estructura secundaria o terciaria probablemente contribuyan a diferenciar ambos tipos de señales. Curiosamente, los dominios S y P, aunque excluidos del nucleolo, sí que mostraron localización nuclear a pesar de que la proporción de aminoácidos básicos en estos dominios es relativamente baja (12.2 y 12.4 %, respectivamente; Anexo 1). Esta observación puede tener dos interpretaciones: a) que la entrada en el núcleo de las fusiones domSGFP y domPGFP sea un proceso pasivo facilitado por el pequeño tamaño de la fusión (43.6 y 37.9 kDa, respectivamente) o, b) que ambos dominios tengan motivos específicos que les dirijan al núcleo. Aunque esta cuestión está por explorar, no es descartable la entrada de las fusiones por difusión en el núcleo ya que, en general, proteínas con un tamaño superior a 40 kDa son las que requieren un transporte activo a través del poro nuclear (Chang *et al.*, 2012; Tamura *et al.*, 2014).

En cualquier caso, los resultados de este trabajo han permitido identificar al dominio R como el responsable de la localización nucleolar de esta proteína. Estudios más detallados centrados en este dominio posibilitarán definir de forma más precisa el NoLS de p37.

A pesar de que los programas predictivos de localización subcelular no reconocieron ningún NLS o NoLS en p37, sí que revelaron la presencia de una putativa NES. Este tipo de señal podría estar regulando el transporte de p37 entre núcleo y citoplasma, un aspecto a analizar interesante ya que el reparto entre los dos compartimentos celulares podría ser clave para modular alguna de las actividades de p37. La mutación de esta NES potencial y el análisis de la distribución subcelular de la p37 mutada, p37mut(NES), ha revelado que este motivo no parece estar involucrado en el movimiento núcleo-citoplasmático de la proteína, lo que subraya la necesidad de corroborar la funcionalidad *in vivo* de motivos determinados exclusivamente mediante aproximaciones *in silico*. Es interesante señalar que la mutación de cinco aminoácidos de la presunta NES, ubicada dentro del dominio S, sí que tuvo un efecto sobre la función VSR de la proteína ya que anuló completamente su capacidad para inhibir el silenciamiento. Este resultado indica que el dominio S también contribuye a la actividad supresora de p37 y sugiere que, como se ha descrito para algunos supresores relacionados como la proteína p38 del virus del marchitamiento del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV) (Thomas *et al.*, 2003), la molécula completa debe ser requerida para el mantenimiento de la función VSR. Es interesante también remarcar que las mutaciones introducidas en el dominio S de p37 fueron letales para el virus, que fue incapaz de acumularse a niveles detectables incluso en hojas locales. La pérdida de la actividad VSR provocada por las mencionadas mutaciones es, probablemente, responsable de la pérdida de viabilidad del PLPV lo que remarca el requerimiento de contrarrestar el silenciamiento por RNA para que haya una multiplicación y dispersión eficaz del patógeno, en línea con lo descrito para otros virus (Azevedo *et al.*, 2010; Voinnet *et al.*, 1999). Las sustituciones aminoacídicas en p37 podrían haber afectado también a la habilidad de la proteína para formar viriones. La anulación simultánea de las funciones de supresión y de encapsidación de p37 dejarían al RNA viral desprotegido frente a los distintos mecanismos de degradación del huésped y podría explicar la falta de acumulación del virus mutante en hojas inoculadas incluso a 3 d.p.if., cuando el silenciamiento por RNA disparado por el virus probablemente aún no está bien establecido. La total falta de acumulación del virus mutante ha impedido, no obstante, corroborar si la proteína p37mut(NES) mantiene su capacidad para formar partículas víricas, aunque es muy probable que ese sea el caso.

Estudios recientes indican que la localización en nucleolo de p37 no es indispensable para la función supresora de la proteína que parece estar basada esencialmente en su capacidad para unir sRNAs (Pérez-Cañamás y Hernández, 2014). Estos resultados están en consonancia

con los obtenidos con otros VSRs que también muestran localización nucleolar como la proteína 2b del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) o la proteína p14 de benyvirus (Chiba *et al.*, 2013; González *et al.*, 2012). El significado biológico de esta localización está por determinar ya que tampoco es requerida para la formación de viriones (Pérez-Cañamás y Hernández, 2014) y, por tanto, podría estar relacionada con alguna función de p37 todavía desconocida. En el caso de la proteína 2b del CMV se ha sugerido que su localización nuclear/nucleolar podría estar relacionada con un papel en regulación transcripcional, inhibición del transporte nuclear o interferencia con la metilación del DNA (Guo y Ding, 2002; Lucy *et al.*, 2000), aunque no hay datos sólidos que apoyen ninguna de estas posibilidades. La posible vinculación de la localización nuclear/nucleolar de p37 con algún cometido adicional de este producto viral está por explorar.

Conclusiones

6. Conclusiones

1. En el dominio R de la proteína p37 se encuentra el determinante de localización nucleolar, puesto que es el único que muestra esta localización específica e idéntica a la de la proteína p37 silvestre. Los dominios S y P sólo muestran una localización citoplasmática y nuclear.
2. Mediante aproximaciones *in silico* se ha identificado una señal NES potencial en el dominio S de p37. Este motivo no parece ser funcional *in vivo* ya que su alteración no provoca ningún cambio sustancial en la distribución de la proteína p37 en el interior de células vegetales.
3. La modificación de la presunta NES de p37 sí que afecta drásticamente a la capacidad de inhibir el silenciamiento por RNA de la proteína lo que indica que el dominio S debe contribuir a la función supresora de este producto viral.
4. La modificación de la presunta NES de p37 también provoca una pérdida de viabilidad del virus, que es incapaz de acumularse incluso en hojas locales. Aunque no se puede descartar que los cambios aminoacídicos introducidos hayan afectado también a la función de encapsidación de p37, los resultados subrayan la importancia del VSR en la infección viral.

Bibliografía

7. Bibliografía

- AHLQUIST, P. (2006). Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4:374-382.
- ALONSO, M. AND BORJA, M. (2005). High incidence of *Pelargonium line pattern virus* infecting asymptomatic *Pelargonium* spp. in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.*, 112:95-100.
- AZEVEDO, J., GARCIA, D., PONTIER, D., OHNESORGE, S., YU, A., GARCIA, S., BRAUN, L., BERGDOLL, M., HAKIMI, M.A., LAGRANGE, T. AND VOINNET, O. (2010). ARGONAUTE quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev.*, 24:904-615.
- BANNAI, H., TAMADA, Y., MARUYAMA, O., NAKAI, K. AND MIYANO, S. (2002). Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics*, 18:298-305.
- BAULCOMBE, D. (2005). RNA silencing in plants. *Nature*, 431:356-363
- BAUMBERGER, N., TSAI, C.H., LIE, M., HAVECKER, E. AND BAULCOMBE, D.C. (2007). The polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr. Biol.*, 17:1609-1614.
- BENÍTEZ-ALONSO, Y., FAULKNER, C., RITZENTHALER, C. AND MAULE, A. (2010). Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection. *Mol. Plant Microbe Interact*, 23:1403-1412.
- BLEVINS, T., RAJESWARAN, R., SHIVAPRASAD, P.V., BEKNAZARIANTS, D., SIAMMOUR, A., PARK, H.S., VAZQUEZ, F., ROBERTSON, D., MEINS JR, F., HOHN, T. AND POGGIN, M.M. (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acid Res.*, 34:6233-6246.
- BOHNERT, HJ., NELSON, D.E. AND R.G. JENSEN. (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*, 7:1099-1111.
- BOISVERT, F.M., VAN KONINGSBRUGGEN, S., NAVASCUES, J. AND LAMOND, A.I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8:574-585.
- BOUWEN, I. AND MAAT, D.Z. (1992). *Pelargonium flower-break* and *Pelargonium line pattern viruses* in the Netherlands; purification, antiserum preparation, serological identification, and detection in pelargonium by ELISA. *Neth. J. Plant Pathol.*, 98:141-156.
- BRAMEIR, M., KRINGS, A. AND MACCALLUM, R.M. (2007). NucPred – Predicting Nuclear Localization of Proteins. *Bioinformatics*, 23:1159-1160.
- BRUNT, A. A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M.J., GIBBS, A.J., WATSON, L. AND ZURCHER, E.J. (1996). *Pelargonium flower break virus* and *Pelargonium line pattern virus*. *Plant Viruses Online*: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 16th January (1997). URL (<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vid/21.09.01>).
- BURGYÁN, J. AND HAVELDA, Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.*, 16:265-272.
- CASTAÑO, A. AND HERNÁNDEZ, C. (2005). Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pelargonium line patterns virus* and its relationship with the family *Tombusviridae*. *Arch. Virol.*, 150:949-965.
- CASTAÑO, A. AND HERNÁNDEZ, C. (2007). Biological activity of transcripts from cDNA of *Pelargonium line pattern virus*. *Acta Virol.*, 51:271-274.
- CASTAÑO, A., RUIZ, L. AND HERNÁNDEZ, C. (2009). Insights into the translational regulation of biologically active open reading frames of *Pelargonium line pattern virus*. *Virology*, 386:417-426.

- CHANG, C.W., COUNAGO R.L., WILLIAMS S. J., BODEN M., KOBE B. (2012). Crystal structure of rice importin- α and structural basis of its interaction with plant-specific nuclear localization signals. *Plant Cell*, 24:5074-5088.
- CHIBA, S., HLEIBIEH, K., DELBIANCO, A., KLEIN, E., RATTI, C., ZIEGLER-GRAFF, V., BOUZOUBAA, S. AND GILMER, D. (2013). The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 26:168-181.
- CURABA, J. AND CHEN, X. (2008). Biochemical activities of *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase 6. *J. Biol. Chem.*, 283:3059-3066.
- DELERIS, A., GALLEGRO-BARTOLOME, J., BAO, J., KASSCHAU, K.D., CARRINGTON, J.C. AND VOINNET, O. (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science*, 313:68-71.
- DÍEZ J., MARCOS, J.F. AND PALLÁS, V. (1998). Carmovirus isolation and RNA extraction. *Methods Mol. Biol.*, 81:211-217.
- DING, S. W. AND VOINNET, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130:413-426.
- DING, S.W. (2010). RNA-based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 10:632-644.
- DONAIRE, L., WANG, Y., GONZALEZ-IBEAS, D., MAYER, K.F., ARANDA, M.A. Y LLAVE, C. (2009). Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology*, 392:203-214.
- FU, S.C., IMAI, K. AND HORTON, P. (2011). Prediction of leucine-rich nuclear export signal containing proteins with NESsential. *Nucleic Acids Res.*, 39:111-131.
- FUJITA, M., FUJITA, Y., NOUTOSHI Y., TAKAHASHI F., NARUSAKA Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9:436-642.
- FUKUNAGA, R. AND DOUDNA, J.A. (2009). dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *EMBO J.*, 28:545-555.
- GARG, P., SHARMA, V., CHAUDHARI, P. AND ROY, N. (2009). SubCellProt: predicting protein subcellular localization using machine learning approaches. *In Silico Biol.*, 9:35-44.
- GENOVÉS, A., NAVARRA, J.A. AND PALLÁS, V. (2006). Functional analysis of the five melon necrotic spot virus genome-encoded proteins. *J. Gen. Virol.*, 87:2371-2380
- GLICK, E., ZRACHYA, A., LEVY, Y., METT, A., GIONI, D., BELAUSOV, E., CITOVSKY, V. AND GAFNI, Y. (2008). Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by *Tomato yellow leaf curl virus* V2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:157-161.
- GONZÁLEZ, I., RAKITINA, D., SEASHKO, M., TALIANSKY, M., PRAVEEN, S., PALUKAITIS, P., CARR, J.P., KALININA, N. AND CANTÓ, T. (2012). RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of *Cucumber mosaic virus* 2b protein than nuclear localization. *RNA*, 18:771-782.
- GUO, H.S. AND DING, S.W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J.*, 21:398-407.
- HAMILTON, A.J. AND BAULCOMBE, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286:950-952.

- HAMMOND, S.M., BERNSTEIN, E., BEACH, D. AND HANNON, G.J. (2000). An RNA directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404:293-296.
- HAO, X., LU, A., SOKAL, N., BHAGWAT, B., LEUNG, E., MAO, R., READE, R., WU, Y., ROCHON, D. AND XIANG, Y. (2011). *Cucumber necrosis virus* p20 is a viral suppressor of RNA silencing. *Virus Res.*, 155:423-432.
- JOHANSEN, L.K. AND CARRINGTON, J.C. (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol.*, 126:930-938.
- KASSCHAU, K.D. AND CARRINGTON, J.C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 95:461-470.
- KIM, S., MACFARLANE, S., KALININA, N., RAKITINA, D., RYABOV, E., GILLESPIE, T., HAUPT, S., BROWN, J. AND TALIANSKY, M. (2007). Interaction of a plant virus encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:11115-11120.
- KINARD, G.R. AND JORDAN, R. (2002). Genome organization of *Pelargonium chlorotic ring pattern virus*: further implications for *Tombusviridae* taxonomy. *Acta Hortic.*, 568:17-27.
- KNOESTER, M., VAN LOON, L.C., VAN DEN HEUVEL, J., HENNING, J., BOL, J.F. AND LINTHORST H.J.M. (1998). Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:1933-1937.
- KOSUGI S., HASEBE, M., TOMITA, M. AND YANAGAWA, H. (2009). Systematic identification of yeast cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106:10171-10176.
- LA COUR, T., KIEMER, L., MØLGAARD, A., GUPTA, R., SKRIVER, K AND SØREN, B.(2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signal. *Protein Eng. Des. Sel.*, 17:527-536.
- LA COUR, T., RAMNEK, G., KRISTOFFER, R., KAREN, S., FLEMMING M.P. AND SØREN, B. (2003). NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Res.*, 31:393-396.
- LAKATOS, L., CSORBA, T., PANTALEO, V., CHAPMAN, E.J., CARRINGTON, J.C., LUI, Y.P., DOLJA, V.V., CALVINO, L.F., LOPEZ-MOYA, J.J. AND BURGUYÁN, J. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.*, 25:2768-2780.
- LLAVE, C. (2010). Virus-induced small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci.*, 12:701-707.
- LANGE, A., MILLS, R.E., LANGE, C.J., STEWART, M., DEVINE, S.E. AND CORBET, A.H. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function and interaction with importin α . *J. Biol. Chem.*, 282:5101-5105.
- LUCY, A.P., GUO, H.S., LI, W.X. AND DING, S.W. (2000). Suppression of posttranscriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.*, 19:1672-1680
- MARTÍNEZ-TURIÑO, S. AND HERNÁNDEZ, C. (2009). Inhibition of RNA silencing by the coat protein of *Pelargonium flower break virus*: distinctions from closely related suppressors. *J. Gen. Virol.*, 90:519-525.
- MENG, C.Y., CHENG, J., PENG, J.R. AND WONG, S.M. (2006). Host-induced avirulence of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* mutants correlates with reduced gene silencing suppression activity. *J. Gen. Virol.*, 87:451-459.

- MÉRAI, Z., KERENYI, Z., MOLNAR, A., BARTA, E., VALOCZI, A., BISZTRAY, G., HAVELDA, Z., BURGYÁN, J., AND SILHAVY, D. (2005). *Aureusvirus* P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J. Virol.*, 79:7217-7226.
- MÉRAI, Z., KERENYI, Z., KERTESZ, S., MAGNA, M., LAKATOS, L., AND SILHAVY, D. (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J. Virol.*, 80:5747-5756.
- MOLNAR, A., CSORBA, T., LAKATOS, L., VARALLYAY, E., LACOMME, C. AND BURGYÁN, J. (2005). Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from high structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol.*, 79:7812-7818.
- NAMETH, S.T. AND ADKINS, S.T. (1993). Viral disease. *En Geraniums IV, The Grower's Manual. Ball Publishing (US)*, 267-275.
- PÉREZ-CAÑAMÁS, M. (2012). Identificación y caracterización parcial del supresor del silenciamiento por RNA del virus del arabesco del *Pelargonium*. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia.
- PÉREZ-CAÑAMÁS, M. AND HERNÁNDEZ, C. (2014). Key importance of small RNA binding for the activity of a GW motif-containing RNA silencing suppressor. *J Biol. Chem.* (enviado).
- POWERS, J.G., SIT, T.L., HEINSOHN, C., GEORGE, C.G., KIM, K.H. AND LOMMEL, S.A. (2008). The *Red necrotic mosaic virus* RNA-2 encoded movement protein is a second suppressor of RNA silencing. *Virology*, 381:277-286.
- QU, F. AND MORRIS, T.J. (2002). Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by *Tomato bushy stunt virus* is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 15:193-202.
- ROCHON, D., LOMMEL, S., MARTELLI, G.P., RUBINO, L., RUSSO, M. (2012). Family *Tombusviridae*. En: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Ikonnikoff, E.J. (eds.), *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, San Diego, CA., 1111-1138.
- SAMBROOK, J. AND RUSSEL, D. (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SCHEETS, K., BLINKOVA, O., MELCHER, U., PALMER, M.W., WILEY, G.B., DING, T. AND ROE, B.A. (2011). Detection of members of the *Tombusviridae* in the Tallgrass Prairie Preserve, Osage County, Oklahoma, USA. *Virus Res.*, 160:256-263.
- SCOTT, M.S., BOISVERT, F.M. MCDOWALL, M.D., LAMOND, A.I. AND BARTON, G.J. (2010). Characterization and predictions of protein nucleolar localization sequences. *Nucleic Acids Res.*, 38:7388-7399.
- SCOTT, M.S., TROSHIN, P.V. AND BARTON G.J. (2011). NoD: a nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *Bioinformatics*, 12:317.
- SHEN H. AND CHOU, K. (2010). Virus-mPLoc: a fusion classifier for viral protein subcellular location prediction by incorporating multiple sites. *J. of Biomol. Struct. Dyn.*, 28:175-186.
- STONE, O.M. AND HOLLINGS, M. (1971). Annual Report Glasshouse Crops Research Institute for 1970, Littlehampton, UK, 153-155.
- STONE, O.M. AND HOLLINGS, M. (1976). Annual Report Glasshouse Crops Research Institute for 1975, Littlehampton, UK, 119-120.
- TAKEDA, A., TSUKUDA, M., MIZUMOTO, H., OKAMOTO, K., KAIDO, M., MISE, K. AND OKUNO, T. (2005). A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO J*, 24:3147-3157.

- TAMURA K. AND HARA-NISHIMURA, I. (2014). Functional insights of nucleocytoplasmic transport in plants. *Plant Sci.*, 5(118):1-10.
- THOMAS, C.L., LEH, V., LEDERER, C. AND MAULE, A.J. (2003). Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology*, 306:33-41.
- VAN DER WEL, N.N., GOLDBACH, R.W. AND VAN LENT J.W. (1998). The movement protein and coat protein of *Alfalfa mosaic virus* accumulate in structurally modified plasmodesmata. *Virology*, 244:322-329.
- VAUCHERET, H. (2008). Plant Argonautes. *Trends Plant Sci.*, 13:350-358.
- VERWOERD, T.C., DEKKER, M.M. AND HOEKEMA, A. (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.*, 17:2362.
- VOINNET, O. (2008). Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci.*, 13:317-328.
- VOINNET, O., PINTO, Y.M. AND BAULCOMBE, D.C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:14147-14152.
- YE, K., MALININA, L. AND PATEL, D.J. (2003). Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature*, 426:874-878.
- YU, C.S., LIN, C.J. AND HWANG, J.K. (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 64:643-651.
- ZAMORE, P.D., TUSCHL, T., SHARP, P.A. AND BARTEL, D.P. (2000). RNAi: double-strand RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101:25-33.
- ZHANG, X., YUAN, Y.R., PEI, Y., LIN, S.S., TUSCHL, T., PATEL, D.J. AND CHUA, N.H. (2006). *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute 1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.*, 20:3255-3268.

Anexos

ANEXO 1

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína p37 del PLPV. En gris se encuentran marcados los aminoácidos correspondientes al dominio R, en verde los del dominio S y en azul los del dominio P. Además, se muestran los aminoácidos básicos presentes en cada dominio en color amarillo, en negrita y subrayados.

MAAKDNPAVIAAVARREQWAIKLQSKGWGSLSKAQKATARSYGI
GNPPTVVVPRRTTRLVAGNPTNARRRGEPGNAKMGTTITKQEYM
GELHSSKIETYLLDPKNVRSFPQLSGLAIGYNKYKITDFKVRYSPK
CSDSECGLTIAYSDDSSDPPPKNKFNLFSMNHKYETAAHKPLLVTL
PVSKETRFLRDKCTDDSKLVDSGAVHVLVDGSHEGRLGELFFELTI
VFSEPTFCTHHSQVIKGLKESEGPEYVKVEPDKETVKLIFQAAGAY
LISIVASKLERIGQLGASEGDKLVVESTDKSACLCRIEAEQPGSAVV
LVYASREAITLRAYINKL