

Actividad antiviral de pequeños RNAs endógenos y supresión de silenciamiento génico por la proteína 16K del virus del cascabeleo del tabaco (TRV)

Lucía Martínez Priego
Director: César Llave Correas



Actividad antiviral de pequeños RNAs endógenos y supresión de silenciamiento génico por la proteína 16K del virus del cascabeleo del tabaco (TRV)

Lucía Martínez Priego

Director: César Llave Correas

Valencia, enero 2016

Esta tesis doctoral se ha realizado en el Departamento de Biología Medioambiental del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo la dirección del doctor César Llave Correas con la financiación de los proyectos GEN2003-20222 y BIO2006-13107 del Plan Nacional de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia/Ciencia e Innovación y del proyecto GR/SAL/0831/2004 de la Comunidad de Madrid.

“Vivez donc et soyez heureux, enfants chéris de mon coeur, et n'oubliez jamais que, jusqu'au fond où Dieu daignera dévoiler l'avenir à l'homme, toute la sagesse humaine sera dans ces deux mots : Attendre et espérer ! »

Le comte de Monte-Cristo
Alexandre Dumas

Aunque adicta a Alexandre Dumas nunca creí que mi frase favorita de la literatura pudiera aparecer en una tesis y mucho menos en la mía. Sin embargo y sin desmerecer el periplo de Edmon Dantès, acabar esta tesis ha sido toda una odisea que ha necesitado, además de trabajo obviamente, de grandes dosis de paciencia y de esperanza. Quiero agradecer a mi director César Llave por tener esas dos virtudes sumadas a su gran calidad científica. La cantidad de cosas que he aprendido de él y con él durante estos años constituyen el legado más valioso que podría obtener de esta etapa. Agradezco también a todos mis compañeros de laboratorio por el tiempo compartido, los conocimientos transvasados y la ayuda prestada. La ciencia nunca se construye sola y esa es de las cosas que la hace grande.

A nivel personal esta tesis tiene mucho de mucha gente. Quiero agradecer a todos aquellos que me han ayudado a escapar de If: a Loïc por su honestidad brutal y su amistad; a Ferran per somniar amb mi des de fa tants d'anys i encara; a Didac per ensenyar-me altres móns, el meu propi i per agafar plegats tranvies que no van enlloc; a Neus, Maria i Manuela perquè amb grans dones al teu costa tot és possible; a Albert per creure en mi; a Yolanda y Foro por adoptarme y hacerme manchega; a mi hermana, la artista creadora de la portada de esta tesis, por su valor y su cariño y a mi hermano por estar siempre ahí para mí.

A mis padres porque mi esfuerzo para escribir esta tesis no es nada comparado con el vuestro para conseguir que yo llegara hasta aquí. Lo vuestro sí que es trabajo, paciencia y esperanza y no lo de Edmon Dantès.

A mi marido Iñaki por hacerme infinitamente feliz todos los días.

Cavallers, ara va de bo...

INDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	25
1.1	EL VIRUS DEL CASCABELO DEL TABACO (TRV).....	27
1.1.1	Generalidades	27
1.2	TRV Y ARABIDOPSIS	30
1.3	SILENCIAMIENTO GÉNICO EN ARABIDOPSIS.....	34
1.3.1	Componentes principales de las rutas de silenciamiento en <i>A. thaliana</i>	29
a)	Proteínas DICER	37
b)	Proteínas RDR	39
c)	Proteínas AGO	41
1.3.2	Pequeños RNAs endógenos	47
a)	miRNAs	47
b)	siRNAs	51
1.4	SILENCIAMIENTO GÉNICO Y VIRUS	57
1.4.1	El silenciamiento génico como mecanismo antiviral en plantas	57
a)	DCL y silenciamiento antiviral	59
b)	RDR y silenciamiento antiviral	61
c)	AGO y silenciamiento antiviral	61
1.4.2	Silenciamiento de genes endógenos inducido por siRNAs de origen viral	65
1.4.3	Supresores de silenciamiento	66
a)	VSRs que inactivan o bloquean proteínas AGO.....	67
b)	VSRs que interfieren con la producción, estabilidad y/ensamblaje de siRNAs	69

c)	VSRs que bloquean la señal de amplificación del silenciamiento génico	71
d)	VSRs que inhiben la RdDM	71
e)	Efectos colaterales de la supresión del silenciamiento	72
1.4.4	TRV y silenciamiento	75
a)	TRV y silenciamiento.....	75
2	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	83
3	MATERIAL Y MÉTODOS	89
3.1	MATERIAL VEGETAL.....	91
3.2	AISLADOS VIRALES	92
3.3	INOCULACIÓN VIRAL POR TRV	93
3.4	CLONACIÓN Y MANTENIMIENTO DE CLONES.....	94
3.4.1	Cepas/estirpes bacterianas.....	94
3.5	PLÁSMIDOS EMPLEADOS PARA CLONACIÓN	96
3.5.1	Plásmidos base	96
3.5.2	Otras construcciones.....	98
3.6	CONSTRUCCIONES EMPLEADAS EN EXPRESIÓN TRANSITORIA.....	100
3.6.1	Clonación del pequeño RNA 38	100
3.6.2	Clonación de las secuencias precursoras de miRNAs	101
3.6.3	Clonación de las secuencias sensoras.....	101

3.6.4	Clonación de las proteínas de TRV.....	102
3.7	CONSTRUCCIONES EMPLEADAS EN ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE.....	103
3.7.1	Clonación de genes AGO 1, AGO2, AGO4 de <i>A. thaliana</i>	103
3.7.2	Clonación de TRV-16K.....	104
3.8	MANTENIMIENTO DE CLONES	106
3.9	MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA	107
3.9.1	Extracción de DNA total.....	107
3.9.2	Extracción de DNA plasmídico	107
3.9.3	Amplificación de DNA por PCR.....	108
3.9.4	Electroforesis en gel de agarosa	109
3.9.5	Elución de DNA a partir de agarosa	109
3.9.6	Marcaje radioactivo de sondas	109
3.10	MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA.....	112
3.10.1	Purificación de RNA.....	112
3.10.2	Fraccionamiento del RNA total	112
3.10.3	Transcripción inversa (RT).....	113
3.10.4	Dot Blot	114
3.10.5	Northern Blot	115
3.10.6	Northern Blot de RNA de bajo peso molecular.....	116
3.10.7	Análisis densitométrico de las señales de hibridación	117
3.10.8	5' RACE (Rapid Amplification of CDNA Ends).....	118
3.10.9	Análisis transcriptómico.....	119
3.10.10	Cuantificación de RNA mediante PCR en tiempo real	121
3.11	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	124
3.11.1	Extracción de proteínas del tejido vegetal.....	124
3.11.2	Análisis y manipulación de proteínas.....	124
	a) SDS-PAGE.....	124
	b) Inmunolectrotransferencia (Western Blot).....	125

3.11.3	Ensayos de inmunoprecipitación	126
a)	Inmunoprecipitación con proteína A-agarosa.....	126
b)	Inmunoprecipitación con HA-agarosa.....	128
3.12	UNIÓN <i>IN VITRO</i> PROTEÍNA-siRNAs	129
3.12.1	Marcaje y anillamiento de RNAs sintéticos.....	129
3.12.2	Ensayo de unión a RNA	130
4	RESULTADOS	131
4.1	miRNAs Y DEFENSA ANTIVIRAL	133
4.1.1	Reconocimiento y procesamiento de secuencias virales por miRNAs.....	133
a)	Requerimientos estructurales y termodinámicos en la interacción entre miRNAs y sus RNAs dianas	134
b)	Identificación de sRNAs endógenos con potencial de interaccionar con secuencias virales	138
c)	Evaluación del reconocimiento y procesamiento de las dianas virales por miRNAs.....	145
4.1.2	Análisis del título viral en mutantes <i>dcl1</i>	159
4.2	IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA SUPRESORA DE SILENCIAMIENTO DE TRV	161
4.2.1.	Identificación del supresor de silenciamiento del TRV	161
4.2.2	Caracterización del modo de acción de la proteína supresora 16K170	
a)	TRV y la iniciación del silenciamiento.....	171
b)	Efecto sobre la acumulación de siRNAs.....	179
c)	Capacidad de unión de siRNAs	182
d)	Capacidad de unión de siRNAsin planta	183
e)	Capacidad de unión de siRNAs in vitro.....	185

f)	Capacidad de estabilización del dúplex miRNA/miRNA*	187
g)	Capacidad de unión de proteínas AGO	189
h)	Efecto sobre la amplificación de la respuesta de silenciamiento	199
4.2.3	Efecto de la proteína supresora 16K sobre la dispersión del silenciamiento génico.....	204
a)	Efecto sobre el movimiento célula a célula de la señal de silenciamiento	204
b)	Efecto sobre el movimiento a larga distancia de la señal de silenciamiento	207
4.2.4	Caracterización molecular de la proteína 16K de TRV	210
4.3	EFFECTO DE LA INFECCIÓN DE TRV en <i>A. thaliana</i> SOBRE EL METABOLISMO DE miRNAs	215
4.3.1	Efecto sobre la acumulación y expresión de miRNAs	216
a)	Efecto sobre la expresión de genes MIRNA	216
b)	Efecto sobre la acumulación de miRNAs maduros.....	218
4.3.2	Efecto sobre el procesamiento de mRNAs diana.....	222
a)	Análisis del procesamiento de SCL6-IV por miR171 en plantas infectadas	222
b)	Análisis del procesamiento de dianas de miRNAs en plantas infectadas con TRV	226
c)	Análisis de los niveles de mRNAs dianas de miRNAs en plantas infectadas	227
5	DISCUSIÓN.....	231
6	CONCLUSIONES.....	249
7	BIBLIOGRAFIA	253

RESUMEN

En las infecciones por virus, el desenlace del proceso infectivo debe entenderse como el resultado neto de las interacciones compatibles y de defensa entre el virus y la planta hospedadora. Cuando un virus entra en una célula eucariota debe lidiar con la activación de diferentes mecanismos de defensa del huésped. El silenciamiento génico mediado por RNA constituye una primera línea de defensa innata de la planta, siendo los propios virus inductores, dianas y supresores de este sistema de defensa. Las plantas a través del silenciamiento génico son capaces de limitar la proliferación viral en las células infectadas permitiendo un delicado equilibrio entre la multiplicación del virus y la integridad celular. Sobre este equilibrio se fundamenta la relación de compatibilidad en la interacción planta-virus. En este escenario, los virus utilizan sus proteínas supresoras de silenciamiento (VSR) para modular los efectos antivirales del silenciamiento y reprogramar la expresión génica del huésped proporcionando un entorno favorable para el desarrollo de la infección compatible

Con este trabajo hemos abordado el modo en que los virus interactúan con el silenciamiento génico en el contexto de una infección compatible. Empleando el virus del cascabeleo del tabaco (TRV) como sistema viral y *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana* como modelos de huésped, hemos indagado en el potencial de los pequeños RNAs (sRNAs) endógenos para guiar procesos de silenciamiento sobre secuencias virales. Nuestros resultados sugieren la posibilidad de interacciones funcionales entre microRNAs (miRNAs) y secuencias complementarias en el genoma del virus, si bien su relevancia como mecanismo

de control de la proliferación viral no se ha estudiado en este trabajo. La manera en que TRV interacciona con la ruta de silenciamiento está condicionada por el efecto supresor de la proteína 16K. Esta proteína impide, al menos parcialmente, el ensamblaje de los complejos efectores de silenciamiento y puede por tanto comprometer el efecto del silenciamiento antiviral dependiente de sRNAs tanto virales (vsiRNAs) como endógenos. El efecto supresor de TRV no parece perturbar globalmente el contenido, composición relativa y actividad de los miRNAs, si bien no es descartable que induzca alteraciones en el metabolismo de especies concretas.

RESUM

En les infeccions per virus, el desenllaç del procés infectiu ha d'entendre's com el resultat net de les interaccions compatibles i de defensa entre el virus i la planta hoste.

Quan un virus entra a una cèl·lula eucariota ha de lluitar amb l'activació de diferents mecanismes de defensa de l'hoste. El silenciament gènic per RNA constitueix una primera línia de defensa innata de la planta, i els propis virus són inductors, dianes i supressors d'aquest sistema de defensa. Les plantes a través d'aquest silenciament, són capaces de limitar la proliferació viral a les cèl·lules infectades, permetent un delicat equilibri entre la multiplicació del virus i la integritat cel·lular. En aquest equilibri es fonamenta la relació de compatibilitat existent a la interacció planta-virus. En aquest escenari, els virus utilitzen les seues proteïnes supressores de silenciament (VSR) per tal de modular els efectes antivirals del silenciament i reprogramar l'expressió gènica de l'hoste, proporcionant un entorn favorable per al desenvolupament de la infecció compatible.

Amb aquest treball hem abordat la manera en la que els virus interaccionen amb el silenciament gènic en el context d'una infecció compatible. Emprant el virus del cascavalleig del tabac (TRV) com a sistema viral i *Nicotiana benthamiana* i *Arabidopsis thaliana* com a hostes models, hem indagat en el potencial dels RNAs endògens curts de doble cadena (sRNAs) per guiar processos de silenciament sobre seqüències virals. Els nostres resultats suggereixen la possibilitat de interaccions funcionals entre microRNAs (miRNAs) i seqüències

complementàries al genoma del virus, tot i que la seua rellevància com a mecanisme de control de la proliferació viral no ha estat tractat en aquest treball.

La manera en la que TRV interacciona amb les rutes de silenciament es troba condicionada per l'efecte supressor de la proteïna 16K. Aquesta proteïna impedeix, al menys parcialment, l'acoblament dels complexos efectors del silenciament i pot llavors comprometre l'efecte del silenciament antiviral depenent de sRNAs, tant virals (vsiRNAs) com endògens.

L'efecte supressor de TRV no sembla pertorbar globalment el contingut, composició relativa i activitat dels miRNAs, , tot i que no es pot descartar que induïska alteracions en el metabolisme d'espècies concretes.

ABSTRACT

During viral infections, the outcome of the infective process is a net balance between the compatible and defence interactions. When a virus infects the eukaryotic cell, it must deal with different host defence mechanisms among which RNA silencing is part of the initial plant innate defence response. RNA silencing in plants has the role of restraining viral proliferation in the infected cell and therefore regulates the equilibrium between viral load and plant cell integrity that is key for the plant-virus compatibility. The virus itself is inductor, target and suppressor of the RNA silencing in plants. Viral silencing suppressor proteins (VSR) counteract host antiviral silencing and modify the host gene expression programme to generate a permissive environment for compatible infections.

In this PhD thesis we have studied the interface between viral and plant RNA silencing in the context of a compatible infection. Using Tobacco rattle virus (TRV) as a model viral system and *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana* as host model systems, we have dissected the role of endogenous small RNAs to promote gene silencing responses to viral sequences. Our results point to possible functional interactions between miRNAs and complementary sequences in viral genomes even though the role of those interactions as a viral proliferation controls mechanisms is not part of this thesis. We have found that TRV 16K silencing suppressor protein effects play a central role to dictate the way the TRV and plant RNA silencing interact. The 16K protein avoids, partially, the assembly of silencing effectors complexes and thus compromises the impact of antiviral vsRNAs-mediated and endogenous small RNAs-mediated RNA silencing. The

suppressor effect of TRV does not have a significant impact on the miRNAs content, relative composition and activity although we cannot discard an effect on the metabolisms of some particular miRNA species.

ABREVIATURAS

A	Adenina
ADK	Adenosina kinasa
AGO	ARGONAUTA
amiRNAs	miRNAs artificiales
AMV-RT	Transcriptasa inversa (<i>Avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase</i>)
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Citosina
c.p.m.	Cuentas por minuto
ca-siRNA	Pequeño RNA interferente en cis (<i>cis-acting small interfering RNA</i>)
cDNA	DNA complementario
CIAP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera (<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>)
CMT3	Metiltransferasa (<i>Chromomethylase 3</i>)
Col-0	Columbia-0
CP	Proteína de la cápsida
dcSAM	SAM descarboxilada
D.O.	Densidad óptica
d.p.a.	Días post agroinfiltración
d.p.i.	Días post inoculación
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanidina trifosfato

DRB	Proteína de unión a doble cadena de RNA (<i>Double-stranded RNA binding</i>)
DRD1	<i>Defective in RNA-directed DNA methylation 1</i>
DRM1/2	Metiltransferasa (<i>Domains rearranged methyltransferase 1/2</i>)
dsDNA DNA)	Doble cadena de DNA (<i>double-stranded</i>)
dsRNA	Doble cadena de RNA (<i>double-stranded RNA</i>)
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxitimina trifosfato
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
EtBr	Bromuro de etidio
EtOH	Etanol
G	Guanina
g	Gravedad
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>Green fluorescent protein</i>)
HEN1	Metiltransferasa (<i>Hua enhancer methyltransferase 1</i>)
HMW-RNA	RNA de alto peso molecular (<i>high molecular weight RNA</i>)
HYL1	<i>Hyponastic leaves 1</i>
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
La.er.	Landsberg erecta
LB	Medio Luria-Bertani
LMW-RNA	RNA de bajo peso molecular (<i>low molecular weight RNA</i>)
mA	Miliamperios
MES	Ácido 2-N-morfolino-etanosulfónico
MET1	Metiltransferasa (<i>DNA methyltransferase 1</i>)
Min	Minutos
miRNA	microRNA

MOPS	3-morfolino-propano-sulfónico
MP	Proteína de movimiento
mRNA	RNA mensajero
nat-siRNA	Pequeño RNA interferente derivado de transcritos naturales antisentido (<i>natural antisense transcript small interfering RNA</i>)
nm	Nanómetro
NOS	Nopalina sintasa
NRPD1	RNA polimerasa (<i>Nuclear RNA Polymerase D1</i>)
NSL	Señal de localización nuclear (<i>Nuclear localization signal</i>)
Nt/nts	Nucleótido/s
ORF	Marco de lectura abierto (<i>open reading frame</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDS	Fitoeno desaturasa
PNK	Polinucleótido quinasa
pre-miRNA	Precursor de microRNA (<i>precursor microRNA</i>)
pri-miRNA	Transcrito primario de microRNA (<i>primary microRNA transcript</i>)
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
REP	Proteína asociada a la replicación (<i>Replication associated protein</i>)
PTGS	Silenciamiento génico postranscripcional (<i>posttranscriptional gene silencing</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>reactive oxygene species</i>)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RDR	RNA polimerasa dependiente de RNA (referido a proteínas de la planta)
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA (referido a proteínas virales)
RISC	Complejo inductor de silenciamiento por RNA (<i>RNA-induced silencing</i>)

	<i>complex)</i>
RIST	Complejo inductor de silenciamiento transcripcional por RNA (<i>RNA induced transcriptional silencing</i>)
RLM-RACE	Amplificación de extremos del RNA mediada por la RNA ligasa (<i>RNA ligase-mediated rapid amplification of RNA ends</i>)
RT	Transcripción inversa (<i>reverse transcription</i>)
SAM	S-adenosil-metionina
SAMDC1	S-adenosil-metionina descarboxilasa 1
SDS	Dodecil sulfato sódico
sgRNA	RNA subgenómico
siRNA	Pequeño RNA interferente (<i>small interfering RNA</i>)
sRNA	Pequeño RNA (<i>small RNA</i>)
ssDNA	Cadena sencilla de DNA (<i>single-stranded DNA</i>)
ssRNA	Cadena sencilla de RNA (<i>single-stranded RNA</i>)
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
ta-siRNA	Pequeño RNA interferente que actúa en trans (<i>trans-acting small interfering RNA</i>)
TBE	Tris-borato-EDTA
TGS	Silenciamiento génico transcripcional (<i>Transcriptional gene silencing</i>)
U	Uridina o Unidades
UTR	Región no traducible (<i>untranslated region</i>)
V	Voltios
VIGS	Silenciamiento génico inducido por virus (<i>virus-induced gene silencing</i>)
vsRNA	Pequeño RNA viral (<i>viral small RNA</i>)
VSR	Supresor viral del silenciamiento por RNA (<i>viral suppressor of RNA silencing</i>)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico
³² P	Fósforo 32

ACRONIMOS DE VIRUS Y VIROIDES

ACMV	Virus del mosaico de la mandioca (<i>African cassava mosaic virus</i>)
BCTV	Virus de la copa rizada de la remolacha (<i>Beet curly top virus</i>)
BMV	Virus del mosaico del bromo (<i>Brome mosaic virus</i>)
BSCTV	Virus de la copa rizada grave de la remolacha (<i>Beet severe curly top virus</i>)
BSMV	Virus del mosaico estriado de la cebada (<i>Barley stripe mosaic virus</i>)
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor (<i>Cauliflower mosaic virus</i>)
CMV	Virus del mosaico del pepino (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
MyMV	Virus del mosaico amarillo del frijol mungo (<i>Mungbean yellow mosaic virus</i>)
ORMV	Virus del mosaico de la colza (<i>Oilseed rape mosaic virus</i>)
PCV	Virus del macizo del cacahuete (<i>Peanut clump virus</i>)
PEBV	Virus del bronceado temprano del guisante (<i>Pea early browning virus</i>)
PepRSV	Virus de la mancha de anillo del pimiento (<i>Pepper ringspot virus</i>)
PLMVd	Viroide del mosaico latente del melocotón (<i>Peach latent mosaic viroid</i>)
PoLV	Virus latente del Pothos (<i>Pothos latent virus</i>)
PPV	Virus de la Sharka (<i>Plum pox virus</i>)
PVX	Virus X de la patata (<i>Potato virus X</i>)

PVY	Virus Y de la patata (<i>Potato virus Y</i>)
RDV	Virus del enanismo del arroz (<i>Rice dwarf virus</i>)
RSV	Virus del rayado del arroz (<i>Rice stripe virus</i>)
RYSV	Virus del enanismo amarillo del arroz (<i>Rice yellow stunt virus</i>)
SBWMV	Virus del mosaico del trigo transmitido por el suelo (<i>Soilborne wheat mosaic virus</i>)
SPCSV	Virus del enanismo clorótico de la patata (<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i>)
TBSV	Virus del enanismo ramificado del tomate (<i>Tomato bushy stunt virus</i>)
TCV	Virus del arrugamiento del nabo (<i>Turnip crinkle virus</i>)
TEV	Virus del grabado del tabaco (<i>Tobacco etch virus</i>)
TMV	Virus del mosaico del tabaco (<i>Tobacco mosaic virus</i>)
ToRSV	Virus de las manchas anulares de tomate (<i>Tomato ringspot virus</i>)
TuMV	Virus del mosaico del nabo (<i>Turnip mosaic virus</i>)
TRV	Virus del cascabeleo del tabaco (<i>Tobacco rattle virus</i>)
TYLCV	Virus del rizado amarillo del tomate (<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>)

1 INTRODUCCIÓN

1.1 EL VIRUS DEL CASCABELO DEL TABACO (TRV)

1.1.1 Generalidades

El virus del cascabeleo del tabaco (TRV) pertenece junto con el virus del bronceado temprano del guisante (PEBV) y el virus de la mancha de anillo del pimiento (PepRSV) al género *Tobravirus*. Estos virus forman partículas cilíndricas rígidas de 22 nm de diámetro y de dos longitudes diferentes, 190 y 50–115 nm (MacFarlane, 1999) (Figura 1A). Su genoma es bipartito, compuesto por dos hebras de ssRNA de cadena positiva (Hamilton *et al.*, 1987). El RNA más largo (RNA1, 6,8 kb aproximadamente) codifica 4 cuadros de lecturas abiertas (*Open Reading frame*, ORF) y está ampliamente conservado entre especies. En el TRV el ORF más cercano al extremo 5' codifica una proteína de 134 kDa con motivos metiltransferasa y helicasa (Hamilton *et al.*, 1987). Un salto de lectura del codón de terminación de este ORF produce una proteína de 194 kDa con un motivo RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) en su porción C terminal. El siguiente ORF (1a) en el RNA1 codifica la proteína de movimiento de 29 kDa, seguida del ORF 1b que codifica una proteína de 16 kDa rica en cisteína que actúa como supresor de silenciamiento (Ziegler-Graff *et al.*, 1991; H., Liu *et al.*, 2002). La helicasa y la RdRp son transcritas directamente del RNA1, mientras que los genes 1a y 1b son transcritos a partir de RNAs subgenómicos (Macfarlane, 2010). El segundo RNA es más corto y poco conservado, mostrando una baja identidad de secuencia tanto entre especies como entre aislados de TRV. Este RNA codifica la proteína de la cápsida (CP) y las proteínas 2b y 2c implicadas en la transmisión del virus por

Introducción

nematodos (Figura 1B) (Valentine, 2004). Todos los genes del RNA2 se transcriben a través de RNAs subgenómicos. Una característica de TRV es que el RNA1 es capaz de replicarse y dispersarse por la planta hospedadora en ausencia del RNA2 en lo que se denomina como infección no multiplicativa (NM) (MacFarlane, 1999).

De entre todos los *Tobravirus*, el TRV es sin duda el más conocido tanto debido a su papel como patógeno como a su utilización como herramienta para la investigación en genética molecular (Macfarlane, 2010). Como patógeno el TRV posee un rango de huéspedes muy amplio pudiendo infectar tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Ghazala and Varrelmann, 2007; Macfarlane, 2010). De entre todos ellos resulta especialmente patógeno en patata produciendo arcos necróticos profundos en la carne del tubérculo que pueden transparentarse a través de la piel (Figura 1A). Los síntomas foliares son sin embargo infrecuentes, y consisten en un moteado intenso que afecta a parte de los tallos de la mata (*one-stem mottle*). Dependiendo del cultivar de patata lo podemos encontrar (Ghazala and Varrelmann, 2007): i) en cultivares resistentes que no muestran síntomas, ii) en cultivares susceptibles sintomáticos en los cuales normalmente el virus se encuentra restringido a los tubérculos y tan sólo se recupera el RNA1 (infección NM), iii) en cultivares totalmente susceptibles que no muestran síntomas y en los que se recuperan los dos RNAs. Su transmisión en la naturaleza se realiza a través de nematodos tricodóridos del género *Trichodorus* sp. La especie del vector está ligada al aislado del virus presente y por ello su epidemiología está ligada al suelo (Macfarlane, 2010).

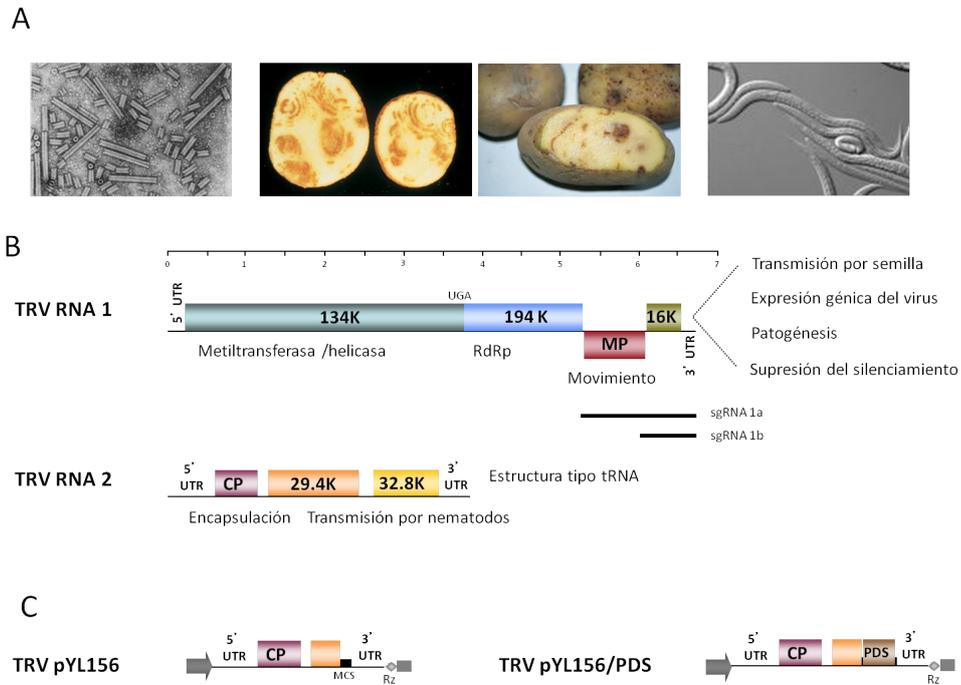


Figura 1: **El sistema TRV.** A) Partículas de TRV y de los nematodos transmisores al microscopio electrónico y síntomas de su infección en patata. B) Estructura y organización genómica. C) TRV como vector de silenciamiento (para una descripción detallada ver apartado 1.4.3).

1.2 TRV Y ARABIDOPSIS

TRV infecta plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0 en condiciones naturales en ausencia de alteraciones evidentes en el crecimiento y desarrollo de la planta (Fernández-Calvino *et al.*, 2015). Sin embargo toda infección compatible es un proceso controlado con dos actores, el virus que se apropia de funciones celulares para replicarse y moverse por la planta, y la planta que responde reprogramando su expresión génica y su contenido metabólico para restringir la infección así como para contrarrestar los potenciales efectos adversos causados por el virus (Whitham *et al.*, 2006). Por tanto, aunque esta interacción planta-virus no es patogénica sí que lleva implícita cambios dinámicos en el metabolismo y fisiología del hospedador que afectan a un amplio rango de procesos celulares y que contribuyen de forma notable a modular la susceptibilidad a la infección. La infección por TRV en *Arabidopsis* conlleva importantes alteraciones en el metabolismo primario que reflejan un proceso de aclimatación metabólica a través de la acumulación de múltiples metabolitos con funciones en la respuesta al estrés (Fernandez-Calvino *et al.*, 2014). Este conjunto de respuestas de la planta resultan esenciales para modelar el desenlace de la interacción planta-virus. Por ejemplo, TRV provoca en hojas de *Arabidopsis* un incremento sustancial en los niveles de putrescina y de los transcritos de los genes *ADC1* y *ADC2* implicados en su biosíntesis. La putrescina es esencial para la aclimatación de *Arabidopsis* al frío (Cuevas *et al.*, 2008), de modo que su acumulación en plantas infectadas con TRV favorece una mayor tolerancia a la congelación respecto a las plantas no infectadas. Los mutantes de *Arabidopsis* *adc1* y *adc2*, defectivos en la síntesis de

esta poliamina, son hipersusceptibles a TRV lo que sugiere que la putrescina actúa como molécula señalizadora en la defensa antiviral (Fernandez-Calvino *et al.*, 2014).

En hojas infectadas con TRV se manifiestan alteraciones significativas en el metabolismo de proteínas que se ilustran con la represión de genes ribosomales así como un incremento de transcritos codificando componentes de la ruta de degradación mediada por la ubiquitina y el proteosoma (Fernandez-Calvino *et al.*, 2014). Además, en plantas infectadas con TRV se acumulan aminoácidos precursores en la síntesis de compuestos antimicrobianos o con propiedades osmoprotectoras que también podrían incrementar la tolerancia al estrés ocasionado por el virus en las células infectadas. La acumulación de intermediarios en la fotorespiración como serina y glicina a tiempos tempranos de la infección podría estar relacionada con la represión transcripcional de la fotorespiración observada en hojas infectadas (Timm *et al.*, 2013). TRV induce la expresión de DIN4, una enzima implicada en el metabolismo de los aminoácidos ramificados (Binder, 2010). La inactivación genética de esta ruta reduce la proliferación de TRV de modo que es posible que el virus, dado que DIN4 participa en la producción de acetyl-CoA, active esta ruta para potenciar la producción de energía (Binder, 2010).

La infección por TRV tiene también un efecto significativo en el metabolismo de carbohidratos. En los periodos de máxima acumulación viral (~8 dpi) se observa en las hojas infectadas un aumento considerable en la concentración de azúcares solubles (Fernandez-Calvino *et al.*, 2014). Este aumento de azúcares, fundamentalmente hexosas, podría explicar la regulación negativa de genes

Introducción

relacionados con la fotosíntesis y la biosíntesis de clorofila que se observa durante la infección (Bolton, 2009). Buena parte de los azúcares de respuesta a TRV se acumulan abundantemente en otras interacciones planta-patógeno (Bolouri Moghaddam and Van den Ende, 2012). De hecho, su acumulación parece desempeñar un papel clave durante la infección al servir como fuente de energía y esqueletos de carbonos para la síntesis de compuestos de defensa. Además actúan como moléculas señalizadoras en respuestas de defensa y en el mantenimiento de la homeostasis celular (Berger *et al.*, 2007; Bolouri Moghaddam and Van den Ende, 2012). Por ejemplo, la acumulación de moléculas detoxificadoras como rafinosa y galactinol puede contribuir a aliviar el estrés asociadas a la producción de especies reactivas de oxígeno (reactive oxygene species, ROS) durante la infección (Nishizawa *et al.*, 2008).

La interferencia de TRV con el metabolismo de lípidos y ácidos grasos es también relevante durante la infección en *Arabidopsis* (Fernandez-Calvino *et al.*, 2014). Por ejemplo, la represión de varios genes críticos en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga y de ácidos grasos cloroplásticos que se observa en hojas infectadas parece facilitar la acumulación de TRV tal como sugiere el incremento de RNAs virales en plantas defectivas para esta ruta. Por otra parte, la infección por TRV estimula la acumulación de oleato-desaturasa FAD2 y el consiguiente incremento de ácido linoleico (y descenso de ácido linolénico) en diversas clases de lípidos cloroplásticos. Esta respuesta parece condicionar notablemente el curso de la infección por TRV puesto que los mutantes de pérdida de función *fad2* son menos susceptibles a TRV que las plantas silvestres. La actividad de FAD2 en la síntesis de ácidos grasos poli-insaturados parece ser crítica en ciertas

interacciones planta-patógeno (Kirsch *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004). Se ha sugerido que la acumulación de ácidos grasos poli-insaturados podría compensar la pérdida de lípidos de membrana que resultan hidroxperoxidados en respuesta a ROS durante la infección (García-Marcos *et al.*, 2009; Díaz-Vivancos *et al.*, 2008).

Aproximadamente el 60% de los genes de *Arabidopsis* estimulados por TRV se encuentran inducidos también durante la senescencia asociada al estrés (Fernández-Calvino *et al.*, 2015) (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). La senescencia es un proceso de muerte celular programada que ocurre en respuesta a estímulos o señales físicas, fisiológicas y hormonales (Lin and Wu, 2004). Este fenómeno de activación de genes de senescencia está bien descrito en infecciones por diversos patógenos pero sin embargo su relevancia en el contexto de la infección es desconocida (Quirino *et al.*, 1999). Un trabajo reciente ha demostrado que dos genes marcadores de senescencia, *Dark-inducible 6 (DIN6)* y *(DIN11)* son importantes moduladores de susceptibilidad en la infección por TRV (Fernández-Calvino *et al.*, 2015). En plantas de líneas transgénicas RNAi de *Arabidopsis* defectivas en *DIN11* se observa una disminución del título viral tanto en preparaciones de protoplastos como en hojas infectadas a tiempos tempranos de la infección. Esto sugiere que *DIN11* podría facilitar la replicación de TRV en la célula infectada. *DIN6* parece ser irrelevante para la infección en *Arabidopsis*, posiblemente debido a la existencia de al menos tres homólogos funcionales en esta especie (Lam *et al.*, 1998). Sin embargo, si resulta crítico para TRV en *N. benthamiana* puesto que el silenciamiento de este gen conlleva una reducción dramática en los niveles de acumulación viral y a la aparición de deformaciones en las hojas superiores de la planta. No obstante, no está claro cuál es la contribución

Introducción

de estos genes durante la infección más allá de lo que pueda inferirse a partir de las funciones predichas para ellos. Si bien la sobreexpresión de genes de senescencia se describió inicialmente durante la respuesta hipersensible asociada a interacciones incompatibles con hongos y bacterias o frente a patógenos que causan necrosis (Pontier *et al.*, 1999; Schenk *et al.*), el estrés celular, más que la muerte celular, parece ser el punto de convergencia que explique la inducción de genes *DIN* y otros genes asociados a la senescencia durante la infección por TRV y otros virus (Fernández-Calvino *et al.*, 2015; Espinoza *et al.*, 2007; Gepstein *et al.*, 2003).

1.3 SILENCIAMIENTO GÉNICO EN ARABIDOPSIS

El silenciamiento génico es un complejo sistema de regulación génica que en plantas controla procesos de crecimiento y desarrollo, estabilidad genómica, adaptación a condiciones de estrés y defensa frente a patógenos (Brodersen and Voinnet, 2006; Chapman *et al.*, 2004). Este sistema está dirigido por pequeñas moléculas de RNA (*small RNAs*, sRNAs) de 21 a 25 nucleótidos (nts) de tamaño, que guían al silenciamiento de genes específicos a nivel post-transcripcional (*posttranscriptional gene silencing*, PTGS) o transcripcional (*Transcriptional gene silencing*, TGS) (Baulcombe, 2004). El silenciamiento se activa en respuesta a RNAs de doble cadena (dsRNAs) o de RNAs de cadena sencilla (ssRNAs) con una estructura secundaria compleja (Figura 2). Estas moléculas son reconocidas y procesadas por ribonucleasas (RNAsas) de tipo III denominadas *Dicer* (en plantas

Dicer-like, DCL) en dúplex de RNAs de 20 a 24 nts de longitud que son estabilizados por la metilación en sus extremos 3' hidroxilos por la metiltransferasa HUA ENHANCER 1 (HEN1) (Bologna and Voinnet, 2014). Los sRNAs actúan asociándose a los complejos efectores de silenciamiento a través de su unión con las proteínas ARGONAUTA (AGO) proporcionándoles especificidad por sus moléculas de DNA o RNA diana a través de mecanismos dependientes de homología de secuencia (Vaucheret, 2008). La interacción funcional de estos complejos efectores con las moléculas de RNA diana conduce a una regulación post-transcripcional negativa a través del corte endonucleolítico de este RNA (Figura 2) o de la represión de su traducción (Brodersen *et al.*, 2008; Llave, Xie, *et al.*, 2002). La interacción con las moléculas de DNA diana da lugar a su represión transcripcional a través de la modificación por metilación del DNA y/o las histonas (Zheng *et al.*, 2007; Zilberman *et al.*, 2003; Baulcombe, 2015) La biogénesis y/o carga de los sRNAs en proteínas AGO se facilita gracias a la actividad de una proteína de unión a dsRNA (*dsRNA-binding protein*, DRB) que interacciona directamente con DCL (Li and Ding, 2006). Además, en plantas, hongos y nematodos el silenciamiento requiere de la actividad de RNA polimerasas celulares dependientes de RNA (*RNA-dependent RNA polymerases*, RDRs) que generan precursores de RNA bicatenario a partir de RNAs molde de cadena sencilla (Voinnet, 2008). Las enzimas RDR son esenciales en la formación de sRNAs secundarios que refuerzan el efecto del silenciamiento génico iniciado por los inductores primarios (Wassenegger and Krczal, 2006). Los sRNAs actúan además como elementos móviles de silenciamiento desplazándose entre células adyacentes a través de los plasmodesmos o a larga distancia usando los haces

Introducción

vasculares del floema (Melnik *et al.*, 2011; Molnar *et al.*, 2011). Algunos miRNAs y siRNAs de 21 nts pueden promover la degradación de mRNAs dianas en tejidos distantes (Pant *et al.*, 2008; Carlsbecker *et al.*, 2010; Chitwood *et al.*, 2009) mientras que los siRNAs de 24 nts activan mecanismos de metilación del DNA (Molnar *et al.*, 2010).

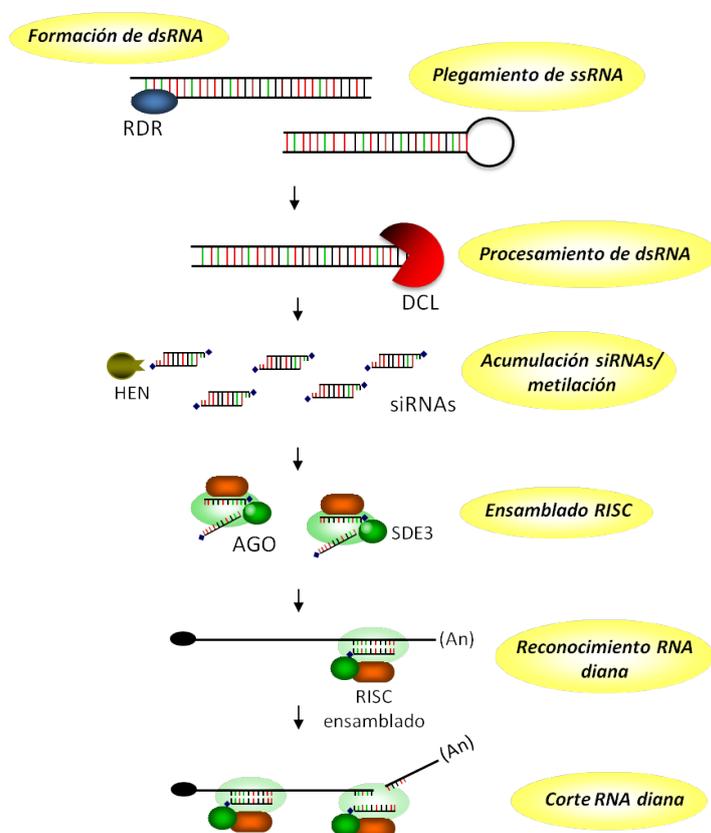


Figura 2: Representación esquemática del proceso de silenciamiento post-transcripcional en plantas.

1.3.1 Componentes principales de las rutas de silenciamiento en *A. thaliana*

a) Proteínas DICER

Las proteínas DICER o DCL son ribonucleasas de clase III que procesan secuencialmente los extremos del dsRNA para producir sRNAs maduros de 20 a 28 nts de longitud (MacRae, 2006; MacRae *et al.*, 2007). Estos productos de corte poseen dos nucleótidos no apareados en el extremo 3', un grupo 5' monofosfato y un grupo hidroxilo en 3' (Elbashir *et al.*, 2001). Estas proteínas poseen un dominio N-terminal DExD helicasa/ATPasa, un pequeño dominio DUF283, un dominio PAZ, dos dominios catalíticos RNasa III (RNasa IIIa y RNasa IIIb) y un dominio C-terminal de unión a dsRNA (dsRBD) (Margis *et al.*, 2006; MacRae, 2006) (Figura 3A).

Dicer actúa como un calibre molecular que determina la longitud de cada sRNA en función la distancia entre los dominios PAZ y RNasa IIIa (Figura 5). Esta característica se asocia con la actividad catalítica de las distintas enzimas DCL en la formación de sRNAs de 21 nts (DCL1 y DCL4), 22 nts (DCL2) y 23-25 nts (DCL3) (Fahlgren *et al.*, 2007). DCL1 es el enzima responsable del procesamiento secuencial de RNAs mensajeros primarios (pri-miRNAs) de genes *MIRNA* y de la síntesis de microRNAs (Kurihara and Watanabe, 2004). Esta enzima conserva la arquitectura molecular típica de las enzimas DICER con la salvedad de poseer un segundo dominio dsRBD. Este dominio, que también se encuentra en DCL3 y DCL4, promueve su localización nuclear junto con otros factores implicados en la biogénesis de miRNAs (Burdisso *et al.*, 2012; Fang Spector, D.L, 2007). DCL1 es

Introducción

regulado negativamente a nivel post-transcripcional por dos miRNAs, miR162 y miR838 (Rajagopalan *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2003). DCL2, DCL3 y DCL4 por su parte procesan sustratos largos de dsRNA de apareamiento casi perfecto en poblaciones de sRNAs de 22, 24 y 21 nts respectivamente (Henderson *et al.*, 2006). DCL3 actúa principalmente en TGS mediado por sRNAs de 24nts de transposones y repeticiones de DNA (Pontes *et al.*, 2006). DCL4 está implicada en PTGS mediado por sRNA de 21 nts y en la biosíntesis de *trans*-acting siRNA (tasiRNA). DCL2 y sus productos de 22 nts actúan tanto en TGS como en PTGS (Jauvion *et al.*, 2012). Estudios genéticos indican que si bien DCL2, DCL3 y DCL4 presentan especificidad de sustrato, sus productos génicos son intercambiables funcionalmente (Bologna and Voinnet, 2014).

Las proteínas DCL de plantas forman un grupo monofilético generado tras la separación entre plantas y animales y antes de la divergencia entre monocotiledóneas y dicotiledóneas hace 150 millones de años (Henderson *et al.*, 2006) (Figura 3B). El estudio de los patrones de expresión de las proteínas DCL de *A. thaliana* muestra que los genes DCL se expresan constitutivamente en todos los tejidos analizados. Sin embargo, cada gen DCL se expresa de manera diferencial, por ejemplo, durante el desarrollo de los órganos reproductivos de la flor y el desarrollo de la semilla (Liu *et al.*, 2009).

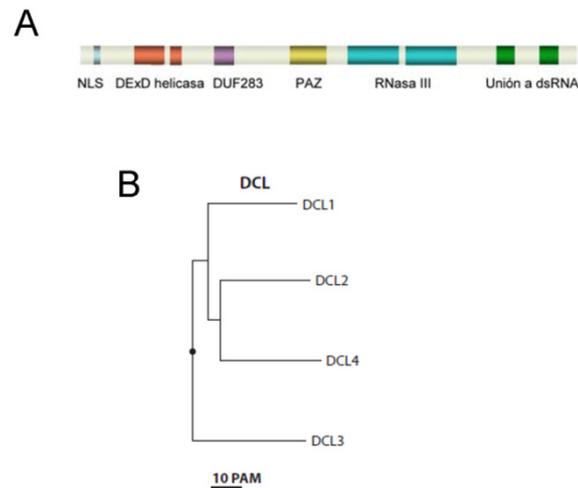


Figura 3: **Estructura y filogenia de las proteínas DICER en Arabidopsis.** A) Representación esquemática de los dominios estructurales de la proteína DCL1 de *A. thaliana*. B) Filogenia de las distintas proteínas DICER en Arabidopsis en cuatro clados. PAM indica el punto aceptado de mutación (Adaptada de Vaucheret, 2008).

b) *Proteínas RDR*

El término RDR se usa para designar enzimas con actividad RNA polimerasa dirigida por RNA (Wassenegger and Krczal, 2006). Estas proteínas generan precursores de RNA bicatenario a partir de ssRNAs molde que sirven a su vez como sustrato para que las proteínas DCL2, DCL3 y DCL4 produzcan sRNAs (Figura 4A) (Wassenegger and Krczal, 2006). En Arabidopsis se han identificado 6 genes que potencialmente codifican proteínas RDR. Tres de estas proteínas, RDR1, RDR2 y RDR6, poseen en el extremo C-terminal un motivo catalítico DLDGD que se

Introducción

encuentra en otras proteínas RdRp eucariotas (Figura 4A, 4B). Estudios bioquímicos utilizando las proteínas RDR1 de tomate y RDR6 de *Arabidopsis* demuestran que estas dos proteínas poseen actividad RNA polimerasa dependiente de RNA sobre sustratos de ssRNA. Es decir, son capaces de hacer una copia completa del molde de ssRNA dando lugar a dsRNAs ya que el RNA sintetizado *de novo* permanece unido al RNA molde (Curaba and Chen, 2007; Schiebel *et al.*, 1998; Dalmay *et al.*, 2001; Mourrain *et al.*, 2000). Las otras tres proteínas identificadas, RDR3, RDR4 y RDR5 poseen en el centro catalítico un motivo DFDGD y se agrupan en un clado filogenético distinto. Su función es desconocida hasta el momento (Wassenegger and Krczal, 2006).

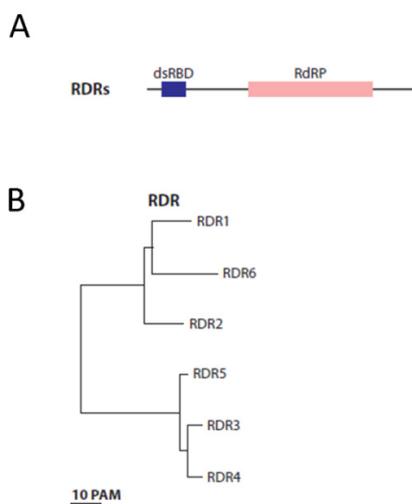


Figura 4: **Estructura y filogenia de las proteínas RDR en *Arabidopsis*.** A) Representación esquemática de los dominios estructurales de las proteínas RDR de *A. thaliana*. B) Filogenia de las distintas proteínas RDR en *Arabidopsis* en cuatro clados. PAM indica el punto aceptado de mutación (Adaptada de Vaucheret, 2008).

c) *Proteínas AGO*

Las proteínas AGO ejercen como efectores del silenciamiento como parte de complejos multienzimáticos donde los sRNAs actúan como determinantes de especificidad (Mallory and Vaucheret, 2010). Estos complejos, denominados RISC o RIST (*RNA-induced transcriptional silencing*), operan sobre el RNA o el DNA, regulándolo a nivel post-transcripcional o transcripcional, respectivamente (Havecker *et al.*, 2010; Vaucheret, 2008). Las proteínas AGO son proteínas largas (90-100 kDa) que contienen tres dominios funcionales denominados PAZ, Mid y PIWI (Figura 6A) (Hutvagner and Simard, 2008; Vaucheret, 2008). El dominio PAZ reconoce el extremo 3' con 2 nts no apareados del dúplex de sRNAs y probablemente ayuda a su carga en la proteína. Una vez unido al dominio PAZ, el dúplex de sRNAs se desenrolla, de manera que sólo una de las cadenas del sRNA queda unida al complejo. El dominio Mid une el extremo 5' fosfato del sRNA, formando un bolsillo con el dominio PIWI, que ancla el sRNA. El dominio PIWI adopta una conformación plegada similar a la de la RNasa H y posee actividad RNA endonucleasa, normalmente conferida por un sitio activo con un motivo Asp-Asp-His (DDH). Esta actividad de corte es la responsable del corte dirigido por sRNAs sobre el mRNA diana durante el proceso de silenciamiento por RNA (Figura 5) (Hutvagner and Simard, 2008).

Introducción

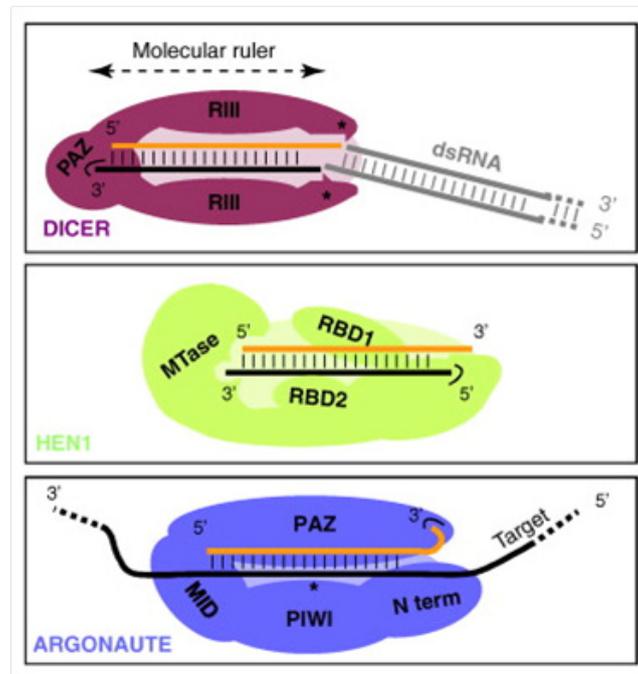


Figura 5: **Modelo de actividad de las proteínas DICER, HEN1 y AGO.** Las proteínas Dicer unen secuencialmente los extremos del dsRNA para producir sRNAs maduros actuando como un calibre molecular que determina la longitud de cada sRNA en función la distancia entre los dominios PAZ y RNasa IIIa. La proteína HEN1 une dsRNAs a través de los dominios RBD, la función metiltransferasa metila sus extremos 3' hidroxilos confiriéndoles estabilidad. La proteína AGO interacciona con el sRNA a través de su extremo 5' quedando posicionado en la hendidura que forma el dominio PAZ. El mRNA aparea con el sRNA quedando entre los dominios N-terminal PIWI y Mid. El sitio catalítico con actividad RNasa H digiere el mRNA (Vazquez *et al.*, 2010).

El genoma de *Arabidopsis* codifica 10 genes AGO definidos en 3 clados filogenéticos y probablemente las proteínas pertenecientes a cada uno de estos clados comparten funciones similares como efectores de las rutas de silenciamiento por RNA (Vaucheret, 2008): i) AGO1, AGO5, y AGO10, ii) AGO2, AGO3 y AGO7, iii) AGO4, AGO6 y AGO8 (Figura 6B).

A



B

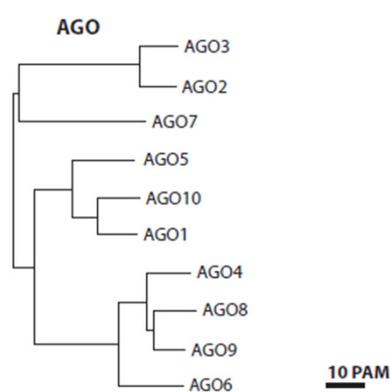


Figura 6: **Estructura y filogenia de las proteínas AGO en Arabidopsis.** A) Representación esquemática de los dominios estructurales de las diez proteínas AGO de *A. thaliana*. B) Filogenia de las distintas proteínas AGO en Arabidopsis en diez clados. PAM indica el punto aceptado de mutación (Adaptada de Vaucheret, 2008).

Estudios de inmunoprecipitación de proteínas AGO en Arabidopsis sugieren que es el tamaño de los sRNAs y la identidad de su nucleótido 5' terminal lo que determina su asociación con cada una de las distintas proteínas AGO (Montgomery *et al.*, 2008; Mi *et al.*, 2008). Así, AGO4, AGO6 y AGO9 se asocian mayoritariamente con sRNAs de 24 nts, mientras que AGO1, AGO2, AGO7 y AGO10 unen moléculas de 21-22 nts. Por otra parte, AGO1, AGO2 y AGO5 tienen afinidad por sRNAs con residuos en 5' de uridina, adenosina o citosina, respectivamente, mientras que AGO4, AGO6 y AGO9 se asocian principalmente

Introducción

con sRNAs con residuos de adenosina en posición 5'. AGO7 y AGO10 se asocian en exclusiva con el miR390 y el miR165/166, respectivamente (Kim, 2008; Mi *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008).

Aunque análisis mutacionales han confirmado la importancia de la identidad del nucleótido en 5' en la asociación con AGO, estudios recientes revelan la existencia de requerimientos diferentes como desapareamientos o interacciones con otras proteínas (Zhu *et al.*, 2011; Montgomery *et al.*, 2008). De hecho, las proteínas AGO de plantas, metazoos y hongos actúan como plataformas uniendo proteínas que contienen motivos Glicina-Triptófano (GW-WG) (El-Shami *et al.*, 2007; Poulsen *et al.*, 2013; Till *et al.*, 2007). Estas proteínas con motivos GW son a menudo cofactores esenciales en varias reacciones de silenciamiento. Por ejemplo, AGO4 une directamente repeticiones GW de la subunidad larga de la RNA polimerasa V, una polimerasa específica de plantas requerida en procesos de metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM) (El-Shami *et al.*, 2007). La presencia de estos motivos en la helicasa SD3 se ha revelado así mismo necesaria para la interacción con AGO1 y AGO2 en silenciamiento de transposones y defensa antiviral (García *et al.*, 2012).

De las 10 diferentes proteínas AGO presentes en Arabidopsis, 2 son de especial interés para el contenido de este trabajo y las describiremos con más detalle: AGO1 y AGO4.

AGO1 es el miembro fundador de esta familia génica y se descubrió a través de la identificación de mutantes de Arabidopsis que mostraban defectos pleiotrópicos del desarrollo (Bohmert *et al.*, 1998). Estos mutantes se denominaron *argonauta 1* debido al parecido de las hojas con los tentáculos de los calamares

del género *Argonauta*. AGO1 se expresa de forma amplia en la mayoría de los tejidos de *Arabidopsis* y es principalmente una proteína periférica de membrana, aunque también se ha visto asociada a endomenbranas. Aunque AGO1 media el silenciamiento de mRNA citoplásmico, presenta una localización celular dinámica. Así se ha encontrado formando parte de los llamados cuerpos de procesamiento en el núcleo junto con precursores miRNA y otras proteínas implicadas en la biosíntesis de miRNAs como SE (SERRATE), HYL1 (HYPONASTIC LEAVES 1) o DCL1 (Fang and Spector, 2007; Pontes *et al.*, 2013). Esta proteína es primordial para la actividad de miRNAs como demuestra el hecho de que la acumulación de miRNAs disminuye en mutantes *ago1* de *Arabidopsis* al tiempo que aumentan los niveles de sus transcritos diana (Vaucheret, 2004). AGO1 se asocia preferentemente con miRNAs, la mayoría de los cuales poseen uracilo en posición 5' terminal. No obstante, AGO1 interacciona con otras clases de pequeños RNAs interferentes, tales como pequeños RNAs de origen viral, o los denominados trans-acting siRNAs (tasiRNAs). Mediante ensayos bioquímicos se ha podido determinar la actividad RNaseH de AGO1 sobre los mRNAs diana de miRNAs y tasiRNAs (Baumberger and Baulcombe, 2005; Qi *et al.*, 2005).

Dado que AGO1 desempeña un papel esencial en la regulación de la expresión génica, su expresión está sujeta a su vez a un estrecho control mediado, al menos en parte, por la actividad del miR168 (Várallyay *et al.*, 2010; Vaucheret, 2009). De hecho la expresión de una versión mutada del mRNA de AGO1 resistente a la actividad del miR168 resulta en niveles elevados tanto de AGO1 como de miR168 (Vaucheret, 2009). Por tanto, esta regulación permite mantener los niveles de

Introducción

AGO1 en un equilibrio funcional a través del efecto dual del miR168 sobre el mRNA de AGO1 y de la proteína AGO1 sobre el miR168.

AGO4 se identificó en rastreos genéticos para la búsqueda de mutantes de *Arabidopsis* deficientes en el silenciamiento transcripcional del gen endógeno *SUPERMAN* (Zilberman *et al.*, 2003). AGO4 es el principal AGO implicado en procesos de TGS y desempeña, junto a otras proteínas relacionadas con RdDM (DRD1, DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION1 ó DRM2, DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE2), un papel crítico en el mantenimiento de la heterocromatina silente en *loci* ricos en repeticiones de DNA y transposones (Zilberman *et al.*, 2003; Zilberman *et al.*, 2004). AGO4 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos de *Arabidopsis* formando parte de los cuerpos de Cajal en asociación con siRNAs de 24 nts y las proteínas Pol IVa, RDR2 y DCL3 (Pontes *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Pontes *et al.*, 2013; Havecker *et al.*, 2010). Sin embargo recientes estudios sugieren que la unión de AGO4 con los siRNAs de 24 nts ocurre en el citoplasma y que la entrada de AGO4 en el núcleo representa un punto de control previo a su actividad en RdDM (Ye *et al.*, 2012). Los complejos AGO4 cargados con siRNAs de 24 nts dirigen el procesamiento endonucleolítico de transcritos nacientes derivados de la heterocromatina diana y guían a otras proteínas modeladoras de la cromatina para actuar en *cis* (Qi *et al.*, 2006; Irvine, 2006).

AGO4 se une a pequeños RNAs con adenosina en su extremo 5' terminal. Algunos miRNAs como el miR172 y miR390 contienen este residuo en posición 5' y pueden asociarse tanto con AGO1 como con AGO4 (Qi *et al.*, 2006; Mi *et al.*, 2008). Esta asociación es funcional dado que AGO4 es competente para procesar

los mRNAs diana de estos miRNAs, *AP2* y *TAS3*, respectivamente (Qi *et al.*, 2006). No obstante no está clara la implicación de AGO4 en la regulación de estos genes puesto que los mutantes defectivos *ago4* no presentan el fenotipo esperable asociado a la desregulación de *AP2* y *TAS3*.

1.3.2 Pequeños RNAs endógenos

En *Arabidopsis* las rutas de silenciamiento dependen mayoritariamente de dos tipos de sRNA: los **microRNAs (miRNAs)** y los **sRNAs interferentes (*small interfering RNAs*, siRNAs)** (Bologna and Voinnet, 2014).

a) *miRNAs*

En plantas, los miRNAs derivan de los genes nucleares *MIR* que se transcriben en transcritos primarios o pri-miRNAs principalmente por la acción de la RNA polimerasa II (Pol II) con la ayuda de coactivadores como la proteína Mediator y NOT2b (Kim *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Fang and Bartel, 2015; Voinnet, 2009) (Figura 7). En los promotores de estos genes se encuentran sobrerrepresentados elementos reguladores como las cajas TATA y los motivos reguladores en *cis* (Xie *et al.*, 2005). Esto permite tener un control preciso sobre su regulación espacio temporal y conseguir una acumulación diferencial de las diferentes isoformas de los miRNAs en los diferentes tejidos. La mayoría de los miRNAs se procesan en el núcleo por DCL1 con ayuda de HYL1 y SE formando un complejo macromolecular (Lobbes *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010). Ensayos de procesamiento *in vitro*

Introducción

demuestran que estas dos proteínas determinan la precisión de la actividad de corte de DCL1 para formar los miRNAs (Lobbes *et al.*, 2006; Montgomery *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010). Cada dúplex de miRNA resultante, de 19 a 25 nts, contiene una cadena madura y una cadena pasajera, conocida como miRNA*. Las dos cadenas del dúplex miRNA:miRNA* son metiladas en la posición 2'-OH de la ribosa terminal en el extremo 3' por la metiltransferasa HEN1 (Figura 5) (Yu *et al.*, 2005). Los miRNAs son exportados desde el núcleo al citoplasma a través de factores exportadores como HASTY (Park *et al.*, 2005). En el citoplasma se incorporan a los complejos AGO1 para regular a nivel post-transcripcional la expresión de sus mRNAs diana (Figura 7) (Baumberger, N; Baulcombe, DC., 2005; Qi *et al.*, 2005).

Los miRNAs regulan a sus mRNAs diana promoviendo su degradación y/o la inhibición de su traducción (Brodersen *et al.*, 2008; Llave, Xie, *et al.*, 2002; Voinnet, 2009). La degradación del mRNA diana es una consecuencia del corte endonucleolítico mediado por AGO1 entre las bases 10 y 11 (contando desde el extremo 5' del miRNA) en la región de complementariedad entre el miRNA y su RNA diana. Los productos 3' y 5' resultantes, que contienen extremos 5' monofosfato y 3' hidroxilo, respectivamente, son posteriormente degradados por una 5'-3' EXORIBONUCLEASE4 (XRN4) y por proteasas del exosoma (Souret *et al.*, 2004; Llave *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2005; Baumberger and Baulcombe, 2005). Los miRNAs en plantas también pueden actuar inhibiendo la traducción de los mRNAs diana (Aukerman and Sakai, 2003; Chen, 2004). Durante un tiempo se asumió que el grado de complementariedad entre el miRNA y el mRNA determinaba el modo de acción del miRNA sobre su secuencia diana. De este modo, una

complementariedad perfecta o casi perfecta entre el miRNA y el mRNA diana favorecía la actividad endonucleolítica del complejo efector, mientras que bases no apareadas en el centro de interacción reprimían este corte, favoreciendo la inhibición de la traducción del mRNA diana como mecanismo preferente de acción del complejo AGO (Hutvagner and Zamore, 2002). Un trabajo reciente estudió el modo de acción de distintos miRNAs que compartían distinto grado de apareamiento con sus respectivos mRNAs diana en una batería de mutantes caracterizados como deficientes en actividad de miRNAs (Brodersen *et al.*, 2008; Lanet *et al.*, 2009). Estos mutantes exhibieron defectos en el corte endonucleolítico pero no en la represión de la traducción de los mRNAs diana analizados, demostrando que ambos mecanismos son independientes del grado de complementariedad de bases entre el miRNA y el mRNA diana y que al contrario de lo que se pensaba, la inhibición de la traducción mediada por miRNAs es un mecanismo de acción muy extendido en plantas (Brodersen *et al.*, 2008). No está claro, sin embargo, cual es el mecanismo subyacente por el cual los miRNAs interfieren con la traducción de los mRNA diana ni si dicha inhibición ocurre en un paso anterior o posterior a la iniciación de la traducción. Para la inhibición de la traducción mediada por miRNAs se requiere la actividad de AGO1, AGO10, una enzima asociada con la ruptura de microtúbulos y los cuerpos P celulares (Brodersen *et al.*, 2008). De hecho, la interacción de los miRNAs con sus RNAs diana induce la localización de proteínas AGO en los cuerpos P donde abundan factores de degradación de RNAs mensajeros (Coller and Parker, 2005). Probablemente los miRNAs dirigen el secuestro de su mRNA diana en los cuerpos P, lo que impide su traducción y favorece su ulterior degradación (Brodersen *et*

Introducción

al., 2008). Por tanto, este efecto de desestabilización del mRNA que acompaña a la represión traduccional por miRNAs está más bien asociado a procesos celulares de degradación de los mRNAs. Este descubrimiento contribuiría a explicar por qué algunas interacciones (pero no todas) entre miRNAs y mRNAs diana conllevan una reducción significativa en la abundancia de los mRNAs que sin embargo no es debida a la actividad nucleolítica del complejo AGO (Brodersen *et al.*, 2008).

De forma independiente a DCL1, DCL3 y ocasionalmente otras DCL pueden tener acceso a ciertos pre-miRNAs y procesarlos para generar miRNAs más largos no canónicos de 22 a 25 nts (Vazquez *et al.*, 2008). Estos miRNAs largos son importantes reguladores génicos que activan complejos AGO4 y dirigen la metilación tanto de los loci a partir de los cuales se originan como de otros genes diana en trans (Wu *et al.*, 2010; Khraiwesh *et al.*, 2010). Algunos pre-miRNAs incluso experimentan un procesamiento secuencial por enzimas DCL para generar múltiples especies de miRNAs siguiendo un patrón de fase definido por el primer corte sobre el precursor (Zhang *et al.*, 2010). Los miRNAs secundarios de 21-22 nts se asocian normalmente con AGO1 y guían el corte endonucleolítico de sus genes diana (Zhang *et al.*, 2010) mientras que las especies de 23-25 nts guían la metilación dependiente de AGO4 de sus *loci* diana (Chellappan *et al.*, 2010).

Entre las dianas de los miRNAs se encuentran factores de transcripción implicados en procesos de desarrollo y crecimiento, factores implicados en el metabolismo de sRNAs e incluso genes de resistencia a patógenos (Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Poethig, 2009; Lu and Huang, 2008).

b) siRNAs

Los siRNAs constituyen un grupo heterogéneo de naturaleza muy variada, entre los que cabe destacar los siRNAs de acción en trans (asiRNAs), los siRNAs asociados a transcritos naturales antisentido (*natural-antisense* siRNAs, natsiRNAs), los siRNAs asociados a repeticiones del genoma (*repeat-associated* siRNAs, rasiRNAs) y los siRNAs derivados de transcritos codificadores (*coding-transcript* siRNAs, ct-siRNAs) (Ghildiyal and Zamore, 2009; Bologna and Voinnet, 2014). Estas moléculas se originan por procesamiento mediado por enzimas DCL de precursores de dsRNA derivados de: i) transcritos en forma de repeticiones invertidas de RNA, ii) la transcripción convergente de transgenes y elementos transponibles (TE), iii) la acción de enzimas RDRs endógenas que utilizan como molde RNAs aberrantes o transcritos producidos por la RNA polimerasa IV (Pol IV).

La gran mayoría de los siRNAs endógenos identificados hasta el momento se denominan rasiRNAs y corresponden con sRNA derivados de la heterocromatina aunque también los podemos encontrar en regiones intergénicas, secuencias promotoras y genes codificadores de proteínas (Kasschau *et al.*, 2007; Moazed, 2009). La heterocromatina está asociada con secuencias repetidas de DNA y elementos transponibles (transposones y retrotransposones) en centrómeros, telómeros y otros loci genómicos y desempeña un papel crítico en la transmisión de los cromosomas, el mantenimiento de la estabilidad del genoma y la regulación de la expresión génica (Avramova, 2002). Los rasiRNAs de 24 nts se producen por la acción de DCL3 sobre dsRNAs sintetizados por RDR2 a partir de transcritos producidos por Pol IV (Pikaard *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2014). Estos

Introducción

rasiRNAs se unen preferencialmente a AGO4, y ocasionalmente a AGO6 o AGO9, para dirigir procesos de RdDM (Matzke *et al.*, 2015; Havecker *et al.*, 2010). Estos complejos se asocian con transcritos nacientes sintetizados por la Pol V y reclutan en la región de los genes diana diversos factores como las metiltransferasas de dominios reordenados 1 y 2 (DRM1 y DRM2) (Sasaki *et al.*, 2014; Wierzbicki *et al.*, 2009). La consecuencia final de la RdDM es la metilación de regiones genómicas diana y su posterior TGS (Ghildiyal and Zamore, 2009).

Los ta-siRNAs son una clase de siRNAs endógenos que se originan a partir de mRNAs no codificadores derivados de genes nucleares denominados *TAS* (Allen *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2005). Estos mRNAs tienen la particularidad de poseer uno o dos sitios de reconocimiento de miRNAs (Axtell *et al.*, 2006). De este modo, el transcrito de *TAS* es reconocido por el miRNA complementario que dirige el corte endonucleolítico para generar RNA aberrantes que carecen de extremos poli-adenilados en 3' o de estructura caperuza en 5'. Estas hebras de RNA se convierten en dsRNA por la acción del complejo RDR6/SGS3 (SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3). DCL4 en coordinación con una proteína de unión a dsRNA, DRB4 (*Double-stranded RNA binding protein 4*), procesa secuencialmente este dsRNA desde el extremo terminal producido por el primer corte del miRNA, dando lugar a los ta-siRNAs de 21 nts de longitud en un registro de fase que está invariablemente definido por el sitio de corte del miRNA (Adenot *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2005; Axtell *et al.*, 2006; Hiraguri *et al.*, 2005). Los ta-siRNAs se unen preferentemente a AGO1 o AGO7 para silenciar post-transcripcionalmente a sus genes diana mediante degradación del mRNA y probablemente por inhibición de su traducción (Figura 7) (Allen *et al.*, 2005; Adenot *et al.*, 2006; Axtell *et al.*, 2006).

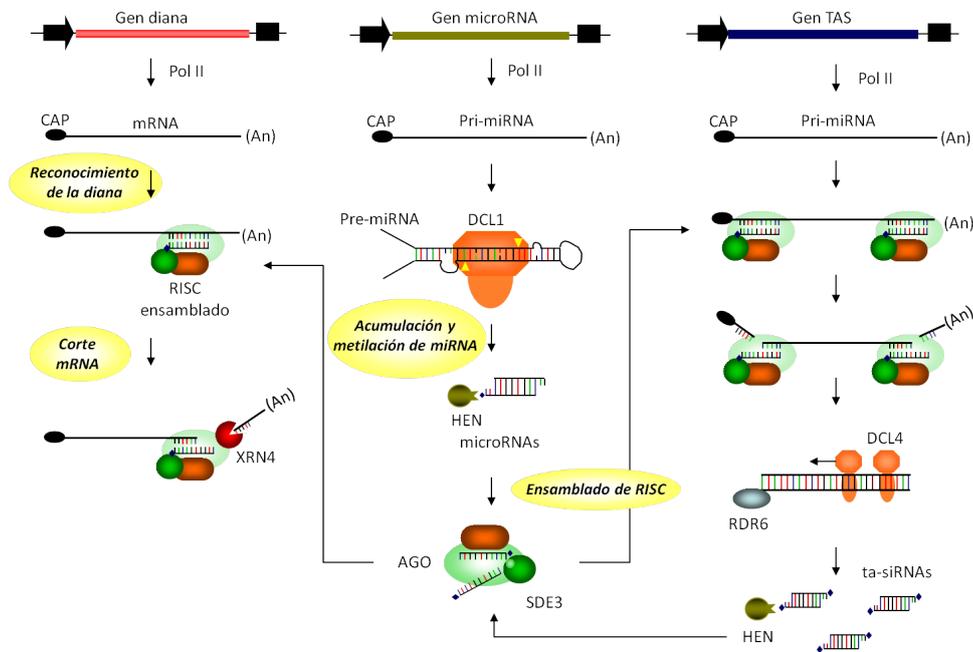


Figura 7: Representación esquemática de la ruta canónica de los miRNAs y ta-siRNAs en *A. thaliana*.

Los nat-siRNAs derivan de pares de genes convergentes denominados NAT (*natural antisense transcripts*) cuya co-expresión genera transcritos sentido/antisentido parcialmente complementarios en sus extremos y con el potencial de formar dsRNAs (Wang *et al.*, 2014). Aunque el mecanismo de biogénesis de los nat-siRNAs, de 24 nts de longitud, no se conoce con exactitud, se sabe que es dependiente de DCL2, RDR6, SGS3 y la subunidad NRPD1a de la Pol IV (Borsani *et al.*, 2005; Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006; Katiyar-Agarwal *et al.*, 2007). Estos nat-siRNAs actúan uniéndose a una proteína AGO y guían el corte de los transcritos homólogos. Los productos resultantes se convierten en dsRNA por la

Introducción

acción de RDR6 proporcionando así el sustrato para la producción dependiente de DCL1 de nat-siRNAs de 21 nts de longitud (Figura 8). En *Arabidopsis* existen aproximadamente 2000 pares de genes con configuración NAT, por lo que la formación de nat-siRNAs podría ser un mecanismo bastante extendido de regulación de la expresión génica en plantas (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006; Chen, 2009).

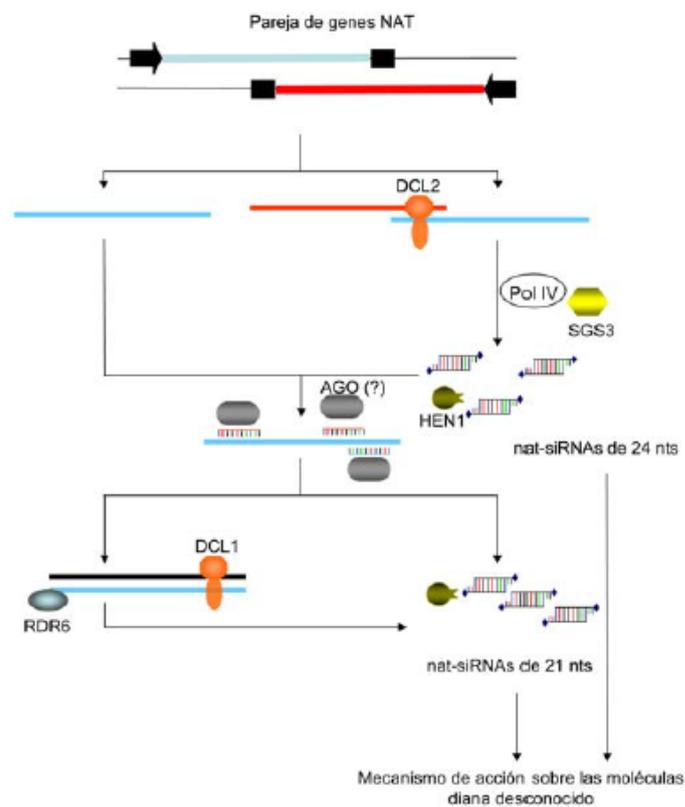


Figura 8: Representación esquemática de la ruta de los nat-siRNAs en *A. thaliana*.

Los ct-siRNAs son una clase de siRNAs endógenos de 21 a 22 nts denominados que derivan de transcritos codificadores, incluyendo transcritos primarios de miRNAs (Zhang *et al.*, 2015). Su biosíntesis está asociada a defectos en la ruta de decaimiento de RNA (RNA decay) que en condiciones normales elimina transcritos aberrantes derivados de la degradación del RNA, del procesamiento incorrecto de sus extremos o de la actividad de enzimas endonucleolíticas (Figura 9) (Kervestin and Jacobson, 2012). De esta manera, cuando la maquinaria del *RNA decay* se saturada, por ejemplo debido a la sobreexpresión de ciertos genes, los transcritos aberrantes resultantes son reconocidos por la maquinaria de silenciamiento para producir ct-siRNAs cuya biogénesis depende de RDR6, SGS3, DCL2, and DCL4. De esto se deduce que la acumulación de ct-siRNA refleja alteraciones en el patrón de expresión de los genes de los que proceden. Los ct-siRNAs se unen con complejos AGO1 y por tanto son competentes funcionalmente para guiar el autosilenciamiento de los transcritos de los que proceden (Zhang *et al.*, 2015).

Introducción

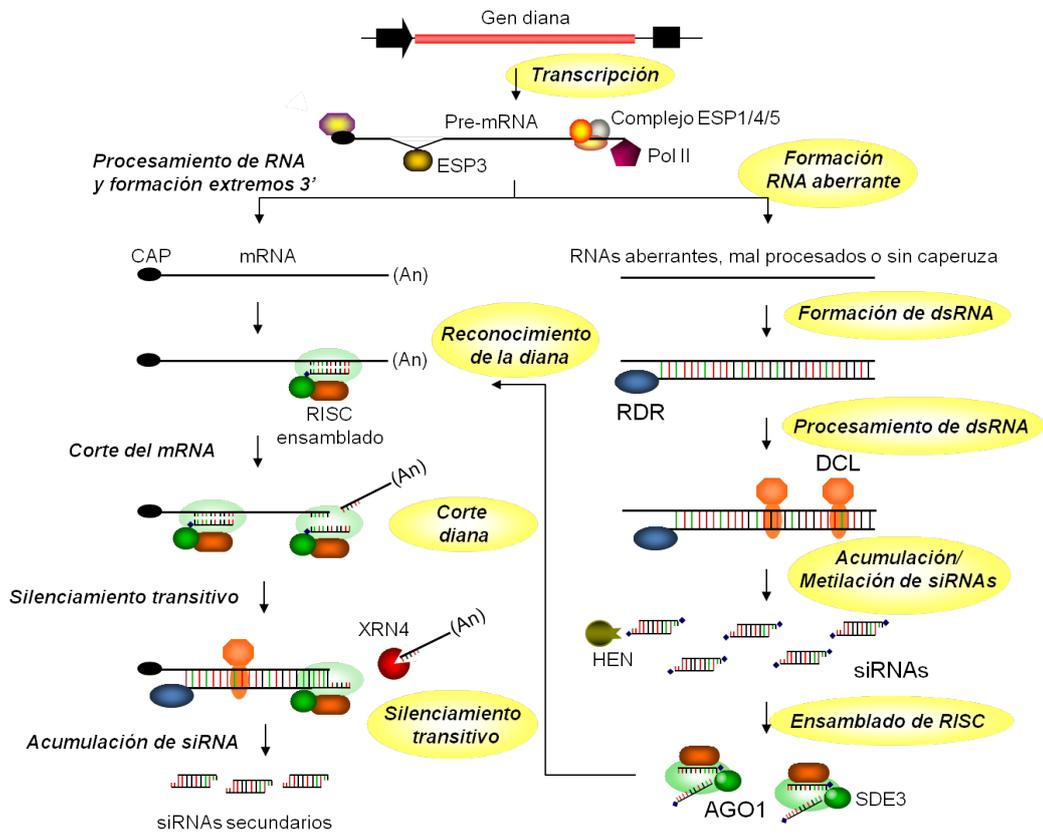


Figura 9: Representación esquemática de la ruta de los ct-siRNAs en *A. thaliana*.

1.4 SILENCIAMIENTO GÉNICO Y VIRUS

1.4.1 El silenciamiento génico como mecanismo antiviral en plantas

La mayoría de los virus de plantas presentan un genoma de ssRNA y polaridad positiva, aunque también pueden encontrarse genomas de ssRNA y polaridad negativa, de dsRNA, de ssDNA y en menor medida de dsDNA (Hull, 2015). En el caso de los virus de RNA, la replicación se lleva a cabo generalmente en el citoplasma de la célula infectada catalizada por una RNA polimerasa viral dependiente de RNA (Heinlein, 2015). La replicación de los virus de ssDNA transcurre normalmente en el núcleo utilizando la maquinaria celular de síntesis de DNA del huésped (Hull *et al.*, 1987). En cambio, la replicación de los virus de dsDNA presenta una fase nuclear donde se lleva a cabo la transcripción viral y otra citoplasmática en la que se producen nuevas moléculas de dsDNA mediante transcripción inversa por una DNA polimerasa dependiente de RNA viral (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000).

Cualquiera que sea la naturaleza de su genoma, los virus de plantas son capaces de activar el mecanismo de silenciamiento por RNA en la célula infectada a través de la formación de dsRNA y por tanto, de sRNAs de origen viral (vsiRNAs) (Llave, 2010; Ding, 2010). Los vsiRNAs comparten características similares con los siRNAs y miRNAs endógenos lo que les posibilita el acceso a los mismos complejos efectores de silenciamiento y por tanto a regular la expresión de genes con secuencias complementarias (Ding and Voinnet, 2007). De este modo, los vsiRNAs formados durante una infección tienen el potencial de guiar el auto-

Introducción

silenciamiento de los genomas virales de los que se originan y reprimir o limitar la proliferación viral (Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009). Al mismo tiempo, pueden potencialmente modular la expresión del genoma del hospedador a través de interacciones funcionales con secuencias complementarias endógenas de RNA y/o DNA (Dunoyer *et al.*, 2007; Dunoyer and Voinnet, 2005; Llave, 2010).

El silenciamiento por RNA inducido por virus se produce en tres fases distintas: iniciación, amplificación y dispersión sistémica (Ding, 2010; Llave, 2010; Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009). La iniciación se activa con la formación de dsRNAs a partir de ssRNA viral. Estas moléculas inductoras son reconocidas por las mismas proteínas DCL que actúan en la biogénesis de sRNAs endógenos y a continuación procesadas para dar lugar a vsRNAs primarios de 21, 22 y 24 nts de longitud (Ding and Voinnet, 2007; Llave, 2010). La amplificación se caracteriza por la producción de vsRNAs secundarios procedentes de dsRNAs cuya síntesis es dependiente de la acción de proteínas RDR del hospedador (Voinnet, 2008). Estos vsRNAs secundarios participan en la dispersión sistémica del silenciamiento, que implica el transporte de la señal de silenciamiento célula a célula y a través del floema (Dunoyer, Schott, *et al.*, 2010; Dunoyer, Brosnan, *et al.*, 2010; Molnar *et al.*, 2010) inmunizando así a las células adyacentes y a tejidos distantes situados delante del frente de infección (Baulcombe 2004).

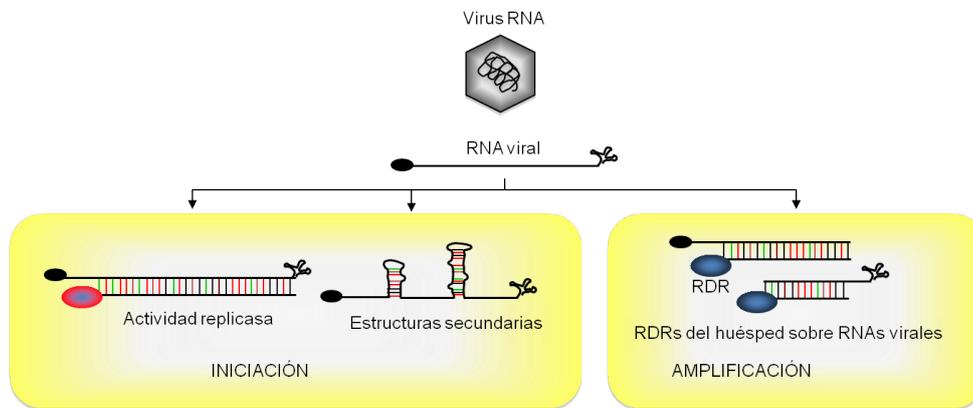


Figura 10: Representación esquemática de la activación del silenciamiento por virus.

a) DCL y silenciamiento antiviral

Las cuatro enzimas DCL descritas en *Arabidopsis* parecen actuar jerárquicamente en la respuesta antiviral (Deleris *et al.*, 2006). DCL4 es la proteína DCL con mayor actividad antiviral como lo demuestra el hecho de que plantas de *Arabidopsis* portadoras del alelo mutante *dcl4* son híper susceptibles a la infección por virus de RNA y DNA (Donaire *et al.*, 2008; Deleris *et al.*, 2006; Diaz-Pendon, 2007; Moissiard and Voinnet, 2006; Garcia-Ruiz *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2008). DCL4 es la proteína con mayor actividad catalítica sobre las dsRNAs virales de modo que los vsRNAs de 21 nts que produce son la clase más abundante en los tejidos infectados. El efecto antiviral de DCL2 está frecuentemente, pero no siempre, subordinado a DCL4 de modo que suele ser evidente cuando DCL4 está comprometida o inhibida por acción de alguna proteína supresora viral (Bouché *et al.*, 2006; Deleris *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). En estas circunstancias, DCL2

Introducción

sustituye a DCL4 para generar vsiRNAs de 22 nts. DCL3 no participa en la defensa antiviral frente a virus de RNA como lo sugiere el hecho de que DCL3 no restringe la acumulación viral en dobles mutantes *dcl2 dcl4* y que estas líneas mutantes sean híper susceptibles a la infección (Bouché *et al.*, 2006; Deleris *et al.*, 2006; Diaz-Pendon, 2007; Donaire *et al.*, 2008; Garcia-Ruiz *et al.*, 2010). No obstante en infecciones con el virus CMV deficiente en su proteína supresora 2b, DCL3 podría actuar potenciando el silenciamiento antiviral conferido por DCL4 (Diaz-Pendon, 2007). El acceso de DCL3 a sustratos de dsRNA de origen viral está supeditado a la actividad de DCL4 y DCL2, de modo que su eficiencia para generar vsiRNAs de 24 nts es más eficiente en ausencia de DCL4 y DCL2 (Blevins *et al.*, 2006; Bouché *et al.*, 2006; Garcia-Ruiz *et al.*, 2010; Fusaro *et al.*, 2006; Moissiard and Voinnet, 2006). DCL3 sí está implicada, junto con DCL4 y DCL2, en defensa antiviral en infecciones con virus de DNA que se replican en el núcleo. Para los *Caulimovirus* con genoma de dsDNA y los *Geminivirus* con genoma de ssDNA, DCL4 y DCL3 son las proteínas DCL más activas en silenciamiento antiviral, mientras que DCL2 sólo opera cuando DCL4 está inactivada (Blevins *et al.*, 2006; Moissiard and Voinnet, 2006). DCL1 parece desempeñar un papel residual en el silenciamiento antiviral ya que la susceptibilidad a la infección no varía sustancialmente en plantas deficientes en DCL1 (Moissiard and Voinnet, 2006). No obstante, la respuesta antiviral impuesta por DCL4 está exacerbada en mutantes hipomorfos *dcl1* puesto que DCL1 actúa regulando negativamente la expresión de DCL4 y DCL3 (Qu *et al.*, 2008). Del mismo modo, la contribución de DCL1 al conjunto total de las poblaciones de vsiRNAs en plantas infectadas es minoritaria (Bouché *et al.*, 2006; Deleris *et al.*, 2006).

b) RDR y silenciamiento antiviral

La resistencia a diferentes virus de RNA es también dependiente de enzimas RDR, principalmente RDR1, RDR2 y RDR6 (Llave, 2010). Estas proteínas RDR del hospedador refuerzan las respuestas primarias del silenciamiento a través de la formación de vsiRNAs secundarios. Plantas de *A. thaliana*, *N. tabacum* o *N. benthamiana* deficientes en RDR6 o RDR1 muestran mayor susceptibilidad a la infección por ciertos virus de RNA, mientras que para otros virus esta susceptibilidad no está alterada (Deleris *et al.*, 2006; Donaire *et al.*, 2008; Mourrain *et al.*, 2000; Schwach *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; Qu *et al.*, 2005). Varios trabajos han demostrado que el silenciamiento antiviral frente algunos virus es dependiente de la actividad conjunta de al menos RDR1 y RDR6, ya que el aumento de susceptibilidad a la infección es particularmente evidente en dobles o triples mutantes que implican la pérdida de función de RDR1, RDR2 y RDR6 (Donaire *et al.*, 2008; Garcia-Ruiz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009).

c) AGO y silenciamiento antiviral

Si bien el procesamiento por enzimas DCL de los intermediarios virales con estructura de RNA bicatenario representa un punto importante de regulación, el silenciamiento de los genomas virales implica la incorporación de vsiRNAs a los mismos complejos efectores que median el silenciamiento de genes endógenos (Szittyá *et al.*, 2010; Schuck *et al.*, 2013; Pantaleo *et al.*, 2007). Así la unión de

Introducción

vsRNAs con proteínas AGO permite regular el RNA bien mediante corte endonucleolítico del mensajero o mediante regulación negativa de la traducción como se ha observado para el RNA2 del virus de las manchas anulares del tomate (*Tomato ringspot virus*, ToRSV) (Ghoshal and Sanfaçon, 2014). En el caso de virus de DNA, estos complejos pueden promover la metilación de secuencias genómicas como se ha observado para el virus de la copa rizada de la remolacha (*Beet curly top virus*, BCTV) (Raja *et al.*, 2008). Diferentes AGO se han relacionado con actividad antiviral en diferentes especies (Tabla 1) (Carbonell and Carrington, 2015). Así de las 10 proteínas AGO que posee *Arabidopsis* esta relación se ha observado para AGO1, AGO2, AGO5, AGO7 y AGO10 (Wang *et al.*, 2011; Takeda *et al.*, 2008; Garcia-Ruiz *et al.*, 2015; Harvey *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2015). En *Arabidopsis* el análisis de mutantes simples y combinados de *ago* infectados con virus silvestres y virus defectivos en el supresor del silenciamiento génico por RNA (*Viral suppressor of RNA silencing*, VSR) confirman que AGO1 y AGO2 son los principales AGO implicados en defensa frente a virus de RNA (Llave, 2010; Cullen, 2013). AGO7 parece actuar con eficiencia similar a AGO1 pero probablemente funcionando como sustituto de este (Qu *et al.*, 2008). Por su parte AGO2 actúa de forma cooperativa no redundante con AGO1 en respuesta a virus con capacidad para suprimir AGO1 como es el caso del virus del arrugamiento del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV) y del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Wang *et al.*, 2011; Harvey *et al.*, 2011). Sin embargo AGO2 es el actor principal en respuesta a otros virus incapaces de inhibir la actividad de AGO1 como es el caso de TRV y del virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*, TuMV) (Ma *et al.*, 2015; Garcia-Ruiz *et al.*, 2015). El papel antiviral de AGO4

parece estar relacionado con la regulación negativa tanto de virus de RNA como de DNA (Carbonell and Carrington, 2015). Mutantes de Arabidopsis deficientes en metilación, incluido *ago4*, son híper susceptibles a la infección por geminivirus, lo que está correlacionado con una reducción en la metilación de citosinas en el DNA viral (Raja *et al.*, 2008). Además, la recuperación (remisión de síntomas) de las plantas tras la infección con geminivirus defectivos en VSR se correlaciona con una híper metilación del DNA viral y requiere de AGO4 como componente de la ruta de metilación dirigida por vsiRNAs (Raja *et al.*, 2008; Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009; Raja *et al.*, 2014). Por último AGO5, AGO7 y AGO10 están implicados en defensa antiviral mediante PTGS pero en un grado menor (Carbonell and Carrington, 2015; Brosseau and Moffett, 2015).

Introducción

AGO	VIRUS ^a	HUÉSPED
AGO1	BMV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	CMV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	RDV	<i>Oryza sativa</i>
	RSV	<i>Oryza sativa</i>
	ToRSV	<i>Nicotiana benthamiana</i>
	TCV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	TuMV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AGO2	CMV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	PVX	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	TRV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	TBSV	<i>Nicotiana benthamiana</i>
	TCV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	TuMV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AGO4	BCTV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	CaMV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	CMV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	PVX	<i>Nicotiana benthamiana</i>
	TRV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AGO5	CMV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	TuMV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AGO7	TCV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	TuMV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AGO10	TuMV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AGO18	RDV	<i>Oryza sativa</i>
	RSV	<i>Oryza sativa</i>

Tabla 1: **Proteínas AGO de plantas con actividad antiviral.** Adaptado de (Carbonell and Carrington, 2015).

^a BCTV, Beet curly top virus; BMV, Brome mosaic virus; CaMV, Cauliflower mosaic virus; CMV, Cucumber mosaic virus; PVX, Potato virus X; RDV, Rice dwarf phytoeovirus; RSV, Rice stripe tenuivirus; TRV, Tobacco rattle virus; TBSV, Tomato bushy stunt virus; ToRSV, Tomato ringspot virus.

1.4.2 Silenciamiento de genes endógenos inducido por siRNAs de origen viral

La gran abundancia y diversidad de secuencia de las poblaciones de vsiRNAs generados durante una infección viral les confiere un enorme potencial para interactuar funcionalmente con genes del hospedador. Un ejemplo lo constituyen los vsiRNAs derivados de la cepa Cg del virus del mosaico del tabaco (Tobacco mosaic virus, TMV) que guían la degradación de dos genes endógenos, el factor específico de poliadenilación (CPSF30) y la proteína alfa asociada al translocón (TRAP α) (Qi *et al.*, 2009). Sin embargo este ejemplo no establece una conexión directa entre la capacidad de los vsiRNAs de silenciar genes endógenos y la inducción de síntomas. Esta relación sí se ha determinado para la relación entre la generación de vsiRNAs por parte del satélite Y del CMV y el amarilleo que produce la infección mixta por este virus y su RNA satélite (Shimura *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2011). Este amarilleo resulta del silenciamiento del gen CHL1 que codifica la subunidad I de la protoporfirín quelatasa, una enzima esencial en la biosíntesis de clorofila por parte de un vsiRNA generado por el RNA satélite. Además, análisis de variabilidad natural del gen muestran que las variantes génicas con modificaciones que dificultan el apareamiento entre el vsiRNAs y el mRNA de CHL1 no presentan regulación negativa del mensajero y además las plantas infectadas no presentan amarilleo. Tanto la aparición de síntomas como la regulación negativa se restablecen cuando se infecta con una construcción del RNA satélite en la que se ha restablecido artificialmente el apareamiento, demostrando la relación directa entre ambos fenómenos (Shimura *et al.*, 2011;

Introducción

Smith *et al.*, 2011). De forma similar el fenotipo de albinismo observado durante la infección por ciertos aislados del viroide del mosaico latente del melocotón (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd, es debida a la regulación negativa de la transcripción de una proteína del huésped, la CHLOROPLASTIC HEAT-SHOCK PROTEIN 90, por 2 vsRNAs derivados del viroide (Navarro *et al.*, 2012). Este gen está implicado en la biogénesis de los cloroplastos y en la señalización entre plastidios y el núcleo, que son funciones que aparecen comprometidas en los tejidos albinos, lo que sugiere que el silenciamiento de la HSP90 tiene un papel clave en la inducción este fenotipo.

1.4.3 Supresores de silenciamiento

Entre las estrategias desarrolladas por los virus para evadir o limitar el silenciamiento génico la capacidad de codificar VSRs es la más extendida entre los virus de plantas (Pumplin and Voinnet, 2013; Csorba *et al.*, 2015; Wieczorek and Obrępalska-Stęplowska). Los VSRs constituyen además, un claro ejemplo de convergencia evolutiva, ya que aunque engloban proteínas que difieren en su estructura, secuencia y actividad biológica, todos ellos comparten la capacidad de suprimir el silenciamiento génico (Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009). Algunos VSRs tienen funciones relacionadas con la replicación, el movimiento y la encapsidación, o actúan como componentes auxiliares de la transmisión viral, como proteasas o como reguladores de la transcripción (Díaz-Pendón and Ding, 2008). Esta naturaleza multifuncional a menudo causa dificultades en la exploración de sus mecanismos de acción debido a la pérdida de viabilidad viral

que se obtiene al inactivarlos funcionalmente. Los VSRs recurren a diferentes estrategias para bloquear el silenciamiento génico (Burguán and Havelda, 2011): i) inactivar o bloquear la actividad de los complejos efectores de silenciamiento, ii) interferir con la producción y/o estabilidad de siRNAs, iii) bloquear la señal de amplificación del silenciamiento génico y iv) inhibir la ruta de RdDM.

a) VSRs que inactivan o bloquean proteínas AGO

Los VSRs han desarrollado diversas estrategias para competir o bloquear las proteínas efectoras del silenciamiento o bien comprometer su integridad. Un ejemplo bien conocido es la proteína P38 de TCV. Esta proteína forma homodímeros capaces de interactuar a través de los motivos GW-WG con AGO1 y probablemente también con AGO2, pero no con AGOs no relacionados con defensa antiviral (El-Shami *et al.*, 2007; Azevedo *et al.*, 2010). Estos motivos se han encontrados también en la proteína efectora relacionada con RdDM, KTF1 (KOW domain-containing Transcription Factor 1) y asignados como motivos de unión a AGO4 (Bies-Etheve *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009). La interacción mediada por el motivo GW-WG entre el supresor P38 y AGO1 parece bloquear específicamente la entrada de siRNAs, pero no de miRNAs, al interior de AGO1 (Zhang *et al.*, 2012; Schott *et al.*, 2012). Además de P38, otros VSRs con capacidad de asociarse con AGO, como P15 de *Pecluvirus* y HC-Pro de *Potyvirus* son capaces de bloquear eficientemente la actividad de complejos efectores de silenciamiento que contienen tanto siRNAs como miRNAs (siRISC y miRISC). Sin embargo, estos VSRs parecen inhibir exclusivamente la incorporación de siRNAs, y no de miRNAs,

Introducción

al complejo RISC. En *Arabidopsis* se ha observado también que la inactivación de AGO1 por P38 tiene un gran impacto sobre la disponibilidad celular de las cuatro enzimas DCL debido a la red de homeostasis que conecta estos factores (Azevedo *et al.*, 2010).

Otro VSR con capacidad de unión a AGO es la proteína 2b de los cucumovirus, cuya interacción con AGO1 y AGO4 impide la degradación del RNA diana (Zhang *et al.*, 2006; González *et al.*, 2010; Duan *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la interacción física entre la 2b de la cepa Fny-CMV y el dominio PAZ y parte del PIWI de AGO1 inhibe la actividad de AGO1 (Zhang *et al.*, 2006). De hecho, plantas transgénicas que expresan 2b constitutivamente copian el fenotipo de plantas mutantes *ago1-27* donde la función de AGO1 está comprometida. Además ambas proteína colocalizan en el núcleo y también comparten algunos focos dentro del citoplasma (Mayers *et al.*, 2000; González *et al.*, 2012; González *et al.*, 2010). Estudios cristalográficos revelan que 2b forma homodímeros con estructura de alfa hélice capaz de unir dsRNAs y siRNAs, bloqueando la actividad de las DCLs en el procesamiento de los dsRNAs, así como la incorporación de los siRNAs en el complejo RISC (Burgyán and Havelda, 2011).

Los poleovirus son virus cuya infección se limita al floema y poseen una proteína P0, indispensable para la infección, que es capaz de inducir la degradación de AGO1 (Mayo and Ziegler-Graff, 1996). Contrariamente a 2b y P38 no posee capacidad de unir AGOs. En su lugar interacciona con el complejo SCF (SKP1-CULLIN1 F-box Complex Ubiquitin Ligase) de la planta que ubiquitina AGO1 e induce su degradación por autofagia (Baumberger *et al.*, 2007; Csorba *et al.*, 2010; Bortolamiol *et al.*, 2007). Otros VSRs, como la proteína P25 del virus X de la

patata (Potato virus X, PVX), conducen a AGO1 y AGO2 al complejo proteasoma 26S para su degradación (CHIU *et al.*, 2010).

El VSR de los potyvirus HC-Pro se une a la proteína del huésped RAV2 y dicha interacción es imprescindible para bloquear la actividad de siRNAs, pero no de miRNAs (Endres *et al.*, 2010). RAV2/EDF2 es un factor de transcripción inducible por etileno que parece servir como cofactor del complejo RISC-siRNA. De esta manera, se puede interpretar que la interacción de HC-Pro con RAV2 interfiere negativamente con la actividad del complejo RISC-siRNA (Endres *et al.*, 2010).

b) VSRs que interfieren con la producción, estabilidad y/ ensamblaje de siRNAs

La inhibición del reconocimiento y posterior procesamiento de los dsRNAs en siRNAs por proteínas DCLs no constituye una estrategia frecuente de supresión. Algunos VSRs sin embargo, como P14 del virus latente del Pothos (*Pothos latent aureusvirus*, PoLV) y P38 de TCV, que poseen capacidad de unión a dsRNAs, impiden el procesamiento de dsRNAs en siRNAs en ensayos de agroinfiltración (Mériai *et al.*, 2006; Mériai *et al.*, 2005). En Arabidopsis P38 es capaz de inhibir la actividad DCL4, aunque esta inhibición no se realice de forma directa sino mediante interferencia con los niveles de AGO1 a través de una red de homeostasis que los conecta (Azevedo *et al.*, 2010). Además de estos dos VSRs la proteína transactivadora P6 de CaMV posee un péptido señal de localización nuclear (*Nuclear localization signal*, NLS) que le permite interactuar físicamente

Introducción

con el cofactor nuclear de DCL4 DBR4 y suprimir la producción de siRNAs al impedir el procesamiento de los dsRNAs por DCL4 (Haas *et al.*, 2008).

Algunos VSRs son capaces de promover la degradación de los sRNAs mediante distintos mecanismos. La subunidad P126 de la replicasa de TMV, así como el supresor HCPro de potyvirus inhiben la actividad de la metiltransferasa HEN1 posibilitando la uridilación y posterior degradación de los sRNAs (Wang *et al.*, 2012; Jamous *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2006). De forma similar, la endoribonucleasa III del virus del enanismo clorótico de la batata (*Sweet potato chlorotic stunt virus*, SPCSV) degrada *in vitro* el dúplex de siRNAs de 21, 22 y 24 nts de longitud para generar especies inactivas de 14 nts (Weinheimer *et al.*, 2015).

Otros VSRs secuestran selectivamente sRNAs para bloquear el ensamblaje de los complejos efectores de silenciamiento (Ding and Voinnet, 2007; Lakatos *et al.*, 2006; Burgyán and Havelda, 2011). Esta estrategia está ampliamente extendida entre los virus de plantas si bien los mecanismos de acción difieren entre especies. Por ejemplo, la proteína P19 de tobusvirus interacciona con gran afinidad con sRNAs de 21 nts, especialmente vsiRNAs y miRNAs endógenos, impidiendo así su asociación con AGO1 (Vargason *et al.*, 2003; Silhavy *et al.*, 2002). Estudios cristalográficos han determinado que P19 forma un homodímero que actúa como un calibre molecular midiendo la longitud de los siRNAs y uniéndolos con independencia de secuencia (Vargason *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003). Excepcionalmente, P19 no es capaz de interactuar con miR168, aunque favorece la transcripción del gen *MIR168* y por tanto la acumulación de formas maduras de miR168 en la célula. Puesto que este miRNA regula negativamente la estabilidad del mRNA de AGO1 y su traducción, la interacción de P19 con el

metabolismo de miR168 implica una reducción significativa de los niveles celulares de AGO1 (Mallory and Vaucheret, 2009; Várallyay *et al.*, 2010)

c) VSRs que bloquean la señal de amplificación del silenciamiento génico

La actividad supresora de algunos VSRs como P6 del virus del enanismo amarillo del arroz (*Rice yellow stunt virus*, RYSV) y V2 del virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) se traduce en un bloqueo en el movimiento de la señal de silenciamiento (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la proteína P6 interacciona con RDR6 impidiendo la formación de vsiRNAs secundarios. De manera similar, la proteína V2 parece competir con SGS3 en la unión a sustratos dsRNA impidiendo así la producción de vsiRNAs secundarios de 21 nts por RDR6 (Fukunaga and Doudna, 2009; Glick *et al.*, 2008).

d) VSRs que inhiben la RdDM

Una parte de la respuesta defensiva frente a virus de DNA como begomovirus y curtovirus de la familia *Geminiviridae* comienza en el núcleo celular e implica la metilación del genoma viral, un proceso que impide la replicación del virus y en el que interviene un enzima celular, la adenosina quinasa (ADK). La proteína supresora C2 es capaz de inactivar ADK bloqueando la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM), un compuesto que sirve como donante de metilos y cofactor esencial de las metiltransferasas (Wang *et al.* 2003). Diferente mecanismo posee

Introducción

la C2 del virus de la copa rizada de la remolacha (*Beet severe curly top virus*, BSCTV). Esta proteína interacciona con la S-adenosil-metionina descarboxilasa 1 (SAMDC1) atenuando su degradación e interfiriendo con el ciclo de metilo al catalizar la conversión de SAM en SAM descarboxilada (dcSAM), que actúa como competidor de SAM por la metiltransferasa (Zhang *et al.*, 2011). La inactivación de ADK y la estabilización de SAMDC1 dan lugar a una reducción en la metilación del DNA y a la supresión del TGS. Por último la proteína AC2 del virus del mosaico amarillo del frijol mungo (*Mungbean yellow mosaic virus*, MyMV) y del virus del mosaico de la mandioca (*African cassava mosaic*, ACMV) activa tanto la transcripción como el silenciamiento a través de la inducción de genes del hospedador que controlan el silenciamiento. Por ejemplo la proteína asociada a la replicación (*Replication associated protein*, REP), es capaz de reprimir la expresión de las metiltransferasas MET1 (METHYLTRANSFERASE 1) y CMT3 (CHROMOMETHYLASE 3) implicadas en el mantenimiento de los niveles de metilación del DNA (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2013)

e) Efectos colaterales de la supresión del silenciamiento

Muchos VSRs han sido identificados como determinantes de patogenicidad responsables en parte de los síntomas que la plantas desarrolla como consecuencia de la infección vírica (Dunoyer and Voinnet, 2005). De hecho la expresión de VSRs en plantas transgénicas da como resultado fenotipos que recuerdan a los síntomas causados por los virus correspondientes durante la infección (Kasschau *et al.*, 2003; Chapman *et al.*, 2004). Por cualquiera de los

mecanismos de acción descritos, los VSRs pueden interferir con la biogénesis y/o actividad de los sRNAs endógenos necesarios para el desarrollo normal de la planta. Así, por ejemplo, supresores con capacidad de bloquear la incorporación de sRNAs a los complejos efectores de silenciamiento o de perturbar la actividad de las enzimas AGO comprometen la expresión de los genes de la planta cuya regulación post-transcripcional depende de mecanismos de silenciamiento génico (Csorba *et al.*, 2007; Lózsza *et al.*, 2008; Kasschau *et al.*, 2003; Akbergenov *et al.*, 2006). El resultado de dicha interferencia es la expresión de genes que en condiciones normales de desarrollo deberían estar desactivados por la acción de sRNAs. Esta desregulación en el metabolismo de los miRNAs y otros sRNAs durante la infección se manifiesta en forma de defectos pleiotrópicos que afectan a órganos vegetativos y reproductores y que se asemejan a los observados en mutantes de pérdida de función para los genes implicados en la biogénesis y función de los miRNAs (Kasschau *et al.*, 2003; Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004). No obstante, aunque la actividad de los VSRs sobre el silenciamiento endógeno proporciona una base sólida para explicar fenómenos de patogénesis viral, deben de existir otros factores virales clave en la inducción de síntomas como demuestra el hecho de que mutantes de TCV, CMV y TuMV defectuosos en la supresión del silenciamiento génico son altamente virulentos en plantas mutantes deficientes en silenciamiento génico (Bazzini *et al.*, 2007). Estudios de correlación entre la gravedad de síntomas y la alteración de los niveles de miRNAs demuestran de hecho, que ésta es independiente de la actividad supresora del silenciamiento génico y que por tanto otras proteínas podían estar alterando estas rutas durante la infección (Bazzini *et al.*, 2007).

Introducción

De forma distinta a la mayoría de los supresores virales, la proteína P69 codificada por los *Tymovirus*, inhibe la ruta de silenciamiento génico inducido por dsRNA, pero sin embargo interfiere favorablemente con la actividad de los miRNAs facilitando su acumulación y estimulando su actividad procesadora (Chen *et al.*, 2004). De esta manera en presencia de P69 aumentan los niveles de miRNAs y disminuye la acumulación de sus correspondientes mRNAs diana. La pregunta que subyace a estos fenómenos es qué beneficio le reporta al virus la capacidad de modular el patrón de expresión génica de la planta y más concretamente, el relacionado con la actividad de los miRNAs. Es posible que esta interferencia con la actividad de los miRNAs sea una consecuencia indirecta de su capacidad de inhibir el silenciamiento génico como mecanismo de defensa antiviral (Llave, 2010). Ambos procesos están mecanística, bioquímica y genéticamente interconectados de modo que la actividad interferente de estos factores virales sobre los miRNAs pudiera ser un efecto colateral inespecífico. Una posible alternativa es que los virus interfieran deliberada y específicamente con la actividad de ciertos miRNAs de forma independiente a su actividad supresora para así crear un entorno celular favorable que permita la replicación y el movimiento del virus en la planta (Llave, 2004; Dunoyer and Voinnet, 2005). Es posible que los virus encuentren ventajoso redirigir la actividad de miRNAs implicados en la regulación de genes asociados con mecanismos de resistencia a enfermedades en plantas (Adai *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2012; Zhai *et al.*, 2011; Shivaprasad *et al.*, 2012).

1.4.4 TRV y silenciamiento

a) TRV y silenciamiento

La infección por TRV es un proceso dependiente de silenciamiento génico, como se deduce de los elevados niveles del virus presentes en plantas en las que sus componentes se encuentran desactivados genéticamente (Donaire *et al.*, 2008). Durante la infección, TRV genera intermediarios en forma de dsRNA que actúan como inductores de la maquinaria de silenciamiento. La formación de vsRNAs de 21, 22 y 24 nts a partir de transcritos de TRV resulta de la acción combinada e interconectada de DCL4 y DCL2 y en menor medida DCL3 y de la amplificación por parte de RDR1, RDR2 y RDR6 de las respuestas iniciales de silenciamiento (Donaire *et al.*, 2008; Donaire *et al.*, 2009). En *N. benthamiana* se ha podido identificar un complejo de silenciamiento antiviral dirigido por sRNAs con actividad nucleasa que es capaz de digerir *in vitro* el RNA viral. Mediante ensayos de infectividad en mutantes de pérdida de función de los genes AGO en Arabidopsis se ha podido determinar que AGO2 y AGO4 son los principales efectores de silenciamiento antiviral frente a TRV (Ma *et al.*, 2015). Por el contrario, AGO1 parece ser clave en la respuesta del silenciamiento de genes endógenos inducida por vectores de silenciamiento derivados de TRV (Ma *et al.*, 2015). Esta observación sugiere la existencia de distintos mecanismos de inhibición de la expresión viral y de la expresión de genes endógenos asociados al silenciamiento de TRV (Schott *et al.*, 2012).

Introducción

Los efectos del silenciamiento sobre el genoma de TRV se manifiestan en un fenotipo de recuperación en las plantas infectadas que por un mecanismo de protección cruzada las hace inmunes a ulteriores infecciones con virus relacionados (Ratcliff *et al.*, 1999). En plantas de *N. benthamiana* infectadas con un TRV recombinante que expresa la proteína de fluorescencia verde (*Green fluorescence protein*, GFP) esta recuperación se traduce en la pérdida de fluorescencia y el descenso de la acumulación viral que se observa tras días de infección (Ratcliff *et al.*, 1999; Jovel *et al.*, 2007) (Figura 11). En plantas recuperadas, el porcentaje de RNA viral asociado a ribosomas disminuye en comparación con plantas no recuperadas sugiriendo que la recuperación implica represión de la traducción de los transcritos virales (Ma *et al.*, 2015). Los RNAs reprimidos traducionalmente se acumulan en cuerpos de procesamiento (*P-bodies*, PB) donde son eventualmente procesados por enzimas que eliminan la caperuza, por ejemplo, DCP2. En plantas recuperadas se observa un aumento en la formación de PB lo que unido al hecho de que mutantes para las enzimas DCP2 presenten fenotipos de hipersusceptibilidad a TRV y mayor eficacia en silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) apunta a un rol importante de estos cuerpos de procesamiento en la eliminación del RNA viral (Ma *et al.*, 2015).

TRV tiene la capacidad de contrarrestar los efectos de este silenciamiento mediante la expresión en su genoma de un VSR, la proteína 16K (Macfarlane, 2010). En la actualidad la existencia de este supresor es un hecho conocido, sin embargo en el momento de realizar este estudio tan sólo algunos trabajos apuntaban a su capacidad de supresión del silenciamiento en células de

Drosophila (Reavy *et al.*, 2004). Toda la información conocida sobre este supresor procede, por tanto, de trabajos contemporáneos o posteriores a éste.

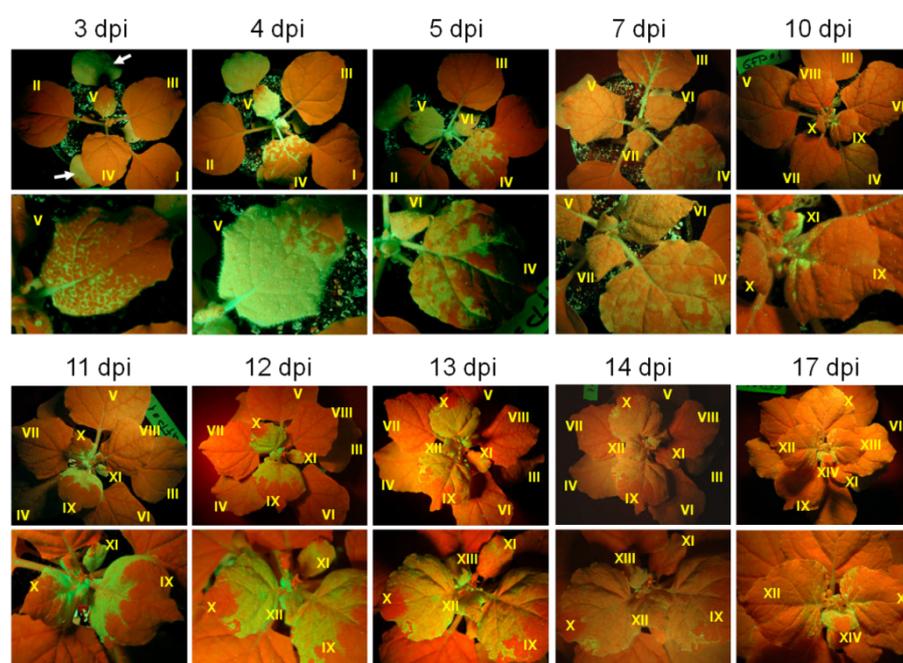


Figura 11: Recuperación de plantas de *N. benthamiana* tras una infección con un vector TRV-GFP. (dpi) días tras la infección. En números romanos se identifican individualmente las hojas.

La proteína 16K codificada en el RNA1 es por tanto el principal supresor del silenciamiento de TRV (Ghazala *et al.*, 2008; Martin-Hernandez and Baulcombe, 2008; Martínez-Priego *et al.*, 2008). Recientemente se ha observado que la proteína 29K relacionada con el movimiento del virus también contribuye a la supresión aunque únicamente en un contexto de replicación, contrariamente a

Introducción

16K que es capaz de suprimir el silenciamiento de forma independiente (Deng *et al.*, 2013). Esta supresión es más eficiente en raíces lo cual puede conferir una ventaja al virus que se acumula en mayor cantidad favoreciendo así su transmisión por nematodos (Andika *et al.*, 2012). 16K es una proteína principalmente citoplasmática aunque puede encontrarse en menor medida en el núcleo, coincidiendo con la presencia de dos señales bipartitas de localización nuclear en su secuencia (Liu *et al.*, 1991; Ghazala *et al.*, 2008). Como supresor es capaz de suprimir el silenciamiento inducido por ssRNA y bajas concentraciones de dsRNA y reduce la acumulación de siRNA en ensayos tanto de expresión transitoria como estable (Ghazala *et al.*, 2008; Martin-Hernandez and Baulcombe, 2008; Martínez-Priego *et al.*, 2008). También interfiere con el movimiento célula a célula y con la propagación sistémica del silenciamiento (Martínez-Priego *et al.*, 2008). Sorprendentemente, TRV resulta infeccioso y mantiene intacta su capacidad de acumularse y propagarse sistémicamente en ausencia de 16K (Martin-Hernandez and Baulcombe, 2008; Deng *et al.*, 2013). No obstante estos mutantes de función presentan diferencias en su dinámica de acumulación respecto de virus con 16K funcional (Deng *et al.*, 2013), y al contrario que estos, los mutantes de función 16K causan necrosis en la hojas inoculadas y en las sistémicas y no son capaces de infectar los meristemas (Martin-Hernandez and Baulcombe, 2008). La ausencia de 16K también afecta a la eficacia de los vectores TRV-VIGS disminuyéndola, lo que puede ser debido a un efecto estabilizador de este supresor sobre el RNA2 (Deng *et al.*, 2013).

b) TRV como vector de silenciamiento (VIGS)

El VIGS es una técnica utilizada para inhibir la expresión de un gen mediante el uso de un virus recombinante que posee un fragmento del gen endógeno que se desea silenciar (Lu *et al.*, 2003). Durante la infección viral el virus es reconocido por la maquinaria de silenciamiento disparándose un mecanismo de regulación que inhibe tanto la proliferación del virus como la expresión del gen de interés en los tejidos infectados. De este modo, empleando los controles adecuados es posible inferir la función del gen silenciado a partir del fenotipo observado en las plantas infectadas (Godge *et al.*, 2007; Purkayastha and Dasgupta). Aunque el fenotipo de pérdida de función del gen silenciado puede a veces verse enmascarado por los efectos de la infección, esta técnica presenta bastantes ventajas frente a otras estrategias de silenciamiento, en particular el RNAi (Watson *et al.*, 2005). Permite la clonación directa en el vector, el proceso es rápido lo que posibilita el análisis masivo de genes y la diana no se silencia hasta que el virus infecta la planta con lo que se pueden silenciar genes esenciales para el crecimiento y el desarrollo (Senthil-Kumar and Mysore, 2011; Deng *et al.*, 2013).

El uso de TRV como vector de silenciamiento en estudios de genómica funcional en plantas está ampliamente extendido debido a que es capaz de infectar un amplio rango de huéspedes, incluyendo *N. benthamiana*, tomate, *Arabidopsis* y otras especies afines (Y., Liu, Schiff, Marathe, *et al.*, 2002; Burch-Smith *et al.*, 2006; Y., Liu, Schiff and Dinesh-Kumar, 2002). Obviamente el uso de TRV como VIGS está supeditado a genotipos del huésped susceptibles a la

Introducción

infección. Por ejemplo, la observación de fenotipos de silenciamiento de genes endógenos no es posible en ciertas variedades de patata o tabaco que muestran resistencia a la infección o que manifiestan síntomas de necrosis o enfermedad en las plantas infectadas (Brigneti *et al.*, 2004; Ghazala and Varrelmann, 2007). TRV es además capaz de infectar meristemas lo que permite el silenciamiento génico en etapas tempranas del desarrollo de los órganos (Martin-Hernandez and Baulcombe, 2008; Harrison and Robinson, 1988). También es capaz de transmitirse a un pequeño porcentaje de las semillas posibilitando el silenciamiento de la diana durante la germinación y las primeras etapas del desarrollo.

Otra de las ventajas en el uso de TRV-VIGS es su capacidad de infectar plantas en ausencia del RNA2. El RNA1 codifica las funciones necesarias para la replicación y dispersión mientras que el RNA2 es extremadamente variable en su contenido génico (tan sólo la presencia de la CP es común a todos los aislados). Además, los genes en el RNA2 se expresan a través de promotores subgenómicos y por tanto insertar genes en lugar de 2b y 2c no afecta globalmente a la infección (Macfarlane, 2010). Teniendo en cuenta estas particularidades, los vectores VIGS basados en TRV permiten la inserción de secuencias foráneas en un sitio de clonación múltiple que sustituye a los genes 2b y 2c en el RNA2 (H., Liu *et al.*, 2002; Ratcliff *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 1998). Los vectores virales se desarrollaron en un primer momento para ser transcritos *in vitro* a partir de un plásmido linearizado que contenía el RNA infeccioso. Sin embargo el uso de vectores binarios de expresión en plantas, y su aplicación mediante infiltración directa en el tejido vegetal, resulta mucho más sencilla. Tanto el RNA1 como el 2 están

clonados en vectores binarios bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV, *Cauliflower mosaic virus*) (Bachan and Dinesh-Kumar, 2012). Estos vectores se emplean para transformar bacterias de la especie *Agrobacterium tumefaciens*, que sirven como vehículo para la transformación de la célula vegetal y la posterior expresión de transcritos virales. TRV se replica rápidamente en el tejido agroinfiltrado e infecta sistémicamente y de forma uniforme los tejidos de la planta de manera que un gen específico puede silenciarse de forma estable en aproximadamente 3-4 semanas (Y., Liu, Schiff, Marathe, *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2013). TRV es además capaz de burlar los efectos del silenciamiento solo parcialmente, lo cual constituye una ventaja evidente puesto que una supresión eficiente afectaría negativamente la respuesta de silenciamiento del gen endógeno.

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El silenciamiento génico es un mecanismo que regula tanto el propio genoma de la planta como el de los virus que las infectan. Esta particularidad hace que el silenciamiento génico y su contribución al proceso infeccioso deban ser estudiados y abordados desde una perspectiva global que integre sus dos vertientes reguladoras más allá de su mera función como mecanismo de defensa antiviral. En la introducción a este trabajo hemos respetado esta visión describiendo los diferentes mecanismos de regulación y haciendo hincapié en las interacciones que se establecen entre ellos.

El desenlace del proceso infeccioso debe entenderse como el resultado neto de las interacciones compatibles y de defensa entre el virus y la planta hospedadora (Maule *et al.*, 2002). Cuando un virus entra en una célula eucariota debe lidiar con la activación de diferentes mecanismos de defensa del huésped. El silenciamiento génico mediado por RNA constituye una primera línea de defensa innata de la planta, siendo los propios virus inductores, dianas y supresores de este sistema de defensa. Las plantas a través del silenciamiento génico son capaces de limitar la proliferación viral en las células infectadas permitiendo un delicado equilibrio entre la multiplicación del virus y la integridad celular. Sobre este equilibrio se fundamenta la relación de compatibilidad en la interacción planta-virus. En este escenario, los virus utilizan sus proteínas VSR para modular los efectos antivirales del silenciamiento y reprogramar la expresión génica del huésped proporcionando un entorno favorable para el desarrollo de la infección compatible (Ding and Voinnet, 2007; Donaire *et al.*, 2008; Donaire *et al.*, 2009; Dunoyer and Voinnet, 2005). Aunque en plantas existen evidencias crecientes que muestran un papel relevante del silenciamiento en el control de la inmunidad basal, no hay

Justificación y Objetivos

evidencias hasta el momento de la existencia de una regulación directa de los genomas virales mediada por sRNAs. Contrariamente, en animales, los miRNAs sí parecen desempeñar un papel importante en las interacciones hospedador-virus. Numerosos virus animales producen miRNAs capaces de regular transcritos del hospedador (Weinberg and Morris, 2006; Sullivan *et al.*, 2005) e incluso sus propios transcritos (Omoto and Fujii, 2005) favoreciendo de esta forma la infección. Además la existencia de miRNAs del hospedador capaces de actuar directamente sobre dianas virales constituye uno de los procesos de defensa antiviral mejor estudiados en estos organismos.

En esta tesis hemos abordado el estudio de la implicación de los miRNAs como mecanismo directo de defensa antiviral en plantas. El pequeño tamaño de los miRNAs y su gran diversidad de secuencia hace posible pensar en la existencia de secuencias complementarias en los ácidos nucleicos virales que pudieran ser diana de miRNAs. Esta hipótesis se apoya además en el hecho probado de que los miRNAs son capaces de reconocer y procesar secuencias homólogas dentro de genomas exógenos. Dado que la existencia de un VSR en el genoma de TRV podría comprometer el efecto inhibitor de miRNAs sobre la acumulación de transcritos virales, es imprescindible identificar y determinar el modo de acción de este VSR y definir su grado de interferencia sobre el metabolismo de miRNAs. Teniendo en cuenta todos estos razonamientos y el estado del conocimiento sobre el tema en el momento en el que esta tesis fue planteada, los objetivos principales a abordar fueron los siguientes:

1. Determinar experimentalmente la interacción funcional entre miRNAs y secuencias virales.
2. Identificar la proteína supresora del silenciamiento génico de TRV y caracterizar su modo de acción.
3. Determinar el efecto de la infección por TRV sobre el metabolismo de miRNAs

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

En los ensayos biológicos realizados en esta tesis hemos empleado las siguientes especies vegetales:

Nicotiana benthamiana: Empleamos tanto el genotipo silvestre, como la línea transgénica 16c que expresa constitutivamente la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Ruiz *et al.*, 1998). Cultivamos las plantas en cámaras de ambiente controlado en condiciones óptimas para la especie: 22-24°C, 60-75% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16:8 h de luz: oscuridad. Utilizamos como sustrato una mezcla de tierra vegetal y vermiculita en proporción 3:1.

Arabidopsis thaliana: Empleamos los ecotipos silvestres Columbia (Col-0) y Landsberg erecta (La.er), así como los mutantes deficientes en la ruta del silenciamiento génico *dcl1-9* (construido sobre fondo genético La.er) y *rdr2-1* (construido sobre fondo genético Col-0), cedidos por el Dr. J.C. Carrington (The Donald Danforth Plant Center, Missouri, USA) y el Dr. O. Voinnet (IBMP-CNRS, Strasbourg, Francia), respectivamente. Estos mutantes han sido descritos previamente (Allen, 2005; Deleris *et al.*, 2006; Dunoyer *et al.*, 2005).

Cultivamos las plantas de *A. thaliana* en cámaras de ambiente controlado en las condiciones óptimas para la especie: 19-22°C, 60-75% de humedad y con un fotoperiodo de 16:8 h de luz:oscuridad, con el mismo sustrato que el empleado para el cultivo de *N. benthamiana*.

3.2 AISLADOS VIRALES

Como sistema viral modelo hemos empleado un clon de cDNA infeccioso del virus del cascabeleo del tabaco (TRV) cedido por el Dr. S.P. Dinesh-Kumar (Yale University, New Haven, USA). Este clon está compuesto por dos vectores virales que contienen las secuencias genómicas correspondientes a los RNAs 1 y 2 del virus. Estos plásmidos se denominan pTRV1 y pTRV2.

El plásmido pTRV1 contiene una copia completa del cDNA del RNA1 del aislado silvestre PpK20. El plásmido pTRV2-PDS sin embargo, contiene una copia incompleta del RNA2, en la cual los cistrones que codifican para las proteínas 26,4 KDa y 32,8 KDa situadas a continuación de la proteína de la cápside han sido sustituidos por un sitio múltiple de clonación (MCS). En este MCS se encuentra clonado un fragmento del gen que codifica la fitoeno desaturasa (PDS) de *N. benthamiana* que está implicado en la síntesis de carotenos (Van Wezel *et al.*, 2003). El silenciamiento de este gen producido durante la infección de *N. benthamiana* por TRV provoca un fenotipo de foto-blanqueamiento en el tejido vegetal (Dinesh-Kumar *et al.*, 2003). Ambos plásmidos producen transcritos infecciosos *in vivo* bajo el control del promotor 35S del CaMV y del terminador de la transcripción del gen de la nopalinasintasa (NOS). Además poseen una ribozima en el extremo C terminal que favorece una producción eficiente de los RNAs virales (Liu *et al.*, 1991).

En esta tesis, y salvo que se indique lo contrario emplearemos el nombre de TRV para referirnos al sistema TRV1/TRV2-PDS.

3.3 INOCULACIÓN VIRAL POR TRV

Para la inoculación de los clones infecciosos en *N. benthamiana* empleamos un sistema de agroinfiltración en plantas a 15-21 días postgerminación. Los cultivos de *A. tumefaciens* de la cepa GV2260, transformados con los plásmidos pTRV1 y pTRV2-PDS, se incubaron en medio Luria-Bertani (LB) bacto-triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l durante 48 h a 28°C en agitación y en presencia de los antibióticos de selección kanamicina a 50 µg/ml, carbamicina a 50 µg/ml, rifampicina a 50 µg/ml y estreptomycin a 25 µg/ml añadiendo también ácido 2-N-morfolino etanosulfónico (MES) 10 mM pH 5,6 y acetosiringona 0,15 mM. Posteriormente estos cultivos se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min. El precipitado se resuspendió en un volumen apropiado de tampón de inoculación MES 10 mM pH 5,6, MgCl₂ 10 mM y acetosiringona 0,15 mM y se incubaron un mínimo de 4 h a temperatura ambiente. Posteriormente se inocularon por inyección en el envés de las hojas de la planta a una DO₆₀₀ igual a 1 (cultivos en proporción 1:1). La infección viral se confirmó con el desarrollo del fenotipo de blanqueamiento asociado al movimiento del virus en la planta y al consiguiente silenciamiento del gen endógeno PDS.

Las plantas de *A. thaliana* se inocularon a las 3 semanas post germinación. El inóculo consistió en un extracto obtenido a partir de hojas superiores no agroinfiltradas de plantas de *N. benthamiana* a los 3 días de la agroinfiltración con TRV, antes de cualquier manifestación de blanqueamiento. Este extracto se obtuvo machacando el tejido vegetal en un mortero con tampón fosfato sódico 0,1M y pH 7,2 1 gr/ml. El inóculo se aplicó frotando directamente este extracto con el dedo enguantado sobre todas las hojas de la roseta previamente espolvoreadas con el abrasivo carborundo.

Material y métodos

La infección viral se comprobó detectando la presencia de ambos RNAs virales por RT-PCR empleando los cebadores descritos en la Tabla 2 y/o por Dot-Blot (Ver apartados 3.10.3 y 3.10.4).

CEBADOR	SECUENCIA 5'-3'
TRV-134K_F	TCGGTACCCGAGATTTACAGTTGTTGG
TRV-134K_R	CGTCTAGAGGTAATCTCTCACCTCCC
TRV-CP_F	CTGGGTTACTAGCGGCACTGGAATA
TRV-CP_R	TCCACCAACTTAATCCCGAATAC

Tabla 2: **Oligonucleótidos empleados para comprobar la infección viral por TRV.** El par de oligos TRV-134K comprueban la presencia del RNA1 y los oligos TRV-CP la del RNA2.

3.4 CLONACIÓN Y MANTENIMIENTO DE CLONES

3.4.1 Cepas/estirpes bacterianas

Escherichia coli: Para la multiplicación de plásmidos se empleó la cepa DH5 α (Taylor *et al.*, 1993). Esta estirpe porta una mutación *recA*⁻ que no permite la recombinación y favorece la estabilidad de los plásmidos, y la mutación *LacZ* que puede ser complementada por una amplia variedad de los plásmidos usados habitualmente en clonación.

Las células de *E.coli* electrocompetentes se obtuvieron en el laboratorio siguiendo una modificación del protocolo descrito por (Cohen *et al.*, 1972), en el cual se substituyó el CaCl_2 por una solución de glicerol al 10%. Las células así obtenidas fueron transformadas por electroporación aplicando un voltaje de 2,2 kV a una resistencia de 200 Ω y una capacitancia de 25 μF .

Las células se incubaron posteriormente en agitación durante 45 min a 37°C en medio LB. A continuación se sembraron en placas de LB-agar en presencia del antibiótico de selección adecuado según el plásmido. Tras una incubación a 37°C de 16 h, la presencia de colonias en el medio de selección indicaba la presencia de células transformadas. Las colonias que contenían el inserto de interés se seleccionaron por PCR utilizando los cebadores correspondientes. Las colonias positivas se cultivaron en medio LB con antibiótico de selección y se guardaron para su mantenimiento según se indica en el apartado 3.8

Agrobacterium tumefaciens: Para los *ensayos de expresión transitoria* se emplearon las cepas GV2260 (Summerfelt, 1990) y C58C1 (Ashby *et al.*, 1988). La cepa GV2260 presenta resistencia a rifampicina y carbamicina, mientras que C58C1 presenta resistencia a rifampicina y a tetraciclina.

Las células termocompetentes de ambas cepas de *A.tumefaciens* fueron obtenidas partiendo de un cultivo en estado exponencial de crecimiento, con una $\text{DO}_{600} = 0,5$. De este cultivo se separó un volumen de 100 ml y se centrifugó 5 min a 5000 rpm. A continuación este precipitado fue resuspendido en 20 ml de una solución de CaCl_2 0,15M. Este volumen fue centrifugado de nuevo en las mismas condiciones. El precipitado obtenido fue resuspendido en 2 ml de la solución de Cl_2Ca y separado en

Material y métodos

alícuotas de 200 μ l. Estas alícuotas se transformaron en presencia de 1 μ g de plásmido aplicando una temperatura constante de 37°C durante 30 min para luego ser enfriadas en hielo.

Las células se incubaron posteriormente en agitación durante 45 min a 28°C en 1 ml de medio LB. A continuación se sembraron en placas de LB-agar en presencia de rifampicina a 50 μ g/ml junto con el antibiótico de selección adecuado según el plásmido. Tras una incubación a 28°C de 48 h, la aparición de colonias en el medio de selección indicaba la presencia de células transformadas. Las colonias que contenían el inserto de interés se seleccionaron por PCR utilizando los cebadores correspondientes. Las colonias positivas se incubaron en medio LB en presencia de rifampicina a la concentración utilizada anteriormente más el antibiótico correspondiente y se guardaron para su mantenimiento según se indica en el apartado 3.8.

3.5 PLÁSMIDOS EMPLEADOS PARA CLONACIÓN

3.5.1 Plásmidos base

- **pRTL2** (Restrepo *et al.*, 1990): Es un derivado del pGEM-T Easy (Promega) al que se le ha introducido un “cassette” de expresión consistente en un promotor duplicado 35S del virus CaMV, la región 5’ no traducible del virus del grabado del tabaco (TEV), un sitio de clonación múltiple y el terminador

de la transcripción 35S del CaMV. Este vector porta el gen *bla* que codifica β -lactamasa y que confiere resistencia a la ampicilina.

- **pSLJ75I55** (Jones *et al.*, 1992): Es un plásmido binario empleado en esta tesis para los ensayos de agro-expresión transitoria en planta. Este tipo de plásmidos posee orígenes de replicación de *E. coli* y *A. tumefaciens*, genes de resistencia a antibióticos y el T-DNA del plásmido Ti con un sitio de clonación múltiple para introducir la secuencia de interés. Este plásmido posee la ventaja de poder replicarse en *E. coli* y transferirse a *A. tumefaciens*. En su secuencia posee los genes *tetR* de resistencia a la tetraciclina y el gen *bar* de resistencia al herbicida bialafos/fosfinocitrina
- **pCambia 1303** (www.cambia.org): Es un plásmido binario de alto número de copias utilizado en este estudio para la expresión transitoria de genes mediada por *A. tumefaciens*. Este plásmido contiene el gen *nptII* de resistencia a kanamicina para bacterias. Además posee la secuencia del gen reportero *uidA* de la β -glucoronidasa integrada dentro del sitio de clonación múltiple para permitir su fusión con el inserto de interés. En las clonaciones contenidas en este trabajo el gen *uidA* ha sido substituido por nuestro inserto de interés.
- **pROK2-YFPN/pROK2-YFPC** (González *et al.*, 2010): Estos plásmidos derivan de un plásmido pROK2 y se utilizan en experimentos de complementación bimolecular de fluorescencia. Poseen en el sitio de clonación múltiple del T-DNA, en los extremos N-terminal y C-terminal (aminoácidos 1-154 y 155-238 respectivamente), la forma soluble de la proteína de fluorescencia amarilla (sYFP) bajo el promotor 35S de CaMV y el terminador Nos. Adyacente a la

Material y métodos

secuencia de la sYFP existe otro sitio de clonación múltiple BamHI-SmaI-KpnI-SacI que permite la fusión del inserto de interés en posición 5' o 3' terminal respecto a la secuencia codificadora. Contienen el gen *nptII* que confiere resistencia bacteriana a kanamicina.

3.5.2 Otras construcciones

- **pSLJ-HAGFP**: Es un derivado del pSLJ75I55 al que se le ha introducido en el sitio de clonación múltiple el cassette de expresión de un plásmido pRTL2 que contenía el ORF completo del gen que codifica la proteína soluble modificada GFP incluyendo el codón de parada y precedido por la secuencia del epítipo HA.
- **pSLJ-dsGFP** (Chisholm *et al.*, 2000): Este plásmido es un derivado del pSLJ75I55 al que se le ha introducido en el sitio de clonación múltiple el cassette de expresión de un plásmido pRTL2 que contenía dos copias en orientación sentido (GFP) y antisentido (PFG) del ORF completo del gen que codifica la proteína GFP. Ambas hebras están separadas por el intrón de 120 nts del gen *RTM1* de *Arabidopsis* (Johansen and Carrington, 2001). El "cassette" de expresión está diseñado para producir dsRNAs en plantas.
- **pFGC-dsGF-FG** (Himber *et al.*, 2003): Este plásmido es un derivado del vector binario pFGC5941 que contiene un intrón de la chalcona sintasa (*CHS*) y está diseñado para producir dsRNAs. Separadas por el intrón contiene dos copias en orientación sentido (GF) y antisentido (FG) de un fragmento de 541 nts correspondiente a la región 5' terminal y central de la secuencia codificadora

de la GFP. Este plásmido fue cedido por el doctor Olivier Voinnet (CNRS, Strassbourg, France).

- **pROK2-P19** (Canto *et al.*, 2006): Plásmido derivado de pROK2 que contiene la secuencia codificante de la P19 del virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV) en el sitio de clonación múltiple bajo el promotor 35S del CaMV y el terminador *NOS*.
- **pSLJ SCL6-IV** (Llave, Xie, *et al.*, 2002): Este plásmido es un derivado del pSLJ75515 al que se ha insertado en el sitio de clonación múltiple un “cassette” de expresión de un plásmido pRTL2 que contiene la secuencia completa del gen *SCL6-IV* (At4g00150) bajo el control del promotor 35S de CaMV y del terminador Nos.
- **pSLJprimiR171** (Llave, Kasschau, *et al.*, 2002): Este plásmido pSL75515 contiene la región intergénica completa entre las posiciones 19084413 y 19084535 del cromosoma III de *A. thaliana*. En ella se localiza el locus *MIRNA171a* a partir del cual se genera el miRNA maduro miR171a. El “cassette” de expresión, derivado de un plásmido pRTL2, está bajo el control del promotor 35S de CaMV y del terminador Nos.
- **pSLJTEV-P1/HCPRO** (Johansen and Carrington, 2001): Este plásmido derivado del pSLJ75515 contiene la secuencia comprendida entre los nucleótidos 12 a 2681 del genoma de TEV. Esta secuencia codifica las proteínas P1 y HCPro y los 82 residuos en N-terminal de la proteína P3. El “cassette” de expresión, derivado de un plásmido pRTL2, está bajo el control del promotor 35S de CaMV y del terminador Nos.

3.6 CONSTRUCCIONES EMPLEADAS EN EXPRESIÓN TRANSITORIA

Las construcciones empleadas en ensayos de expresión transitoria por agroinfiltración se obtuvieron siguiendo el siguiente esquema. En un primer paso la secuencia de interés se amplificó por PCR a partir de DNA genómico o plasmídico. Se utilizaron para ello cebadores que incorporaban las dianas de restricción necesarias para facilitar su clonación en el plásmido pRTL2 (Tabla 3). A continuación el “cassette” de expresión del plásmido pRTL2 que contiene el promotor 35S, la región líder del TEV, la secuencia clonada correspondiente y la región terminadora del 35S se cortó con los enzimas HindIII o PstI (el detalle para cada construcción se indica en la Tabla 2) y se clonó en el sitio correspondiente del vector de expresión pSLJ75I55. La integridad nucleolítica de las distintas construcciones se comprobó por secuenciación.

3.6.1 Clonación del pequeño RNA 38

El sRNA38 se sitúa en posición 7190449-7190472 entre los genes anotados como AT5G21140 y AT5G21150 en el cromosoma V de *A. thaliana*. Un fragmento de 2620 bp entre las posiciones 7189619 y 7192519, correspondiente a la secuencia completa de la región intergénica (IGR38C) que lo contiene además de una secuencia parcial (IGR38P) de 1000 pb entre las posiciones 7189619y 7189635 se amplificaron por PCR a partir de una preparación de DNA genómico (DNAzol, Ambion). En cada caso se amplificaron y clonaron independientemente las hebras sentido y antisentido del DNA genómico en pRTL2 en los sitios NcoI y KpnI del vector. El “cassette” de

expresión del plásmido pRTL2 se cortó con el enzima HindIII y se clonó en el sitio HindIII del vector de expresión pSLJ75I55.

3.6.2 Clonación de las secuencias precursoras de miRNAs

Para realizar estas construcciones nos basamos en las estructuras en forma de horquilla propuestas para los distintos precursores de miRNAs disponibles en la base de datos del “Arabidopsis Small RNA Project” (<http://asrp.cgrb.oregonstate.edu>). Para cada miRNA se seleccionó un fragmento de aproximadamente 1000 pb que incorporaba en su totalidad las secuencias adyacentes que generaban dichas estructuras secundarias y que por tanto debían de ser capaces de generar el miRNA maduro. Cada precursor se amplificó por PCR y se clonó en pRTL2. Las enzimas de restricción empleadas en cada caso y la secuencia de dichos cebadores se indican en la Tabla 3. Los “cassettes” de expresión de pRTL2 así contruidos y que contenían las diferentes secuencias precursoras se transfirieron al plásmido binario pSLJ75I55 mediante digestión y ligación con HindIII.

3.6.3 Clonación de las secuencias sensoras

Las secuencias sensoras empleadas en este estudio nos permiten monitorizar la actividad de miRNAs en un sistema de expresión transitoria mediada por *A. tumefaciens*. Dichas secuencias se basan en la secuencia codificadora de la forma soluble de la GFP a la que se fusiona, en posición 3' terminal tras el codón de terminación, la secuencia diana del miRNA correspondiente. Para la construcción de

Material y métodos

estas secuencias sensoras se amplificó por PCR la secuencia nucleolítica correspondiente a la proteína de fusión HAGFP utilizando como molde el plásmido pRTL2-HAGFP. Como iniciadores empleamos un cebador directo con la secuencia codificadora del epítipo HA que incorporaba la diana la NcoI en el extremo 5' y un cebador reverso que contenía los 19 nts terminales de la secuencia codificadora de la GFP seguidos de los 21 nts correspondientes a la secuencia diana estudiada. Este cebador contenía en posición 5' el sitio de restricción SacI (Tabla 3). Digerimos a continuación los productos de PCR con las enzimas adecuadas y los clonamos en pRTL2. Los "cassettes" de expresión de pRTL2 así contruidos y que contenían las diferentes secuencias sensoras se transfirieron por último al plásmido binario pSLJ75I55 mediante digestión y ligación con PstI.

3.6.4 Clonación de las proteínas de TRV

Los cistrones de las secuencias codificadoras de las distintas proteínas virales se amplificaron por PCR empleando cebadores específicos que incorporaban dianas de restricción para su clonación en pRTL2 (ver Tabla 3). Los cebadores de sentido directo incorporaban en 5' la secuencia correspondiente al epítipo HA, de modo que el producto de amplificación resultaba en una proteína de fusión con un epítipo HA en su posición N-terminal. Como molde se empleó el vector de cDNA pTRV1 descrito en el apartado 1.2. El "cassette" de expresión de cada construcción pRTL2 se digirió con HindIII o PstI y se clonó en pSLJ75I55 con la enzima correspondiente.

3.7 CONSTRUCCIONES EMPLEADAS EN ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE.

3.7.1 Clonación de genes AGO 1, AGO2, AGO4 de *A. thaliana*

Las secuencias correspondientes a los mRNAs de los genes *AGO1* ([AT1G48410](#)), *AGO2* ([AT1G31280](#)) y *AGO4* ([AT2G27040](#)) se amplificaron por RT-PCR empleando como molde de preparaciones purificadas de RNA total de *A. thaliana*. La reacción se realizó con el enzima “SuperScriptII” y con un cebador oligodT comercial (Roche) en un volumen final de reacción de 25 µl siguiendo el protocolo indicado por el fabricante y detallado en el apartado 3.10.3. Una fracción del cDNA (5 µl) así obtenido se amplificó por PCR con el enzima “PhusionHigh-Fidelity DNA polymerase”, utilizando oligonucleótidos diseñados sobre las secuencias de cDNA de Arabidopsis de *AGO1*, *AGO2*, *AGO4* presentes en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Estos cebadores incorporaban las dianas de las enzimas de restricción necesarias para su posterior clonación y que se indican en la Tabla 3. Los productos de PCR obtenidos se digirieron con los enzimas de restricción correspondientes y se clonaron en los plásmidos binarios pROK2-sYFPN/pROK2-sYFPC previamente linearizados con las mismas enzimas. El producto resultante es una proteína de fusión que contiene la secuencia codificadora de la proteína sYFP en posición amino (sYFPN) o carboxilo (sYFPC) terminal respecto a la proteína AGO.

3.7.2 Clonación de TRV-16K

La secuencia codificadora de la proteína viral TRV-16K se amplificó por PCR con la enzima “AmplitaqDNA polimerasa” a partir del clon de cDNA pTRV1 empleado como molde. Los cebadores empleados incorporaban las secuencias diana de las enzimas de restricción necesarias para su clonación en los plásmidos pROK2 y que se indican en la Tabla 3. El producto de PCR obtenido se digirió con los enzimas de restricción correspondientes y se clonó en los plásmidos binarios pROK2-YFPN/pROK2-YFPC previamente linearizados con las mismas enzimas. La construcción resultante es una proteína de fusión que contiene la secuencia codificadora de la proteína YFP en posición amino (YFPN) o carboxilo (YFPC) terminal respecto a la proteína TRV-16K. Las construcciones 16K portadoras de mutaciones puntuales (C65/66P and GW/GA) se realizaron por mutagenesis dirigida (Higuchi *et al.*, 1988) por PCR usando el plásmido pROK-sYFPN-16K como molde y cebadores mutagénicos que incorporan el cambio nucleotídico deseado (Higuchi *et al.*, 1988). El mutante 16K Δ 17 resulta de la delección de los 17 aminoácidos N-terminales de la proteína nativa 16K y se obtuvo por PCR a partir del plásmido pROK-sYFPN-16K. El producto de PCR mutagenizado así obtenido se digirió con los enzimas de restricción correspondientes y se clonó en el plásmido binario pROK2-YFPN.

Material y métodos

Cebador	Secuencia 5'-3'	Dianas
Precursores miRNAs		
Pre-miR399b_F	CGAGCTCAAGCCTTCATATGGATCT	SacI
Pre-miR399b_R	GGGGTACCTCAAAGCCGAATAACAGAG	KpnI
Pre_miR172b_F	CGAGCTCCTTCTTCACTTGACCTCT	SacI
Pre-miR172b_R	GGGGTACCTTGATAGATGATTGCGTCA	KpnI
Pre-miR157c_F	AGCCATGGCTTTGTCACTTCATACAC	NcoI
Pre-miR157c_R	CGTCTAGACCGCAATGATGAAGAATG	XbaI
Sensores miRNAs		
HA-GFP_F	TATGCCATGGCATACCTTATGATGTACCTGATTATGCAAGTAAAGGAGAAGAA CTTTTC	NcoI
GFP-MCDV_R	GCGAGCTCTGAATCTTCTTGATGCTGCTTTTATTTGTATAGTTCATCC	SacI
GFP-AP2_R	GCGAGCTCAGAATGCTGATGATGCTGCAGTTATTTGTATAGTTCATCC	SacI
GFP-UBQ_R	GCGAGCTCTGCCAAAGAAGATTTGCCCTATTATTTGTATAGTTCATCC	SacI
GFP-TRV_R	GCGAGCTCCTCCCAAAGGAAGGCCGCCCTTATTTGTATAGTTCATCC	SacI
GFP-SPL10_R	GCGAGCTCTTGACAGAAGAGAGAGAGCAGTTATTTGTATAGTTCATCC	SacI
GFP-TSWV_R	GCGAGCTCGGCAGGTATCCTTGGGTACTTATTTGTATAGTTCATCC	SacI
sRNA38		
IGR38C_F	GATCCATGGGATTCACTAAAATATAGGTG	NcoI
IGR38P_R	GATGGTACCGGGAGACAGAAAGTGC	KpnI
IGR38P_F	GATCCATGGGGGAGACAGAAAGTGC	NcoI
IGR38C_R	GATGGTACCGATTCACTAAAATATAGGTG	KpnI
Proteínas TRV		
HA134K_F	AGCCATGGCATACCTTATGATGTACCTGATTATGCAGCGAACGGTAACTTCAA GTTG	NcoI
134K_R	CTGAGCTCTCATAAGACGGTCTCAG	SacI
HA29K_F	GCCATGGCATACCTTATGATGTACCTGATTATGCAGAAGACAAGTCATTGGTC	NcoI
29K_R	CGTCTAGATTAAGACGAGTTTTTCTTA	XbaI
HA16K_F	AGCCATGGCATACCTTATGATGTACCTGATTATGCAACGTGTGACTCAAGGG TTG	NcoI
16K_R	CGTCTAGATCAAAAAGCAAACAACG	XbaI

Material y métodos

Complementación bimolecular fluorescente		
TRV-16K_F	CCCGGCATGACGTGTGACTCAAGGGTTGT	XmaI
TRV-16K_R	GAGCTCCGTCAAAAAGCAAACAACGATCAA	SacI
AGO4-sYFP-F	GGATCCATGGATTCAACAAATGGTAACGG	BamHI
AGO4 sYFP-R	GGTACCTTAACAGAAGAACATGGAGTTGGC	KpnI
AGO1 sYFP-F	CCCGGTATGGTGAGAAAGAGAAGAACGGAT	SmaI
AGO1 sYFP-R	GGTACCTCAGCAGTAGAACATGACACGCT	KpnI
AGO2 sYFP-F	ACTGGATCCATGGAGAGAGGTGGTTATCG	BamHI
AGO2-sYFP-R	CATGAGCTCTCAGACGAAGAACATAACATTC	SacI
Construcciones mutantes de 16K		
16KC65-66/P-sYFP-F	TGTGTATAATTTTTTGGCCGTAGTCACCTTG	
16KC65-66/P-sYFP-R	CGGCCAAAAAATTATACACATCAAAAGTAAAATC	
16KΔ17-sYFP-F	CCCGGCATGAGTATCGGTCATGCTAAC	

Tabla 3: **Secuencias de los cebadores utilizados en experimentos de clonación.** La primera columna indica el nombre el cebador; la segunda columna indica su secuencia en 5'-3'. Las dianas de restricción presentes en cada cebador aparecen marcadas en rojo. La tercera columna indica el nombre de la enzima correspondiente.

3.8 MANTENIMIENTO DE CLONES

Todos los clones generados en esta tesis se emplearon para transformar células competentes de *E. coli* y/o *A. tumefaciens* como se detalla en el apartado 3.4 Las células transformadas se incubaron en medio LB en presencia de los antibióticos correspondientes a 37°C durante 16 h y 28°C durante 48 h, respectivamente. Una alícuota de cada cultivo en crecimiento exponencial fue congelada a -80°C en glicerol al 10%.

3.9 MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA

3.9.1 Extracción de DNA total

El DNA total se extrajo a partir de 25-50 mg de material vegetal, disgregado en un tubo Eppendorf con ayuda de un micropistilo, utilizando 1 ml del reactivo “DNAzolreagent” (Life Technologies). El extracto se centrifugó a 10000 g durante 10 min a 4°C. Al sobrenadante así obtenido se le añadieron 0.5 ml de etanol al 100% por cada ml de DNAzol y se centrifugó a 4000 g durante 5 min para precipitar el DNA. Una vez precipitado, el DNA se lavó dos veces con 500 µl de etanol al 70% centrifugándolo después de cada lavado a 4000 g durante 1 min. El DNA se resuspendió en un volumen apropiado de agua miliQ y se cuantificó con ayuda del “Nanodrop” ND-1000 (ThermoScientific) para su uso posterior.

3.9.2 Extracción de DNA plasmídico

Los plásmidos de interés se multiplicaron mediante cultivo de células transformadas en medio de selección LB en presencia del antibiótico correspondiente como se detalla en el apartado 3.4. Los cultivos de *E.coli* se realizaron en agitación en un volumen de 10 ml durante 24 h a 37°C. El plásmido se purificó utilizando el kit “High PurePlasmidIsolation kit” (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cultivos de *A. tumefaciens* se incubaron en agitación en un volumen de 50 ml durante 48 h a 28°C. El plásmido se purificó utilizando el kit “QiagenPlasmidMidi kit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En

Material y métodos

ambos casos la cantidad y calidad del DNA purificado se midieron utilizando el “Nanodrop ND-1000” (ThermoScientific) y por separación en geles de agarosa al 1%.

3.9.3 Amplificación de DNA por PCR

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR se realizó empleando los siguientes moldes de DNA: 1) preparaciones de DNA plasmídico (0,1-0,5 μ g), 2) cDNA obtenido en una reacción de transcriptción inversa (RT, un cuarto del volumen de la reacción) (ver apartado 3.10.3) o 3) preparaciones de DNA genómico (200-500 ng).

Las amplificaciones de fragmentos menores de 1000 pb se realizaron con el enzima “AmpliTaQ DNA Polimerase” 5 U/ μ (AppliedBiosystems). La mezcla de reacción se ajustó a un volumen de 10, 20 ó 100 μ l dependiendo del análisis posterior, en tampón Tris-HCl 100 mM pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, BSA 2 mg/ml y glicerol 0,01% peso/volumen, en presencia de cebadores específicos a una concentración de 0,3 μ M cada uno, de una mezcla de desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega) a concentración final de 0,2 mM cada uno y de 1-5 U de la enzima. Las amplificaciones de fragmentos de tamaño superior a 1000 pb se realizaron con el enzima “Phusion High-Fidelity DNA polymerase” (Finnzymes) partiendo de la misma cantidad de DNA o cDNA que el caso anterior y en presencia de 1X de tampón 5x Phusion HF Buffer, MgCl 20 mM, 0,5 μ M de cada uno de los dNTPs y 4 U del enzima. El número y condiciones de cada ciclo de amplificación variaron en ambos casos según la pareja de cebadores empleada y del tamaño del fragmento que se quería amplificar. La reacción se realizó en termocicladores “PTC-100TM” (MJresearch, inc).

3.9.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para el análisis y separación de fragmentos de ácidos nucleicos se empleó la electroforesis en geles de agarosa (Pronadisa) al 1-2% en función del tamaño del producto a analizar. El electrolito utilizado fue tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X pH 8. La electroforesis se llevó a cabo a 100-120 V durante el tiempo estimado para una correcta separación de los fragmentos. La visualización de los ácidos nucleicos se realizó mediante tinción del gel con EtBr y con luz ultravioleta con el transiluminador “E-box” (VilberLourmat). Como marcadores de peso molecular se usó el DNA del fago lambda digerido con las enzimas BamHI y HindIII o el marcador comercial “GeneRuler 100pb DNA ladder plus” (Fermentas).

3.9.5 Elución de DNA a partir de agarosa

Los productos de DNA de interés se eluyeron tras su separación en geles de agarosa utilizando el kit comercial “GENECLEAN Turbo” (MP Biomedicals) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.9.6 Marcaje radioactivo de sondas

Las sondas de cDNA utilizadas para la detección de secuencias nucleotídicas en ensayos de hibridación Northern blot y/o Dot blot se prepararon a partir de productos de PCR obtenidos empleando cebadores específicos (ver Tabla 4). Los

Material y métodos

moldes empleados en cada caso fueron: el plásmido pRTL2-HAGFP para la síntesis de sondas derivadas de la GFP, el plásmido pTRV1 para la sonda 3' UTR del RNA genómico de TRV y para la sonda de 16K y el plásmido pSLJ-TEV-P1/HCPro para la sonda de HCPro. El producto amplificado se extrajo con fenol:cloroformo y se purificó por precipitación con etanol al 100%. La técnica de marcaje fue el "random priming" en presencia de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (6000Ci/mmol; 10mCi/ml) usando el fragmento "Klenow" de la DNA polimerasa I (NEBL) según las instrucciones del fabricante. Los nucleótidos no incorporados a la reacción se eliminaron usando el sistema "P30 Micro Bio-Spin Chromatography columns" (BioRad).

SONDA	PLÁSMIDO MOLDE	CEBADORES
GFP	pRTL ₂ HAGFP	GFP_F: GGAGAGGGTGAAGGTGATGC GFP_R: TGCCATGTGTAATCCCAGCA
GF	pRTL ₂ HAGFP	GF (GFP)_F: TGGTGATGTTAATGGGCACAA GF(GFP)_R: TGTTGACGAGGGTGTCTCCC
P	pRTL ₂ HAGFP	P (GFP)_F: GACACAACATTGAAGATGG P (GFP)_R: GTATAGTTCATCCATGCCA
TRV1	pTRV1	TRV134K_F: TCGGTACCCGAGATTTACAGTTGTTGG TRV134K_R: CGTCTAGAGGTAATCTCTCACCTCCC
16K	pTRV1	TRV16K_F: ATGTACCTGATTATGCAACGTGTGTACTIONCAAGGGTTG TRV16K_R: TCAAAAAGCAAACAAACG
HCPro	TEV-P1/HCPRO	HCPro_F: AGCGACAAAAACATCTCTGAGGCATT HCPro_R: CTAAAGGATTCTCACTGAGATTGATC

Tabla 4: **Plásmidos y cebadores empleados en la obtención de las sondas para la detección de secuencias nucleotídicas.** Se describe para cada sonda, el nombre de la misma, el plásmido molde utilizado así como las secuencias de los oligos utilizados para su amplificación.

sRNA	IDENTIFICADOR	SECUENCIA 5'-3'
sRNA38	DBE#38	ATAAACTTGGTTCGCAGAGGTTTA
miR158	ath-miR158a	TGCTTTGTCTACATTTGGGA
miR171	ath-miR171	GATATTGGCGCGGCTCAATCA
miR403	ath-miR403	CGAGTTTGTGCGTGAATCTAA
miR162	ath-miR162a	CTGGATGCAGAGGTTTATCGA
miR172	ath-miR172b	ATGCAGCATCATCAAGATTCT
miR157	ath-miR157c	GTGCTCTCTATCTTCTGTCAA
miR169	ath-miR169	TCGGCAAGTCATCCTTGGCTG
miR393	ath-miR393	GATCAATGCGATCCCTTTGGA
miR395c	ath-miR395c	GAGTCCCCCAAACACTTCAG
miR397b	ath-miR397b	CATCAACGATGCACTCAATGA
miR398	ath-miR398c	CAGGGGTGACCTGAGAACACA
miR399	ath-miR399b	CAGGGCAACTCTCCTTTGGCA
miR447a	ath-miR447a	CAACAAAACATCTCGTCCCCAA
miR171*	ath-miR171*	TCTCAGTGAACCAAGCCAATA
miR403*	ath-miR403*	AATTAGATTCAAGCACAAAACA
miR162*	ath-miR162*	GATCGATGAACCGCTGCCTCC
miR172*	ath-miR172*	TGTGAATCTTAATGGTGTCTGC
miR158*	ath-miR158*	TTTCCAAAATTGTAGACAAAG
miR169*	ath-miR169*	CCGTTCAACAGGAACCGATGT
TAS1	TAS1a	TACGCTATGTTGGACTTAGAA
TAS2	TAS2	AAGTATCATCATTTCGCTTGGGA
TAS3	TAS3a	AAGGCCTTACAAGGTCAAGAA

Tabla 5: **Oligonucleótidos sintéticos de DNA utilizados como sondas.** En la columna de la izquierda se indica el miRNAs o ta-siRNAs al que es complementario.

3.10 MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA

3.10.1 Purificación de RNA

Las preparaciones de RNA total empleadas en los análisis de Northern blot y Dotblot se obtuvieron con “TRIZOL Reagent” (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y partiendo de 1-2 mg de tejido fresco homogeneizado en nitrógeno líquido. Las preparaciones de RNA total utilizadas en reacciones de RT-PCR convencional y cuantitativa, en el análisis transcriptómico y en la técnica de 5'-RACE se obtuvieron empleando el kit comercial “RNeasyPlantMiniKit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de 80-100 mg de tejido vegetal. El RNA así extraído recibió un tratamiento adicional con DNasa (Turbo DNase, Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar cualquier rastro de DNA. En todos los casos la calidad y cantidad del RNA extraído se determinó con la ayuda del “Nanodrop ND-1000” (ThermoScientific) y por visualización en geles de agarosa al 1%. El RNA utilizado en el estudio transcriptómico requirió de un análisis adicional para la comprobación de su pureza e integridad con ayuda del “ExperionAutomatedElectrophoresisSystem” (Bio-Rad).

3.10.2 Fraccionamiento del RNA total

Para obtener la fracción de bajo peso molecular del RNA (LMW) se empleó una preparación de de RNA total (0,5 a 1 mg) que se fraccionó empleando el sistema de columnas de afinidad “DNA/RNA Midi Kit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del

fabricante. Como método alternativo empleamos el fraccionamiento por LiCl. La muestra de RNA se llevó a un volumen de 400 μ l y se añadieron 0,2 vol de LiCl 8 M. Las muestras se incubaron un mínimo de 2 h en hielo. A continuación se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante enriquecido en RNA LMW se transfirió a un nuevo tubo y se precipitó añadiendo 2,5 vol de etanol absoluto y 0,1 vol de acetato sódico 3 M. Después de incubar las muestras durante 30 min en hielo, se centrifugaron a 14000 rpm otros 30 min a 4°C. El precipitado resultante se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en un volumen adecuado de agua libre de RNasa.

3.10.3 Transcripción inversa (RT)

La síntesis de cadenas complementarias de DNA (cDNA) se llevó a cabo por transcripción inversa utilizando RNA total como molde y las enzimas: i) transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT, Promega) para la síntesis de cadenas de longitud inferior a 1kb o ii) Superscript II (Invitrogen) para la síntesis de cadenas de longitud mayor a 1 kb. La reacción catalizada por la AMV-RT se realizó partiendo de 1-5 μ g de RNA total molde, y añadiendo 0,25 μ M de cebador reverso, 1X de tampón específico 5X compuesto por Tris-HCl 250 mM pH 8.3 a 25°C, KCl 250 mM, MgCl 250mM, espermidina 2.5 mM y DTT 50 mM, más 0,5 mM de mezcla de dNTPs, 5 U de inhibidor de RNasa "RNasin" (Promega) y 1 U de enzima AMV RT y siguiendo las instrucciones del fabricante. Por su parte la reacción catalizada por la "SuperScript II" partió de la misma concentración de RNA total molde a la que se añadió 2 μ M de cebador reverso, oligodT (Roche) 2 μ M, mezcla de dNTPs 0,5 mM, 1X

Material y métodos

de tampón específico de la enzima 5X, DTT 0.1 M, 100 U de inhibidor de RNasa “RNasin” y 200 U de “SuperScript IIRT”.

3.10.4 Dot Blot

Las muestras de RNA total (500 ng) se depositaron sobre una membrana de nylon cargada positivamente (Roche) fijándose a la misma por exposición durante 5 min a la radiación UV proporcionada por un “Stratalinker 1800” (Stratagene). La membrana se incubó durante 2 h a 65°C en tampón de hibridación compuesto por 50% formamidadesionizada, SSC 5X, N-lauroylsarcosina 0,1%, SDS, 0,1%, “Blockingreagent” (Roche) 2%. A este mismo tampón de incubación se le añadió 500 ng de la sonda de RNA marcada con digoxigenina. La membrana se incubó en presencia de la sonda durante 16-20 h a 65°C. Tras la hibridación la membrana se sometió a diversos lavados: i) 2 lavados breves de 5 min en SSC 2x y SDS 0,1% a 65°C, ii) 2 lavados de 30 min en SSC 0,1% y SDS 0,1% a 65°C y iii) un último lavado de 5 min con ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM pH 7,5, Tween 20 0,3% (v/v) a temperatura ambiente. A continuación la membrana se incubó durante 30 min en ácido maleico 100 mM, NaCl 50 mM pH 7,5, solución bloqueante 10X compuesta por caseína al 10% purificada en tampón maleico y el anticuerpo antidigoxigenina (Sigma) marcado con fosfatasa alcalina (Roche) en proporción 1/10000. Tras esta incubación la membrana se lavó brevemente con ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM pH 7,5, Tween 20 0,3% (v/v) a temperatura ambiente. El revelado se realizó incubando la membrana en oscuridad con Tris-HCl 0,1M pH 9,5, NaCl 0,1M en presencia del substrato quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina, el CSPD (disodio 3 (4-

metoxyspiro {1,2-dioxietano-3,2'-(5'-cloro) triciclo [3.3.1.1^{3,7}] decan} 4-yl fenil-fosfato))) (Roche). La membrana se expuso durante el tiempo necesario (de 1 a 120 min) en películas fotográficas (AGFA) y se revelaron con ayuda de un revelador "RX AGFA Curix60".

3.10.5 Northern Blot

Para la detección de RNA de alto peso molecular por Northern blot se emplearon preparaciones de RNA total (20 µg en un volumen máximo de 40 µl) desnaturalizadas previamente a 65°C durante 5 min en tampón de carga 5X [(azul de bromofenol 0,03%, EDTA 5 mM, formaldehído 7,4%, glicerol al 20%, formamida al 30%), tampón 3-morfolino-propano-sulfónico (MOPS) 80 mM, acetato sódico 20 mM y 0,2 µg/µl de bromuro de etidio]. Las muestras se separaron en geles desnaturalizantes de agarosa al 1,5% que contenían MOPS pH7 y formaldehído al 6%. El electrolito utilizado estaba compuesto igualmente por 0,5 M de MOPS 0,5 M pH 7.

Como marcador de peso molecular se empleó "RNA MilleniumMarker"(Ambion) con un rango de tamaños de 0,5 a 9 kb. La electroforesis se llevó a cabo a 60-80 V durante el tiempo necesario para asegurar una correcta separación de los fragmentos. Una vez completada la electroforesis, los geles se visualizaron con un transiluminador de luz UV para confirmar la normalización de la carga. Tras la electroforesis el gel se lavó en tampón 10X SSC durante 10 min. Pasado ese tiempo el RNA se transfirió a membranas de nylon cargadas positivamente (Roche) por

Material y métodos

capilaridad durante 16 h en tampón 10X SSC. El RNA se fijó a las membranas por radiación UV a 1.200 J con un "Stratalinker" Modelo 1.800 (Stratagene)

Las membranas se transfirieron a tubos de hibridación y se incubaron a 42°C en tampón comercial "Perfect-Hyb" (Sigma) durante al menos 1 h. A continuación, se añadió la sonda correspondiente ya desnaturizada sobre la solución de hibridación y las membranas se incubaron durante 16 h a 42°C. Tras la hibridación la membrana se lavó sucesivamente en soluciones de SSC y SDS de concentración decreciente según el siguiente esquema: 2 lavados con SSC 2X y SDS 0,2%, 1 lavado con SSC 1X y SDS 0,1% y 1 último lavado con SSC 0,1X y SDS 0,1% a 50-65°C dependiendo del tipo de sonda empleado. Finalmente la membrana se expuso en películas autoradiográficas sensibles a rayos X "BioMaxXar Film" (Kodak) el tiempo necesario y se reveló con un revelador "RX AGFA Curix60". Cuando fue necesario reutilizar la membrana se eliminó la sonda marcada lavando con 0,1X SSC y 0,1% SDS a 90°C el tiempo necesario hasta el decaimiento de la actividad radioactiva.

3.10.6 Northern Blot de RNA de bajo peso molecular

Para la detección de sRNAs, las muestras de RNA de bajo peso molecular (RNA LMW) (15-30 µg) se desnaturizaron en 1 vol de formamida y 0,1 vol de tampón de carga a 65°C durante 5 min dejándose enfriar en hielo a continuación durante un mínimo de 2 min. Las muestras se cargaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 15-17% (acrilamida/bisacrilamida, 37:5:1 (BioRad)) y urea al 7%. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TBE 5X a 180 V durante 2-3h. Como

marcadores de peso molecular se utilizaron oligonucleótidos sintéticos de RNA con el extremo 5' fosforilado (Dharmacon) (Ver Tabla 6).

Una vez completada la electroforesis los geles se tiñeron en tampón TBE 5X con EtBr para confirmar la normalización de la carga. A continuación el RNA se transfirió desde el gel a una membrana de nylon con carga positiva (Roche) mediante electrotransferencia semi seca a 400 mA durante 1 h empleando tampón TBE 0,5X y el aparato "Trans-blotsemidrytranfercell" (BioRad). El RNA se fijó a la membrana como en el apartado anterior.

Para la detección de sRNAs empleando como sondas oligonucleótidos sintéticos de DNA se realizó la prehibridación e hibridación de las membranas a 38°C en tampón "ULTRAHyb" (Ambion) durante 16 h. Tres lavados de la membrana de 30 min cada uno se realizaron a continuación a 38°C en tampón 2X SSC y 0,5X SDS. Cuando se emplearon sondas de cDNA para detección de sRNAs la hibridación y los lavados se realizaron a 42°C.

OLIGOS	SECUENCIA 5'-3'
21 nt	pACCUCUGCGAACCAAGUUUUAU
24 nt	pGGCACCUCUGCGAACCAAGUUUUAU

Tabla 6: **Oligonucleótidos sintéticos de RNA de 21 y 24 nts utilizados como marcadores de peso molecular.**

3.10.7 Análisis densitométrico de las señales de hibridación

Las películas expuestas y reveladas en experimentos de hibridación se procesaron con un escáner "GS800 CalibratedDensitometer" (BioRad) con el que se

Material y métodos

analizó la intensidad de las bandas de hibridación con el programa “QuantityOne” versión 4.2.3 (BioRad).

3.10.8 5' RACE (Rapid Amplification of CDNA Ends)

Los ensayos de 5' RACE se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por (Llave, Kasschau, *et al.*, 2002). Para ello se emplearon preparaciones purificadas de mRNA poli (A) (250 ng) obtenidas con el kit comercial “Oligotex® mRNA Mini Kit” (Qiagen) a partir de RNA total. El RNA poliadenilado se ligó, sin tratamiento previo con fosfatasa alcalina (CIAP), con un adaptador de RNA (A1; 50 ng) (Tabla 7) con ayuda de 20 U de T4 RNA ligase (NEBL) a 4°C durante 16 h. Este adaptador posee un extremo 3'-OH de modo que forma enlace fosfodiéster con el extremo 5'-P de los mRNAs procesados por sRNAs (Llave, Kasschau, *et al.*, 2002). El RNA híbrido [A1-RNA poli (A)] formado, se purificó con fenol: cloroformo y posterior precipitación con etanol. El producto purificado fue el molde de una transcripción inversa con “Superscript II” (Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.10.3

El cebador de la RT fue un oligod (T) comercial, “GeneRaceoligodT” (Roche), cuya secuencia es complementaria a la secuencia de la cola poli (A). Sobre este cDNA monocatenario se realizó una PCR base con la enzima “AmpliTaqDNA polimerase” (Roche), utilizando como cebador directo el oligonucleótido 5'RACE A1 (Tabla 7) cuya secuencia corresponde parcialmente con el adaptador A1. Como cebador reverso se empleó el oligonucleótido 3' RACE Nested complementario de la secuencia fusionada en posición 5' con el oligo empleado en la RT. La PCR base se empleó como molde para la amplificación de productos específicos con ayuda de la “Hot StartAmpli-Taq

GOLD polymerase” (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como cebador directo en esta PCR se empleó el oligonucleótido 5’RACE A1 y como cebadores reversos secuencias específicas de los genes estudiados (Tabla 7). El programa de amplificación consistió en una primera amplificación de 3 ciclos a 70°C durante 45 sec, una segunda de 3 ciclos a 65°C 45 sec y por último 30 ciclos de amplificación a 60°C de 45 sec.

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA 5’-3’
RNA oligo A1	CACUGCGUUUGCUGGCUUUGGCUGAAUUCG’
Gene Racer OligodT Primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T) ₂₄
5’ RACE A1	CGTTTGCTGGCTTTGGCTGAAT’
3’ RACE nested	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG’
Race ARF10_R	CCGCTTCCGCTCTTCTTCCAAA’
Race SCL6IV_R	GGAGCCGAGGAGGTCTAAGCTCAA’
Race CLV_R	CTTAAGCTCTGACATCTCCGGTGG’

Tabla 7: Oligonucleótidos utilizados en 5’RACE

3.10.9 Análisis transcriptómico

Para el análisis transcriptómico se utilizó el “microarray” de CATMA (Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArray) (Crowe *et al.*, 2003; Sclep *et al.*, 2007; Allemeersch *et al.*, 2005) (<http://www.catma.org>). Los genes de Arabidopsis presentes en el “microarray” están representados por secuencias específicas de reconocimientos (GST) únicas, cada una de las cuales se diseñó de modo que presentara una similitud de secuencia menor del 70% con cualquier otra secuencia

Material y métodos

del genoma. Estas GST consistieron en amplicones de 150 a 500 pb que incluían secuencias de cebadores con dianas para enzimas de restricción para que pudieran ser fácilmente reamplificados, clonados y/o usados en estudios funcionales. El diseño de estos GST se basó no sólo en las anotaciones del TIGR (Plant Transcripts Assemblies), <http://plantta.jcvi.org/> sino también en las predicciones de genes codificantes de proteínas del “Eugene v1.0 software”, y de diferente información disponible (transcritos, sitios de iniciación de la traducción, similitudes proteicas etc.). Este “microarray” contiene 24576 secuencias disponibles anotadas como genes en TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org/>) junto con 677 secuencias GST adicionales específicas del CATMA.

El marcaje, la hibridación y la visualización de las muestras se realizó como se describe en (Lurin, 2004) en la “Unité de Recherche en GénomiqueVégétale” (URGV. INRA UMR1165, CNRS UMR8114, Evry, Francia). Los datos representan el logaritmo de la media de la intensidad de cada píxel a 635 nm (rojo) y 532 nm (verde), sin sustracción del fondo. Los ratios de logaritmos hacen referencia a la expresión diferencial entre dos condiciones $\log_2(\text{rojo/verde})$ o $\log_2(\text{verde/rojo})$ en función del diseño experimental. Los “microarrays” se normalizaron para eliminar desviaciones. Para la determinación de los genes expresados diferencialmente se realizó un T-test de los \log_2 asumiendo que la varianza de los ratios de los \log_2 era el mismo para todos los genes. Aquellos *spots* que presentaban varianzas extremas se excluyeron del análisis. Los p-valores se ajustaron según el método de Bonferroni con controles para el “familywise error rate” (FWER). Se consideró que dos genes presentaban una expresión diferencial si el FWER era menor del 5%.

3.10.10 Cuantificación de RNA mediante PCR en tiempo real

Para la cuantificación por RT-PCR en tiempo real (*qRT-PCR*) se utilizaron muestras de RNA total tratadas con DNasa, cuantificadas y verificadas tal y como se indica en el apartado 3.10.1. En esta tesis se han utilizado dos procedimientos distintos de RT-PCR a tiempo real.

En los experimentos de determinación de los niveles de mRNAs dianas de miRNAs, las reacciones de RT y PCR se realizaron en etapas independientes. En primer lugar se obtuvo el cDNA a partir de una preparación de RNA total (previamente tratada con DNasa) empleando el kit comercial “iScriptcDNAsynthesiskit” (BioRad) tal como indica el fabricante. En este paso se incluyó un control sin enzima para asegurar la ausencia de contaminación por DNA en las muestras. La PCR posterior se llevó a cabo partiendo de 4 μ l del cDNA obtenido previamente y añadiendo tampón “QuantimixEasy SYG master mix para SYBR Green 1”2X (Biotools) y 3 μ M de cada cebador específico. La reacción de amplificación se llevó a cabo en el “iCycler iQ5 Multicolor Real-Time PCR DetectionSystem” (Bio-Rad) con el siguiente programa de amplificación: 95°C 10 min de desnaturalización inicial seguido de 40 ciclos de amplificación (desnaturalización 20 sec a 95°C, anillamiento 20 sec a 62°C, elongación 20 sec a 72°C). El análisis de los resultados se realizó con el programa “iQ5 Software Standard Edition versión 2.0” (BioRad).

En los experimentos de determinación de los niveles de RNA genómico viral se utilizó un sistema de qRT-PCR en un paso. La reacción completa de RT-PCR se llevó a cabo partiendo de 30 ng de RNA total y añadiendo tampón “QuantimixEasy SYG

Material y métodos

master mix para SYBR Green I™2X (Biotools), cebadores 0,3 μM de los, 10 U de “RNA inhibitor” (AppliedBiosystems), y 1 U de MuLV RT (AppliedBiosystems). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un “Rotor Gene 6000” (CorbettLifeSciences) con el siguiente programa de amplificación: 95°C 10 min de desnaturalización inicial, seguido de 40 ciclos de amplificación (desnaturalización 20 sec A 95°C; anillamiento 20 sec a 60°C; elongación 20 sec a 72°C). El análisis de los resultados se realizó con el programa “Rotor Gene 6000” (CorbettLifeSciences).

Los cebadores utilizados en las amplificaciones se detallan en la Tabla 8 y fueron diseñados utilizando el programa “Primer 3” versión 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) sobre la secuencia del gen de interés que se detalla en la tabla y cumpliendo los requisitos establecidos por el programa para cebadores de PCR a tiempo real. La eficiencia de los mismos se determinó realizando curvas estándar consistentes en diluciones seriadas de las muestras. Partiendo de una concentración inicial de RNA de 50 ng/ul se realizaron 8 puntos de concentración decreciente, cada uno de ellos a un tercio de concentración menor que el anterior. Los programas de análisis del “Rotor Gene 6000” y “iQ5 Software Standard Edition” versión 2.0 calcularon a partir de los valores de Ct obtenidos en cada punto la eficiencia de cada pareja de cebadores, considerándose como válidas únicamente aquellas eficiencias superiores al 95%. El nivel de expresión relativa de cada mensajero se calculó según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando *β tubulina* (AT1G20010) y *CBP20* (AT5G44200) de *A. thaliana* como genes de referencia. La presencia de los productos deseados de PCR se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 2% o por secuenciación. Salvo que se indique lo contrario, se realizaron 2 réplicas biológicas independientes y 3 réplicas técnicas en cada una. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con el programa

“Statgraphics Plus”, versión 5.1 (StatisticalGraphicsCorporation), aplicando un test ANOVA seguido de un test de Duncan.

NOMBRE	IDENTIFICADOR	SECUENCIA 5'-3'
SCL6-VI_F	At2g45160	TTCCCGTCGTCTTCTTCTCC
SCL6-VI_R	At2g45160	GTGGTCGCCGTTGTTGTTTC
HAP2A_F	At5g12840	GAGCCCTGGTGAAAAACAA
HAP2A_R	At5g12840	GGGGCAATCCAAAGAAGAGG
CSD2_F	At2g8190	CAATCCTCGCATTCTCATCTCC
CSD2_R	At2g8190	GAGCTTTAACGGCGAAGGAAAC
HisH4_F	At1g07820	GGGAAGAGGAAAGGGAGGAA
HisH4_R	At1g07820	CCACTGATACGCTTGACACCA
CBP20_F	At5g44200	GTGGCTTTTGTTCGTCCTGTT
CBP20_R	At5g44200	GCCCCATTGTCTTCCTTCTTG
β tubulin_F	At1g20010	GCAACAATGAGCGGTGTGACTT
β tubulin_R	At1g20010	GAAATGGAGACGAGGGAATGG
(TRV) CA_R	NC_003805	GCTGTGCTTTGATTTCTCCACC
(TRV) CA_F	NC_003805	GTGCACGCAACAGTTCTAATCG

Tabla 8: **Oligonucleótidos usados en qRT-PCR.** En la tabla se indica el nombre del gen, su identificador correspondiente así como la secuencia de cada oligo. Los oligos de TRV no tienen código AGI ya que como DNA molde se utilizó el plásmido TRV descrito en el apartado 2.2.

3.11 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.11.1 Extracción de proteínas del tejido vegetal

Los extractos de proteína se prepararon triturando 2 discos frescos de hoja de *N. benthamiana* de medio centímetro de diámetro con N₂ líquido en 200 µl de tampón Laemmli 2X (50 mM Tris-Cl pH 6,8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,001% BPB, 10% Glicerol). Las muestras homogeneizadas se hirvieron durante 5 min y se clarificaron mediante centrifugación.

3.11.2 Análisis y manipulación de proteínas

a) SDS-PAGE

Los extractos proteicos homogeneizados (5-20 µl), se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10-15% (acrilamida/bisacrilamida 29:2:0.8) y 10% SDS empleando el soporte "Mini-Protean II" (BioRad). La electroforesis se llevo a cabo en tampón Tris-glicina-SDS compuesto por 25 mM Tris PH 8,3, 190 mM glicina y 0,1% SDS durante aproximadamente una hora aplicando una corriente de 20 mA por cada soporte. Las proteínas se visualizaron por tinción del gel con una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,25% con 20% de metanol y 10% de ácido tricloroacético y posterior eliminación del exceso de colorante con una solución de ácido acético al 10%. Esta visualización

sirvió además para comprobar la normalización de la carga. Los pesos moleculares de las proteínas se estimaron comparando su movilidad electroforética con la del marcador comercial “Prestained SDS-PAGE standardBroadRange” (BioRad) de rango de 6,9 a 210 kDa. Cuando fue necesario se emplearon geles en gradiente a partir de dos soluciones de acrilamida/bisacrilamida (29:2:0,8) para el gel separador al 5% y 15% respectivamente.

b) Inmunoelectrotransferencia (Western Blot)

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (GE Healthcare) en tampón Tris-Glicina-metanol compuesto por 25mM Tris-HCl pH 8.3, 190 mM glicina y 20% metanol. La transferencia se llevó a cabo mediante el sistema “Mini Trans-BlotCell” (BioRad), aplicando una corriente de 250 mA durante 1 h o mediante el sistema “Trans-BlotSemi-dry Transfer Cell” (BioRad) aplicando una corriente de 400 mA y 25 V durante 1 h. Tras la transferencia, las membranas se incubaron 1-2 h en tampón PBST compuesto por 15 mM Na₂PO₄ pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20 con un 5% de leche desnatada en polvo para bloquear los puntos de unión no ocupados de la membrana.

Para la detección de HCP_{ro} de TEV, la membrana se incubó durante 16 h con un anticuerpo policlonal específico cedido por el Dr T.P. Pirone (U. Kentucky, EEUU) en proporción 1:5000 en tampón PBST y 5% de leche en polvo. Para la detección de las proteínas de fusión YFPN-AGO1, YFPN-AGO2 y YFPN-AGO4 la membrana se incubó con un anticuerpo policlonal específico frente al extremo N-terminal de la GFP

Material y métodos

(SIGMA) en proporción 1:3000 en tampón PBST y 5% leche en polvo. En todos los casos las membranas se lavaron tras la hibridación 3 veces con volúmenes adecuados de tampón PBST. A continuación la membrana se incubó durante una hora con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (SIGMA) en proporción 1:10000 en tampón PBST y 5%leche en polvo. El exceso de anticuerpo secundario se lavó con volúmenes adecuados de PBST. Para la detección de las proteínas fusionadas al epítipo HA no fue necesaria la incubación con el anticuerpo secundario conjugado. La membrana se incubó durante 16 h a 4°C con el anticuerpo conjugado “Anti HA peroxidasehighaffinity” (Roche) en proporción 1:10000 en tampón PBST y 5% leche en polvo.El revelado de la actividad peroxidasa se efectuó en todos los casos por quimioluminiscencia mediante el sistema ECL (AmershamBiosciences).

3.11.3 Ensayos de inmunoprecipitación

a) Inmunoprecipitación con proteína A-agarosa

Para la preparación de extractos proteicos se trituraron aproximadamente 2 g de hoja en N₂ (l) a los que se añadió 10 ml de tampón de lisis compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 7.4, KCl 100 mM, MgCl 22.5 mM, “Nomidet P40” 0.1% (SIGMA) y una tableta inhibidora de proteasas (Roche). El homogenizado así obtenido se clarificó como se describe en el apartado 3.11.1. La concentración en proteína del extracto clarificado se determinó por la técnica de Bradford (Sambrook and Russell, 2001). A los extractos obtenidos, normalizados a una concentración de 2 mg/ml de proteína,

se les añadió 50 µl/ml de proteína A agarosa (Roche) y se incubaron durante 20 min a 4°C. A continuación los extractos fueron centrifugados durante 5 min a 5000 g. De la fracción sobrenadante obtenida se conservó una alícuota de 100 µl de la cual se extrajo RNA total con “TRIZOL Reagent” (Ambion). La fracción proteica precipitada unida a la “protein-A-agarose” se extrajo con Laemmli 2X, siguiendo los protocolos descritos en el apartado 3.11.1. El sobrenadante restante (aproximadamente 500 µl) se dividió en dos volúmenes equivalentes. Uno de los volúmenes se incubó en presencia de 2 µg de anticuerpo Anti-HA (“Anti-HA peroxidasehighaffinity”, Roche) y el otro en presencia de 2 µg de anticuerpo Anti-His (Roche), durante 2 h a 4°C. La alícuota incubada en presencia de anticuerpo anti-His constituyó el control negativo. Tras la incubación, se añadió a cada muestra 50 µl de “protein-A-agarose” (Invitrogen). Las muestras se incubaron en agitación durante 1 h a 4°C y tras la incubación se centrifugaron durante 30 sec a 5000 g. El sobrenadante fue eliminado y la fracción precipitada se lavó 3 veces en tampón de lisis. Tras el último lavado se añadieron 200 µl de tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.4, EDTA 10 mM, NaCl 300 mM y SDS 2% (peso/volumen). El sobrenadante con el RNA se separó de las proteínas unidas a la “protein-A-agarose” por centrifugación a 5000 g durante 30 sec. Las proteínas se extrajeron como se ha descrito anteriormente. El sobrenadante se trató con 0.2 µg/µl de “Proteinase K” (SIGMA) y el RNA se extrajo precipitándolo con 1 µl de glicógeno (20 µg/µl) y 1 vol de isopropanol. Las muestras se incubaron a -20°C un mínimo de 2 h y posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 min a 4°C. El precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua libre de RNasa.

Material y métodos

b) Inmunoprecipitación con HA-agarosa

Aproximadamente 1-2 g de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltrada se trituraron con ayuda de N₂(l) en 4 ml de tampón de extracción compuesto por 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5% glicerol, 0,1% Tritón X-100, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 tableta de cóctel inhibidor de proteasas de plantas (SIGMA Fast Protease Inhibitor Cocktail Tablets), y 2% polivinilpirrolidona (PVP). A continuación las muestras se incubaron en agitación durante 10 min a 4°C. Tras la incubación la muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se recogió y se volvió a centrifugar a 20000 g durante 30 min en una microfuga para separar el extracto proteico sobrenadante del RNA precipitado. La resina HA-agarosa (50 µl) (Monoclonal anti-HA agarose A2095, SIGMA) se bloqueó durante 1 h con BSA (1 mg/ml) y se resuspendió con un volumen de tampón de lavado (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5% glicerol, 0,1% Tritón X-100, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 tableta de cóctel inhibidor de proteasas de plantas. La cantidad de proteína en el sobrenadante se estimó mediante ensayo Bradford de modo que fuera posible ajustar la concentración total de proteína en todas las muestras. La resina se incubó entonces en agitación suave con el extracto proteico obtenido anteriormente durante 2 h a 4°C. Tras esta incubación se realizaron 4 lavados de la resina con el tampón de lavado. Finalizado el último lavado se añadió a la resina 40 µl del mismo tampón con 1 vol de Laemmli 2X. Las muestras se hirvieron a continuación durante 5 min y se centrifugaron a 6000 g durante 5 min para separar las proteínas en el sobrenadante del precipitado de resina. Las fracciones crudas no inmunoprecipitadas e inmunoprecipitadas se analizaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida.

3.12 UNIÓN *IN VITRO* PROTEÍNA-SIRNAS

3.12.1 Marcaje y anillamiento de RNAs sintéticos

Los RNAs sintéticos de cadenas complementarias de 21 nts (AG1: 5' CGUACGCGUCACGCGUACGUU 3' y AG2: 5' CGUACGCGUGACGCGUACGUU 3') empleados en esta tesis fueron cedidos por el Dr. López-Moya (CRAG, CSIC-IRTA-UAB, Barcelona). 30 pmol de cada oligonucleótido AG1 y AG2 se fosforilaron en presencia de [γ -P³²] dATP y 20 U de "T4 polinucleotide kinasa" (Fermentas) en un volumen final de 20 μ l durante 1 h a 37°C. Para la formación del dúplex de RNA, el oligonucleótido AG2 se incubó en exceso molar 10X con el oligonucleótido AG1 a 95°C durante 1 min. Transcurrido ese tiempo se dejó enfriar lentamente para facilitar el anillamiento de las cadenas complementarias y formar el ds-siRNA de 21 nts.

La muestra se corrió en un gel nativo de poliacrilamida al 12% en tampón 0.5x TBE, durante 2 h a 80 V. La banda del dúplex marcado se escindió del gel y se eluyó en 1 ml de NaClO₄ 3M en un tubo Eppendorff. El dúplex se precipitó con 2 vol de etanol y 10 μ g de glucógeno mediante incubación de 1 h a -80°C. A continuación la solución se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm a 4°C y el precipitado se lavó dos veces en etanol al 70%. La muestra se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, y el precipitado se secó en una centrifuga de vacío. Posteriormente se resuspendió en 10 μ l de agua desionizada estéril y se congeló hasta su uso.

3.12.2 Ensayo de unión a RNA

Aproximadamente 100 mg de hoja de *N. benthamiana* agroinfiltrada con la construcción de interés se trituraron en N₂ (l) y se resuspendieron en 200 µl de tampón HEPES 150 mM (ácido [N-(2-hidroxi)etil] piperazina-N'-2-etano-sulfónico) pH 7.5, acetato de potasio 500 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 2 µM. Las reacciones de unión entre RNA (simple y doble cadena) y proteína se realizaron incubando 3 µl de este extracto durante 30 min a temperatura ambiente en presencia de 5 µl de una mezcla que contenía 1 µl de siRNA AG1 marcado o 1 µl de ds-siRNA marcado, 12 µl de tampón de lisis 5x compuesto por HEPES 150 mM pH 7.5, acetato de potasio 500 mM, MgCl₂ 100 mM, 0.6 µl de DTT 1M, 1 µl de "RNasin" (Promega) y 45,4 µl de agua libre de RNasa. El control negativo consistió en la incubación de 3 µl de extracto con 2 µl de esta mezcla en ausencia de siRNAs marcados. Los complejos formados se resolvieron en un gel nativo de poli(acrilamida) al 5% en 1X TBE. La electroforesis se llevó a cabo en cámara fría a 50 V durante 30 min seguidos de 2-3 h a 100 V. Los gels se secaron en un secador de gels "BioRad 583" (BioRad) durante 45 min a 80°C y se visualizaron directamente con ayuda de un "PhosphorImaging" (BioRad).

4 RESULTADOS

4.1 miRNAs Y DEFENSA ANTIVIRAL

4.1.1 Reconocimiento y procesamiento de secuencias virales por miRNAs

En el momento en que se planteó este estudio ya existían evidencias en sistemas animales de que los miRNAs del hospedador desempeñaban un papel importante en las interacciones con determinados virus puesto que eran capaces de reconocer y procesar secuencias complementarias dentro del genoma viral (Lecellier *et al.*, 2005). Contrariamente, en plantas no existía ninguna evidencia de este tipo, si bien el pequeño tamaño de los sRNAs (~20-24 nts), así como su abundancia y diversidad de secuencia hacían pensar en la probable existencia de secuencias complementarias en los ácidos nucleicos virales. De hecho, cuando se aplicaban algoritmos informáticos para el análisis de secuencias era posible identificar multitud de secuencias virales con diverso grado de complementariedad con sRNA endógenos de la planta. No obstante, aunque el número de candidatos podía reducirse notablemente en función del número y la posición de desapareamientos y enlaces G:U en la zona de complementariedad, la mayor parte eran probablemente falsos positivos. Por otra parte, no estaban todavía bien definidos en ese momento cuales eran los requerimientos estructurales necesarios para una interacción funcional entre un sRNAs y su diana lo cual complicaba aún más hacer una predicción fiable de posibles dianas entre el conjunto de secuencias predichas.

Resultados

Teniendo esto en cuenta, como paso preliminar a la búsqueda de regiones complementarias entre genomas virales y sRNAs del hospedador, estudiamos el grado de apareamiento de secuencias en los pares funcionales miRNAs-RNA mensajero (mRNA) diana descritos hasta el momento. Nuestro objetivo era establecer unos parámetros mínimos de complementariedad en los que fuese posible el reconocimiento y el procesamiento endonucleolítico del mRNA diana que nos sirvieran para discriminar las interacciones virus-sRNA más probables entre todas las predichas por métodos informáticos. Una vez establecidos, empleamos la herramienta de búsqueda de secuencias diana de la base de datos de sRNAs “Arabidopsis Small RNA Project” (ASRP; <http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/db/>) para enfrentar diversas secuencias virales con el conjunto de sRNAs de Arabidopsis obtenidos por métodos de secuenciación y seleccionar así sRNAs endógenos con potencial para interactuar con las secuencias virales escogidas. De todos los posibles candidatos predichos bioinformáticamente se seleccionaron aquellos pares que cumplieran con los requisitos establecidos y se estudió su capacidad de interactuar funcionalmente.

a) Requerimientos estructurales y termodinámicos en la interacción entre miRNAs y sus RNAs dianas

En plantas, el reconocimiento efectivo entre el miRNA y su mensajero diana parece requerir de un alto grado de complementariedad (Reinhart *et al.*, 2002). Esta complementariedad se extiende a toda la región de interacción si bien es con

frecuencia incompleta y presenta ciertos desapareamientos y/o enlaces G:U (Figura 12A) (Dugas and Bartel, 2004; Reinhart *et al.*, 2002). En animales por el contrario, los dúplex funcionales son tremendamente variables en estructura y en la mayoría de los casos la zona de interacción entre ambos contiene numerosos bucles y desapareamientos. La porción de secuencia estrictamente complementaria se reduce a una región corta de 7 a 8 nts en el extremo 5' terminal del miRNA conocida como región semilla (Brennecke *et al.*, 2005).

Nuestro primer objetivo en este estudio consistió en definir un rango de apareamiento funcional basándonos en el estudio previo de los pares miRNA-mRNA diana ya conocidos. Esto nos permitiría discriminar las uniones más improbables de aquellas con un grado de apareamiento que estuviera sustentado por interacciones validadas entre un miRNA y su diana. De este modo sería posible acotar los requerimientos mínimos de apareamiento que pudieran ser posteriormente aplicados para la búsqueda de potenciales interacciones entre sRNAs endógenos y secuencias complementarias del RNA viral. Los parámetros estudiados fueron el número de desapareamientos canónicos y enlaces G:U, su localización y la estabilidad termodinámica del enlace. Estos parámetros se estudiaron en los 63 pares miRNA-mRNA que habían sido validados funcionalmente antes de iniciarse este trabajo (Gustafson *et al.*, 2005). El 84,1% de los pares estudiados presentaba un número total de desapareamientos (incluyendo enlaces G:U) en la zona de complementariedad igual o inferior a 3, de los que el 23% presentaban 2 desapareamientos canónicos y 1 enlace G:U (Figura 12B). Curiosamente tan solo un 4,76% de los casos investigados presentaban complementariedad total, mientras que en el otro extremo el 6,34% de las

Resultados

interacciones funcionales validadas presentaban hasta 5 desapareamientos con un máximo de 4 desapareamientos canónicos. En conclusión, la complementariedad es en la mayoría de los casos parcial (95,24%) y aunque se han descritos interacciones funcionales en pares con hasta 5 desapareamientos, la mayoría de los casos analizados presentan un máximo de 2 desapareamientos combinado con hasta un máximo de 1 enlace G:U. Al igual que en animales, en plantas se ha observado que la estabilidad de unión en la región 5' del miRNA parece ser determinante para un eficaz reconocimiento y procesamiento de la diana (Bartel, 2004). Esta región requiere un mayor grado de complementariedad mientras que la región 3' admite un mayor número de desapareamientos (Mallory *et al.*, 2004). Del mismo modo, dado que la actividad catalítica de AGO1 ocurre en una posición centrada en la zona de interacción entre el miRNA y el RNA diana es esperable que dicha región sea poco tolerante a desapareamientos (Hutvagner and Simard, 2008; Mallory and Vaucheret, 2010). Los resultados relativos a los 63 pares estudiados en nuestro trabajo indicaban que en efecto el número máximo de desapareamientos encontrados correspondía a la región 3' del miRNA, siendo inferiores en las regiones, central y 5' terminal (Figura 12C). El 49,2% de los casos estudiados presentaban desapareamiento exclusivamente en la región 3' terminal mientras que el 25,4% contenía algún desapareamiento en posición central y/o 5' terminal. El último parámetro estudiado fue la estabilidad termodinámica del enlace. Analizamos con ayuda del programa mfold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu>) la energía libre de los enlaces en la zona de apareamiento entre cada miRNA y su diana estableciendo que el intervalo óptimo debía estar comprendido entre 28 y 38,7kJ/mol.

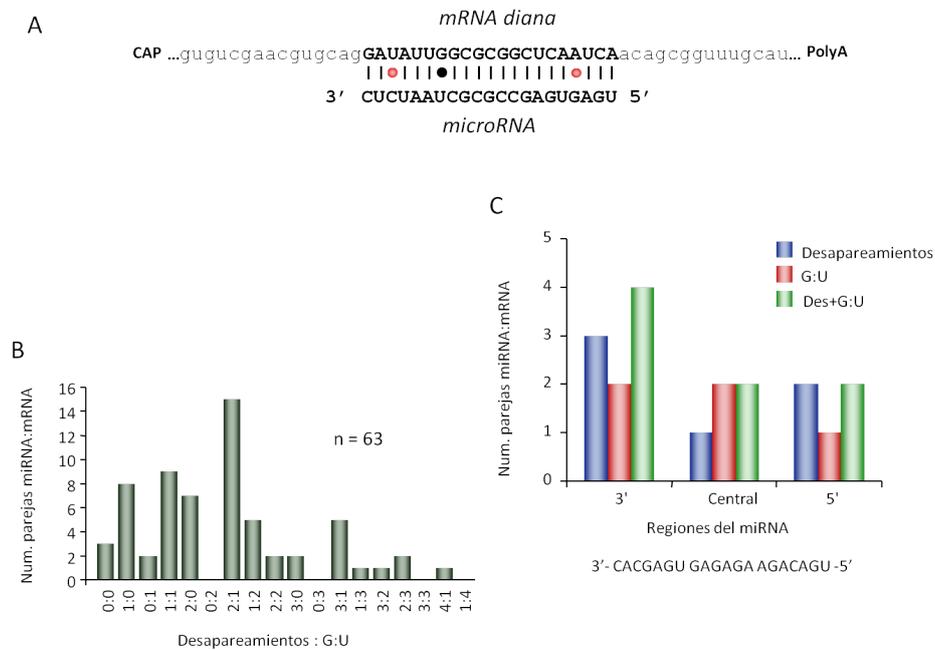


Figura 12: Requerimientos estructurales en la interacción entre miRNAs y sus mRNAs diana. B) Representación gráfica del número de desapareamientos en la zona de complementariedad entre el miRNA y su diana validada en los 63 pares estudiados. A) Estructura tipo de la unión entre un miRNA y su mRNA diana. Las líneas verticales representan bases apareadas, los puntos rojos desapareamientos canónicos entre bases y los puntos negros enlaces G:U. En el eje X se muestra el ratio de desapareamientos canónicos frente a no canónicos G:U. En el eje Y se presenta el número de parejas miRNA-mRNA para cada caso. C) Representación del número máximo de desapareamientos totales (verde), canónicos (azul) y no canónicos (rojo) en las regiones 3', central y 5' del miRNA respecto a su secuencia diana

Resultados

b) Identificación de sRNAs endógenos con potencial de interaccionar con secuencias virales

Con el fin de identificar sRNAs endógenos con el potencial teórico de aparear con secuencias virales de acuerdo con los parámetros definidos en el apartado anterior empleamos la herramienta “Blast” para la búsqueda de secuencias complementarias disponible en el servidor ASRP

(http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/db/search_user_seq.html).

Para ello recurrimos a la colección de sRNAs disponible en la base de datos del ASRP que en el momento de realizarse este estudio contaba con aproximadamente 1920 secuencias únicas de sRNAs endógenos de Arabidopsis. Como secuencias de referencia se emplearon las secuencias correspondientes a los RNAs virales de 586 especies diferentes anotadas en

(<http://www.dpvweb.net/seqs/plantviruses.php>).

Se analizaron virus pertenecientes a los principales géneros virales, analizando tanto virus de DNA como de RNA, e incluyendo algunos satélites y virus no asignados a género. En algunos casos concretos, como la familia Potyviridae, se analizaron todos los virus de la familia anotados en la base de datos. En la mayoría de los casos no se encontraron sRNAs en la colección secuenciada con suficiente complementariedad con los genomas virales investigados, y cuando los hubo en general el nivel de complementariedad obtenido fue muy bajo. Esta observación muy probablemente refleje el reducido número de sRNAs secuenciados disponibles en la base de datos en el momento del estudio. Sólo en 13 casos la herramienta de búsqueda encontró alguna

similitud (Tabla 9) aunque en la mayoría de ellos el número de desapareamientos era cercano al límite máximo observado en el apartado anterior. De los 13 casos se seleccionaron 3 para su estudio funcional: dos pares miRNA-virus (miR399-Virus del cascabeleo del tabaco (TRV)) y (miR172-Virus del enanismo clorótico del maíz (MCDV)) que presentaban 5 y 4 desapareamientos (incluyendo enlaces G:U), respectivamente y el par (sRNA38-Virus del mosaico sureño de la judía (SBMV)) con 5 desapareamientos G:U.

El sRNA38 (ASRP, DBE#38) tiene una longitud de 24 nts y se había identificado inicialmente en varias genotecas de sRNAs obtenidas a partir de inflorescencias de *Arabidopsis* así como de plantas tratadas con flagelina donde se encontraba sobrerrepresentado respecto a las plantas no tratadas (Llave *et al.*, 2002; Olivier Voinnet, comunicación personal). Se encuentra localizado en una región intergénica del cromosoma 5 (5: 7190449-7190472), entre los genes At5g21140 y At5g21150 (Figura 13A y B) y hasta el momento no se le conoce ninguna función. No obstante, el hecho de que su tamaño y secuencia sea variable y que otros sRNAs de tamaños que oscilan entre 19 y 25 nts mapean en zonas adyacentes dentro del mismo locus sugieren que se trata de un siRNA similar a los siRNAs derivados de la heterocromatina. Como paso previo al estudio de su posible interacción con el genoma de SBMV decidimos estudiar su expresión en tejido vegetal y determinar la estructura de su molécula precursora.

Resultados

Diana - miRNA	Desapareamientos totales	G:U	Desapareamientos + G:U	AG	pb	% G-C
NC_002990 (BYMV RNA 1)- sRNA1735 (miR158*)	0	5	5	-19,9	20	30
NC_002990 (BYMV RNA 1)- sRNA1727 (miR158*)	1	5	6	-20	21	28,6
NC_003530 (carnation ringspot virus RNA 1)- sRNA1772 (miR169*)	2	1	3	-25,6	20	55
NC_003810 (Spinach latent virus RNA 3)- sRNA1991 (miR391*)	2	3	5	-27,7	21	52,4
NC_003627 (Maize chlorotic mottle virus)- sRNA1727 (miR158*)	2	4	6	-23,6	21	28,6
NC_003627 (Maize chlorotic mottle virus)- sRNA1735 (miR158*)	2	4	6	-22,7	20	30
NC_003805 (Tobacco rattle virus RNA 1)- sRNA1867 (miR399)	2	3	5	-31,2	21	61,9
NC_003627 (Maize chlorotic mottle virus)- sRNA2007 (miR158*)	3	4	7	-23,8	22	27,3
NC_003840 (Tomato ringspot virus RNA 1)-sRNA1632	3	2	5	-23,2	20	45
NC_003746 (Rice yellow stunt virus)- sRNA1426 (miR160)	3	3	6	-30,3	21	61,9
NC_003746 (Rice yellow stunt virus)- sRNA1815 (miR169 like)	3	2	5	-27,7	21	47,6
NC_002051 (Tomatto spotted wilt virus RNA S)- sRNA1770 (miR157)	3	2	5	-27	21	42,8
NC_002051 (Tomatto spotted wilt virus RNA S)- sRNA1952(miR157)	3	2	5	-26,9	21	42,8
NC_002051 (Tomatto spotted wilt virus RNA S)- sRNA1424 (miR157)	3	2	5	-26,1	21	42,8
NC_003626 (Maize chlorotic dwarf virus)- sRNA1867(miR399)	3	2	5	-32,8	21	61,9
NC_001480 (Eggplant mosaic virus)- sRNA1634	4	1	5	-28,4	20	65
NC_003626 (Maize chlorotic dwarf virus)-sRNA1432(miR172)	4	0	4	-26,1	21	42,8
NC_003626 (Maize chlorotic dwarf virus)-sRNA811(miR172)	5	0	5	-26,1	21	42,8
AJ414558 (Southern bean mosaic virus partial)-sRNA38	5	5	5	-37,3	24	54,2

Tabla 9: **Listado de virus con secuencias parcialmente complementarias con sRNAs de *A. thaliana*.** Se detallan el número de desapareamientos canónicos, enlaces G:U, desapareamientos totales, la energía libre y el porcentaje de GC en la zona de interacción predicha. En la primera columna los sRNAs se nombran de acuerdo a su código en la base de datos ASRP. Se muestra el número de acceso de las secuencias virales predichas como posible diana. pb, pares de bases.

El sRNA38 procede de una región intergénica, pero desconocíamos si era capaz de adquirir una estructura secundaria estable en forma de horquilla como es característico de los precursores de miRNAs. Para determinarlo, seleccionamos una zona de unos 200 pb aguas arriba y abajo respecto a la posición del sRNA38 y con ayuda del programa mfold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu>) hicimos una predicción computacional de la estructura secundaria del hipotético precursor. La estructura resultante más estable obtenida se muestra en la figura 13C junto con las estructuras correspondientes a los precursores de algunos miRNAs bien caracterizados. En estos observamos que la secuencia del miRNA se localiza en la

varilla de la horquilla, en una región con elevado apareamiento de la cadena de RNA. Sin embargo en la predicción de estructura generada para el sRNA38 a partir de sus secuencias colindantes, el sRNA38 se encuentra en una región poco estructurada que presenta numerosos desapareamientos. El hecho de que esta región genómica no tenga el potencial de autoplegarse en una estructura secundaria estable accesible por las enzimas DCL parece descartar la posibilidad de que el sRNA38 sea un miRNA.

Para analizar *in planta* la expresión del sRNA38 clonamos en un vector binario (pSLJ75I55; ver material y métodos sección 3.6.1) la secuencia completa (2921 nts) correspondiente a la región intergénica donde mapea el sRNA 38 bajo el promotor constitutivo 35S (pSLJ IGR38-L). Del mismo modo clonamos un fragmento de menor tamaño (1000 nts) que contenía el sRNA38 en una posición centrada (pSLJ IGR38-S). En ambos casos, las secuencias correspondientes se clonaron en orientación sentido (+) y antisentido (-). Las construcciones resultantes se emplearon para agroinfiltrar plantas de *N. benthamiana* ($DO_{600}=0,4$) (Figura 14A). Como controles se utilizaron plantas de *N. benthamiana* sin agroinfiltrar (Nb), plantas agroinfiltradas con vector vacío (pSLJ75I55) y plantas agroinfiltradas con una construcción portadora de la secuencia de la GFP (pSLJ-GFP).

Las muestras se tomaron a los 2 y 3 días post agroinfiltración (dpa). En estas condiciones experimentales fue posible detectar por Northern blot el miR171 endógeno en el tejido agroinfiltrado. Por el contrario, no se observó banda de hibridación con el sRNA38 a partir de ninguna de las construcciones ensayadas (Figura 14B). Aunque no podemos descartar que el sRNA38 se esté acumulando

Resultados

en las muestras analizadas por debajo de límites detectables por la técnica de hibridación, este resultado sugiere que nuestro sistema experimental no reproduce los requerimientos necesarios para la biosíntesis de este sRNA a partir de su probable secuencia precursora

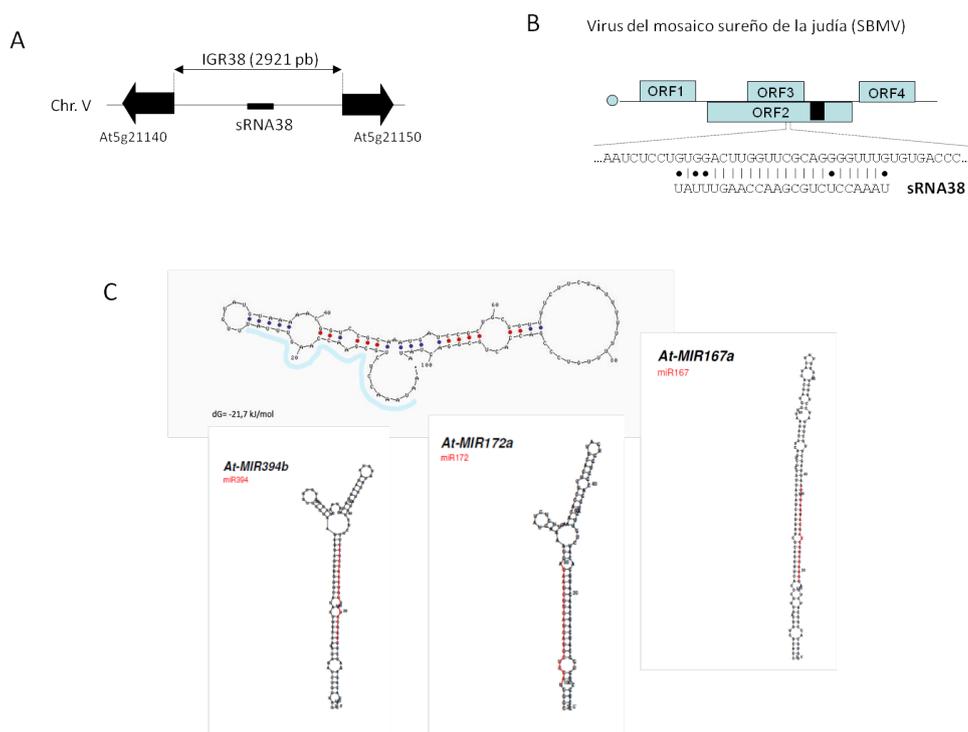


Figura 13: **Complementariedad entre el Virus del mosaico sureño de la judía (SBMV) y el sRNA38.** B) Representación esquemática del genoma de SBMV. En la zona expandida se muestra la zona de interacción entre la secuencia viral en el ORF2 y el sRNA38. Los puntos representan los enlaces G:U. A) Localización genómica del sRNA38 en una región intergénica del cromosoma V de *A. thaliana*. Las flechas gruesas representan los genes colindantes y su orientación. C) Predicción de la estructura secundaria del hipotético precursor del sRNA38 según el programa “mfold”. En azul se indica la posición de la secuencia del sRNA38. Como comparativa se muestran las predicciones de las estructuras precursoras de los miRNAs validados de Arabidopsis miR167a, miR172b y miR394b.

En cualquier caso, la expresión del sRNA38 en Arabidopsis parece ser muy baja como lo sugiere su escasa abundancia basada en lecturas obtenidas en diversos experimentos de ultrasecuenciación en plantas no infectadas de diferentes fondos genéticos (ASRP, https://mpss.udel.edu/web/php/pages/sigAnalysis.php?SITE=at_sRNA&rna=UAAACCUCUGCGAACCAAGUUUUAU). Este hecho tal vez se deba a un procesamiento ineficaz a partir del precursor como parecen indicar los resultados obtenidos en nuestro sistema de expresión transitoria. Por otra parte, además de la secuencia “canónica” identificada en nuestro estudio (aquella con mayor complementariedad con el genoma del SBMV), la mayor parte de las lecturas secuenciadas para este sRNA corresponden con variantes de secuencia y longitud lo que confirma la idea de que el sRNA38 forma parte de una población heterogénea resultante del procesamiento de precursores de dsRNA similares a los que originan las distintas clases de siRNAs endógenos.

No obstante, llama la atención que este sRNA sea relativamente abundante en colecciones de sRNAs generadas a partir de tejido infectado. Considerando el número de lecturas normalizadas, el sRNA38 aparecía sobrerrepresentado en colecciones de sRNAs en plantas infectadas con TRV (149,4 lecturas/1000) respecto a lo observado en plantas control no infectadas (23,1 lecturas/1000) (datos no publicados del laboratorio). Este hecho coincide con lo observado en plantas de Arabidopsis tratadas con flagelina activa donde el número de lecturas para todas las variantes polimórficas del sRNA38 era 5 veces mayor que el observado en plantas tratadas con flagelina inactiva (Olivier Voinnet, comunicación personal). Por tanto, aunque no hemos sido capaces de investigar

Resultados

experimentalmente el potencial del sRNA38 para interactuar y regular secuencias de origen viral (dado que no hemos logrado su expresión en nuestro sistema de estudio), la acumulación de este sRNA en tejido sujeto a estrés biótico sugiere que pudiera estar relacionado con alguna respuesta generalista de la planta asociada al estrés.

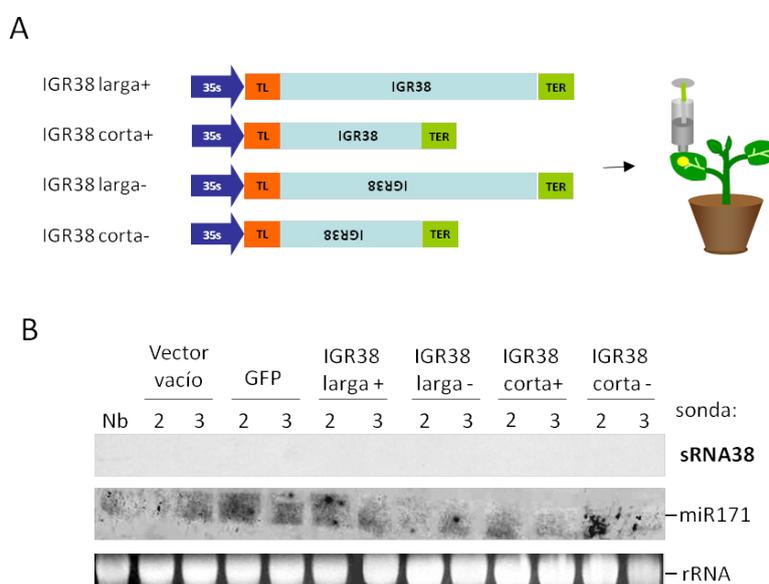


Figura 14: **Análisis de expresión de sRNA38.** A) Esquema de las construcciones empleadas en los experimentos de agroinfiltración. La región intergénica que contenía la secuencia del sRNA38 (IGR38) se clonó total (larga) o parcialmente (corta) y en sentido positivo (+) o negativo (-) bajo el promotor y terminador 35S. TL, secuencia “líder” no traducible de TEV. B) Ensayo Northern blot de acumulación de sRNA38 en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* a los 2 y 3 dpa. La membrana se hibridó secuencialmente con oligonucleótidos marcados con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ complementarias a las secuencias del sRNA38 y del miR171 (control de hibridación). Como controles negativos se utilizaron plantas sin agroinfiltrar (Nb), plantas agroinfiltradas con vector binario vacío y plantas agroinfiltradas con una construcción GFP. Como control de carga se usó la tinción con EtBr del gel antes de la transferencia.

c) *Evaluación del reconocimiento y procesamiento de las dianas virales por miRNAs*

El miR172 regula la expresión de 6 factores de transcripción de la familia APETALA 2-like (AP2, TOE1, TOE2, TOE3, SMZ, SNZ) y está relacionado con el control de la floración, observándose floración temprana en mutantes de sobreexpresión de este miRNA (Chen, 2004; Aukerman and Sakai, 2003). La expresión de este miRNA está regulada temporalmente: es indetectable a los 2 días tras la germinación pero se acumula progresivamente cuando la planta se acerca a la floración. Todos los miembros de la familia génica MIR172 parecen ser intercambiables funcionalmente y ejercen su represión sobre el mRNA tanto a nivel de la traducción como por corte endonucleolítico sobre su secuencia diana (Chen, 2004; Aukerman and Sakai, 2003). Los resultados obtenidos a través de experimentos de secuenciación masiva de sRNAs de plantas infectadas por virus respecto de plantas control no inoculadas indican que si bien en plantas infectadas con el virus del mosaico de la colza (*Oilseed rape mosaic virus, ORMV*) se observa una leve disminución en la acumulación de este miRNA (Hu *et al.*, 2011) en plantas infectadas con otros virus como el Virus del enanismo del arroz (RDV) no se observan alteraciones significativas (Li *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2009). Del mismo modo, el patrón de acumulación de miR172 tampoco parece alterarse significativamente en respuesta a TRV (apartado 4.3.1 b), lo que sugiere que su expresión y acumulación no está influenciada por virus. En nuestro análisis comparativo de secuencias observamos que el miR172 es parcialmente complementario con la región 3' UTR de MCDV (NC_003626 entre las posiciones

Resultados

11628-11648), presentando 4 desapareamientos de los que uno se localiza en la región 5', dos en la región central y uno en la región 3'.

El miR399 se acumula en el tejido vegetal en respuesta al ayuno por fosfato (Pi) y actúa regulando post-transcripcionalmente la expresión del gen *PHO2* tanto por corte endonucleolítico sobre el mensajero como probablemente por represión de la traducción (Bari *et al.*, 2006). Excepcionalmente, el gen *PHO2* tiene 5 sitios de complementariedad con el miR399 en su 5' UTR, aproximadamente en los 200-400 nucleótidos previos al codón de inicio. El gen *PHO2* codifica una enzima conjugadora de ubiquitina E2 y participa en la regulación de la homeostasis del Pi en *Arabidopsis* (Bari *et al.*, 2006; Aung *et al.*, 2006). Así, la sobreexpresión de este miRNA se traduce en altos niveles de Pi en hojas como ocurre en mutantes *pho2* (Aung *et al.*, 2006; Bari *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2005). El miR399 posee además la capacidad de viajar por el floema funcionando como una señal para el mantenimiento de la homeostasis del Pi a larga distancia (Pant *et al.*, 2008). En nuestro análisis comparativo de secuencias observamos que el miR399 es parcialmente complementario con el gen que codifica la proteína 194kDa de TRV (NC_003805.1 entre las posiciones 2418-2437), presentando 5 desapareamientos, 3 de los cuales son enlaces G:U.

Para evaluar si estos miRNAs eran capaces de reconocer las secuencias virales complementarias identificadas en nuestra búsqueda y dirigir su procesamiento endonucleolítico empleamos el sistema de agroinfiltración en *N. benthamiana* que nos permite expresar de forma transitoria el miRNA de estudio y la correspondiente secuencia diana. Para ello, generamos construcciones sensoras en un plásmido binario que contenían, bajo el control del promotor 35S,

la secuencia codificante de la GFP a la que se había fusionado inmediatamente a continuación del codón de parada la secuencia diana de estudio. Cada secuencia diana fusionada correspondía con la región del genoma viral que mostraba complementariedad parcial con el miRNA correspondiente (Figura 15B). Como controles se emplearon construcciones donde la GFP aparecía fusionada con las secuencias diana validadas para los miRNAs estudiados. Para comprobar que la fusión de la secuencia diana no alteraba la correcta expresión de la proteína GFP a partir de las construcciones sensoras se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* únicamente con las construcciones GFP fusionadas a las dianas validadas (GFP-AP2 o GFP-UBQ) o a las dianas virales predichas (GFP-TRV o GFP-MCDV) de cada miRNA. La fluorescencia, como medida de expresión del sensor GFP, se observó a 3 dpa bajo luz UV para minimizar el efecto del silenciamiento inducido por cadenas sencillas de RNA a tiempos tardíos tras la agroinfiltración. En todos los casos estudiados la fluorescencia en el tejido infiltrado con cada una de las construcciones sensoras (GFP-AP2, GFP-UBQ, GFP-TRV, GFP-MCDV) era equivalente a la observada en hojas agroinfiltradas con una construcción control GFP (Figura 16 y 17). Este resultado indicaba que la fusión de las secuencias dianas al gen GFP no alteraba la correcta expresión de la proteína de fusión, y descartaba o minimizaba el efecto de miRNA endógenos sobre la estabilidad de RNA mensajero.

A continuación, cada construcción sensora se coinfiltró junto una construcción portadora de la secuencia precursora del miRNA correspondiente (miR399, miR172) bajo el promotor 35S. Si el miRNA tiene capacidad de interactuar por complementariedad de bases con su secuencia diana y

Resultados

promover el corte del mRNA, esperaríamos observar un descenso en los niveles de mRNA y en la fluorescencia generada por la proteína GFP en el tejido agroinfiltrado (Figura 15A).

Secuencias precursoras miRNA	Sensores de actividad miRNA		Controles de especificidad
	Sensor diana validada	Sensor posible diana viral	
pSLJ miR172b (5:1188212..1188232)	pSLJ HAGFP_AP2 (AT4G36920)	pSLJ HAGFP_MCDV (NC_003626)	pSLJ miR171a (3:19084500..19084520)
pSLJ miR399a (1:10227151..10227171)	pSLJ HAGFP_UBQ (AT2G33770)	pSLJ HAGFP_TRV (NC_003805)	pSLJ miR398b (5:4690986-4691179)
			pSLJ miR158a (3:3366354..3366373)

Tabla 10: **Construcciones empleadas.** Se detalla para cada construcción el nombre del plásmido obtenido y los datos de la secuencia clonada (la posición en el genoma de Arabidopsis para las secuencias precursoras de miRNA y el código AGI de la secuencia de la diana validada o de la posible diana viral)..

La especificidad de la interacción entre el miRNA y su secuencia diana se comprobó empleando construcciones precursoras de miRNAs que no mostrasen complementariedad con la secuencia diana (miR171, miR398, miR158) (apartado 3.6.2) (Tabla 10). Para validar nuestro sistema experimental investigamos primero si cada miRNA seleccionado (miR172, miR399) era capaz de regular negativamente el mRNA derivado de una construcción sensora control que portase una secuencia diana validada para dicho miRNA (GFP-AP2, GFP-UBQ) y si dicha regulación era específica y dependiente de secuencia. Para ello se agroinfiltraron conjuntamente la secuencia precursora del miRNA (miR172 ó miR399) ($DO_{600}=0,6$) junto con la construcción GFP sensora para dicho miRNA (GFP-AP2 ó GFP-UBQ) ($DO_{600}=0,2$). La DO_{600} de la solución de agroinfiltración se ajustó a 1 con vector vacío. A los 3 dpa se observó en el tejido coinfiltrado con

miR172 y GFP-AP2 una disminución significativa de la fluorescencia respecto de la obtenida por la construcción sensora en ausencia del miRNA correspondiente (Figura 16B). El mismo resultado se observó en el tejido agroinoculado simultáneamente con miR399 y su construcción diana GFP-UBQ (Figura 16A).

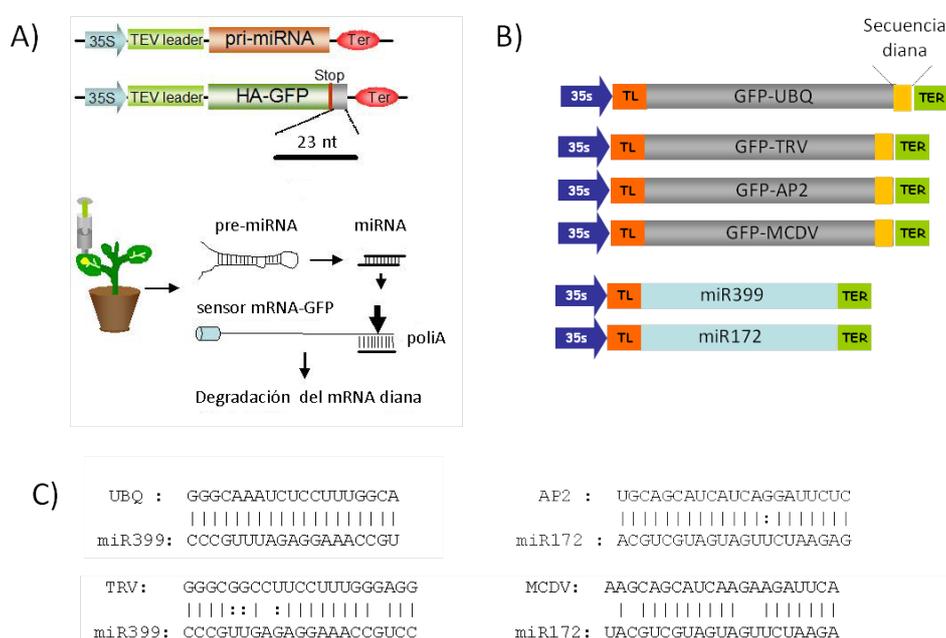


Figura 15: **Ensayo de actividad de miRNAs sobre secuencias diana sensoras.** A) Representación esquemática de la estrategia experimental empleada. El miRNA generado a partir de la secuencia precursora agroinfiltrada interacciona funcionalmente con la secuencia complementaria integrada en el mRNA de la GFP sensora resultando en la degradación del mRNA y la pérdida de fluorescencia. B) Esquema de las construcciones empleadas para la expresión transitoria del precursor de miRNA y de la construcción sensora GFP. Se indica la localización de la secuencia diana a continuación del codón de terminación de la GFP. C) Esquema de la complementariedad entre los miRNAs miR399 (izquierda) y miR172 (derecha) y sus dianas validadas UBQ y AP2 así como con sus posible dianas virales TRV y MCDV. Las líneas rectas representan las bases complementarias, la ausencia de líneas los desapareamientos y los dos puntos los enlaces G:U.

Resultados

Para comprobar la especificidad de la interacción entre cada construcción sensora y su miRNA complementario y descartar que el efecto observado se deba a la expresión transitoria de cualquier otro miRNA no complementario, el experimento se repitió coinfiltrando cada una de las construcciones sensoras en presencia de diferentes miRNAs heterólogos. En todos los casos investigados la coexpresión de construcciones sensoras (GFP-AP2 o GFP-UBQ) junto con miRNAs no específicos derivó en niveles de fluorescencia semejantes a los observados en plantas que expresaban la construcción sensora en ausencia del miRNA (Figura 16A y 16B). Estos niveles eran siempre superiores a los detectados cuando la construcción sensora se coagroinfiltraba junto con el miRNA específico (Figura 16A y 16 B). Finalmente, para demostrar que el fenotipo observado se debía a la activación de un proceso de silenciamiento repetimos el esquema experimental incorporando una construcción que contenía la secuencia de la proteína supresora de silenciamiento HCPro de TEV. La proteína HCPro bloquea el silenciamiento génico secuestrando siRNAs y miRNAs y por tanto interfiriendo con su ensamblaje en los complejos efectores RISC (Kasschau *et al.*, 2003; Lakatos *et al.*, 2006). Como era previsible, los niveles de fluorescencia en el tejido agroinfiltrado con las construcciones GFP-AP2 y miR172 en presencia del supresor HCPro se recuperaban a niveles similares al control (Figura 16C). Idéntico resultado se observó cuando se coinfiltraban simultáneamente las construcciones GFP-UBQ, miR399 y HCPro (Figura 16C). Estos resultados confirmaban que la regulación de GFP-AP2 y GFP-UBQ es dependiente del silenciamiento mediado por miR172 y miR399, respectivamente.

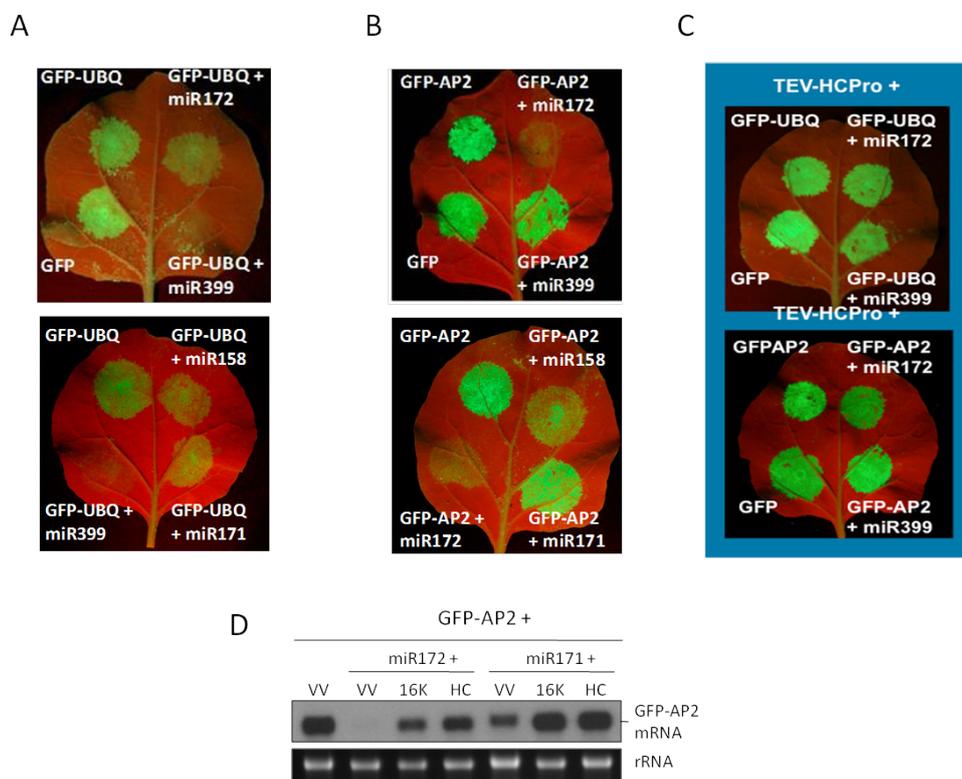


Figura 16: **Validación del sistema experimental para el análisis de actividad de miRNA sobre secuencias diana.** A) Observación bajo luz UV de la fluorescencia asociada a la expresión de la proteína sensora GFP-UBQ en ausencia de miRNAs o en presencia de miRNA homólogo (miR399) o heterólogo (miR172, miR158, miR171). B) Fluorescencia asociada a la expresión del sensor GFP-AP2 en ausencia o en presencia de miRNA homólogo (miR172) o heterólogo (miR399, miR158, miR171). C) Efecto del supresor de silenciamiento HCPro sobre la expresión de fluorescencia de las construcciones sensoras GFP-UBQ y GFP-AP2 en presencia de miRNAs (homólogo o heterólogo). La construcción GFP fue incluida como control de inducción y expresión. Las hojas agroinfiltradas se fotografiaron a 3 dpa. Obsérvese la disminución de fluorescencia solo en presencia del miRNA homólogo y la reversión del fenotipo en presencia del supresor HCPro. D) Acumulación de mRNA de la construcción sensora GFP-AP2 en coinfiltraciones de GFP-AP2 y miR172 (miRNA homólogo) o miR171 (miRNA heterólogo), en presencia de 16K, TEV-HCPro (control positivo), o vector vacío (VV) (control negativo). La tinción del gel con EtBr se utilizó como control de carga.

Resultados

A continuación investigamos si el efecto represor del miRNA homólogo sobre la expresión de GFP se debía al corte endonucleolítico del mRNA de la construcción sensora. Para ello, el RNA total se extrajo de las hojas agroinfiltradas a 3 dpa y se analizó por Northern blot empleando una sonda radiactiva complementaria a la GFP. Los sRNAs se analizaron a partir de RNA de bajo peso molecular empleando oligonucleótidos marcados con [32 P]-ATP como sondas. Los niveles relativos de acumulación de mRNA de GFP se obtuvieron mediante análisis densitométrico de las señales de hibridación. Los ratios de acumulación (RA) se estimaron tomando como referencia el nivel de expresión de las construcciones sensoras en ausencia de miRNA. Los resultados obtenidos demuestran que los niveles de acumulación del mRNA descendían drásticamente (aprox. 80%) en el tejido coinfiltrado con la construcción GFP-AP2 en presencia del miR172 respecto a lo observado en ausencia de miRNA o en presencia de un miRNA heterólogo (miR171 o miR398) (Figura 16D y 17D). Estos datos indicaban que el miRNA homólogo comprometía la estabilidad del mRNA seguramente dirigiendo su procesamiento por un complejo efector de silenciamiento. En conjunto, nuestros resultados validaban la estrategia experimental diseñada basada en el uso de secuencias sensoras dentro de un sistema heterólogo de expresión transitoria para validar interacciones funcionales entre miRNAs y sus dianas.

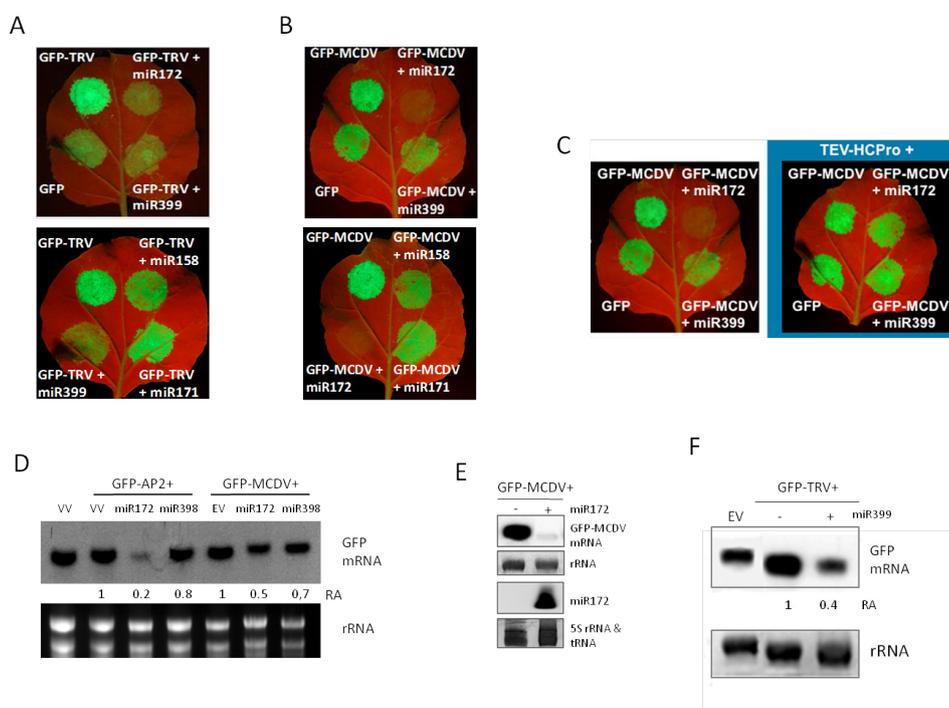


Figura 17. Análisis de la actividad de miRNAs sobre secuencias virales. A) Efecto de la coexpresión de GFP-TRV con un miRNA complementario (miR399) o un miRNA heterólogo (miR172, miR171, miR158) sobre los niveles de fluorescencia en el tejido infiltrado. B) Efecto de la coexpresión de la construcción sensora GFP-MCDV con un miRNA complementario (miR172) o un miRNA heterólogo (miR399, miR171, miR158) sobre los niveles de fluorescencia en el tejido infiltrado. C) Efecto del supresor de silenciamiento HCPro sobre la expresión de fluorescencia de la construcción sensora GFP-MCDV en presencia de miRNAs (homólogo o heterólogo). D) Acumulación de mRNA de las construcciones sensoras GFP-AP2 y GFP-MCDV en presencia del miRNA complementario (miR172) o del miRNA heterólogo (miR398). E) Acumulación de mRNA de la construcción sensora GFP-MCDV y de miR172 en coinfiltraciones de GFP-MCDV y miR172 (+). F) Acumulación de mRNA de la construcción sensora GFP-TRV en presencia del miRNA complementario (miR399) (+). La agroinfiltración con las construcciones GFP y vector vacío se muestran como controles. La observación de fluorescencia bajo luz UV y la acumulación de mRNA en hoja agroinfiltrada se realizaron a 3 dpa. Los blots se hibridaron con sondas marcadas radioactivamente complementarias a GFP y a miR172. Las señales de hibridación de los blots se midieron por densitometría. La acumulación relativa de mRNA (RA) se calculó a partir de la intensidad de cada banda con respecto a la muestra sin miRNAs, a la que arbitrariamente se asignó el valor 1. La tinción del gel con EtBr se utilizó como control de carga.

Resultados

Una vez establecido el sistema experimental, analizamos la capacidad de cada miRNA seleccionado (miR399 o miR172) de interaccionar funcionalmente con las secuencias virales identificadas en este estudio y reprimir así la expresión de las construcciones sensoras correspondientes (GFP-TRV o GFP-MCDV). En plantas agroinfiltradas con miR172 y su construcción sensora GFP-MCDV se observaba una disminución sustancial de la fluorescencia similar a la observada cuando el miR172 se coexpresaba con una GFP portadora de una secuencia validada para este miRNA (GFP-AP2) (Figura 17B). Además esta disminución solo era visible en presencia del miRNA homólogo y no cuando la construcción sensora se infiltraba con otros miRNAs heterólogos (miR158, miR171, miR399) indicando que la regulación de la GFP-MCDV era específica y dependiente de secuencia. En este caso, la fluorescencia se mantenía a niveles similares a los generados por una construcción control GFP (Figura 17B). Por otra parte, el miR172 era incapaz de regular negativamente construcciones sensoras con secuencias diana no complementarias (GFP-UBQ y GFP-TRV) lo que confirmaba la especificidad de la reacción (Figura 6A y B). Este resultado fue reproducible en al menos 3 réplicas biológicas del experimento. Como era de esperar, la presencia de la proteína supresora HCPro revertía la fluorescencia derivada de la construcción GFP-MCDV a niveles similares a los del experimento control aún en presencia del miR172, corroborando la idea de que la regulación de GFP-MCDV es dependiente de la actividad reguladora de miR172 (Figura 17C).

En ensayos de expresión se observó además una casi desaparición de los niveles de mRNA de la construcción sensora GFP-MCDV en presencia de niveles detectables de miR172 respecto del control en ausencia del miRNA (Figura 17E).

No obstante, la eficacia reguladora del miR172 sobre la secuencia viral en el contexto del sensor GFP variaba entre ensayos de expresión. Por ejemplo, el experimento que se ilustra en la Figura 17D muestra niveles de acumulación de GFP-MCDV mRNA en el tejido infiltrado en presencia del miR172 tan solo un 50% menores que en el experimento control en ausencia del miRNA (Figura 17D). Este resultado sugería que la eficacia de miR172 para guiar el corte endonucleolítico de su diana natural (2 desapareamientos, uno de ellos G:U) era mayor que la observada sobre la diana viral predicha (4 desapareamientos). No obstante, los niveles de expresión de las proteínas GFP-AP2 y GFP-MCDV observados bajo UV en el tejido agroinfiltrado con el miR172 fueron similares a pesar de que sus mRNAs se acumularan a distintos niveles (Figura 16B y 17A). Dado que la disminución en la acumulación de mRNA no parecía equiparable a la disminución de fluorescencia observada en la hoja agroinfiltrada, parece posible que el miR172 pudiera ejercer su función reguladora combinando la capacidad para guiar el corte específico de la secuencia diana, con la de bloquear la traducción de la proteína. De este modo aunque GFP-MCDV sea peor diana de corte que GFP-AP2 la interacción funcional de miR172 con GFP-MCDV puede tener un componente traduccional suficiente para inhibir la expresión de la proteína. Esta posibilidad parece razonable dado que 1) el miR172 además de guiar el corte endonucleolítico mediado por AGO1 es capaz de inhibir la traducción de sus dianas naturales (Aukerman and Sakai, 2003), y 2) el número mayor de desapareamientos entre miR172 y su diana viral predicha en este estudio podría dificultar la actividad endonucleolítica del complejo efector del silenciamiento y favorecer la represión de la traducción del gen diana.

Resultados

En plantas agroinfiltradas con miR399 y su construcción sensora GFP-TRV también observamos en general un descenso apreciable en la fluorescencia respecto a la hojas control sin miR399 (Figura 6B). Además, la fluorescencia derivada de la construcción GFP-TRV en presencia de miRNAs heterólogos (miR158, miR171) fue equiparable a la del experimento control en ausencia de miRNA lo que sugería que la interacción es específica de secuencia (Figura 6B). Del mismo modo, la construcción portadora del miR399 tampoco era capaz de silenciar la expresión de secuencias diana no complementarias (GFP-AP2 y GFP-MCDV) (Figura 17B). Cuando analizamos por Northern blot los niveles de acumulación de mRNA de la construcción GFP-TRV también observamos una reducción cercana al 60% en el tejido infiltrado con el miR399 respecto al experimento control sin miRNA (Figura 17F). No obstante, los resultados obtenidos con el miR399 y la construcción sensora GFP-TRV fueron sustancialmente más variables entre réplicas biológicas. Por ejemplo, las diferencias en la intensidad de la fluorescencia fueron en ocasiones leves como se aprecia en la Figura 17A. Esto probablemente se deba a un procesamiento ineficaz de la construcción precursora y a la baja acumulación del miR399 en el tejido infiltrado. Además, es posible que 1) el mayor número de desapareamientos entre miR399 y la secuencia complementaria de TRV dificulte la interacción funcional entre ambos y, 2) la actividad eficiente de este miRNA esté condicionada por el número y ubicación de los sitios de unión en el mRNA diana como ocurre en su diana natural el gen PHO2 (AT2G33770).

A pesar de que las diferencias de expresión de las construcciones sensoras en presencia y ausencia del miRNA homólogo eran evidentes, los resultados del

ensayo Northern blot mostraban en todos los casos estudiados una ligera reducción en los niveles de acumulación del mRNA diana en presencia de un miRNA heterólogo (Figuras 16D, 17D y 17E). Por ejemplo, los mRNAs de las construcciones GFP-AP2 y GFP-MCDV acumulaban un 20% y un 30% menos, respectivamente, cuando se infiltraban con miR398 (Figura 17D). La ligera reducción en los niveles de mRNA, y en ocasiones de fluorescencia, en presencia de miRNAs no específicos podría estar relacionada con el silenciamiento típicamente asociado a la expresión transitoria de transgenes en sistemas heterólogos. Además, dado que los vectores de expresión que portan las secuencias sensoras y los precursores de miRNAs comparten elementos comunes (promotor y terminador 35S y secuencia líder de TEV) es razonable pensar que el silenciamiento natural de una construcción repercuta negativamente y amplifique la respuesta de silenciamiento sobre la otra construcción. Si las construcciones agroinfiltradas en nuestro sistema de expresión transitoria estuvieran siendo silenciadas como sugería el resultado anterior, deberíamos encontrar siRNAs a lo largo de la construcción empleada. Para comprobarlo analizamos la presencia de siRNAs en las muestras coagroinfiltradas con GFP-AP2 y miR172 ó miR171 empleando una sonda complementaria a la región 5' de la GFP (sonda GF ver material y métodos 3.6). Las construcciones se agroinfiltraron a la misma DO_{600} que en los experimentos anteriores (construcciones sensoras $DO_{600}= 0,2$, miRNAs a $DO_{600}= 0,6$ y TEV HCPro $DO_{600}=0,2$) y se llevaron a una DO_{600} de 1 con vector vacío. A 3 dpa no fue posible detectar siRNAs en muestras que expresaban únicamente la construcción GFP-AP2 indicando que a tiempos cortos la inducción de silenciamiento por el transgen era todavía ineficiente (Figura 18). Sin embargo,

Resultados

cuando la construcción GFP-AP2 se coexpresaba con otro miRNA, ya fuera el específico (miR172) o el heterólogo (miR171), los siRNAs derivados de GFP-AP2 se acumulaban a niveles similares indicando que la activación del silenciamiento del transgen era más rápida cuando se coexpresaban dos o más construcciones relacionadas (Figura 18). Curiosamente, este efecto se observaba tanto en ausencia como en presencia del supresor HCPro a pesar de que la actividad de esta proteína parece estar asociada con una disminución en la acumulación de siRNAs derivados del transgen. Este hecho explicaba la disminución generalizada de fluorescencia y/o mRNA en todos los ensayos de coexpresión realizados en este estudio.

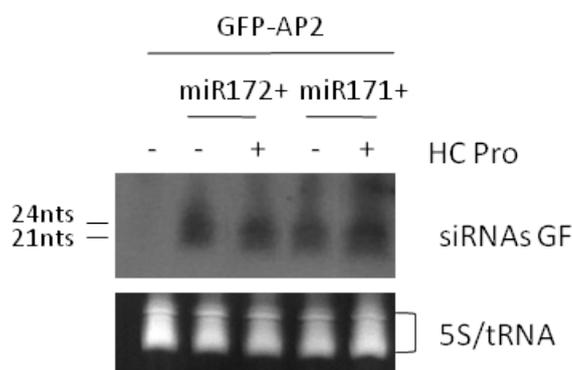


Figura 18: **Análisis del silenciamiento de las construcciones empleadas en el sistema de expresión transitoria.** Acumulación de siRNAs derivados de la región GF en muestras coagroinfiltradas con la construcción sensora GFP-AP2 en presencia del miRNA específico (miR172) o del heterólogo (miR171) y en presencia (+) y ausencia (-) del supresor de silenciamiento HCPro. Las muestras se extrajeron a 3 dpa. 21 y 24 nts indican marcador de tamaño. La tinción del gel con EtBr se utilizó como control de carga.

En conclusión, la agroinfiltración conjunta de la secuencia sensora junto con una secuencia precursora de miRNA inducía un silenciamiento basal de ambas construcciones posiblemente como consecuencia de compartir elementos génicos comunes. Sin embargo el efecto específico del miRNA sobre su diana resultaba evidente en virtud de la drástica disminución en la fluorescencia de la construcción sensora GFP y de sus niveles de mRNA observadas en presencia de un miRNA con elevada complementariedad en comparación con los niveles cercanos al control observados con un miRNA heterólogo. En el sistema heterólogo utilizado los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de la existencia de secuencias de sRNAs endógenas con el potencial de interactuar funcionalmente con genomas virales.

4.1.2 Análisis del título viral en mutantes *dcl1*

En el apartado anterior hemos demostrado que algunos miRNAs, y de forma extensible otros siRNAs, tienen el potencial de reconocer secuencias virales con las que comparten complementariedad de bases e interactuar con ellas para dirigir su silenciamiento. Aunque posible desde el punto de vista mecanístico, no está claro que estas interacciones entre miRNAs y secuencias virales ocurran durante la infección y representen una estrategia generalizada de defensa antiviral. Si los miRNAs tuvieran, además de su función reguladora del metabolismo y desarrollo de la planta, una función antiviral sería de esperar que cualquier alteración en la síntesis y/o actividad de los miRNAs repercutiera en el título viral. En mutantes de pérdida de función *dcl1* de Arabidopsis la expresión de

Resultados

miRNAs se ve reducida notablemente (Park *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002; Dugas and Bartel, 2004) Por tanto, si la ruta de los miRNAs representa, al menos en parte, una estrategia antiviral dirigida a inactivar el RNA viral esperaríamos que las plantas *dcl1* fueran hípersusceptibles a la infección y que el RNA viral se acumulara a niveles más altos que los esperados en un fondo genético silvestre. Para comprobar esta hipótesis analizamos por qRT-PCR la acumulación del RNA 1 de TRV en inflorescencias de *A. thaliana* mutantes *dcl1-9* y en su fondo silvestre La.er. Los resultados obtenidos en este estudio mostraban que el fondo silvestre acumulaba significativamente más TRV que el fondo mutante *dcl1-9* (figura 19) (test ANOVA seguido de test Duncan, Pvalor = 0,003). Del mismo modo, no se ha observado un efecto significativo en la acumulación viral en otros virus de plantas asociado a la pérdida de función de DCL1 (Deleris *et al.*, 2006; Blevins *et al.*, 2006) lo que sugiere que se trata de un efecto generalizado.

La explicación más plausible a nuestra observación es que los bajos niveles de acumulación viral en el mutante hipomorfo *dcl1-9* se deban al aumento de la expresión de las enzimas DCL4 y DCL3 implicadas en las rutas de silenciamiento génico frente a virus y cuya regulación es dependiente de DCL1 (Qu *et al.*, 2008). En conclusión, a la vista de los datos no podemos concluir que una disrupción en la síntesis de miRNAs conlleve una alteración directa del título viral que pudiera indicar un posible papel antiviral de los miRNAs. Este efecto puede encontrarse enmascarado por el aumento de la actividad de DCL4 y DCL3 y/o también por la existencia y actividad de un supresor de silenciamiento en TRV.

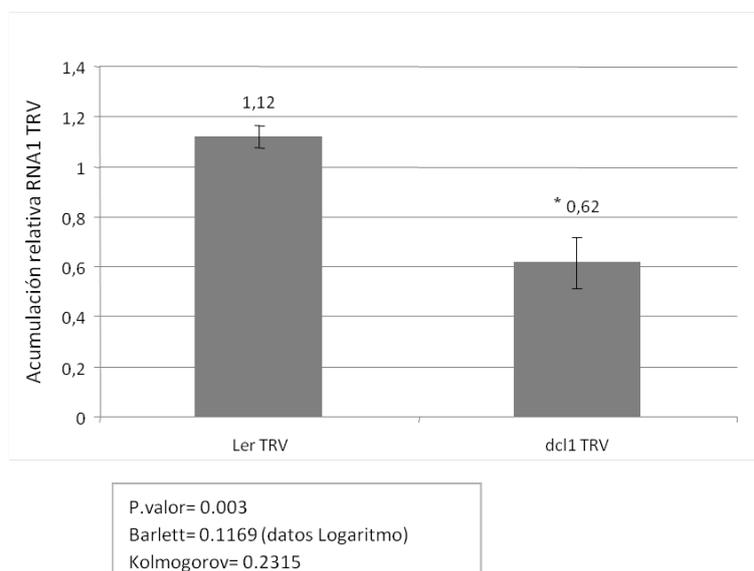


Figura 19: **Análisis del título viral en mutantes *dcl1***. Expresión relativa de TRV1 medida por qRT-PCR en inflorescencias de mutantes *dcl1-9* de *A. thaliana* con respecto a su fondo silvestre La.er. Los histogramas representan la media de tres réplicas técnicas por muestra. Las barras de error muestran la desviación estándar. El asterisco indica diferencias significativas en la expresión de TRV1 analizada por test ANOVA seguido de un test de Duncan.

4.2 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA SUPRESORA DE SILENCIAMIENTO DE TRV

4.2.1. Identificación del supresor de silenciamiento del TRV

La presencia de un supresor de silenciamiento en el genoma de TRV podría estar enmascarando un posible efecto antiviral de los sRNAs endógenos. Algunos

Resultados

supresores virales son capaces de interferir con las rutas de silenciamiento reguladas por diversas clases de sRNAs alterando tanto su acumulación como su actividad (Hu *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2011; Silhavy and Burguán, 2004). Para determinar si existe un supresor de silenciamiento en el genoma de TRV que pueda potencialmente alterar la actividad de los sRNAs en general, y miRNAs en particular, como agentes antivirales y/o reguladores de la expresión génica, diseñamos una serie de experimentos dirigidos a identificar y caracterizar funcionalmente el supresor de silenciamiento en TRV.

En el momento en que este trabajo se planteó, se había demostrado que la proteína 16K de TRV era capaz de suprimir parcialmente el silenciamiento de untransgén GFP inducido por una doble cadena de GFP (dsGFP) en líneas celulares transformadas de *Drosophila* (Reavy *et al.*, 2004). Estos datos sugerían que la proteína 16K podría actuar como un supresor natural de silenciamiento génico en plantas.

Para determinar si en efecto el virus poseía actividad supresora realizamos un ensayo de expresión transitoria en *N. benthamiana* mediada por *Agrobacterium* para coexpresar de forma conjunta y separada cada uno de los RNAs (RNA 1 y 2) del genoma de TRV junto con una construcción reportera GFP. Los cultivos portadores de la construcción GFP (p35S:GFP) se infiltraron a una $DO_{600} = 0,4$ mientras que los vectores con los RNAs virales se agroinfiltraron a una $DO_{600} = 0,6$ para el RNA 1 (p35S:TRV1) y a una $DO_{600} = 0,3$ para el RNA 2 (p35S:TRV2). Todas las soluciones de infiltración se llevaron a una $DO_{600} = 1$ con vector binario vacío. En el tejido agroinfiltrado con la secuencia GFP en ausencia de virus observamos que la fluorescencia alcanzaba sus niveles más altos a los 2-3

dpa para después disminuir hasta casi desaparecer a los 7 dpa debido al silenciamiento del mRNA de la GFP inducido por el propio transgén agroinfiltrado (Figura 20). Idéntico resultado se observó cuando la construcción reportera GFP se agroinfiltraba en presencia del RNA2 del virus, indicando que la proteína CP codificada por el RNA 2 en nuestro sistema TRV recombinante no tenía capacidad para bloquear el silenciamiento de la GFP en este sistema experimental. Por el contrario, en presencia del RNA1 de TRV la fluorescencia de la GFP se mantenía a niveles elevados en todos los tiempos analizados, incluso a los 7 dpa, indicando que el virus poseía actividad supresora del silenciamiento y que ésta se localizaba en su RNA1 (Figura 20).

Resultados

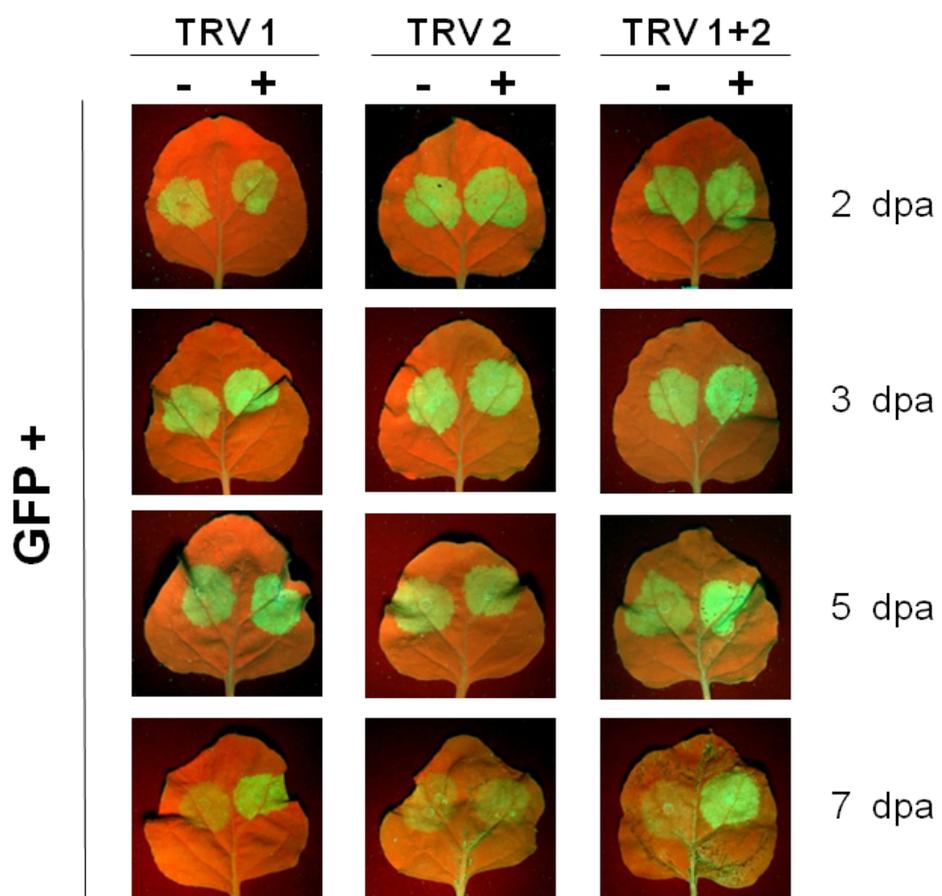


Figura 20: Ensayo de actividad supresora de silenciamiento en TRV. Observación bajo luz UV de la fluorescencia asociada a la construcción GFP en presencia (+) o ausencia (-) de las construcciones TRV1, TRV2 o TRV 1+2. La fluorescencia resultante de la expresión de la proteína GFP se observó en el tejido agroinfiltrado a 2, 3, 5 y 7 dpa. Nótese el incremento de fluorescencia en presencia de los clones infecciosos TRV1 ó TRV1+2 a los 7 dpa.

Para determinar dónde se localizaba exactamente la actividad supresora del silenciamiento se clonaron las secuencias codificantes de las proteínas virales 16K, 29K y 134K del RNA1 del virus en vectores binarios bajo el promotor 35S. Para facilitar su detección se fusionó un epítipo HA al extremo 5' de la secuencia viral correspondiente (apartado 3.6.4). Con cada una de estas construcciones se realizó un nuevo ensayo de expresión transitoria en *N. benthamiana* empleando la GFP como gen reportero. A 3 dpa las hojas infiltradas con la construcción GFP en compañía de las proteínas virales 29K o 134K mostraban fluorescencia con una intensidad similar al experimento control con vector vacío (Figura 21). La fluorescencia en estos tres casos se desvanecía en el tiempo debido a la activación del silenciamiento del transgén, indicando que ni 29K ni 134K poseían actividad supresora en este sistema. Por el contrario, el tejido agroinfiltrado con GFP en presencia de la proteína 16K mostraba una intensidad en la fluorescencia similar a la observada en presencia de virus o en presencia del supresor de silenciamiento HCPro, muy superior en ambos casos a la derivada de la expresión individual del transgén GFP. Más aún, la fluorescencia se mantenía a tiempos tardíos post-agroinfiltración incluso a niveles superiores a los observados en el tejido agroinfiltrado con la GFP y el vector vacío a tiempos tempranos (Figura 21). Estos resultados corroboraban las observaciones previas en células de invertebrados de que la proteína 16K de TRV posee actividad supresora del silenciamiento génico.

Resultados

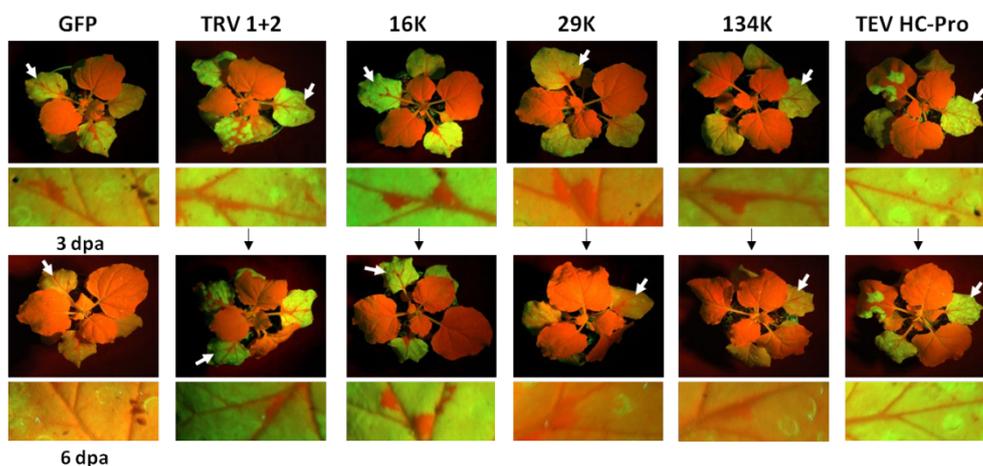


Figura 21: **Determinación de la proteína de TRV responsable de la actividad supresora.** Observación bajo luz UV de la fluorescencia asociada a la construcción reportera GFP en planta entera (vista superior) y en hoja infiltrada. Las flechas indican las hojas magnificadas en los paneles inferiores. Como control del experimento se utilizó la proteína supresora HCPro de TEV. La fluorescencia de la GFP se monitorizó a 3 y 6 dpa. Nótese el incremento de fluorescencia en presencia de 16K ó TRV1+2 a los 6 dpa. El fondo de color rojo generado por el propio tejido de la planta bajo la luz UV es debido a la fluorescencia de la clorofila

Para corroborar las observaciones anteriores a nivel molecular se analizaron los niveles de acumulación del mRNA de la construcción GFP reportera en todos los supuestos estudiados. Los resultados obtenidos en el ensayo Northern blot mostraban cómo en las plantas control agroinfiltradas con GFP y vector vacío, el mRNA de la GFP alcanzaba su máximo de acumulación a los 2 dpa para luego disminuir gradualmente hasta los 6 dpa (Figura 22A). En presencia de las construcciones 29K y 134K los niveles de mensajero de la GFP a los 3 dpa son incluso menores de lo observado en el experimento control, probablemente debido a la amplificación del silenciamiento natural del transgén asociada a la

coexpresión de construcciones que comparten elementos comunes (Figura 22A). Igualmente la acumulación del mRNA disminuye de manera más notable a los 6 dpa por efecto del silenciamiento de la construcción. Sin embargo en las plantas coinfiltradas con 16K la acumulación de mRNA alcanza máximos a los 3 dpa, superiores al del experimento control y similares a los observados en presencia del virus infeccioso (TRV1 + TRV2) o de HCPro (Figura 22A). Estos altos niveles de expresión se mantuvieron a 6 dpa, aunque en menor medida que en el control positivo HCPro. Para verificar la correcta expresión de las proteínas virales a partir de las construcciones empleadas realizamos un ensayo Western blot a partir de un extracto de proteínas empleando un anticuerpo anti-HA que reconoce específicamente el epítipo HA fusionado en posición N-terminal con cada una de las proteínas de TRV ensayadas. Los resultados obtenidos revelaban la presencia de bandas de hibridación con el tamaño esperado en las muestras infiltradas con 16K y 29K indicando que las construcciones correspondientes se traducían normalmente en el tejido infiltrado (Figura 22B). Por el contrario, en las muestras infiltradas con la construcción 134K encontramos una banda de aproximadamente 28 kDa que no correspondía con el tamaño esperado para esta proteína. Por tanto, no podemos dar validez a los resultados obtenidos con esta construcción dado que no tenemos evidencias de que esté generando una proteína activa funcionalmente (Figura 22B).

Resultados

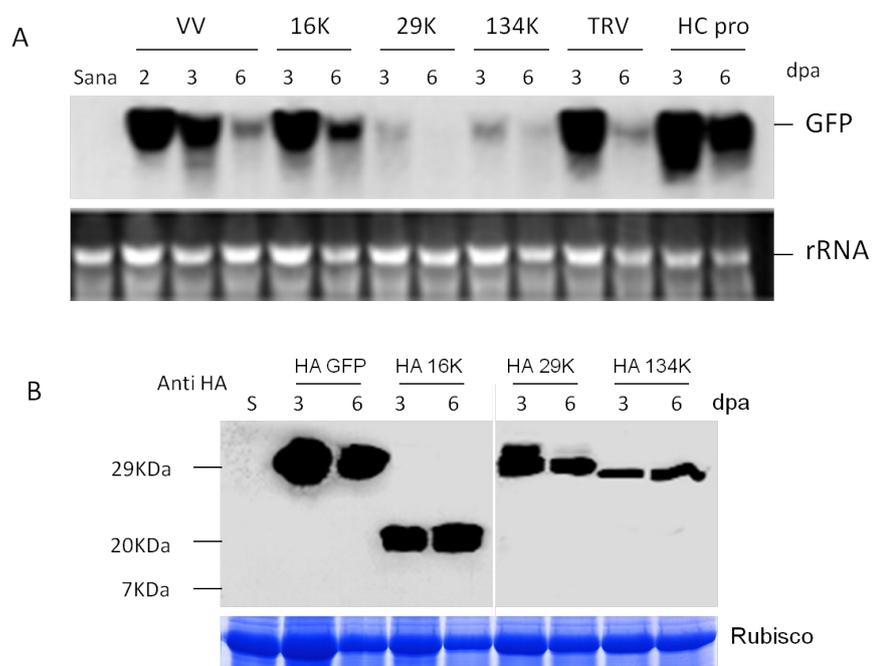


Figura 22: **Acumulación de mensajero de la construcción reportera GFP.** A) Niveles de mensajero GFP en hoja agroinfiltrada en presencia de las construcciones 16K, 29K ó 134K. El vector vacío (VV) se empleó como control negativo mientras que el clon infeccioso de TRV y la construcción HCPro se emplearon como controles positivos. Las muestras de RNA total se analizaron por Northern blot con una sonda GFP complementaria marcada radioactivamente como control negativo se utilizó una planta no agroinfiltrada (NI). La tinción del gel con EtBr se utilizó como control de carga. B) Análisis de expresión de las proteínas virales en las hojas agroinfiltradas. Los extractos de proteína total se analizaron por Western blot empleando un anticuerpo anti-HA. La posición de los marcadores de peso molecular se muestra a la izquierda del panel. La proteína Rubisco se muestra como control de carga. En ambos casos las muestras se recolectaron a 3 y 6 dpa.

Para analizar en detalle la cinética de inducción de silenciamiento de la construcción GFP y de la supresión mediada por la proteína 16K, empleamos el sistema de expresión transitoria para analizar los niveles de mRNA de ambas construcciones (GFP y 16K) a tiempos de 0 a 7 dpa. La proteína supresora HCPro se empleó como control positivo. El RNA total de las hojas agroinfiltradas se extrajo y se analizó por Northern blot empleando sondas radioactivas complementarias con la secuencia de la GFP o de la 16K. En el tejido infiltrado con GFP en ausencia de supresor los niveles de mRNA son máximos a los 2 dpa y decrecen rápidamente hasta reducirse notablemente a 4 dpa y casi por completo a 7 dpa. Por el contrario, en presencia del supresor 16K los niveles de mRNA de la GFP se mantienen elevados y relativamente estables hasta 5 dpa para ir reduciéndose paulatinamente a tiempos más largos sin llegar a desaparecer a los 7 dpa (Figura 23). El control positivo HCPro presentaba un comportamiento similar al de 16K con niveles elevados del mRNA de la GFP en todos los puntos de muestreo. Del mismo modo los niveles de mRNAs correspondientes a las construcciones 16K y HCPro siguieron una cinética de acumulación idéntica a la observada para el mRNA de la GFP en el tejido agroinfiltrado (Figura 23). En conclusión, estos resultados indicaban que 16k era capaz de suprimir el silenciamiento asociado a la expresión transitoria de cadena simple de RNA. Asimismo los resultados mostraban que en nuestras condiciones experimentales de estudio, la proteína 16k era tan efectiva como la proteína supresora HCPro de TEV.

Resultados

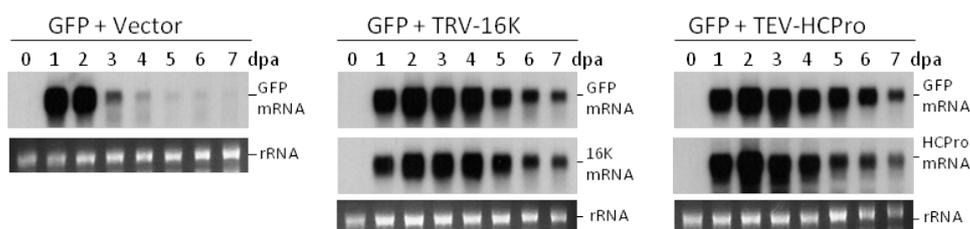


Figura 23: **Cinética de inducción del silenciamiento del transgén GFP en el sistema de expresión transitoria.** Acumulación de transcritos de las construcciones ensayadas en las hojas agroinfiltradas entre 0 y 7 dpa. Las muestras de RNAs se prepararon a partir de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con la construcción GFP en ausencia o en presencia de los supresores 16K o HCPro y se analizaron por Northern blot con sondas complementarias marcadas. La tinción del gel con EtBr se utilizó como control de carga

4.2.2 Caracterización del modo de acción de la proteína supresora 16K

Como describimos en la introducción de esta tesis los supresores de silenciamiento ejercen su acción a diferentes niveles. Pueden bloquear la iniciación del silenciamiento actuando sobre la molécula inductora o interfiriendo con la acción de las enzimas DCL (Mérai *et al.*, 2005; Mérai *et al.*, 2006; Deleris *et al.*, 2006). También pueden inhibir la rama efectora actuando sobre las moléculas guía (sRNAs) o sobre las proteínas AGO dentro del complejo efector del silenciamiento (Silhavy *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006). Pero también pueden intervenir en la amplificación del silenciamiento mediada por proteínas RDR (Glick *et al.*, 2008; Jauvion *et al.*, 2010). Los siguientes experimentos se han diseñado

para caracterizar el modo de acción de la proteína supresora 16K e inferir su efecto inhibitor en la iniciación y mantenimiento del silenciamiento génico.

a) TRV y la iniciación del silenciamiento

Puesto que la activación de la maquinaria de silenciamiento ocurre en respuesta a RNAs bicatenarios, la inducción de silenciamiento asociada a RNAs de cadena sencilla, considerados genéricamente como inductores débiles, pasa inexorablemente por su conversión a dsRNA (Johansen and Carrington, 2001). Para determinar la capacidad de la proteína 16K de interferir con el silenciamiento desencadenado por una dsRNA empleamos de nuevo el sistema de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*. Para ello, utilizamos las construcciones GFP y dsGFP, como diana e inductor de silenciamiento, respectivamente. La construcción dsGFP consistía en una repetición invertida del gen GFP separada por un intrón (apartado 3.5.2). Como control positivo de supresión se empleó la construcción HCPro. Todas las construcciones se infiltraron a una $DO_{600} = 0,2$ excepto dsGFP que fue infiltrada a distintas concentraciones. En todos los casos la solución de infiltración se llevó a una $DO_{600} = 0,5$ con vector vacío. La agroinfiltración conjunta de la construcción reportera GFP junto con concentraciones elevadas ($DO_{600} = 0,1$) del inductor dsGFP activaba el silenciamiento de la construcción reportera como se deduce de la ausencia de fluorescencia en el tejido infiltrado a 3dpa en comparación con lo observado cuando se omitía el inductor dsGFP (Figura 24A). A esta concentración de inductor, la fluorescencia se mantenía a niveles indetectables aún en presencia

Resultados

del supresor 16K mientras que se recuperaba, aunque solo parcialmente, cuando el tejido se coinfiltraba con el supresor HCPro (Figura 24A). Este resultado preliminar parecía indicar que la proteína supresora 16K no era capaz de bloquear el silenciamiento local iniciado por RNA bicatenario y sugería que pudiese actuar en un paso previo a la formación del inductor dsRNA.

Sin embargo, también era posible que la capacidad de 16K de suprimir el silenciamiento estuviese comprometida a concentraciones altas del inductor. Por ello, repetimos el experimento utilizando concentraciones decrecientes de dsGFP para determinar si la actividad supresora de 16K dependía de la dosis de inductor empleada en el ensayo. Idéntico resultado al anterior se observó cuando el cultivo que contenía la construcción inductora se utilizaba a una $DO_{600} = 0,05$. Sin embargo, a concentraciones más bajas del inductor dsGFP ($DO_{600} = 0,01$) observamos una recuperación de la fluorescencia, apenas perceptible bajo luz UV, en el control infiltrado con vector vacío pero que se hacía muy evidente en presencia de 16K y, especialmente, del supresor HCPro (Figura 24A). Este fenotipo de recuperación asociado a la actividad supresora de 16K era más palpable aún cuando el inductor dsGFP se empleaba a una $DO_{600} = 0,005$. A esta dosis era posible detectar trazas de fluorescencia en el ensayo control en ausencia de supresor lo que sugería que la inducción de silenciamiento en el tejido infiltrado no era total (Figura 24A).

Para tener una medida más precisa y fiable de la capacidad de la 16K de interferir con el silenciamiento inducido por dsRNA, repetimos este experimento con las mismas construcciones y concentraciones pero observando la fluorescencia de la GFP con un microscopio confocal.

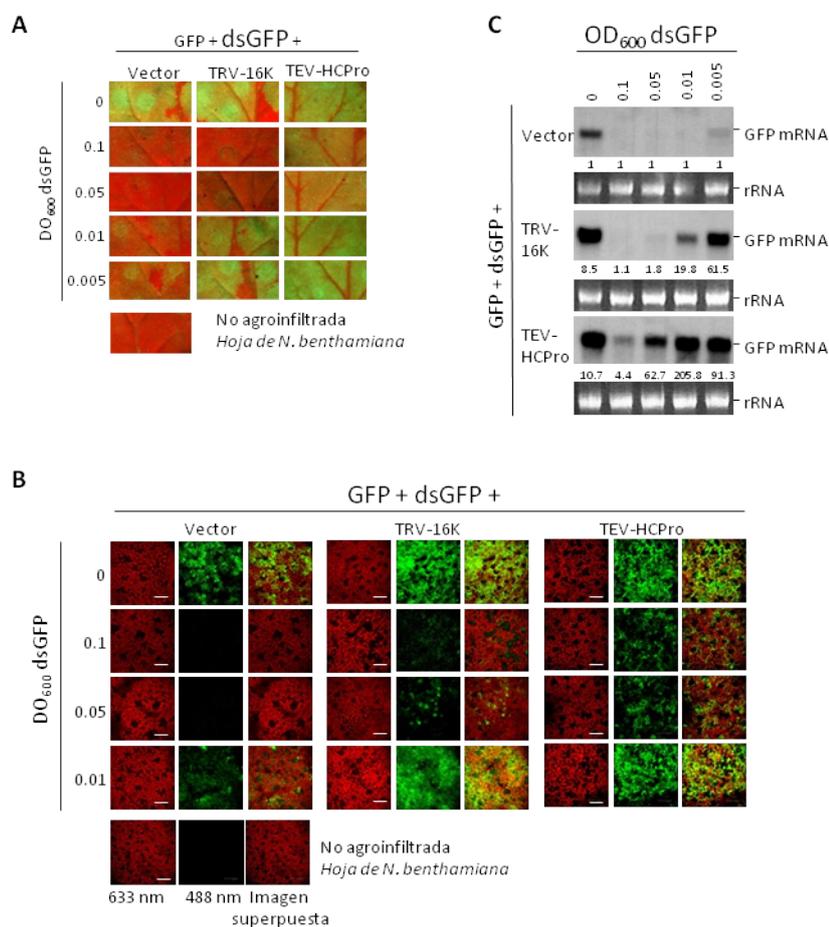


Figura 24: Interferencia de 16K con el silenciamiento iniciado por dsGFP en el sistema de expresión transitoria. Observación de la fluorescencia asociada a la construcción reportera GFP en presencia del supresor 16K y de concentraciones crecientes de la construcción dsGFP. La fluorescencia de la GFP se observó a los 3 dpa bajo luz UV (A) y por microscopio confocal (B). (A, B). Las longitudes de onda de excitación del láser en las imágenes obtenidas por microscopía confocal fueron de 488nm y 633nm como se indica en la imagen. La barra blanca muestra la escala de las imágenes: 150μm (B). C) Northern blot para la detección de mensajeros de GFP realizado a partir de RNA total extraído de hojas infiltradas mostradas en el panel (A) y analizado con la ayuda de una sonda radioactiva complementaria a la GFP. Los niveles de acumulación relativa (AR) para cada

Resultados

mensajero se calcularon normalizando los valores de intensidad de cada banda de hibridación respecto de la intensidad obtenida en el control agroinfiltrado con vector vacío para cada concentración del inductor. La tinción del gel con EtBr se utilizó como control de carga. En todos los experimentos se utilizó la proteína supresora HCPPro de TEV como control de supresión.

Tanto la preparación de las muestras como las condiciones de visualización se detallan en material y métodos. Las observaciones se realizaron a los 3dpa. Como se observa en la figura 24B, la GFP se expresa de forma homogénea en prácticamente todas las células agroinfiltradas en ausencia del inductor dsGFPy con mayor intensidad en presencia de 16K y HCPPro. Este resultado refleja la actividad supresora de ambas proteínas que permiten mayores niveles de expresión de las construcciones agroinfiltradas incluso a tiempos tempranos después de la infiltración. A concentraciones altas del inductor dsGFP ($DO_{600} = 0,1$ y $0,05$) y en ausencia de supresor la expresión transitoria de la GFP se abolía completamente en el tejido infiltrado. Por el contrario, a estas dosis de inductor era posible detectar una leve recuperación de fluorescencia en presencia del supresor 16K, más evidente aún cuando se empleaba el supresor HCPPro (Figura 24B). Por tanto, empleando la microscopía confocal podíamos constatar supresión, al menos parcial, a unas concentraciones de inductor para las cuales no había sido posible registrar supresión de silenciamiento mediante la visualización de la fluorescencia bajo luz UV ($DO_{600} = 0,1$ y $0,05$). La supresión mediada por 16K era más intensa a concentraciones menores de inductor ($DO_{600} = 0,01$), si bien en estas condiciones la inducción de silenciamiento era incompleta como sugiere el hecho de que en ausencia de supresor se observaban células fluorescentes en el tejido infiltrado. En conclusión, la mayor sensibilidad de este sistema

experimental nos permitía detectar signos débiles de supresión a concentraciones elevadas de inductor que se hacían más manifiestos a medida que la concentración de inductor disminuía.

Finalmente llevamos a cabo un ensayo Northern blot para analizar la acumulación del mRNA de la GFP en el tejido agroinfiltrado. En ausencia de supresor, observábamos para concentraciones altas del inductor dsGFP ($DO_{600} = 0,1-0,01$) una reducción en los niveles de mRNA de la GFP de aproximadamente el 98% respecto a la muestra control sin inductor (Figura 24C). Incluso a concentraciones más bajas de dsGFP ($DO_{600} = 0,005$) los niveles de mRNA diana eran un 93% inferiores al control (Figura 24C). Estos resultados demuestran que niveles muy bajos del dsGFP inductor eran suficientes para generar una degradación masiva de los mensajeros diana por silenciamiento génico en el tejido agroinfiltrado. Cuando se añadía la construcción 16K a la mezcla de agroinfiltración, y en consonancia con los resultados obtenidos con otras metodologías, observamos que los niveles de mRNA de la GFP se incrementaban de forma dependiente de la concentración del inductor dsGFP. A concentraciones altas de inductor ($DO_{600} = 0,1$) la recuperación en los niveles de mensajero es apenas perceptible confirmando la incapacidad de 16K de revertir eficientemente el silenciamiento en presencia de altas dosis de dsRNA. Sin embargo a concentraciones más bajas ($DO_{600} = 0,05$) del inductor, los niveles de mRNA de la GFP se recuperaban aproximadamente un 10% en presencia de 16K (Figura 24C). A niveles aún más bajos del inductor ($DO_{600} = 0,01$) el mRNA en presencia de supresor 16K se acumulaba unas 40 veces más en relación al experimento control sin supresor. A una concentración de dsGFP equivalente a $DO_{600} = 0,005$, el mRNA

Resultados

se acumuló 90 veces más en el tejido infiltrado con 16K respecto al control. Es importante enfatizar que aunque la inducción del silenciamiento de GFP no fue total a esta concentración de inductor ($DO_{600} = 0,005$) los niveles de mensajero se redujeron en un orden de magnitud lo que demostraba que la inducción de silenciamiento por dsGFP y el efecto supresor de 16K en estas condiciones era perfectamente cuantificable y fiable. El potencial supresor del HCPPro empleado como control positivo era evidente incluso a las concentraciones más altas de inductor utilizadas en este estudio.

Para determinar el efecto supresor de 16K sobre el silenciamiento de un transgén constitutivo inducido por un RNA bicatenario empleamos la línea transgénica 16c de *N. benthamiana* transformada de forma estable con el gen GFP y cuyo silenciamiento (local y sistémico) es inducible mediante agroinfiltración con construcciones GFP o dsGFP en hojas basales (Ratcliff *et al.*, 1999). Como inductores de silenciamiento usamos las construcciones dsGFP o dsGF apartado 3.5.2) y como control negativo de actividad supresora el vector vacío y la construcción 29K. Cuando se agroinfiltraba la construcción dsGFP en hojas de la línea 16c, la fluorescencia asociada a la expresión del transgén estable GFP disminuía gradualmente en el tejido agroinfiltrado con las construcciones control. Sin embargo, se mantenía hasta aproximadamente los 11 dpa a niveles similares al observado en plantas transgénicas 16c no infiltradas cuando se incluía 16K en la solución de agroinfiltración (Figura 25B). Para corroborar estas observaciones, analizamos la acumulación de mRNA del transgén estable GFP en la zona agroinfiltrada. El ensayo Northern blot revelaba una reducción cercana al 80% en los niveles de mRNA en el tejido inyectado con una construcción que contenía una

repetición invertida correspondiente a la mitad 5' proximal del gen GFP (dsGF) ($DO_{600} = 0,05$) (Figura. 25C). Esta disminución era de aproximadamente dos órdenes de magnitud después de los 7 dpa. Sin embargo, el efecto inductor de la construcción dsGF se atenuaba en presencia de 16K puesto que los niveles de GFP mRNA en el tejido agroinfiltrado se redujeron en torno al 50% a los 2 dpa. Este resultado indicaba que 16K era capaz de prevenir, al menos parcialmente, la degradación del mRNA del transgén GFP. Sorprendentemente, era posible apreciar un leve efecto supresor de la proteína 16K sobre el silenciamiento local del transgén GFP en la línea 16c cuando los cultivos portadores de la construcción dsGF se inyectaban a una $DO_{600} = 0.5$ (Figura 25C). Este resultado estaba en aparente conflicto con la observación previa de que 16K era incapaz de suprimir localmente el silenciamiento de un transgén expresado de forma transitoria en presencia de altas dosis de un inductor de dsRNA. Una posible explicación a esta discrepancia es que el desenlace del proceso de inducción de silenciamiento y su supresión por proteínas virales pudiera diferir parcialmente dependiendo de la naturaleza de la secuencias inductora y diana; en este caso, el silenciamiento de un transgén estable que se expresa de forma constitutiva en toda la planta frente a una construcción exógena que se expresa de forma transitoria en un tejido agroinfiltrado. En conjunto nuestros resultados demostraban que 16K era capaz de suprimir el silenciamiento inducido por una repetición invertida aunque la eficacia de la supresión estaba comprometida por la concentración de dsRNA. Esto sugiere que 16K actúa a un nivel posterior a la formación de la dsRNA inductora de silenciamiento. Comparativamente con HCPro, y en las condiciones

Resultados

experimentales en las que se ha realizado este estudio, la proteína 16K parece comportarse como un supresor más débil que el supresor de los Potyvirus.

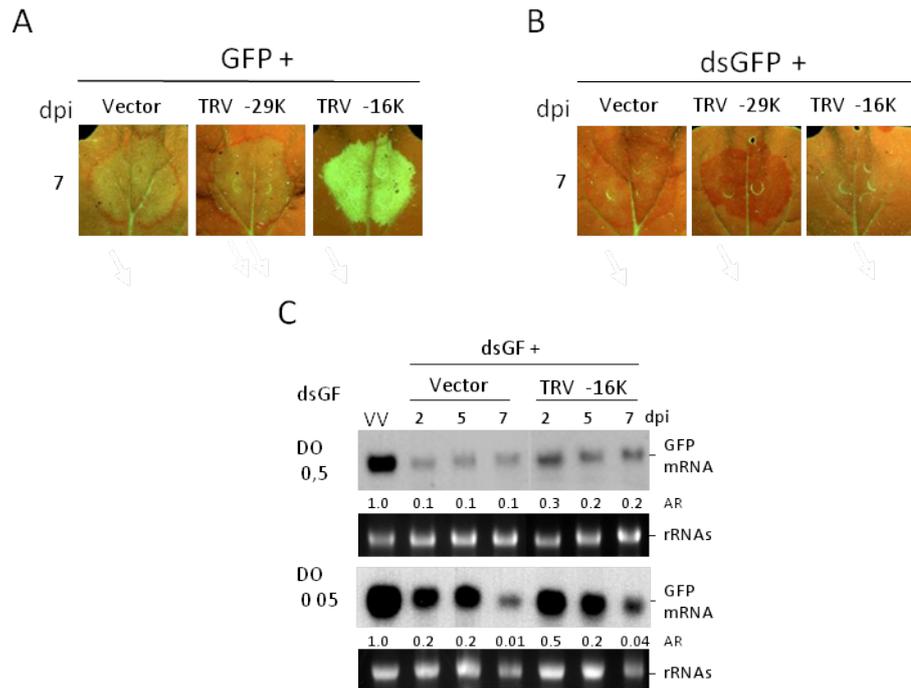


Figura 25: Interferencia de 16K con la activación local del silenciamiento de un transgén.

Detalle de la fluorescencia en hojas de la línea transgénica 16c de *N. benthamiana* agroinfiltradas con una construcción GFP (A) o dsGFP (B) en presencia o ausencia de 16K. GFP y dsGFP se emplearon en calidad de inductores de silenciamiento local. Como control negativo de actividad supresora se emplearon vector vacío y la construcción 29K. La fluorescencia de la GFP se observó a los 7 dpa bajo luz UV. C) Northern blot para la detección de mensajeros de GFP realizado a partir de RNA total extraído de hojas infiltradas a los 7 dpa y analizado con una sonda radioactiva complementaria a la GFP. Los niveles de acumulación relativa (AR) para cada mensajero se calcularon normalizando los valores de intensidad de cada banda de hibridación respecto de la intensidad obtenida en el control agroinfiltrado con vector vacío para cada concentración del inductor. La tinción del gel con EtBr se utilizó como control de carga.

b) Efecto sobre la acumulación de siRNAs

La inducción de silenciamiento génico lleva inexorablemente ligada la formación y acumulación de siRNAs a partir de la secuencia inductora. Para investigar si la actividad supresora de 16K estaba asociada a un efecto sobre la acumulación de siRNAs analizamos los niveles de siRNAs producto del silenciamiento de la GFP en las muestras usadas en el experimento de identificación del supresor. El RNA total se fraccionó para obtener RNA de bajo peso molecular y se analizó mediante experimentos Northern blot con la misma sonda complementaria a la GFP del experimento anterior. En el tejido agroinfiltrado con la construcción GFP se producía un aumento gradual en la acumulación de siRNAs mayoritariamente de 21 y 24 nts que era inversamente proporcional a la acumulación del mRNA de GFP (Figura 26A). La aparición de siRNAs producto del silenciamiento de la GFP ya era visible a los 3 dpa coincidiendo con la reducción drástica observada en los niveles de mRNA de la GFP. En el tejido agroinfiltrado en presencia de 16K los niveles de acumulación de siRNAs eran sustancialmente menores en todos los tiempos analizados comparados con el experimento control (Figura 26A). La detección de siRNAs se retrasa hasta los 4-5 dpa momento en que se apreciaba un ligero descenso en la acumulación del mRNA de la GFP. Los niveles de acumulación de siRNAs derivados de la GFP en presencia de HCPro fueron muy bajos en todo momento probablemente debido a la capacidad de esta proteína para unir y secuestrar siRNAs. De forma similar a lo descrito para HCPro, nuestros resultados sugieren

Resultados

que la actividad supresora de la 16K está asociada a una disminución en la acumulación de siRNAs.

Para determinar el efecto supresor del 16K sobre el procesamiento de los dsRNA y la subsiguiente formación y acumulación de siRNAs utilizamos de nuevo un ensayo de agroinfiltración en *N. benthamiana*, coinfiltrando el inductor dsGFP a diferentes concentraciones en presencia o ausencia de 16K. Como control empleamos la proteína HCPro. La expresión transitoria de la construcción dsGFP llevaba asociada la formación de siRNAs de 21 y 24 nts independientemente de la concentración de cultivo empleada en este experimento. La acumulación de estos siRNAs era tanto mayor cuanto más alta era la dosis empleada de repetición invertida dsGFP (Figura 26B). Esto sugería que el RNA bicatenario inductor se procesaba eficientemente en el tejido infiltrado de modo que los niveles de siRNAs eran proporcionales a los de moléculas inductoras. Cuando se incorporaba la construcción 16K a la mezcla de infiltración, y la dsGFP se empleaba a concentraciones altas ($DO_{600} = 0,01$) donde la capacidad supresora del 16K estaba limitada, la reducción en la acumulación de siRNAs fue modesta (aprox. 30%). Por el contrario, a esa misma dosis de inductor, esta reducción fue del 80% en los tejidos que expresaban HCPro.

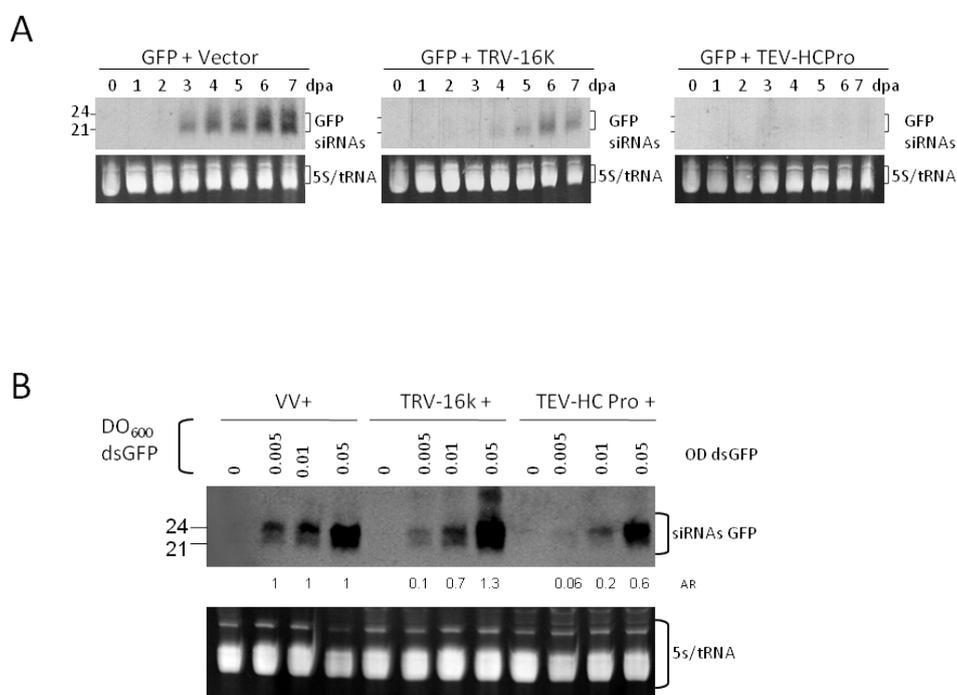


Figura 26: **Efecto de 16K sobre la acumulación de siRNAs.** A) Cinética de acumulación de siRNAs derivados de la GFP. B) Acumulación de siRNAs derivados de dsGFP en plantas agroinfiltradas con concentraciones crecientes de dsGFP. Las muestras de RNAs de bajo peso molecular se prepararon 2 dpa a partir de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones GFP o dsGFP en ausencia o en presencia de los supresores 16K o HCPro y se analizaron por Northern blot con una sonda radioactiva complementaria a la GFP. Los niveles de acumulación relativa (AR) de los siRNA se calcularon normalizando los valores de intensidad de cada banda de hibridación respecto de la intensidad obtenida en el control agroinfiltrado con vector vacío para cada concentración del inductor. Los marcadores de RNA de 21 y 24nts se muestran a la izquierda de cada blot. La tinción del gel con EtBr se utilizó como control de carga. En ambos casos se empleó la proteína HCPro de TEV como control de supresión.

Resultados

A concentraciones todavía más elevadas de dsGFP ($DO_{600}= 0.05$) el efecto de la 16K sobre la acumulación de siRNAs era imperceptible. Sin embargo cuando el dsGFP fue agroinfiltrado a una concentración baja ($DO_{600}= 0,005$), a la que 16K respondía como un supresor de silenciamiento local eficiente, los siRNAs resultantes del procesamiento del dsRNA se redujeron en casi un 90% en presencia de 16K (Figura 26). El mismo efecto se observó en presencia del control HCPPro. En conclusión nuestros datos corroboraban nuestras observaciones previas de que 16K era capaz de reducir los niveles de siRNAs producto del silenciamiento a bajos niveles del inductor en el tejido agroinfiltrado. Este hecho sugería que 16K debe actuar dentro de la ruta del silenciamiento génico en un paso requerido para la acumulación de los siRNAs.

c) *Capacidad de unión de siRNAs*

A la vista de los resultados anteriores postulamos que uno de los mecanismos de acción que podría explicar la reducción en los niveles de siRNAs asociada a la supresión de silenciamiento por 16K es que esta proteína secuestre siRNAs de simple y/o de doble cadena impidiendo así su unión al complejo efector de silenciamiento. Este mecanismo ha sido observado en numerosos supresores como HCPPro, P19 y P21 (Chapman *et al.*, 2004; Chellappan *et al.*, 2005; Dunoyer *et al.*, 2004; Lakatos *et al.*, 2006). Para comprobar esta hipótesis hemos diseñado diversas aproximaciones experimentales con el propósito de evaluar la capacidad de unión de 16K con siRNAs.

d) Capacidad de unión de siRNAs in planta

En primer lugar investigamos la capacidad de 16K para unirse a los siRNAs que se generan de forma natural en la planta por el procesamiento de una repetición invertida de RNA. Para ello realizamos experimentos de expresión transitoria en *N. benthamiana* en los que agroinfiltrábamos conjuntamente una construcción que contenía la repetición invertida de la GFP en presencia y en ausencia de la construcción 16K. Tal como hemos demostrado anteriormente los transcritos derivados de la construcción dsGFP adquieren la configuración de RNA bicatenario y son procesados eficientemente por DCL en siRNAs de 21 a 24 nts.

Para valorar la capacidad de unir siRNAs realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de la proteína 16K empleando un anticuerpo anti HA seguido de un análisis del RNA asociado al inmunoprecipitado. Las muestras de hoja infiltrada se trituraron en tampón de lisis tal y como se detalla en (apartado 3.11.1) y se separaron 3 fracciones: una para extracción de RNA ("input" RNA), una para extracción de proteínas ("input" proteína) y una última que se separó en las dos fracciones usadas para la inmunoprecipitación con el anticuerpo correspondiente. La primera se incubó en presencia de anticuerpo anti-HA para retener específicamente la proteína recombinante 16K y la segunda en presencia de un anticuerpo anti-His que se empleó como control negativo para descartar uniones inespecíficas. Tras la primera incubación con el anticuerpo específico, las muestras se trataron con proteína A-Agarosa (SIGMA) para separar la fracción proteica retenida en la matriz de agarosa del RNA del sobrenadante. La presencia de 16K en la fracción proteica no inmunoprecipitada ("input") preparada a partir

Resultados

del tejido agroinfiltrado se analizó por Western blot con la ayuda de un anticuerpo anti-HA. Los resultados muestran una banda del tamaño esperado para la proteína 16K junto con otra de mayor tamaño (aproximadamente 54 kDa) que pudiera representar agregados de proteína 16K. Esta banda se detectó en muestras agroinfiltradas con la construcción 16K y no en el ensayo control infiltrado con un vector vacío, demostrando la especificidad de la reacción (Figura 27). La presencia de siRNAs derivados del procesamiento de dsGFP en la fracción no inmunoprecipitada de RNA se analizó por Northern Blot con la ayuda de una sonda radioactiva complementaria a la GFP. Como era de esperar, fue posible detectar señales de hibridación para siRNAs en el tejido infiltrado con la construcción dsGFP tanto con vector vacío como con 16K (Figura 27). Al analizar la fracción inmunoprecipitada, observamos como la proteína 16K inmunoprecipitaba en presencia de anti-HA pero no cuando se empleaba anti-His como control de especificidad. Es más, la proteína 16K solo se detectaba en muestras infiltradas con la construcción 16K y no en muestras control infiltradas con vector vacío (Figura 27). Este resultado demostraba que era posible inmunoprecipitar eficientemente la proteína 16K expresada en nuestro sistema heterólogo. Sin embargo, no pudimos detectar la presencia de siRNAs derivados del dsGFP en la fracción de RNA asociada al inmunoprecipitado de 16K (Figura 27). Nuestros datos sugieren por tanto que 16K no es capaz de unir siRNAs en estas condiciones experimentales.

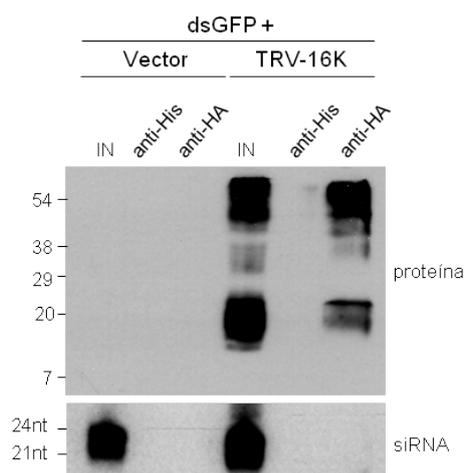


Figura 8: **Análisis *in planta* de la unión de 16K con siRNAs.** Ensayo de inmunoprecipitación de 16K y siRNAs derivados de dsGFP. Las hojas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con la construcción dsGFP en presencia y en ausencia de 16K. Las muestras infiltradas se analizaron a los 3 dpa. La proteínas del extracto se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-HA, mientras que el en anticuerpo anti-His se empleó como control negativo en la inmunoprecipitación. El 16K se detectó por Western blot (panel superior) usando anticuerpos monoclonales anti-HA y (IN) extracto proteico sin inmunoprecipitar. Los siRNAs derivados de dsGFP se detectaron por Northern blot (panel inferior) utilizando una sonda específica marcada radiactivamente. Los marcadores de peso molecular (kDa, arriba; nts, abajo) se indican en la figura.

e) Capacidad de unión de siRNAs *in vitro*

Para comprobar el resultado anterior investigamos si la proteína 16k era capaz de unir *in vitro* siRNAs sintéticos. Para ello se realizaron extracciones de proteínas a partir de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con la construcción 16K. Como control positivo en la reacción empleamos una construcción que

Resultados

expresaba la proteína supresora P19 de *Tombusvirus* que posee capacidad de unión a siRNAs (Lakatos *et al.*, 2006; Calabrese and Sharp, 2006). Cada uno de los extractos de proteína se incubó en presencia de siRNAs sintéticos de 21nts tanto de simple como de doble cadena marcados radiactivamente como se detalla en (apartado 3.12.2). Las muestras se analizaron en un gel nativo de poliacrilamida y se visualizaron directamente con ayuda de un PhosphorImaging (BioRad).

Es de esperar que, en estas condiciones, los siRNAs que permanezcan asociados a fracciones proteicas tengan una movilidad electroforética menor que la fracción libre de siRNAs y queden retenidos en la parte superior del gel, en una posición consecuente con el tamaño de la proteína a la que se unen. Por el contrario, los siRNAs no unidos a proteína (siRNAs libres) se localizaran en la parte baja del gel. Como se observa en la Figura 28, en las muestras correspondientes a extractos de plantas infiltradas con la construcción P19 e incubadas con siRNAs de cadena sencilla o doble detectamos una señal en la parte superior del gel cuya presencia coincide con una disminución de siRNAs libres en la parte inferior del gel. Este resultado confirma que P19 en efecto es capaz de unir tanto siRNAs de simple como de doble cadena de 21nts en nuestro sistema experimental. Por el contrario no fue posible identificar señales correspondientes a siRNAs con movilidad electroforética reducida en muestras que expresaban la proteína 16K (Figura 28). Los siRNAs en esas muestras aparecían en forma libre en cantidades comparables al control negativo empleando el vector vacío en el tejido infiltrado. Por tanto estos resultados en conjunto sugieren que 16K no posee la capacidad de unión de siRNAs y que su mecanismo de supresión probablemente no se asocie con el secuestro de siRNAs.

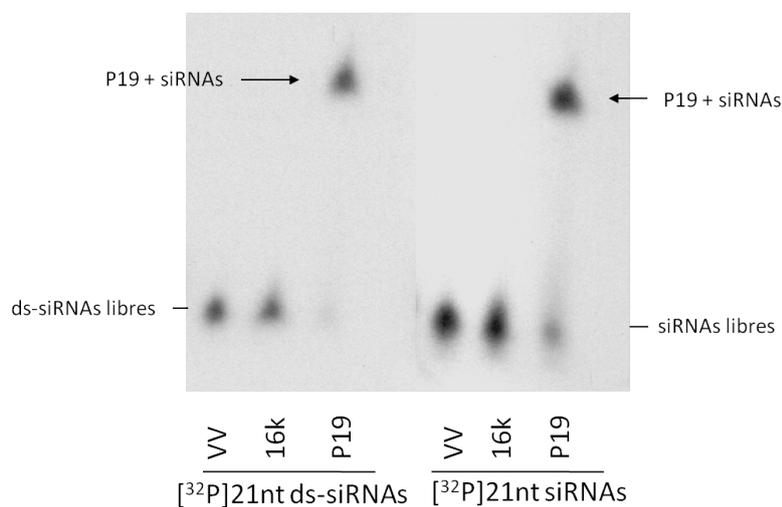


Figura 28: **Análisis *in vitro* de la unión de 16K con siRNAs.** Ensayo de interacción de 16K con siRNAs sintéticos en gel de retardo. Los extractos proteicos, preparados a los 3 dpa a partir de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con 16K o P19 (control positivo de interacción) se incubaron en presencia de siRNAs sintéticos de 21 nts, de cadena simple y doble, y marcados radiactivamente. La señal radioactiva emitida se analizó directamente en el gel con “PhosphorImaging” (BioRad). En el panel se indican las posiciones de los siRNAs libres (no unidos) y de los siRNAs unidos al supresor.

*f) Capacidad de estabilización del dúplex miRNA/miRNA**

La incorporación de siRNAs en los complejos efectores de silenciamiento implica la separación de las dos cadenas sencillas del dúplex, la asociación de una de ellas a AGO (cadena guía) y la degradación de la cadena complementaria (cadena pasajera). Esta situación se ilustra en el caso de los miRNAs para los cuales la detección de las cadenas pasajeras o miRNA* suele ser complicada en ensayos Northern blot debido a su baja abundancia (Khvorova *et al.*, 2003;

Resultados

Schwarz *et al.*, 2003). Algunos supresores de silenciamiento que poseen la capacidad de unir siRNAs estabilizan los dúplex miRNA/miRNA* impidiendo la separación de las dos hebras y su ensamblaje en los complejos efectores. Esto se traduce en que plantas transgénicas que expresan este tipo de supresores, los miRNAs* tienden a acumularse siendo fácilmente detectables por Northern blot (Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004). Por tanto, si la 16K fuese capaz de unir siRNAs o miRNAs durante el proceso infeccioso, esperaríamos encontrar una mayor acumulación de miRNAs* en plantas infectadas por el virus. Para comprobar esta posibilidad analizamos por Northern blot la fracción de RNA de bajo peso molecular procedente de plantas de *A. thaliana* inoculadas con tampón o infectadas con TRV. En la mayoría de los casos no fuimos capaces de detectar miRNAs* para los miRNAs estudiados ni en planta control no infectada ni en planta infectada con TRV a excepción del miR172* (Figura 29). Para este miRNA* se analizaron las bandas de hibridación por densitometría y se calcularon los ratios de acumulación (RA) relativa respecto de la muestra control que presentaba mayor acumulación. No se detectaron diferencias significativas de acumulación entre planta sana e infectada lo que descartaba un efecto estabilizador de la 16K sobre el dúplex (Figura 29).

Por tanto 16K tampoco parecía ser capaz de unir siRNAs en el contexto de la infección. En conclusión, su actividad como supresor no implicaba una interacción directa con los siRNAs a pesar de causar una disminución apreciable en sus niveles de acumulación.

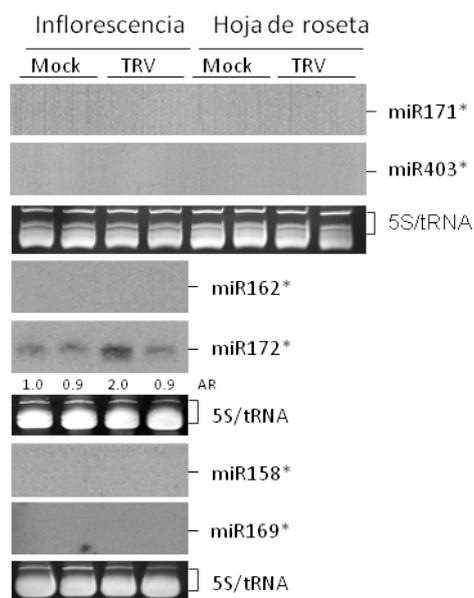


Figura 29: **Análisis de acumulación de miRNAs*** en planta infectada por TRV. Northern blot realizado a partir de RNA debajo peso molecular extraído de plantas de *A. thaliana* inoculadas con tampón o infectadas con TRV a 14 días post infección (dpi). La presencia de miRNAs* se analizó utilizando sondas radioactivas complementarias a cada miRNA*. Las muestras se recolectaron por duplicado para minimizar las variaciones intermuestrales. Los niveles de acumulación relativa (AR) de las muestras se obtuvieron por análisis densitométrico y relativizados a una de las muestras control a la que se asignó el valor 1. La tinción del gel con EtBr se utilizó como control de carga

g) Capacidad de unión de proteínas AGO

La capacidad de los supresores virales de silenciamiento de interactuar con proteínas AGO parece venir determinada, al menos en parte, por la existencia de un motivo GW-WG en su secuencia de aminoácidos (Giner *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2010). El análisis de la secuencia de 16K utilizando la herramienta

Resultados

bioinformática de predicción de dominios GW-WG de unión a AGO (Zielezinski and Karlowski, 2011; Karlowski *et al.*, 2010) revelaba la existencia de un dominio único en posición aminoacídica 48 del extremo N-terminal que podría conferir a la proteína la facultad de unión a AGO. Las proteínas AGO presentan distintas afinidades de unión a siRNAs en función, entre otras, del nucleótido presente en posición 5' terminal (Mi *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008). Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que los siRNAs derivados de TRV producidos durante la infección presentan una clara tendencia a iniciarse en 5' con U, A y en menor medida C (Donaire *et al.*, 2009). Esto sugiere que AGO1 (U en 5'), AGO2 y AGO4 (A en 5') podrían ser las proteínas AGO a las que se unen preferencialmente los vsRNAs en el tejido infectado y que la interacción de vsRNAs con estas proteínas pudiera ser relevante en el contexto de una infección viral. Por ello nos propusimos analizar la capacidad de 16K de interactuar con AGO1, AGO2 y AGO4.

Para abordar este trabajo empleamos la tecnología de fluorescencia por complementación molecular (BIFC) que además aporta información adicional sobre la localización subcelular de las proteínas implicadas. Esta técnica se basa en el uso de la proteína fluorescente amarilla ("Yellow Fluorescent Protein", YFP), una variante de la GFP cuya expresión produce fluorescencia en el tejido vegetal, fragmentada en dos partes (Bracha-Drori *et al.*, 2004). Cada una de ellas, incapaz de emitir fluorescencia por sí sola, se fusiona con las proteínas de interés de modo que la posible interacción entre las proteínas fusionadas reconstituye la proteína YFP fragmentada y recupera la fluorescencia. Por tanto, clonamos cada una de las proteínas a estudio en los plásmidos binarios que contenían los fragmentos sYFPN

y sYFPC (N-terminal y C-terminal, respectivamente, de la YFP). Las construcciones resultantes se coexpresaron en hojas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración y la fluorescencia en la zona infiltrada se observó bajo microscopía confocal. Al expresar estas construcciones conjuntamente se puede inferir si existe interacción entre las proteínas de interés si se reconstituye el fluoróforo fragmentado y se restablece la fluorescencia.

Previamente, comprobamos que las proteínas de fusión sYFPN-16K y sYFPC-16K que iban a ser empleadas en los ensayos de interacción retenían la capacidad de actuar como supresores de silenciamiento. Para ello utilizamos el sistema de expresión transitoria en *N. benthamiana*. Las hojas se agroinfiltraron con una construcción GFP en combinación con las construcciones sYFPN-16K o sYFPC-16K. La construcción 16K se empleó como control positivo de supresión. Las hojas coinfiltradas indistintamente con las construcciones sYFPN-16K y sYFPC-16K mostraban una fluorescencia más intensa que la observada en ausencia de supresor, y equivalente a la observada en presencia del supresor 16K control (Figura 30). Este resultado demostraba que las proteínas de fusión con YFP eran capaces de suprimir el silenciamiento inducido por una simple cadena de GFP a niveles similares a la proteína 16K silvestre. Más aún, estas construcciones conservaban intacta su capacidad como supresores de silenciamiento cuando se añadía al experimento dsGFP a una dosis a la que habíamos observado que 16K era capaz de inhibir el silenciamiento ($DO_{600}=0,05$).

Resultados

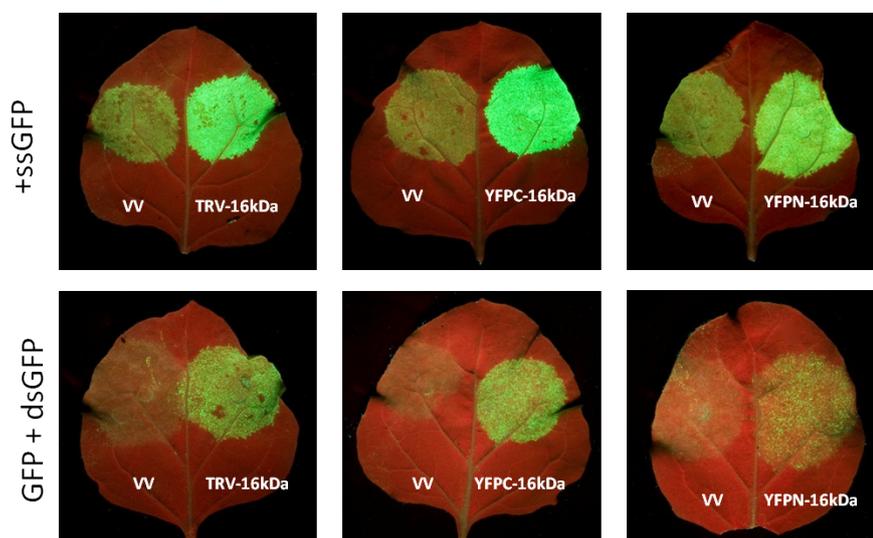


Figura 30: **Análisis de la actividad supresora de silenciamiento en el sistema de expresión transitoria de las construcciones 16K empleadas en los ensayos BiFC.** Observación bajo luz UV de la fluorescencia asociada a la expresión de la proteína GFP en presencia o ausencia de las construcciones YFPC-16K y sYFPN-16K. El panel superior muestra la inducción del silenciamiento asociado a la expresión transitoria del transgen GFP. El panel inferior muestra la inducción del silenciamiento del transgen GFP por la construcción dsGFP. La construcción 16K se empleó como control positivo de supresión, mientras que el vector vacío (VV) sirvió como control negativo. La fluorescencia de la GFP se monitorizó en la zona infiltrada a los 4 dpa bajo luz UV.

En primer lugar investigamos la capacidad de 16K para formar homodímeros así como la localización subcelular de los mismos. Las construcciones sYFPN-16K y sYFPC-16K se coagroinfiltraron en hojas de *N. benthamiana*. Discos de 1 cm de diámetro en la zona agroinfiltradas se analizaron por microscopia confocal a los 4 dpa. Como control negativo para descartar la autofluorescencia por saturación de la ganancia o por muerte celular se analizaron discos de hoja agroinfiltrados con sYFPNó sYFPC por separado a una $DO_{600} = 0,4$ (datos no mostrados). En las

muestras infiltradas con sYFPN-16K y sYFPC-16K se detectó fluorescencia en las células epidérmicas observadas resultado de la interacción de los dos fragmentos de la YFP. Este resultado indicaba que el supresor forma homodímeros *in vivo*. Pese a la presencia en la secuencia codificante de la proteína 16K de señales de localización nuclear (NLS) (Ghazala *et al.*, 2008) la distribución de la fluorescencia fue claramente citoplasmática (Figura 31A). No obstante, ocasionalmente se detectó también fluorescencia leve en el nucléolo (Figura 31B) constatando la formación de homodímeros de 16K también a este nivel.

Para estudiar la posible interacción de la 16K con AGO1, AGO2 y AGO4, las secuencias codificantes de *A. thaliana* para estas proteínas AGO se fusionaron a los fragmentos N-terminal y C-terminal de la sYFP (apartado 3.7.1) para generar las construcciones sYFPN-AGO1 y sYFPC-AGO1, sYFPN-AGO2 y sYFPC-AGO2, y sYFPN-AGO4 y sYFPC-AGO4.

Cada una de las construcciones sYFPfusionadas en posición C-terminal de AGO (sYFPC-AGO1, -AGO2, -AGO4) se agroinfiltraron conjuntamente con la construcción fusionada en N-terminal de 16K (sYFPN-16K). Todas las construcciones fueron agroinfiltradas a una $DO_{600}=0,2$. Las observaciones se realizaron sobre discos de hoja infiltrada a los 4 dpa. Al observar bajo microscopía confocal la zona infiltrada se detectó fluorescencia en hojas donde se coexpresaba la 16K tanto con AGO1 como con AGO4 lo que sugería que la proteína 16K pudiera interactuar con AGO1 y AGO4 *in vivo* (Figura 32).

Resultados

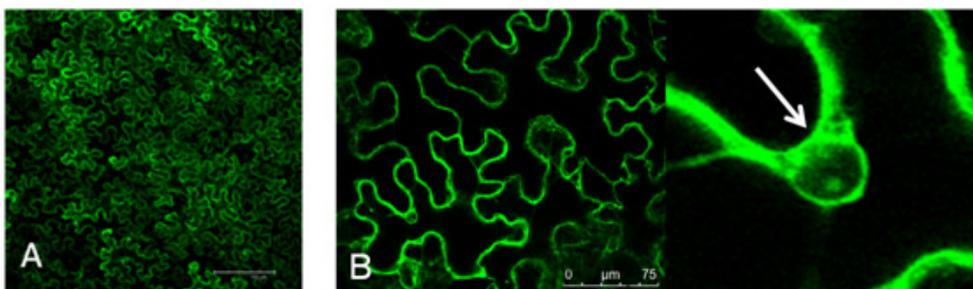


Figura 31: **Ensayo BiFC de interacción 16K-16K y localización subcelular.** A) Fluorescencia en células epidérmicas asociada a la reconstitución de la proteína de fluorescencia amarilla (YFP) por interacción de los monómeros de 16K en N y C terminal. Las construcciones YFPN-16K y YFPC-16K se coinfiltraron en hojas de *N. benthamiana* y la fluorescencia se observó a los 4 dpa por microscopía confocal. La barra a la derecha de la imagen representa 150 μm . Nótese la distribución mayoritariamente citoplasmática de la fluorescencia asociada a la interacción de 16K consigo misma. B) Detalle de un núcleo mostrando fluorescencia asociada al nucléolo. La barra blanca a la derecha de la imagen representa 75 μm .

La fluorescencia resultado de la interacción se localizó en el citoplasma de las células epidérmicas observadas. Por el contrario, nuestros resultados sugerían que no existía interacción entre 16K y AGO2 pues no fue posible detectar signos de fluorescencia en nuestras condiciones experimentales (datos no mostrados).

También se agroinfiltraron las construcciones sYFP fusionadas en N-terminal de cada una de las proteínas AGO con su construcción correspondiente fusionada en C-terminal (ej.: sYFPN-AGO1 y sYFPC-AGO1). En ningún caso fue posible detectar fluorescencia en hojas agroinfiltradas con sYFPN-AGO1 y sYFPC-16K (Figura 32) que sugiriese interacción entre las proteínas AGO1 para formar dímeros bajo las condiciones del experimento. Idéntico resultado fue el observado en tejido agroinfiltrado con las construcciones equivalentes de AGO2 y AGO4 (Figura

32 y datos no mostrados). Estos resultados sugerían además que no se producía interacción inespecífica y espontánea entre los fragmentos de la YFP.

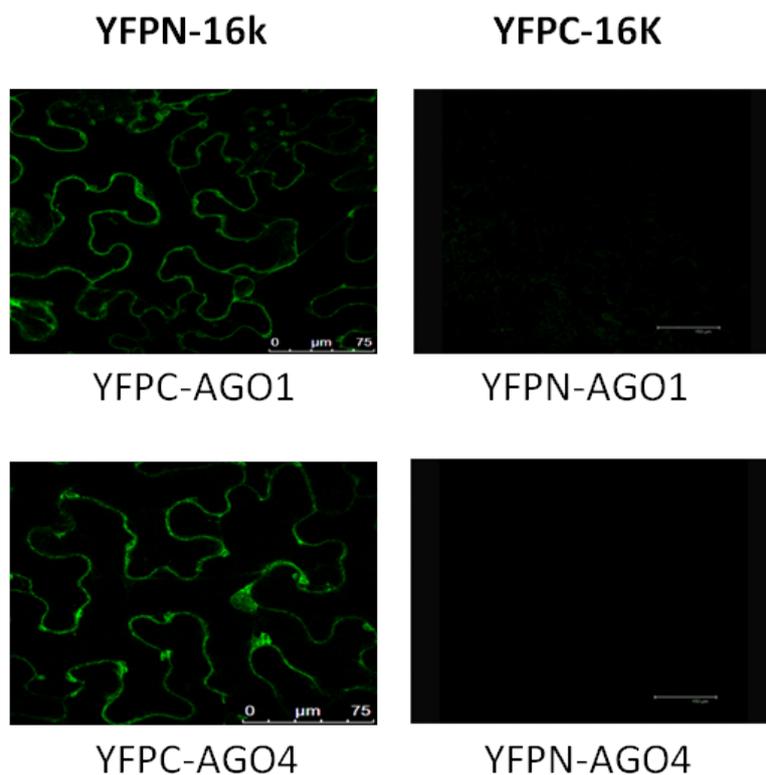


Figura 32: **Ensayo BiFC de interacción *in vivo* entre proteínas AGO y 16K.** Imágenes de microscopía confocal de discos de hojas de *N. benthamiana* coagroinfiltradas con las construcciones YFP fusionadas con AGO en posición N-terminal (sYFPN-AGO1 y -AGO4) o C-terminal (sYFPC-AGO1 y -AGO4) junto con la construcción YFP fusionada con 16K en C-terminal (sYFPC-16K) o N-terminal (sYFPN-16K), respectivamente. Las muestras se analizaron a los 4 dpa. La barra blanca a la derecha de la imagen representa 75 μ m. La observación de fluorescencia es indicativa de la interacción entre las construcciones indicadas.

Resultados

Para contrastar los resultados obtenidos por BiFC realizamos ensayos de interacción *in vitro* por inmunoprecipitación con HA-agarosa. Para este ensayo se utilizó la construcción HA16K empleada en los ensayos de expresión transitoria descritos en el apartado 4.2.1. Cada una de las proteínas AGO (AGO1y AGO4) investigadas se expresó en el tejido vegetal a partir de las construcciones de fusión con sYFPN empleadas en los ensayos BiFC. Todas las construcciones se agroinfiltraron en hojas de *N. benthamiana*. A los 3 dpa se realizó un extracto proteico de la hoja coagroinfiltrada con HA16K y cada una de las proteínas YFPN-AGO. Este extracto se preparó en presencia de una resina de HA-agarosa que retenía específicamente el epítipo HA y que por tanto permitía inmunoprecipitar la proteína HA16K y todas aquellas proteínas que interaccionaran con ella (apartado 3.11.3 b). El extracto crudo no inmunoprecipitado y la fracción retenida por la resina de HA-agarosa (inmunoprecipitada) se analizaron por Western blot en geles de SDS-PAGE del 8 y 12% para detectar los complejos proteicos formados en función de su tamaño (entre 100-150 kDa para las proteínas sYFPN-AGO y 16kDa para 16K). En todos los casos, la proteína HA16K se detectaba en ensayos Western blot con un anticuerpo anti-HA tanto en la fracción cruda como en la fracción eluida resultante de la inmunoprecipitación, indicando que dicha proteína podía inmunoprecipitarse a partir de los extractos proteicos. Cuando las membranas se incubaron con un anticuerpo frente al extremo N-terminal de la proteína GFP (NtGFP, capaz de reconocer el fragmento YFPN) no pudimos detectar bandas de hibridación de un tamaño consistente con sYFPN-AGO1 en la fracción inmunoprecipitada de las muestras agroinfiltradas con HA16K y sYFPN-AGO1 (Figura 33A). Para descartar que este resultado negativo no estuviera

condicionado por la fusión de AGO1 con sYFPN (tampoco fue posible detectar interacción entre sYFPC-16K y sYFPN-AGO1 en ensayos BiFC), realizamos el ensayo de inmunoprecipitación a partir de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con sYFPN-16K y una nueva construcción en la que la proteína AGO1 estaba fusionada en su extremo C-terminal con el epítipo HA (AGO1-HA). La proteína AGO1-HA se detectaba por western blot usando un anticuerpo anti-HA tanto en la fracción cruda como en la eluida de todas las muestras infiltradas con esta construcción, demostrando que AGO1-HA podía inmunoprecipitarse (Figura33B). Sin embargo, cuando las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-NtGFP solo fue posible detectar la proteína sYFPN-16K en la fracción cruda, pero no en la fracción inmunoprecipitada (Figura33B). Este experimento se repitió 4 veces incrementando la DO_{600} de los cultivos agroinfiltrados pero siempre con resultado negativo. No fue posible por tanto corroborar los resultados obtenidos por BiFC que sugieren una asociación física entre 16K y AGO1.

En los ensayos de inmunoprecipitación a partir de hojas infiltradas con las construcciones HA16K y sYFPN-AGO4 si fue posible documentar la interacción entre ambas proteínas. Cuando las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-NtGFP fue posible detectar bandas de hibridación con la movilidad electroforética esperable para sYFPN-AGO4 tanto en la fracción cruda como en la inmunoprecipitada de las muestras infiltradas en presencia de HA16K (Figura33C). Por el contrario, la proteína no pudo detectarse en ninguna de las muestras que expresaban la construcción sYFPN-AGO4 junto a un vector vacío, es decir, en ausencia del supresor HA16K. Esto sugiere que la HA16K, como era de esperar, contribuya a estabilizar el mRNA de la construcción sYFPN-AGO4 y facilite su

Resultados

expresión. Estos resultados obtenidos empleando otra aproximación experimental confirmaban la interacción observada por BiFC entre la proteína 16K de TRVy AGO4.

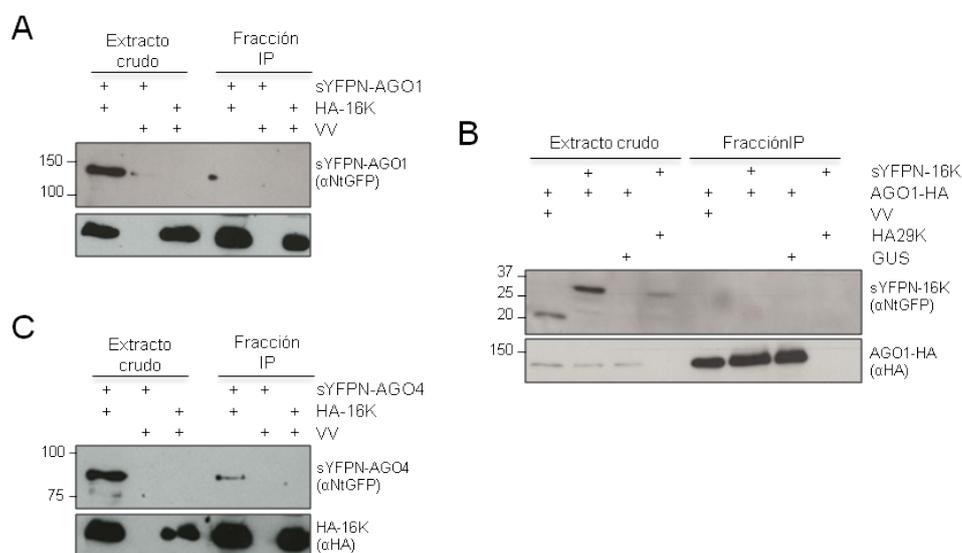


Figura 33: **Ensayo de interacción *in vivo* entre proteínas AGOy 16K por inmunoprecipitación.** Todas las construcciones empleadas se agroinfiltraron en hojas de *N. benthamiana*. Los extractos proteicos obtenidos se inmunoprecipitaron (IP) con un anti-HA y se analizaron por Western blot usando anticuerpos anti-HA y anti-NtGFP según se indica en cada caso. A la izquierda de cada panel se muestran los marcadores de peso molecular. Un vector vacío (VV) que contiene la mitad sYFPNy/o la construcción HA29K se utilizaron como controles negativos. A) Ensayo de inmunoprecipitación en hojas infiltradas con HA16K y sYFPN-AGO1. B) Ensayo de inmunoprecipitación en hojas infiltradas con HA16K y sYFPN-AGO4. C) Ensayo de inmunoprecipitación en hojas infiltradas con AGO1-HA y sYFPN-16K.

h) Efecto sobre la amplificación de la respuesta de silenciamiento

La amplificación del silenciamiento por RNA lleva asociada la producción de siRNAs secundarios a partir de regiones del RNA diana adyacentes a aquellas donde se inició la respuesta primaria de silenciamiento (Himber *et al.*, 2003). Este proceso es dependiente de RDR y se conoce como transitividad (Vaistij *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 1998). De los seis genes homólogos RDR presentes en el genoma de *A. thaliana*, las enzimas RDR1, RDR6 y RDR2 participan en la defensa antiviral mediada por silenciamiento, presumiblemente copiando RNAs virales a dsRNAsy amplificando así la respuesta inducida por el virus (Deleris *et al.*, 2006; Donaire *et al.*, 2008; Schwach *et al.*, 2005). En respuesta, algunos supresores del silenciamiento como P19 y HCPro inhiben el proceso de amplificación mediado por RDR6 (Moissiard *et al.*, 2007).

En esta tesis nos propusimos investigar el efecto de la proteína 16K sobre la respuesta de amplificación estudiando el proceso de transitividad. Nuestro objetivo era determinar si la presencia de 16K afectaba a la producción de siRNAs secundarios a partir de un transgén GFP expresado de forma constitutiva. Para ello empleamos el sistema de agroinfiltración para expresar en hojas transgénicas de la línea 16c de *N. benthamiana* (portadoras del transgén GFP) la construcción dsGF utilizada anteriormente. En este sistema experimental, dsGF representa el substrato inductor para la síntesis de siRNAs primarios que actuarían sobre las secuencias complementarias en la porción 5' (GF) del mRNA del transgén GFP. La producción de siRNAs en la región 3' terminal (P) del transgén GFP, adyacente a la región primaria de inducción de silenciamiento (GF), reflejaría un proceso de

Resultados

transitividad. El RNA se purificó de las muestras agroinfiltradas a los 2, 5 y 7 dpa, se fraccionó para obtener los RNAs de bajo peso molecular y se analizó por Northern blot empleando sondas radioactivas correspondientes a las regiones “GF” y “P” del transgén GFP. Como indicábamos en la Figura 25, la agroinfiltración de la construcción inductora dsGF en el tejido transgénico ($DO_{600} = 0,05$) provocaba una reducción gradual a lo largo del tiempo en los niveles del mRNA del transgén que llegaban al orden de magnitud a los 7 dpa en relación con la muestra control en ausencia de inductor. Esta inducción de silenciamiento se asociaba a su vez con la formación y acumulación gradual de siRNAs de 21 a 24 nts. La hibridación con sondas específicas nos permitía confirmar que se trataba tanto de siRNAs primarios procedentes de la región GF (derivados del inductor y/o del RNA diana en la zona de inducción) como de siRNA secundarios de la región P (derivados exclusivamente del RNA diana) (Figura 34). Las dos clases de siRNAs alcanzaban el nivel máximo de acumulación a 7 dpa. Aunque las intensidades en la señales de hibridación de los siRNAs de la región GF y de la región P parecen equivalentes, la acumulación de siRNAs secundarios de la región P fue menor y su detección necesitó de exposiciones más prolongadas.

Cuando el experimento de agroinfiltración de dsGF se realizó en presencia de 16K, los niveles de mRNA del transgén GFP se recuperaban parcialmente respecto al ensayo control y tanto siRNAs primarios como secundarios se acumulaban aún en presencia del supresor en el tejido agroinfiltrado (Figura 34). Los niveles de siRNAs a lo largo del experimento se mantuvieron constantes, confirmando el efecto inhibitorio de 16K en la acumulación de los dos tipos de siRNAs (Figura 34). Por tanto asumiendo que RDR6 participa en la formación de siRNAs secundarios

en nuestro sistema, podemos inferir que 16K no tiene ningún efecto destacado sobre la amplificación por transitividad del silenciamiento génico mediada por RDR6.

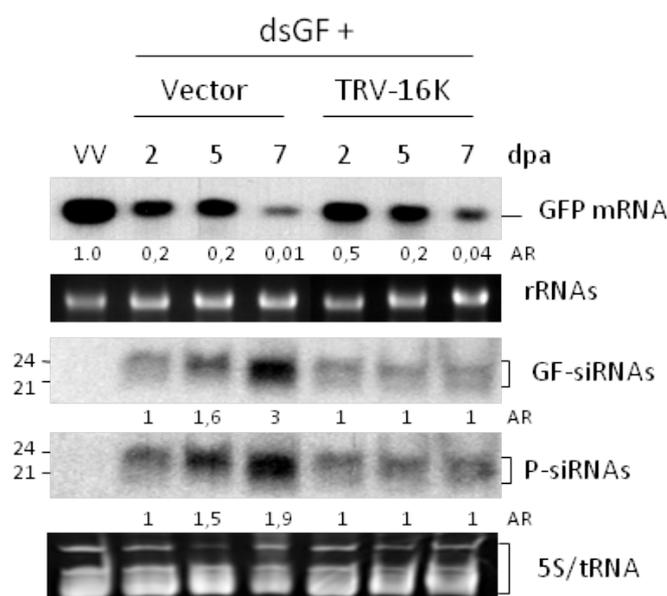


Figura 34: **Efecto de 16K sobre la transitividad en la síntesis de siRNA secundarios.** El panel superior muestra los niveles de mensajero GFP en muestras de la línea GFP transgénica 16c agroinfiltrada con la secuencia inductora de silenciamiento dsGF a diferentes tiempos en presencia o ausencia del supresor 16K. Los paneles inferiores muestran la acumulación de siRNAs primarios (GF-siRNAs) y secundarios (P-siRNAs). Las muestras se colectaron a 2, 5 y 7 dpa y se analizaron por Northern blot usando sondas radiactivas correspondientes a la secuencia codificadora del GFP (análisis de mRNA) o de la región GF o P de la GFP (análisis de siRNAs). El vector vacío se utilizó como control negativo de supresión. Los niveles de acumulación relativa para cada mensajero (AR) se calcularon normalizando los valores de intensidad de cada banda de hibridación respecto de la intensidad obtenida en la muestra obtenida a los 2 dpa en cada caso. 21 y 24nts indican la posición de los marcadores de RNA. La tinción del gel con EtBr se utilizó como control de carga.

Resultados

El enzima RDR6 también se encuentra implicado en biogénesis de ta-siRNAs generando los dsRNAs que posteriormente serán procesados por DCL4 de acuerdo a un registro de fase predeterminado (Peragine *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005; Jamalkandi and Masoudi-Nejad, 2009). En el genoma de *A. thaliana* hay 4 *loci* TAS que generan mRNAs precursores para la síntesis de ta-siRNAs. (Vazquez *et al.*, 2004; Yoshikawa *et al.*, 2005). Con el fin de inferir un posible efecto inhibitor de 16K sobre RDR6 analizamos la acumulación de 3 de estos ta-siRNAs maduros (siRNA255, siRNA1511 y siRNA2141) en plantas de *A. thaliana* control e infectadas con TRV. En experimentos Northern blots empleando dos réplicas biológicas por cada caso se observó para los ta-siRNA255 (TAS1) y ta-siRNA1511 (TAS2) una marcada tendencia hacia una mayor acumulación en plantas infectadas por TRV respecto a las plantas control (Figura 35).

Por el contrario, la infección por TRV provocaba una disminución cercana al 80% en la acumulación del ta-siRNA2141 (TAS3) respecto al control no infectado (Figura 35). Estos resultados sugieren la posibilidad de que TRV interfiera sobre la biogénesis de ta-siRNAs si bien a la vista de nuestras observaciones no es posible hacer inferencias sobre el modo de acción de 16K.

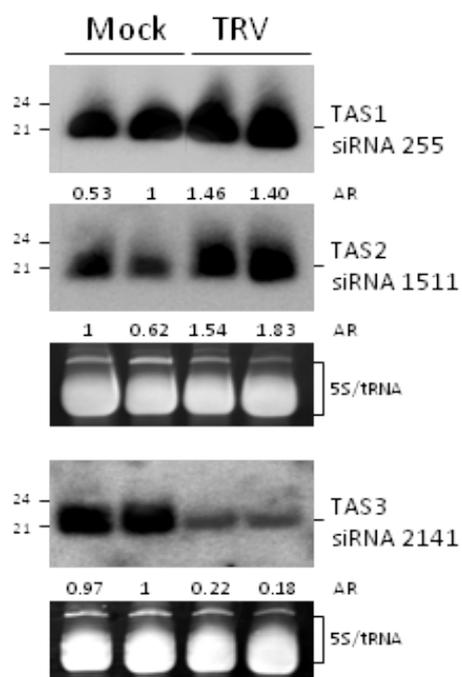


Figura 35: **Efecto de 16K sobre la acumulación de ta-siRNAs.** Acumulación de ta-siRNAs en muestras de inflorescencias de Arabidopsis infectadas con TRV y muestras control inoculadas con tampón. Las muestras de RNA de bajo peso molecular se analizaron por duplicado en ensayos Northern blot con sondas radioactivas complementarias a cada una de las secuencias analizadas. El nivel de acumulación (AR) se relativizó respecto a la muestra control que mostraba la señal de hibridación de mayor intensidad en cada caso, a la cual se le asignó el valor 1 de forma arbitraria. 21 y 24 nts indican la posición de los marcadores de RNA. La tinción del gel con EtBr se utilizó como control de carga

Resultados

4.2.3 Efecto de la proteína supresora 16K sobre la dispersión del silenciamiento génico.

a) Efecto sobre el movimiento célula a célula de la señal de silenciamiento

El sistema de expresión transitoria sobre plantas de la línea 16c transformadas con el transgén GFP representa un modelo ideal para inferir el efecto de proteínas virales sobre el movimiento a corta y larga distancia de la señal que propaga la respuesta de silenciamiento a otras partes distantes de la planta. Cuando se agroinfiltra una construcción GFP exógena en plantas 16c se observa bajo luz UV alrededor de la zona agroinfiltrada un anillo rojo intenso que contrasta con la fluorescencia verde asociada al transgén GFP fuera del área infiltrada (Voinnet and Baulcombe, 1997). Este anillo, reflejo del silenciamiento del transgén GFP endógeno en las células periféricas a la zona agroinfiltrada, es indicativo del movimiento a corta distancia de la señal de silenciamiento que se genera en la zona de inducción local (Himber *et al.*, 2003). Para comprobar si la proteína 16K tenía algún efecto sobre la aparición del anillo rojo y por tanto sobre el movimiento de silenciamiento célula a célula agroinfiltramos hojas de *N. benthamiana* de la línea 16c con la construcción GFP (como inductora exógena de silenciamiento) a una $DO_{600} = 0,5$ en presencia o ausencia de 16K. Como controles negativos empleamos un vector vacío y la proteína 29K de TRV que carece de actividad supresora en el sistema de agroinfiltración. Las hojas agroinfiltradas se fotografiaron bajo luz UV a los 7, 11 y 15 dpa. Se analizaron 12 parches

agroinfiltrados procedentes de 6 réplicas independientes para cada combinación y momento de observación. Como era esperable el silenciamiento de la GFP en la zona agroinfiltrada y la presencia del anillo rojo se hicieron evidentes ya a los 7 dpa en hojas agroinfiltradas con la construcción GFP e indistintamente vector vacío ó 29K (Figura 36A). A los 15 dpa el anillo rojo de células silenciadas permanecía visible y la zona agroinfiltrada se había tornado completamente roja bajo luz UV debido al silenciamiento del transgén GFP. Sin embargo, en presencia del supresor 16K observamos como a 7 dpa la zona agroinfiltrada mostraba una intensa fluorescencia debido a la supresión local del silenciamiento del transgén GFP sin que se apreciaran indicios del halo silenciado (Figura 36A). A partir de los 11dpa observamos una disminución gradual de la fluorescencia respecto a la observada a los 7 dpa debido probablemente a una disminución en la actividad supresora. A los 15 dpa, los niveles de fluorescencia eran comparables a los observados en tejido sin agroinfiltrar y era cuando se hacía más evidente la aparición del anillo de células silenciadas (Figura 36A). Estos resultados, reproducibles en todos los casos analizados, sugerían que el supresor 16K causaba un retraso en la dispersión célula a célula de la señal de silenciamiento.

A continuación analizamos el efecto de la proteína 16K sobre el movimiento célula a célula del silenciamiento inducido por dsRNA en la línea 16c. Para ello, se coinfiltraron hojas de *N. benthamiana* 16c con el inductor fuerte de silenciamiento dsGFP a la concentración ($DO_{600}= 0,05$) frente a la cual 16K se había mostrado efectivo como supresor de silenciamiento local junto con la construcción 16K ($DO_{600}= 0,5$). Nuevamente empleamos vector vacío o 29K como construcciones control. Las hojas agroinfiltradas se fotografiaron bajo luz UV a los

Resultados

7, 11 y 15 dpa y como en el experimento anterior se analizaron 12 parches agroinfiltrados procedentes de 6 réplicas independientes para cada combinación y momento de observación. Los resultados obtenidos a los 7 dpa mostraban una inducción fuerte del silenciamiento en la zona agroinfiltrada con dsGFP que se traducía en la pérdida de fluorescencia en esta zona (Figura 36B). Al mismo tiempo observábamos la aparición del anillo rojo de células silenciadas resultado del movimiento a corta distancia de la señal de silenciamiento. Por el contrario, la inducción de silenciamiento por dsGFP en la zona agroinfiltrada estaba atenuada en presencia del supresor 16K sin que hubiese rastro del anillo de silenciamiento a 7-11 dpa, que sólo se hizo patente a partir de los 15 dpa, cuando la capacidad de 16K para suprimir el silenciamiento local del transgén GFP se veía comprometida (apartado 2.2 a, Figura 23).

Por tanto, independientemente de la naturaleza del inductor (cadena sencilla o doble), nuestros datos indicaban que la presencia de 16K se traducía en un retraso en la aparición del anillo de células silenciadas alrededor de la zona agroinfiltrada. Este retraso sugiere que 16K previene, al menos parcialmente, el movimiento de la señal de silenciamiento desde la zona agroinfiltrada hasta las 10-15 células adyacentes. Este hecho coincide con la pérdida gradual de la actividad supresora de la 16K a tiempos tardíos post-agroinfiltración, cuando además los niveles de siRNAs derivados del mRNA diana (considerados como la señal de silenciamiento célula a célula) tienden a recuperarse.

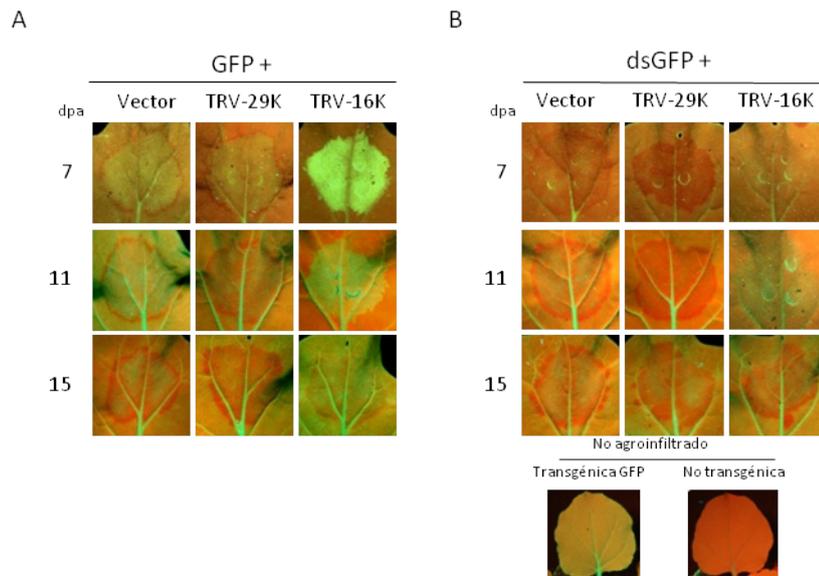


Figura 36: **Efecto de 16K sobre el movimiento a corta distancia de la señal de silenciamiento en el sistema de expresión transitoria.** Formación del halo rojo de tejido silenciado alrededor de la zona de infiltración en hojas de la línea GFP transgénica 16c. Las hojas se agroinocularon con los inductores de silenciamiento GFP (A) o dsGFP (B) en presencia o ausencia del supresor 16K. La construcción 29K y el vector vacío se emplearon como controles negativos de supresión. La aparición del anillo rojo es indicativa del silenciamiento del transgen estable GFP más allá de la zona de inducción. Las muestras se monitorizaron bajo luz UV a los 7, 11 y 15 dpa. En la parte inferior se muestran una hoja de la línea 16c y otra de planta silvestre, observadas bajo luz UV.

b) Efecto sobre el movimiento a larga distancia de la señal de silenciamiento

A continuación investigamos si el supresor 16K interfería con el movimiento a larga distancia de la señal de silenciamiento estudiando la propagación sistémica

Resultados

del silenciamiento del transgén GFP en la línea 16c de *N. benthamiana*. Como se describe en el apartado anterior, en esta línea es posible inducir el silenciamiento sistémico del transgén GFP a través de la expresión transitoria por agroinfiltración de una construcción inductora con homología de secuencia a la GFP (Voinnet and Baulcombe, 1997). Este efecto es consecuencia de la inducción local de silenciamiento y la consiguiente dispersión de la señal de silenciamiento a través del tejido vascular de la planta (Figura 37A). La dispersión de la señal de silenciamiento es dependiente de la acción amplificadora de RDR6 y requiere de la presencia de moléculas homólogas en los tejidos a los que viaja (Melnik *et al.*, 2011; Dunoyer, Schott, *et al.*, 2010; Voinnet, 2005; Kalantidis *et al.*, 2008). Para valorar el efecto de la proteína 16K sobre el establecimiento del silenciamiento sistémico se realizó un ensayo de inducción local de silenciamiento en plantas 16c usando dosis elevadas de la construcción inductora dsGFP ($DO_{600}=0,5$). Intentos previos en nuestro laboratorio usando un inductor más débil como ssGFP, o incluso dosis bajas de dsGFP, no habían conseguido la dispersión sistémica del silenciamiento lo cual sugería que este fenómeno fuese dependiente de la concentración del inductor. Como control positivo se empleó el supresor HCPro de TEV cuya actividad se relaciona con un retraso y/o inhibición en el movimiento sistémico de la señal de silenciamiento ($DO_{600}=0,5$) (Mallory *et al.*, 2001; Mallory *et al.*, 2003). Se infiltraron 20 plantas por cada caso. La aparición del silenciamiento sistémico se monitorizó desde los 3 a los 22 dpa mediante observación bajo luz UV de la fluorescencia en las hojas superiores no agroinfiltradas.

En ausencia de supresores (16K o HCPro) la agroinoculación de la repetición invertida dsGFP en las hojas basales implicaba la desaparición gradual de la fluorescencia en las hojas superiores no infiltradas. Así a 7 dpa las hojas superiores del 85% de las plantas transgénicas 16c agroinfiltradas con dsGFP y vector vacío presentaban silenciamiento sistémico del transgén GFP. Por el contrario, solo el 45% de las plantas agroinfiltradas con dsGFP en presencia de la 16K mostraban desaparición gradual de la fluorescencia en hojas superiores. El efecto fue mucho más drástico en el caso de HCPro donde ninguna de las plantas mostraba síntomas de silenciamiento (Figura 37B). Este resultado sugería que la proteína 16K previene, al menos parcialmente, el movimiento de la señal de silenciamiento a larga distancia a tiempos cortos tras la inducción del silenciamiento, aunque de forma menos eficiente que HCPro. Sin embargo a tiempos largos (30 dpa; dato no mostrado) el silenciamiento gradual del transgén se observó en todas las plantas a pesar de la presencia de los supresores, indicando que ambas proteínas virales eran capaces de retrasar aunque no de evitar el establecimiento del silenciamiento sistémico.

Resultados

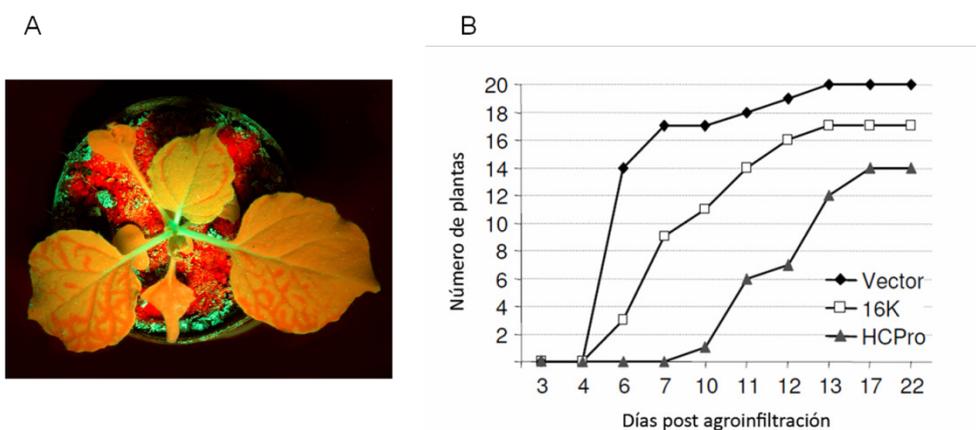


Figura 37: **Efecto de 16K sobre el movimiento a larga distancia de la señal de silenciamiento.** Propagación del silenciamiento sistémico del transgén GFP en plantas de la línea 16c de *N. benthamiana*. A) Observación de la fluorescencia asociada al transgén GFP bajo luz UV. El color rojo de la imagen es el resultado de la fluorescencia de la clorofila bajo la luz UV e indica silenciamiento de GFP. Obsérvese la dispersión del silenciamiento del transgen en la periferia de las venas en hojas superiores sin agroinyectar. B) Cinética de la dispersión sistémica de la señal de silenciamiento en presencia de supresores de silenciamiento. La gráfica muestra el número de plantas con fenotipo de silenciamiento sistémico en hojas superiores en cada tiempo de muestreo. En ambos casos, las hojas basales se agroinfiltraron con la construcción dsGFP como inductor local de silenciamiento en presencia de o ausencia del supresor 16K. La proteína HC-Pro se empleó como control positivo de supresión.

4.2.4 Caracterización molecular de la proteína 16K de TRV

La proteína 16K de TRV posee, en su región central y N-terminal, residuos ricos en cisteína que recuerdan a ciertos dominios en forma de dedos de zinc presentes en proteínas reguladoras (Figura 38A) (H., Liu *et al.*, 2002). Comparaciones de 16K con otras proteínas ricas en cisteína de los géneros virales

furovirus, hordeivirus y pecluvirus, identifican un patrón central Cys-Cys-Gly-X-X-His altamente conservado (Figura 38A) (Diao *et al.*, 1999). A la vista de estas observaciones nos planteamos investigar el rol que desempeñan esos residuos de cisteína tanto en la estabilidad de la proteína, como en la supresión del silenciamiento y en la unión a AGO4 determinada previamente por BiFC. Para ello, utilizamos mutagénesis dirigida y se generaron dos mutantes: i) un mutante de delección de 16K que carecía de los primeros 17 aminoácidos ricos en cisteína de la región N terminal, y ii) un doble mutante en el cual los residuos de cisteína de las posiciones 65 y 66 fueron reemplazados por fenilalanina (Figura 38A). Las construcciones mutantes resultantes 16K Δ 17 y 16KC65-66/P se fusionaron a sYFPN para crear las proteínas recombinantes sYFPN-16K Δ 17 y sYFPN-16KC65-66/P respectivamente. En primer lugar determinamos si las proteínas mutantes de fusión mantenían intacta su habilidad para bloquear el silenciamiento desencadenado por la expresión de un T-DNA. La actividad supresora de los mutantes se comparó con la construcción fusión del supresor nativo (sYFPN-16K) en ensayos de coinfiltración en *N. benthamiana* a 5 dpi. El análisis Northern Blot de las hojas agroinfiltradas reveló un incremento sutil de los transcritos de GFP en aquellas hojas agroinfiltradas con GFP y sYFPN-16K Δ 17 y sYFPN-16KC65-66/P comparado con las plantas control infiltradas con vector vacío, sugiriendo una inhibición parcial del silenciamiento de la GFP (Figura 38B). Sin embargo la magnitud de este silenciamiento, en ambos casos, estaba lejos del observado en plantas coinfiltradas con GFP y la construcción fusión del supresor nativo (sYFPN-16K) (Figura 38B). La fluorescencia a 5 dpi de las plantas coinfiltradas con GFP y sYFPN-16K Δ 17, sYFPN-16KC65-66/P y vector vacío bajo luz UV era además

Resultados

notablemente inferior a la observada en hojas coinfiltradas con GFP y sYFPN-16K (Figura 38C).

A continuación analizamos el efecto de estas mutaciones sobre la estabilidad de la proteína, comparando la acumulación de las proteínas mutantes con la de la proteína nativa 16K. Las construcciones mutantes fusionadas a sYFPN se agroinfiltraron a una DO_{600} de 0,1 ó 0,3 en hojas de *N. benthamiana*. Las proteínas se extrajeron a los 3 dpi y se analizaron por Western Blot usando un anticuerpo anti-NtGFP. Los análisis densitométricos de varias réplicas independientes revelaron que el mutante sYFPN-16KC65-66/P se acumulaba un 40-70% menos que el control sYFPN-16K (en la Figura 38D se muestra un blot representativo). Por su parte, la acumulación en ensayos de expresión transitoria del mutante de delección sYFPN-16K Δ 17 se redujo en la mayoría de los casos cerca del 40% en comparación con sYFPN-16K, detectándose sin embargo ocasionalmente, niveles de acumulación de proteína mutante similares al control (Figura 38E). Los bajos niveles de proteína detectados en nuestro ensayo pueden explicarse bien por una inestabilidad de la proteína causada por las mutaciones C65-66/P y 16K Δ 17 o bien ser consecuencia de la incapacidad de estos mutantes de suprimir localmente el silenciamiento desencadenado en la expresión transitoria de T-DNA. Al coinfiltrar las construcciones mutantes con el supresor activo P19, observamos que los niveles de sYFPN-16K Δ 17 se incrementaron notablemente, indicando con ello que la proteína es estable en ausencia de silenciamiento (Figura 38E). Este hecho sugiere que es su deficiente supresión del silenciamiento la que afecta negativamente a su propia producción traduciéndose todo ello en una disminución de la expresión de GFP. En contraposición, los niveles de sYFPN-

16KC65-66/P se mantienen bajos independientemente de la presencia de P19, apuntando a que la mutación impacta directamente en la acumulación de la proteína e indirectamente da como resultado un supresor del silenciamiento disfuncional. (Figura 38E).

A continuación repetimos los ensayos de BiFC utilizando las construcciones mutantes fusionadas a sYFPN y las construcciones sYFPC-AGO1 o AGO4 (Figura 38F). En ninguna de las múltiples réplicas analizadas fue posible visualizar fluorescencia derivada de YFP. Tampoco se observó autodimerización en ninguna de las construcciones mutantes de 16K fusionadas bien con sYFPN o con sYFPC (datos no mostrados). Dado que tanto la mutación C65-66/P como la 16K Δ 17 afectan a la acumulación de la proteína, no podemos discriminar inequívocamente si la ausencia de fluorescencia era debida a los bajos niveles de proteína en el tejido infiltrado o la incapacidad funcional de ambas proteínas para interactuar.

Además de los residuos ricos en cisteína, el supresor de TRV 16K posee un motivo sencillo glicina/triptófano (GW) en la posición 48 del extremo N terminal. Este tipo de repeticiones se han identificado en supresores del silenciamiento relacionados con la unión y reconocimiento de proteínas AGO (Azevedo *et al.*, 2010; Giner *et al.*, 2010; Karlowski *et al.*, 2010). Para determinar si este motivo estaba implicado en la actividad supresora de 16K, generamos una construcción de 16K con una mutación puntual en la que una alanina reemplazaba el residuo de triptófano. La nueva construcción (16KGW/GA) se analizó en un ensayo de expresión transitoria para valorar su capacidad de supresión del silenciamiento local de una construcción GFP. Los ensayos Northern blot revelaban altos niveles

Resultados

de expresión de mRNA de GFP en presencia de la proteína mutante 16K, comparables a los obtenidos en presencia de la P19 (Figura 38B). Del mismo modo, la fluorescencia en hojas infiltradas con GFP y el mutante 16K/GW/GA era comparable a la observada en hojas que co-expresaban la secuencia nativa de la 16K (Figura 38C). Estos resultados sugerían que el motivo GW predicho en 16K es irrelevante en la supresión del silenciamiento en ensayos de expresión transitoria (Figuras 38B y 38C).

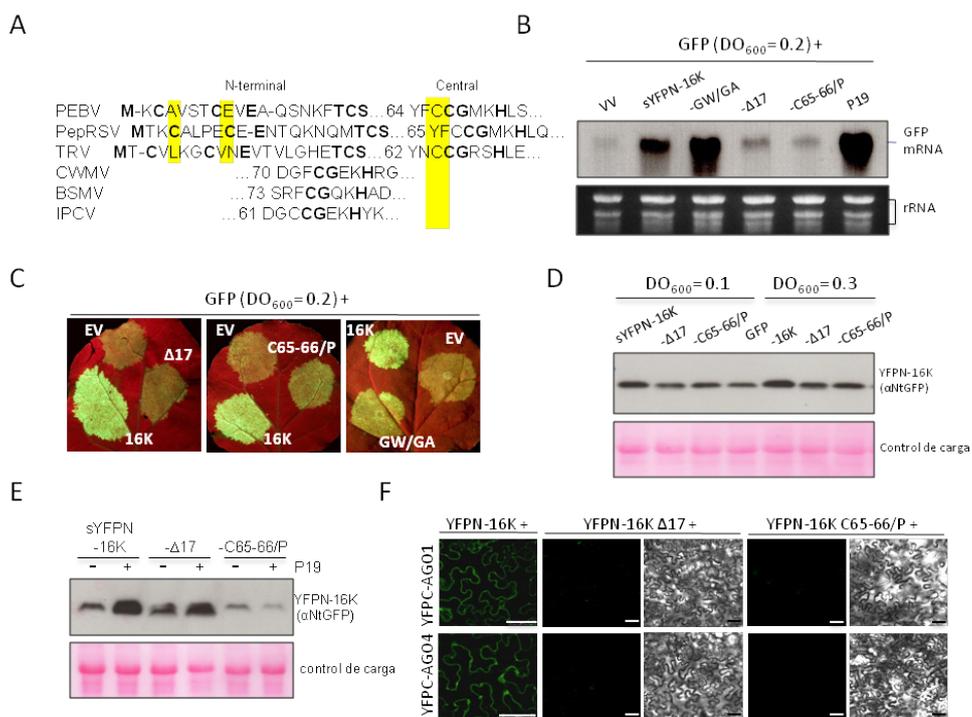


Figura 38: Efecto de los mutaciones en residuos conservados de cisteína en N terminal de 16K en su acumulación y en su actividad supresora. A) Alineamiento parcial de las secuencias aminoácidas de las proteínas ricas en cisteínas: proteínas 16K de Tobravirus (Virus del oscurecimiento temprano del guisante, PEBV); Virus de la mancha anular del

pimiento, PepRSV; TRV), proteínas 19K de Furovirus (Virus chino del mosaico del trigo, CWMV), Yb proteínas de Hordeovirus (Virus del mosaico estriado de la cebada, BSMV) y 3' terminal del gen RNA1 de Pecluvirus (Virus indio del macizo del cacahuate, IPCV). Los aminoácidos testados están señalados en amarillo y aquellos que son comunes a todas las secuencias están señalados en negrita. B) y C) Actividad supresora de las construcciones mutantes de 16K fusionadas a sYFPN en ensayos de expresión local transitoria. La construcción GFP fue coinfiltrada con vector vacío (EV) o las construcciones mutantes de 16K fusionadas con sYFPN que se indican. Los niveles de mRNA de GFP fueron determinados a 5 dpi mediante ensayos Northern blot utilizando una sonda marcada radioactivamente. Las coinfiltraciones con vector vacío y con P19 fueron utilizadas como control negativo y positivo respectivamente. La tinción del gel con EtBr se utilizó como control de carga (B) La fluorescencia de la GFP se detectó bajo luz UV a los 5 dpi (C). D) Acumulación a 3 dpi de las proteínas mutantes de 16K fusionadas a sYFPN mediante análisis Western blot utilizando un anticuerpo anti-NtGFP. La tinción con Red Ponceau se usó como control de carga. E) Acumulación de las proteínas mutantes de 16K fusionadas a sYFPN en presencia de vector vacío (-) o P19 (+). F) Ensayos de BiFC entre las proteínas mutantes de 16K fusionadas a sYFPN y las construcciones sYFPC-AGO1 o AGO4. En ningún caso se observó fluorescencia derivada de BiFC. Se muestran los controles positivos usando sYFPN-16K. Las barras representan 75µm (-16K) o 50µm (mutantes -16K).

4.3 EFECTO DE LA INFECCIÓN DE TRV EN *A. THALIANA* SOBRE EL METABOLISMO DE MIRNAS

Pese a la potencialidad observada en algunos de los miRNAs estudiados en esta tesis de reconocer y procesar dianas virales, el efecto global sobre la infección parece ser irrelevante en términos de susceptibilidad y acumulación viral en virtud de lo observado en mutantes *dcl1*. Por otra parte, la existencia de un supresor de silenciamiento en el genoma de TRV con capacidad para restringir, al menos parcialmente, la acumulación de siRNAs derivados de un transgen sugiere la posibilidad de potenciales interferencias con el metabolismo de miRNAs y su posible función antiviral. Esta interferencia ha sido documentada para otros

Resultados

supresores de origen viral, observándose alteraciones en la acumulación y/o actividad de miRNAs en plantas transgénicas que expresan de forma constitutiva algunos de estos supresores. Este fenómeno se traduce en anomalías del desarrollo similares a las descritas en plantas mutantes para las rutas de miRNAs (Chapman *et al.*, 2004; Chen, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004; Kasschau *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006). Por tanto, una vez identificado y caracterizado parcialmente el modo de acción de la proteína supresora 16K analizamos las posibles alteraciones provocadas por la infección por TRV sobre la biogénesis y actividad de los miRNAs.

4.3.1 Efecto sobre la acumulación y expresión de miRNAs

Para determinar si se producían cambios significativos en la biogénesis de los miRNAs en respuesta a TRV, analizamos tanto su patrón de expresión como su acumulación relativa en plantas de *A. thaliana* infectadas sistémicamente.

a) Efecto sobre la expresión de genes MIRNA

Para obtener un perfil a escala genómica del patrón de expresión diferencial de los transcritos precursores primarios pri-miRNAs en plantas infectadas con TRV se realizó un análisis transcriptómico de diferentes tejidos (hojas, raíces, inflorescencias) empleando un “microarray” de *A. thaliana* de la plataforma CATMA (www.catma.org). Este “microarray” contiene 24576 secuencias específicas de reconocimiento (Gene sequences tags, GSTs) incluyendo GSTs correspondientes a genes MIRNA. En concreto, el “microarray” contenía las

secuencias de 94 pri-miRNAs validados hasta el momento que representaban en ese momento el 54,32% de los miRNAs presentes en la base de datos del ASRP. Además contenía 372 secuencias correspondientes a regiones con elevada probabilidad de generar pri-miRNAs pero cuya síntesis, no había sido comprobada aún y a los cuales denominamos hipotéticos pri-miRNAs. Para reducir lo máximo posible el efecto derivado de la variabilidad entre muestras se realizaron 3 réplicas biológicas para cada uno de los 3 tejidos analizados. Como controles se emplearon plantas de *Arabidopsis* inoculadas con extracto de hojas sanas de *N. benthamiana*. Cada réplica contenía material vegetal de al menos 20 plantas infectadas sistémicamente. Las muestras de hojas y raíces se recolectaron a los 8 dpi mientras que las inflorescencias se recogieron a los 13 dpi. La infección se comprobó independientemente en cada una de las muestras mediante hibridación dot-blot y RT-PCR de modo que las muestras que no estaban infectadas o que mostraban señales débiles de acumulación viral fueron descartadas del análisis. De este modo teníamos la certeza que todas las plantas usadas en el ensayo estaban infectadas y acumulaban cantidades equiparables de virus. También se comprobó que las plantas control estaban libres de virus. Para el estudio únicamente se consideraron como significativos aquellos spots en que el "Familywise error rate" (FWER) de la media de las 3 réplicas era menor del 5% ($p\text{-valor} \leq 0,01$). Los resultados obtenidos están disponibles en la plataforma GenBank/EMBL en las accesiones GSE15556/15557/15558. El análisis bioinformático de los datos mostraba que ninguno de los transcritos pri-miRNAs validados presentes en el "microarray" CATMA presentaba variaciones significativas cuando se comparaban las muestras infectadas con las muestras

Resultados

control en los 3 tejidos estudiados. Tan solo se encontró un hipotético pri-miRNA inducido en plantas infectadas con respecto a las plantas control en los tres tejidos. Para descartar la posibilidad de que algunos de los GSTs del “microarray” no asignados como genes *MIRNA* representaran auténticos precursores primarios de miRNAs, comparamos las secuencias genómicas de todos los miRNAs descritos hasta entonces en la base ASRP (tanto miRNAs presentes en el experimento como para el resto de miRNAs que no estaban representados en el “microarray” de CATMA) con los GSTs del microarray. El resultado de este análisis no reveló nuevos precursores primarios. En conclusión, a pesar del hecho de que el “microarray” CATMA empleado en este estudio contenía solamente el 54,32% de los miRNA conocidos hasta el momento en *A. thaliana*, nuestros datos parecían indicar que la infección por TRV en esta especie no alteraba significativamente la expresión global de los genes *MIRNA*.

b) Efecto sobre la acumulación de miRNAs maduros

Para inferir el efecto de la infección viral sobre la acumulación de miRNAs maduros realizamos ensayos Northern blot usando RNA de bajo peso molecular purificado a los 14 dpi a partir de inflorescencias y hojas de *A. thaliana* infectadas sistémicamente con TRV. Para minimizar la variación intermuestral se analizaron dos muestras independientes empleando sondas específicas para cada miRNA. Como control se utilizaron plantas inoculadas con tampón. La infección en las muestras analizadas se comprobó por RT-PCR con cebadores específicos de TRV a partir del RNA total antes de ser fraccionado (apartado 3.10.3). Como era de

esperar, cuando las membranas se hibridaron con una sonda radioactiva específica de TRV los siRNAs de 21 a 24 nts derivados del virus se acumulaban en las muestras infectadas, pero no en las muestras control (Figura 39). El análisis densitométrico de las bandas de hibridación obtenidas para cada miRNA indicaban que la mayoría de los miRNAs analizados se acumulaban a niveles semejantes en las plantas TRV y control, teniendo en cuenta una ligera variabilidad intermuestral. En hojas de roseta, miR171 y miR403 se acumulaban en tejido infectado un 30% y un 20% menos, respectivamente, que en muestras control no inoculadas. Del mismo modo, la acumulación de miR169 en inflorescencias infectadas era aproximadamente un 40% inferior al de inflorescencia control, mientras que el miR398 era entre un 30 y un 80% más abundante en inflorescencia en presencia de TRV (Figura 39). Estos resultados son reproducibles en las dos réplicas analizadas y podrían ser diagnósticas de un efecto dirigido de TRV sobre estas dos especies de miRNAs. No está claro sin embargo que estas diferencias en la acumulación de especies concretas sean relevantes desde el punto de vista biológico. En otras ocasiones, algunos de los miRNAs investigados presentaban perfiles de acumulación alterados en solo una de las dos muestras analizadas. Es el caso de miR172 y miR162 que mostraban niveles reducidos en una de las dos muestras infectadas y que probablemente representen la variabilidad intermuestral inherente al experimento. En todos los casos, pese a observar diferencias de acumulación en estos miRNAs maduros, el estudio de expresión de los genes *MIRNA* indicaba que sus pri-miRNAs se acumulaban a niveles comparables de modo que la presencia de TRV podría modular el patrón de acumulación de las especies maduras pero no la expresión

Resultados

de sus genes. Nuestros datos sugieren por tanto que la infección por TRV no provoca cambios globales en la acumulación de miRNAs como se ha observado en otros sistemas virales (Chapman *et al.*, 2004; Chen, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004; Kasschau *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006). No obstante, aunque las variaciones observadas puedan reflejar una variación natural entre muestras independientes más que respuestas específicas a la infección viral, nuestros datos apuntan la posibilidad de que la infección por TRV altere específicamente la maduración y acumulación de ciertas especies de miRNAs a partir de sus precursores primarios.

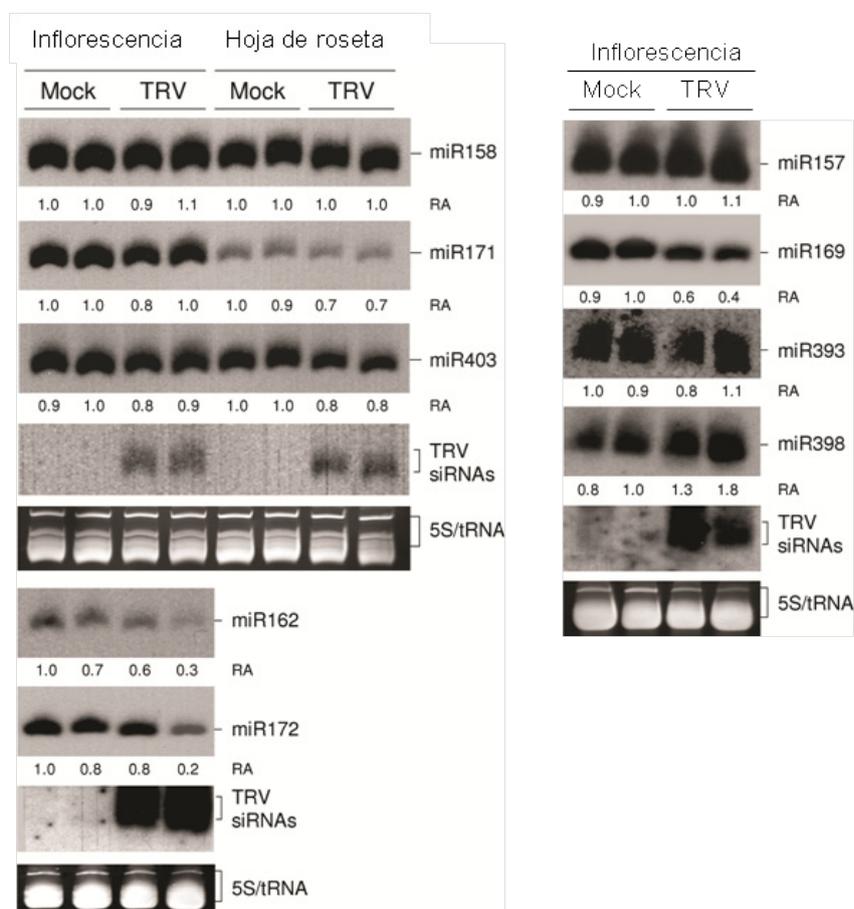


Figura 39: Efecto de la infección por TRV sobre la acumulación de miRNAs maduros. Acumulación de miRNAs en inflorescencias y hojas de roseta infectadas sistémicamente con TRV. Las muestras se recolectaron por duplicado y se analizaron por Northern blot a los 14 dpi empleando como sondas oligonucleótidos de DNA marcados con ^{32}P -dCTPy complementarias a cada secuencia de miRNA. Los niveles de acumulación (RA) de cada miRNAs en cada muestra se obtuvieron por análisis densitométrico de las bandas de hibridación que se relativizaron respecto a la muestra control no infectada con menor acumulación. A esta muestra se le asignó el valor 1. La tinción de los geles con EtBr se utilizó como control de carga. La presencia del virus en las muestras analizadas se comprobó por RT-PCR y por hibridación con sondas frente a TRV1.

Resultados

4.3.2 Efecto sobre el procesamiento de mRNAs diana

Aunque TRV no parece provocar alteraciones globales en la expresión y acumulación de miRNAs, no podemos descartar que interfiera con su actividad reguladora. Para comprobar esta posibilidad analizamos el efecto de la infección sobre el procesamiento de sus mRNAs diana.

a) *Análisis del procesamiento de SCL6-IV por miR171 en plantas infectadas*

El miR171, cuya acumulación parece estar levemente disminuida durante la infección por TRV (Figura 39), regula negativamente la expresión del gen *Scarecrow-like 6 (SCL6-IV, At2g45160)* en *A. thaliana* (Llave, Xie, *et al.*, 2002). Este miR171 guía el corte endonucleolítico del mRNA de SCL6-IV de modo que la coexpresión por agroinfiltración en *N. benthamiana* de construcciones SCL6-IV y miR171 bajo el promotor 35S se traduce en una baja acumulación de la forma madura del mRNA de SCL6-IV que contrasta con una mayor acumulación en el tejido infiltrado de la forma procesada del mRNA (Llave, Xie, *et al.*, 2002). Cuando estas construcciones se coexpresan en presencia de un supresor de silenciamiento que interfiere con la actividad de los miRNAs (por ejemplo, HCPPro) se recuperan los niveles de expresión del mRNA maduro y se reduce notablemente la acumulación de la forma procesada aún en presencia de cantidades crecientes de miRNA en el tejido analizado (Kasschau *et al.*, 2003). Para comprobar si la infección por TRV alteraba significativamente el patrón de corte del mRNA de

SCL6-IV, las construcciones SCL6-IV y miR171 se agroinfiltraron en hojas de *N. benthamiana* conjuntamente con el clon infeccioso de TRV. Los resultados obtenidos mostraron como la expresión de SCL6-IV en ausencia del miR171 resultaba en la acumulación mayoritaria de la forma madura de su mRNA, tanto en tejido control no inoculado como en hojas infectadas por TRV (Figura 40). No obstante, en ambos casos fue posible detectar tenues señales de hibridación que correspondían con formas procesadas resultantes de la actividad del miR171 endógeno de *N. benthamiana* (Figura 40). La coexpresión de SCL6-IV y miR171 dio lugar a niveles bajos de la forma madura, y elevados de la forma procesada, independientemente de la presencia del virus en el tejido agroinfiltrado. El miR171 exógeno se acumulaba a niveles comparables en hojas no inoculadas y en hojas infectadas. Idénticos resultados se obtuvieron cuando las construcciones SCL6-IV y miR171 se agroinfiltraron en presencia del supresor 16K (Figura 40). Por tanto puesto que no parecen existir diferencias en el ratio de acumulación de la forma procesada y sin procesar del mRNA del gen SCL6-IV en los dos tratamientos, podemos concluir que el procesamiento de SCL6-IV no estaba impedido ni en presencia del virus ni en presencia del supresor 16K codificado por TRV.

Resultados

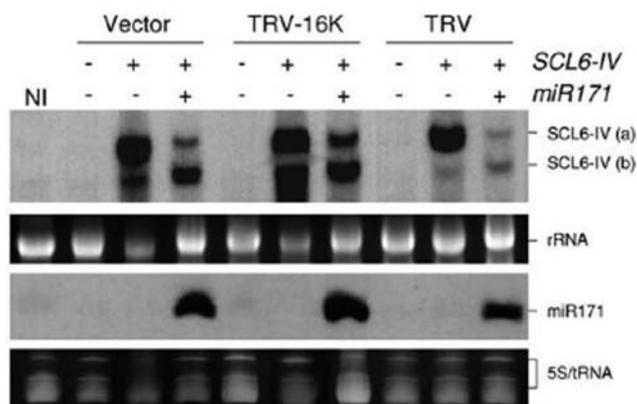


Figura 40: **Efecto de 16K sobre el procesamiento de SCL6-IV por miR171 en el sistema de expresión transitoria.** En el panel superior se muestra la acumulación del mRNA de SCL6-IV (SCL6-IVa) y de su producto de corte (SCL6-IVb) en hojas de *N. benthamiana* coinfiltradas con o sin miR171 y en presencia o ausencia de 16K o del clon infeccioso TRV. Las hojas se agroinfiltraron con distintas combinaciones de las construcciones referidas tal como se indica en la figura. Como control negativo se empleó una planta no agroinfiltrada (NI). En el panel inferior se muestra la acumulación del miR171 en cada una de los casos estudiados. Las muestras se analizaron por Northern blot empleando sondas DNA radiactivas correspondientes a la región 3' de la secuencia de SCL6-IV o a la secuencia complementaria al miR171. La tinción de los gels con EtBr se utilizó como control de carga.

Para confirmar este resultado se analizaron por Northern blot los niveles endógenos del mRNA de SCL6-IV y del miR171 en hojas e inflorescencias de plantas de *A. thaliana* infectadas por TRV o inoculadas con tampón. Se realizaron dos réplicas independientes para cada tratamiento para minimizar la variación intermuestral. Las muestras de RNA se obtuvieron a los 14 dpi, momento en el que habíamos determinado que la acumulación del virus era mayor. En ninguno de los dos tejidos analizados se apreciaron diferencias en la acumulación del miR171 ni de las formas maduras y procesadas del mRNA de SCL6-IV que pudieran

sugerir alteraciones en su procesamiento entre las plantas infectadas y las plantas control inoculadas con tampón (Figura 41). Este resultado nos permitía al menos descartar un efecto generalizado de TRV sobre la actividad reguladora de los miRNAs, si bien, no descarta la inhibición de la función de miRNAs concretos.

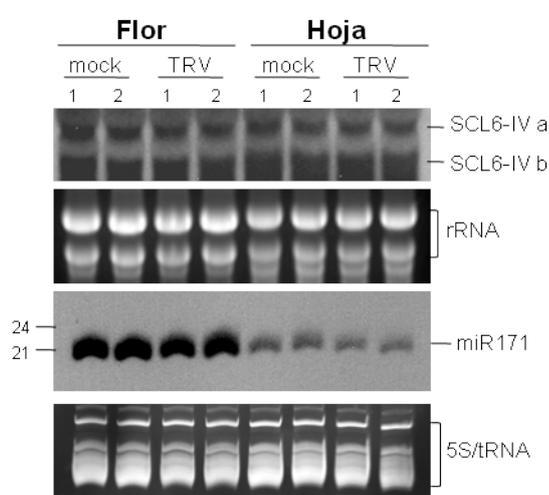


Figura 41: Efecto de la infección por TRV sobre el procesamiento del SCL6-IV endógeno en *A. thaliana*. En el panel superior se muestra la acumulación del mRNA de SCL6-IV (SCL6-IVa) y de su producto de corte (SCL6-IVb) en hojas e inflorescencias de *Arabidopsis* de plantas control, inoculadas con tampón y de plantas infectadas con TRV. En el panel inferior se presenta la acumulación del miR171 en cada una de las muestras. Dos réplicas independientes se analizaron por Northern blot con sondas de DNA complementarias a la región 3' de la secuencia de SCL6-IV o a la secuencia del miR171. La tinción de los geles con EtBr se utilizó como control de carga. 21 y 24 nts indican la posición de los marcadores de peso molecular.

Resultados

b) Análisis del procesamiento de dianas de miRNAs en plantas infectadas con TRV

Para comprobar si la infección viral pudiera alterar el patrón o sitio de corte guiado por el miRNA sobre su secuencia diana utilizamos la técnica 5' RACE que nos permite posicionar sitios de procesamiento por miRNAs en mRNAs diana en plantas (Mallory *et al.*, 2004; Sunkar *et al.*, 2005; Mallory *et al.*, 2005). Puesto que el mensajero cortado por el complejo enzimático RISC presenta un fosfato en 5' es posible su ligación a un adaptador de RNA con la ayuda de la T4 RNA ligasa (Kasschau *et al.*, 2003; Llave, Xie, *et al.*, 2002). El producto ligado se puede así amplificar por transcripción inversa y PCR con ayuda de unos cebadores complementarios al adaptador 5' y a la secuencia a amplificar. De este modo, se analizó la presencia y/o ausencia de los productos de procesamiento de los genes dianas *ARF10* (At2g28350) y *SCL6-IV* (At4g00150), cuya regulación implica la actividad de miR160 y miR171, respectivamente. El ensayo se realizó en planta infectada por TRV y en planta control inoculada con tampón, tanto en inflorescencias como en hojas de roseta a los 14 dpi. Como control negativo se utilizó el gen *CLAVATA (CLV)* que no es diana de ningún miRNA. La secuencia de los adaptadores y de los oligonucleótidos utilizados se detalla en material y métodos 4.8. Como era de esperar no se observó ningún producto de amplificación que sugiriese la existencia de productos de procesamiento del mRNA del gen *CLV*. Por el contrario sí fue posible detectar en roseta y en inflorescencias productos de amplificación de un tamaño coherente con el esperado para los productos de procesamiento de los genes *SCL6-IV* y *ARF10*

tanto en plantas control como en plantas infectadas sistémicamente por TRV (Figura 42). Estos datos sustentan la idea de que la infección por TRV no altera globalmente la actividad nucleolítica de los complejos de silenciamiento guiados por miRNAs.

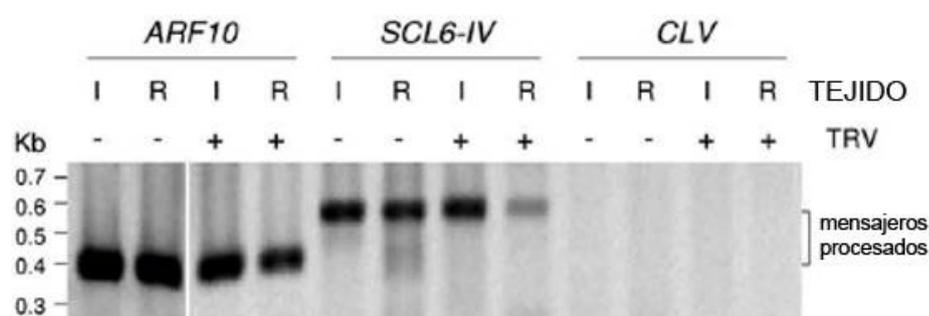


Figura 42: **Análisis del procesamiento de mRNAs diana en plantas infectadas con TRV.** Identificación por 5'-RACE de los productos de corte por miRNAs de los genes diana ARF10 y SCL6-IV en Inflorescencias (I) y hojas de roseta (R) de Arabidopsis de plantas control inoculadas con tampón (-) y de plantas infectadas con TRV (+). El gen *CLAVATA* (*CLV*) se empleó como control negativo de procesamiento. Los marcadores de peso molecular de DNA se muestran a la izquierda de la figura.

c) *Análisis de los niveles de mRNAs dianas de miRNAs en plantas infectadas*

La interferencia con el metabolismo de miRNAs resulta frecuentemente en la expresión ectópica de genes que deberían estar regulados negativamente por la actividad de los miRNAs (Feng *et al.*, 2012; Chapman *et al.*, 2004; Kasschau *et al.*,

Resultados

2003; Dunoyer *et al.*, 2004; Vaucheret, 2006; Stav *et al.*, 2010). Así por ejemplo, la expresión constitutiva del supresor HCPPro en plantas de *A. thaliana* resulta en la sobreacumulación de mRNAs de genes diana debido a que dicho supresor interfiere con la actividad de los miRNAs que los regulan (Kasschau *et al.*, 2003). Para valorar el impacto global de la infección por TRV en la expresión de genes diana de miRNAs comparamos por RT-PCR cuantitativa los niveles de algunos mRNAs sensibles a la actividad de miRNAs en plantas infectadas por TRV y en plantas control inoculadas con tampón. La presencia del virus en el tejido infectado se confirmó por RT-PCR convencional usando cebadores específicos que se describen en material y métodos. Para llevar a cabo este análisis se seleccionaron los mRNAs de los genes *SCL6-IV*, *HAP2A* y *CSD2*, regulados respectivamente por miR171, miR169 y miR398. Estos mensajeros se escogieron por ser dianas de miRNAs cuyos perfiles de acumulación presentaban variaciones en planta infectada por TRV respecto a las plantas control. Para cada mRNA diana se diseñaron parejas de cebadores que amplificaban regiones cercanas al extremo 5' de la secuencia codificante de modo que fuera posible estimar la abundancia relativa de los mRNAs de longitud total y evitar la amplificación de la región 3' que se mantiene estable tras el procesamiento por el miRNA. Se incluyó en el análisis el mRNA del gen *hisH4* como control, al no ser susceptible de ser afectado por la actividad de miRNAs. Como se observa en la figura 43, los mRNAs analizados presentaron niveles equivalentes en planta infectada por TRV o inoculada con tampón (p -valor $<0,05$) a excepción de *CSD2* cuyos niveles fueron ligera, aunque significativamente, mayores en planta infectada (p -valor $<0,01$). Estas diferencias se corresponden únicamente con 0,27 ciclos de qRT-PCR y coinciden con el

aumento moderado en la acumulación del miR398 en plantas infectadas. No obstante, aunque el mensajero *CSD2* sí presenta unos niveles de acumulación ligeramente mayores en tejido infectado por TRV, estudios transcriptómicos realizados en nuestro laboratorio indican que no existían diferencias en la expresión de este gen en plantas infectadas por TRV con respecto a plantas control inoculadas con tampón (p -valor $<0,05$). Los niveles de acumulación de los mRNAs de *SCL6-IV* y *HAP2A* no variaban significativamente como resultado de la infección por TRV. En conjunto, nuestros datos sugerían que la infección por TRV no llevaba asociada una desregulación generalizada en el metabolismo de miRNAs que derive en la expresión descontrolada de sus genes diana.

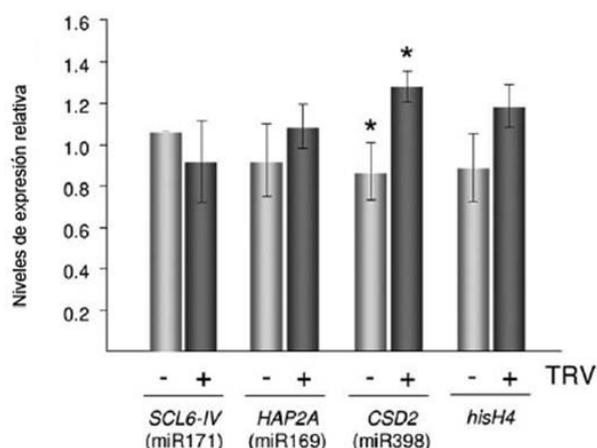


Figura 43: **Efecto de la infección por TRV en la expresión de genes diana de miRNAs en *Arabidopsis*.** Acumulación relativa de mRNAs medida por qRT-PCR de los genes diana de miRNAs *SCL6-IV*, *HAP2A* y *CSD2* en plantas control inoculadas con tampón (-) y en plantas infectadas con TRV (+). Los niveles de expresión se normalizaron respecto a los genes *CBP20* y β -tubulina y se calcularon según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Biorad IQ5 software Standard edition versión 2.0). El asterisco denota diferencias significativas entre las muestras ($P < 0,01$). *hisH4* no es una diana de miRNA y se utilizó como control negativo del experimento.

Resultados

En conclusión, tanto los datos relativos a la acumulación y expresión de miRNAs como los relativos al procesamiento y acumulación de sus dianas sugieren que la infección sistémica de TRV no provoca cambios globales en las rutas controladas por miRNAs. Estos datos son consistentes con el hecho de que las plantas de *A. thaliana* infectadas por TRV no muestran anomalías del desarrollo (Figura 44) como las que se observan en mutantes de pérdida de función *dcl1* o *ago1* o en aquellas transgénicas que sobreexpresan supresores del silenciamiento que interfieren con estas rutas y que responden al desequilibrio en la expresión de genes controlados por miRNAs (Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004; Kasschau *et al.*, 2003). Datos de nuestro laboratorio corroboran estas observaciones constatando que no existen diferencias fenotípicas significativas entre plantas infectadas sistémicamente por TRV y plantas sanas (Fernández-Calvino *et al.*, 2015)

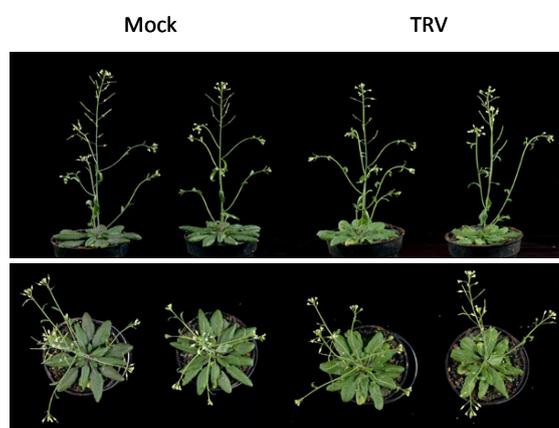


Figura 44: **Plantas de *A. thaliana* infectadas sistémicamente con TRV.** Vista frontal y cenital de plantas de *A. thaliana* control inoculadas con tampón e infectadas por TRV. En ningún caso se aprecian diferencias fenotípicas en tejidos vegetativos y reproductores asociadas a la presencia del virus.

Con este trabajo hemos pretendido abordar el modo en que los virus interactúan con el silenciamiento génico en el contexto de una infección compatible. Empleando el TRV como sistema viral y *N. benthamiana* y *Arabidopsis* como modelos de huésped hemos indagado en el potencial de los sRNAs endógenos para guiar procesos de silenciamiento sobre secuencias virales. Nuestros resultados sugieren la posibilidad de interacciones funcionales entre miRNAs y secuencias complementarias en el genoma del virus, si bien su relevancia como mecanismo de control de la proliferación viral no se ha estudiado en este trabajo. La manera en que TRV interactúa con la ruta de silenciamiento está condicionada por el efecto supresor de la proteína 16K. Esta proteína impide, al menos parcialmente, el ensamblaje de los complejos efectores de silenciamiento y puede por tanto comprometer el efecto del silenciamiento antiviral dependiente de sRNAs tanto virales como endógenos. El efecto supresor de TRV no parece perturbar globalmente el contenido, composición y actividad de los miRNAs, si bien no es descartable que induzca alteraciones en el metabolismo de especies concretas.

El pequeño tamaño y la enorme diversidad de secuencia de los sRNAs endógenos invitan a pensar que estas moléculas pudieran reconocer secuencias complementarias de origen viral e interactuar con ellas. Sin embargo, en el momento en que este trabajo se puso en marcha se desconocían en gran medida los requerimientos estructurales y termodinámicos para una interacción funcional entre los sRNAs y sus dianas, lo que dificultaba la identificación de dianas virales. El estudio de pares miRNAs-mRNAs validados experimentalmente nos permitió establecer unos criterios de apareamiento mínimo que se emplearon para la

Discusión

búsqueda de posibles dianas de miRNAs en el genoma de los virus de RNA. Como resultado pudimos identificar algunas secuencias virales parcialmente complementarias con miRNAs de la planta. No obstante, la mayoría de ellas contenía un número de desapareamientos que podían hacer cuestionar su idoneidad como potenciales secuencias diana. Este resultado probablemente esté influenciado por el reducido número de secuencias de miRNAs y sRNAs en general disponibles en las bases de datos y empleados en nuestro análisis. No podemos desechar sin embargo que la falta de complementariedad refleje una presión de selección positiva sobre los virus para modificar secuencias susceptibles de reconocimiento por miRNAs u otros sRNAs conservados y evitar así su degradación por la maquinaria de silenciamiento de la planta. Para investigar la capacidad de los miRNAs seleccionados de regular secuencias virales complementarias, desarrollamos un sistema sensor basado en la expresión transitoria de construcciones GFP portadoras de la secuencia diana de estudio. Este sistema nos ha permitido validar la unión funcional de miR172 y miR399 con secuencias parcialmente complementarias en los genomas de MCDV y TRV, respectivamente. Así la co-expresión de sensores con miRNAs homólogos, pero no heterólogos, provocaba una disminución de fluorescencia y de transcritos del sensor GFP en las hojas infiltradas. Por tanto, nuestros resultados sugieren que los sRNAs del huésped alberguen el potencial de regular genomas virales (Lin *et al.*, 2009; Llave, 2004; Niu *et al.*, 2006; Simón-Mateo and García, 2006).

Es importante mencionar que los dúplex estudiados presentan un grado de complementariedad parcial que pudiera comprometer el efecto del silenciamiento. Por ejemplo, el par miR172 y GFP-MCDV presenta dos

desapareamientos en posición central. Esta posición se incluye en la denominada región semilla, que comprende los nucleótidos 1 a 11 del miRNA (desde el extremo 5') y que tradicionalmente se ha considerado crítica para que el corte endonucleolítico mediado por AGO1 tenga lugar. Sin embargo, nuestros resultados indican que la complementariedad en la zona central de la región semilla no es estrictamente necesaria para promover la degradación del mRNA diana, al menos en nuestras condiciones experimentales. Es probable que otros factores distintos a la complementariedad de secuencia puedan contribuir al éxito del silenciamiento. Esta idea se ha sugerido recientemente en un trabajo del grupo de (Li *et al.*, 2014) en el cual se demuestra que un apareamiento perfecto en la zona central de complementariedad no es necesario para que el silenciamiento del mRNA diana sea efectivo. Estos autores proponen que la relación estequiométrica entre el miRNA y su mRNA diana así como el contexto en el que reside la secuencia de unión en el mRNA son factores determinantes en el grado de silenciamiento (Li *et al.*, 2014; Todesco *et al.*, 2010). En el caso del miR399, su sitio de reconocimiento en el RNA de TRV contiene un desapareamiento en la región semilla así como un desapareamiento y tres enlaces G:U en el extremo 3' del miRNA. Aunque este grado de desapareamiento se ha descrito en algunas interacciones validadas entre miRNAs y mRNAs endógenos de la planta (Brodersen Voinnet, O., 2006; Palatnik *et al.*, 2003; Schwab *et al.*, 2005), la interacción es también imperfecta de modo que su funcionalidad podría estar sujeta a condicionantes externos. Es importante tener en cuenta que en los ensayos de expresión transitoria, la transcripción de miRNAs está dirigida por el promotor constitutivo 35S que en plantas dicotiledóneas provoca niveles elevados

Discusión

de expresión génica. En nuestros ensayos por tanto es de esperar que el miR172 y el miR399 se acumulen a niveles elevados en la zona infiltrada favoreciendo el reconocimiento de sus secuencias diana en condiciones subóptimas de complementariedad (Li *et al.*, 2014; Todesco *et al.*, 2010). Por otra parte la eficiencia del miR399 para dirigir silenciamiento podría estar condicionada por el número de secuencias de reconocimiento y su ubicación a lo largo de su mRNA diana. El miR399, cuya expresión se activa en condiciones de ayuno de fosfato, interacciona con al menos 5 secuencias complementarias situadas en la región 5' no traducible del gen *PHO* (At2g33770), que codifica un enzima conjugadora de ubiquitina E2 (Ubiquitin-conjugatin E2). En nuestro sistema sensor, miR399 reconoce un sitio único de unión lo que podría explicar el efecto parcial de silenciamiento sobre el mRNA del sensor.

La existencia de un supresor de silenciamiento en el genoma de TRV resulta esencial para entender cómo el virus interacciona con las rutas de silenciamiento durante la infección. En esta tesis hemos estudiado la función supresora de la proteína 16K, que en el momento de iniciar nuestro trabajo se había propuesto como supresor de silenciamiento en ensayos *in vitro* usando cultivos celulares de *D. melanogaster*. Mediante análisis de su modo de acción, hemos determinado que 16K es capaz de suprimir la iniciación del silenciamiento promovido por ssRNA o dsRNA en ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana*. Esta habilidad sin embargo se ve comprometida en presencia de concentraciones elevadas de dsRNA inductor. Así, 16K mostraba una actividad supresora óptima a dosis de cultivo portador de dsRNA de hasta $DO_{600} = 0,01$ mientras que la actividad era residual a concentraciones altas de cultivo dsRNA

($DO_{600} = 0,1$ y $0,05$). No obstante, la inducción del silenciamiento de la GFP a dosis de dsRNA equivalente a una DO_{600} de cultivo de $0,01$ era incompleta, como lo sugiere la observación de fluorescencia al microscopio confocal y la acumulación de GFP mRNA en el tejido infiltrado. Por tanto, 16K parece actuar en el límite de la inducción del silenciamiento. Esto sugiere que la 16K se comporta como un supresor débil en este sistema experimental, al contrario de lo observado para la proteína HC-Pro que es capaz de bloquear la degradación de GFP con concentraciones de inductor de dsRNA de $DO_{600} = 0,1$. En resumen, 16K es capaz de suprimir el silenciamiento por RNA en presencia de niveles bajos del inductor de dsRNA, mientras que a niveles altos de dsRNA su capacidad supresora se ve superada.

También hemos determinado que 16K es capaz de reducir la acumulación de siRNAs derivados del silenciamiento en el tejido inyectado. A bajos niveles de dsRNA inductor la proteína 16K provocaba una disminución de hasta el 90% en la acumulación de siRNAs derivados del silenciamiento del transgen GFP en hojas infiltradas, mientras que la reducción de los niveles de siRNA se hizo menos evidente a medida que aumentaba la concentración de inductor. Puesto que 16K es capaz de prevenir la acumulación de siRNAs a partir de dsRNA en hoja agroinfiltrada, la disminución de siRNAs en presencia de 16K parece deberse al efecto de la proteína viral sobre la acumulación de siRNAs y no a un posible efecto sobre la formación y/o accesibilidad de los sustratos de dsRNA.

Nuestros experimentos en plantas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan GFP de forma constitutiva demuestran que 16K es capaz de inhibir, al menos en parte, el movimiento a corta y a larga distancia de la señal del

Discusión

silenciamiento. Curiosamente 16K bloquea parcialmente la difusión del silenciamiento del transgén GFP iniciado por concentraciones de dsRNA de $DO_{600} = 0,5$, concentraciones sobre las que no había mostrado actividad supresora en los ensayos de expresión transitoria por agroinfiltración. Este hecho sugiere que 16K puede actuar sobre elementos en la cascada de señalización que no participan en la iniciación y el mantenimiento del silenciamiento. Podrían existir por tanto diferentes escenarios posibles y no excluyentes para explicar la interferencia de la 16K en la ruta de señalización: i) 16K puede restringir la formación de la señal móvil, dando como resultado una acumulación limitada de las moléculas señal en el área infiltrada. Esta idea está de acuerdo con el hecho de que los siRNAs de 21 nts sean componentes de la señal de silenciamiento en el movimiento célula a célula (Dunoyer and Voinnet, 2005; Himber *et al.*, 2003). En nuestros ensayos hemos encontrado sin embargo pequeñas cantidades de siRNAs derivados de GFP en los tejidos infiltrados que expresan 16K lo que parece indicar que es necesario que la señal de siRNA supere un umbral para que se inicie de forma eficiente el movimiento célula a célula. ii) 16K puede también prevenir de forma específica el movimiento a corta y a larga distancia interfiriendo la señal al unirse a los complejos funcionales encargados del movimiento del silenciamiento o bloqueando la propagación de la señal a través de los plasmodesmos y del floema. iii) 16K puede interferir con la formación o actividad de otros componentes esenciales celulares y factores accesorios de las rutas del silenciamiento mediado por RNA requeridos en el movimiento de la señal. Una consideración importante en nuestro sistema experimental es que el efecto supresor de 16K sobre el movimiento célula a célula y en la dispersión sistémica del silenciamiento se

desvanece con el tiempo (por ejemplo a 15 dpi), cuando la capacidad de 16K para suprimir el silenciamiento local está ya mermada. Una posible explicación es que la formación y/o dispersión de la señal de silenciamiento ocurra de forma eficiente una vez que el efector supresor en el tejido infiltrado desaparece.

El sistema de expresión transitoria empleado en esta tesis para analizar interacciones funcionales entre miRNAs y secuencias diana proporciona un excelente oportunidad para inferir el efecto de la proteína 16K sobre el ensamblaje de los complejos efectores mediados por AGO. Un trabajo reciente de nuestro grupo ha demostrado que 16K es incapaz de bloquear la actividad de complejos de silenciamiento pre-ensamblados en el procesamiento de mRNAs sensores diana (Fernandez-Calvino *et al*, *in press*). Por el contrario, 16K fue capaz de inhibir eficientemente el corte endonucleolítico de los sensores GFP analizados cuando el miRNA y el sensor se administraban simultáneamente en el tejido de la planta. Este hecho sugiere que 16K debe actuar presumiblemente impidiendo el ensamblado inicial de los complejos efectores.

Algunos supresores virales de silenciamiento que actúan bloqueando la activación de los complejos RISC (P19, P21 y HC-Pro) secuestran específicamente sRNAs para así prevenir su asociación con las enzimas AGO (Burguán and Havelda, 2011; Garcia-Ruiz *et al.*, 2015; Lakatos *et al.*, 2006; Schott *et al.*, 2012). Por el contrario, la base de la inhibición en la formación de complejos RISC por 16K no parece relacionarse con la retención de sRNAs puesto que de acuerdo a nuestros resultados 16K es incapaz de unir sRNAs. No obstante es posible que su capacidad para reducir la disponibilidad de siRNAs derivados del silenciamiento pueda

Discusión

afectar, al menos parcialmente, al ensamblado de estos complejos (Ghazala *et al.*, 2008).

Tal como se ha descrito para otros supresores, 16K podría dificultar el ensamblado de los complejos efectores asociándose con las proteínas AGO. Nuestros ensayos de BiFC sugieren una interacción potencial con AGO1 que sin embargo no pudo validarse en ensayos de inmunoprecipitación a partir de construcciones expresadas mediante agroinfiltración. Nuestros resultados negativos podrían estar influenciados por el sistema experimental empleado y por tanto no descartan por completo que esta interacción pueda tener lugar en condiciones naturales de infección. Por el contrario, nuestros ensayos de BiFC e inmunoprecipitación proporcionan evidencias concluyentes de interacción entre 16K y AGO4. De estos resultados se plantea la cuestión de si 16K interfiere con la formación *de novo* de los complejos RISC a través de la unión con AGO4. Esta posibilidad implicaría que AGO4 fuese reclutado por los complejos RISC para contribuir al silenciamiento post-transcripcional en los ensayos de expresión transitoria. Esta idea no se ha analizado experimentalmente en esta tesis si bien el hecho de que miR172 posea una adenosina en posición 5' terminal y que se una a AGO4 para dirigir el corte endonucleolítico del mRNA diana del gen *AP2* sugieren un papel productivo para AGO4 en el ensayo de silenciamiento en *N. benthamiana*. En condiciones normales de desarrollo se sabe que el miR172 se asocia con AGO1 y con AGO4 y ejerce su represión sobre el mRNA de *AP2* tanto inhibiendo su traducción como por corte endonucleolítico sobre su secuencia diana (Chen, 2004; Aukerman and Sakai, 2003). Aunque AGO4 se relaciona típicamente con el silenciamiento transcripcional de la cromatina, la unión de

miR172 con AGO4 también conduce al silenciamiento post-transcripcional de los mRNAs dianas. Por ejemplo, miR172 se ha encontrado enriquecido en tejidos florales en asociación con AGO4 si bien la relevancia biológica de esta unión así como del mecanismo de silenciamiento post-transcripcional mediado por AGO4 todavía se desconocen (Meng *et al.*, 2012). El hecho de que mutantes defectivos *ago4* no muestren los efectos de la desregulación del mensajero de *AP2*, que sí se observan en mutantes *ago1*, probablemente indica una redundancia funcional con AGO1, siendo AGO1 el principal efector implicado en la regulación de *AP2* (Meng *et al.*, 2012).

La proteína 16K posee un motivo glicina/triptófano (GW) de reconocimiento y unión a proteínas AGO y que está presente también en otros supresores del silenciamiento (Azevedo *et al.*, 2010; Giner *et al.*, 2010; Karlowski *et al.*, 2010). Aunque este motivo podría representar el punto de unión de 16K con las enzimas AGO, nuestros experimentos de expresión transitoria empleando construcciones mutantes de 16K demuestran que este motivo es irrelevante en la supresión del silenciamiento. La mayoría de proteínas de unión a AGO poseen reiterados motivos GW o WG en un contexto aminoacídico con alta representación de residuos de G, W, serina (S) y treonina (T), y rico en aminoácidos con carga (Azevedo *et al.*, 2010). Estas condiciones no se dan en la proteína 16K, lo que sugiere que el motivo GW no representa un sitio funcional de unión a AGO1.

La 16K es una proteína rica en cisteínas que comparte identidad de secuencia con otras proteínas ricas en cisteínas de los géneros *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Benyvirus* y *Carlavirus*. Algunas de estas proteínas

Discusión

probablemente compartan funciones comunes puesto que la proteína 19K del virus del mosaico del trigo transmitido por el suelo (*Soilborne wheat mosaic furovirus*, SBWMV) o la proteína γ b del virus del mosaico estriado de la cebada (*Barley stripe mosaic hordeivirus*, BSMV) son capaces de complementar las funciones de 16K durante la infección (H., Liu *et al.*, 2002). De hecho, la proteínas 19K y γ b, o la proteína 15K del virus del macizo del cacahuete (*Peanut clump pecluvirus*, PCV) actúan como supresores de silenciamiento y poseen la capacidad para modular la gravedad de los síntomas y la acumulación sistémica del virus (Donald and Jackson, 1994; Dunoyer *et al.*, 2002; Te *et al.*, 2005; Yelina *et al.*, 2002). Los experimentos realizados en esta tesis empleando mutantes de sustitución y delección sugieren que los residuos de cisteína en la región amino terminal de la proteína 16K son críticos para su estabilidad y función. Mientras que la incapacidad del mutante sYFPN-16K65-66/P para suprimir silenciamiento se debe probablemente a la inestabilidad de la proteína, el mutante de delección 16K Δ 17 produce un supresor incapaz de reprimir el silenciamiento local inducido por la expresión de un T-DNA. Sería interesante determinar si mutaciones en los residuos conservados de Cys alteran la formación de la estructura en forma de dedos de zinc provocando plegamientos inapropiados de la proteína.

Los resultados obtenidos en esta tesis abren la posibilidad de que interacciones entre miRNAs y secuencias virales pudieran ocurrir en el contexto de una infección. Por el momento, varias evidencias parecen apoyar experimentalmente esta idea. Primero, se ha demostrado que los miRNAs de *Arabidopsis* pueden regular negativamente virus quiméricos que portan en su genoma secuencias complementarias de miRNAs. Los experimentos de (Simón-

Mateo and García, 2006) demostraron además que la limitación en la acumulación de esos virus quimera era función de: i) la posición de la secuencia insertada en el genoma del virus, indicando que algunos sitios son más accesibles que otros a la maquinaria de silenciamiento de la planta y ii) la abundancia del miRNA responsable de la regulación en el tejido estudiado. En este sentido los resultados más acusados se obtuvieron en hojas superiores infectadas con un virus de la Sharka (*Plum pox virus*, PPV) quimérico portador de una secuencia complementaria al miR159, que es un miRNA muy abundante en hojas. Estudios del genoma de estos virus quiméricos tras sucesivos ciclos de infección mostraron que la secuencia complementaria al miRNAs acumulaba mutaciones, posibilitando al virus escapar de la maquinaria de regulación de la planta. Estas mutaciones además se concentraban de forma preferente en la región 5' o región semilla, y señalaban la importancia de esta región en la estabilidad de la unión con el miRNA (Bartel, 2004). Curiosamente casi no se detectaron mutaciones en regiones del genoma del virus fuera de la secuencia complementaria del miRNA, ni en virus quiméricos que portaban dianas mutadas no reconocidas por el miRNA, ni en virus quiméricos con secuencias diana tras infectar plantas transgénicas que expresaban el supresor P1/HC-Pro (Simón-Mateo and García, 2006).

Segundo, plantas de *Arabidopsis* transformadas con precursores recombinantes de miRNAs que contienen secuencias virales complementarias, se vuelven inmunes a la infección con esos virus (Lin *et al.*, 2009; Niu *et al.*, 2006). El diseño de estos miRNAs artificiales (amiRNAs) demostró que dentro de la secuencia del precursor tan sólo los 21 nts del sitio diana eran suficientes para conferir resistencia a los virus con secuencias complementarias y que además esta

Discusión

resistencia era específica de secuencia y no se extendía a virus heterólogos. Sí se observaban fenómenos de resistencia a infecciones dobles cuando en una misma planta se co-expresaban dos amiRNAs con secuencias complementarias a dos virus diferentes. Esta especificidad de secuencia es, al igual que en los experimentos de (Simón-Mateo and García, 2006), crítica en la región 5' complementaria al amiRNA. También en este caso las especies virales que escapaban a la resistencia en las plantas transgénicas para amiRNAs contenían mutaciones en la secuencia diana. Estas mutaciones disminuían cuando la diana se encontraba en la proteína supresora del virus indicando la existencia de dos presiones de selección opuestas, la impuesta por la funcionalidad de la proteína y por el silenciamiento del virus (Lin *et al.*, 2009; Niu *et al.*, 2006).

Dado que ambas evidencias se han obtenido en sistemas artificiales, no queda claro si las interacciones entre miRNAs y genomas virales tienen, en condiciones naturales, un efecto irrelevante para la infección o por el contrario desempeñan un papel dinámico evitando el exceso de proliferación viral durante la infección (Qu *et al.*, 2008). Parece poco probable que los miRNAs tengan un papel regulador antiviral en plantas ya que los virus evolucionan rápidamente evitando cualquier posible reconocimiento (Lin *et al.*, 2009; Simón-Mateo and García, 2006). No obstante, no podemos excluir que en algunos casos la presión de selección impuesta por la funcionalidad de la proteína sea mayor que la impuesta por el silenciamiento génico. En esos casos es posible que las interacciones fortuitas entre miRNAs y regiones genómicas que codifiquen dominios conservados con funciones básicas para el virus puedan contribuir eventualmente a modelar el resultado de la interacción en ciertos sistemas planta-virus.

Estudios de nuestro laboratorio han determinado que tanto AGO2 como AGO4 desempeñan un papel antiviral frente a TRV como demuestra el hecho que los mutantes de pérdida de función *ago2-1* y *ago4-2* son hipersusceptibles a la infección respecto del control Col-0. Por el contrario, el efecto de AGO1 sobre TRV es errático (Carbonell and Carrington, 2015; Ma *et al.*, 2015). Esto sugiere que AGO4 y AGO2 son los principales AGO implicados en los complejos efectores de silenciamiento antiviral frente a TRV. La pregunta que subyace a estas observaciones es si la capacidad de la proteína 16K de interactuar con AGO4 podría tener implicaciones en el desenlace de la infección. A pesar de que AGO4 normalmente interviene en procesos de control transcripcional guiando la hipermetilación de la cromatina, su papel antiviral frente a ciertos virus de RNA parece estar mediado por el corte endonucleolítico de las dianas (Carbonell and Carrington, 2015). Además se ha demostrado que la interacción física entre ciertos VSRs y AGO4 limita su actividad de corte (Hamera *et al.*, 2012; Pérez-Cañamás and Hernández, 2015). AGO4 es además capaz de modular la resistencia viral inducida por la proteína NB-LRR de *N. benthamiana* a través de un mecanismo de control de la traducción que es independiente del corte endonucleolítico (Bhattacharjee *et al.*, 2009).

De acuerdo a nuestros resultados 16K inhibe la programación *de novo* de los complejos efectores de silenciamiento bloqueando la actividad de miRNAs en el sistema de expresión transitoria. Aunque dicha interferencia no parece deberse a una asociación directa con AGO1, la actividad de 16K podría tener implicaciones tanto en las rutas de miRNAs como en los procesos que regulan. Nuestro trabajo muestra que ni 16K ni la infección por TRV provocan alteraciones globales en la

Discusión

biogénesis y función de miRNAs en Arabidopsis. Así la infección por TRV no altera el patrón de expresión de genes *MIRNA* y la mayoría de los miRNAs maduros estudiados se acumulan a niveles similares en plantas control inoculadas con tampón y en plantas infectadas por TRV. Tampoco parece interferir con la actividad endonucleolítica dirigida por miRNAs como se deduce al comparar los niveles de transcritos de genes regulados por miRNAs en plantas de Arabidopsis infectadas con plantas control. Tan solo los niveles de mRNA de *CSD2* mostraron una cierta inducción, que puede ser atribuida a los cambios transcriptómicos que ocurren durante la infección más que a una interferencia específica con el miR398. Ni la infección por TRV en plantas de Arabidopsis ni la expresión transitoria de la proteína 16K en *N. benthamiana* alteraba significativamente el patrón de corte de transcritos *SCL6* mediados por miR171. Por último el hecho de que las plantas infectadas por TRV no muestren síntomas acusados ni defectos de desarrollo como los observados en plantas deficientes en la biogénesis y función de miRNAs, apoya la tesis de que TRV ejerce un efecto menor sobre el metabolismo de estas moléculas reguladoras (Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004; Kasschau *et al.*, 2003). Esta observación no excluye sin embargo la posibilidad de que la infección impacte directa o indirectamente con la formación y/o actividad de algunas especies de miRNAs, como lo sugieren cambios puntuales en los perfiles de acumulación de ciertos miRNAs en plantas infectadas.

A diferencia de lo observado con la proteína 16K, está bien documentada la capacidad que tienen otros VSRs de modular específicamente la expresión de los genes de la planta durante la infección al interferir con la actividad reguladora de numerosos miRNAs y otros sRNA endógenos (Kasschau *et al.*, 2003; Chapman *et*

al., 2004; Dunoyer *et al.*, 2004). En la mayoría de los casos, los supresores interfieren negativamente con su actividad pues inhiben por diferentes mecanismos su incorporación dentro del complejo efector RISC. El resultado de dicha interferencia es la expresión de genes de la planta durante la infección viral que en condiciones normales de desarrollo deberían estar desactivados por la acción de los miRNAs. Por ejemplo, el supresor HC-Pro es capaz de secuestrar miRNAs y otras especies de sRNAs impidiendo así su asociación funcional con AGO1. De esta manera, el HC-Pro ejerce un efecto inhibitor sobre la actividad de los miRNAs (Chapman *et al.*, 2004; Chellappan *et al.*, 2005; Dunoyer *et al.*, 2004; Kasschau *et al.*, 2003; Lakatos *et al.*, 2006; Garcia-Ruiz *et al.*, 2015). No obstante, se ha descrito como la infección con ciertos virus portadores de un supresor débil o con virus recombinantes que carecen de supresor son también capaces de alterar el perfil de acumulación de miRNAs y causar síntomas acusados en las plantas infectadas (Bazzini *et al.*, 2007). En infecciones dobles con PVX y el virus y de la patata (*Potato virus Y*, PVY) en *N. benthamiana* se observa también que la alteración en la acumulación de ciertos miRNAs y de sus correspondientes dianas es mucho más acusada que la observada en infecciones simples (García-Marcos *et al.*, 2009). Aunque no se ha demostrado una conexión funcional, este efecto sinérgico se aprecia también en la gravedad de los síntomas observados y es independiente de la actividad de sus proteínas supresoras. Este hecho pone de manifiesto que algunas interacciones planta-virus se asocian con alteraciones en el metabolismo de miRNAs que sin embargo son independientes de la capacidad del virus para bloquear el silenciamiento post-transcripcional (Bazzini *et al.*, 2007).

6 CONCLUSIONES

1. El sistema de expresión transitoria de construcciones GFP portadoras de posibles dianas virales nos ha permitido validar la unión funcional de miR172 y miR399 con secuencias parcialmente complementarias en los genomas de MCDV y TRV. Estos resultados invitan a pensar que los sRNAs del huésped albergan el potencial de regular genomas virales.
2. La proteína 16K de TRV es capaz de interactuar con AGO4 e interfiere con el ensamblaje *de novo* de los complejos efectores RISC para suprimir el silenciamiento por RNA.
3. 16K es funcional en presencia de niveles bajos de inductor de silenciamiento provocando una disminución en la acumulación de sRNAs y un retraso en el movimiento a corta y a larga distancia de la señal del silenciamiento.
4. Los residuos de cisteína en la región amino terminal de la proteína 16K son críticos para su estabilidad y su función supresora del silenciamiento.
5. Ni 16K ni la infección por TRV provocan alteraciones globales en la biogénesis y función de miRNAs en Arabidopsis.

7 BIBLIOGRAFIA

- Adai, A., Johnson, C., Mlotshwa, S., Archer-Evans, S., Manocha, V., Vance, V. and Sundaresan, V.** (2005) Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.*, **15**, 78–91.
- Adenot, X., Elmayan, T., Laussergues, D., Boutet, S., Bouché, N., Gasciolli, V. and Vaucheret, H.** (2006) DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Curr. Biol.*, **16**, 927–32.
- Akbergenov, R., Si-Ammour, A., Blevins, T., Amin I, Kutter C, Vanderschuren H, Zhang P, Gruissem W, Meins F Jr, Hohn T, Pooggin MM.** (2006) Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 462–71.
- Allemeersch, J., Durinck, S., Vanderhaeghen, R., Alard P, Maes R, Seeuws K, Bogaert T, Coddens K, Deschouwer K, Van Hummelen P, Vuylsteke M, Moreau Y, Kwekkeboom J, Wijfjes AH, May S, Beynon J, Hilson P, Kuiper MT.** (2005) Benchmarking the CATMA microarray. A novel tool for *Arabidopsis* transcriptome analysis. *Plant Physiol.*, **137**, 588–601.
- Allen, E. Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC.** (2005) MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, **121**, 207–221.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M. and Carrington, J.C.** (2005) MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, **121**, 207–21.
- Andika, I.B., Kondo, H., Nishiguchi, M. and Tamada, T.** (2012) The cysteine-rich proteins of beet necrotic yellow vein virus and tobacco rattle virus contribute to efficient suppression of silencing in roots. *J. Gen. Virol.*, **93**, 1841–1850.
- Ashby, A.M., Watson, M.D., Loake, G.J. and Shaw, C.H.** (1988) Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 toward vir-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *J. Bacteriol.*, **170**, 4181–7
- Aukerman, M.J. and Sakai, H.** (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, **15**, 2730–41.

Bibliografia

- Aung, K., Lin, S.-I., Wu, C.-C., Huang, Y.-T., Su, C.-L. and Chiou, T.-J.** (2006) *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol.*, **141**, 1000–11.
- Avramova, Z. V** (2002) Heterochromatin in animals and plants. Similarities and differences. *Plant Physiol.*, **129**, 40–9.
- Axtell, M.J., Jan, C., Rajagopalan, R. and Bartel, D.P.** (2006) A Two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell*, **127**, 565–577.
- Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge S, Yu A, Garcia S, Braun L, Bergdoll M, Hakimi MA, Lagrange T, Voinnet O.** (2010) Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev.*, **24**, 904–15
- Bachan, S. and Dinesh-Kumar, S.P.** (2012) Tobacco rattle virus (TRV)-based virus-induced gene silencing. *Methods Mol. Biol.*, **894**, 83–92.
- Bari, R., Datt Pant, B., Stitt, M. and Scheible, W.-R.** (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol.*, **141**, 988–99.
- Bartel, D.P.** (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281–97.
- Baulcombe, D.** (2004) RNA silencing in plants. *Nature*, **431**, 356–63.
- Baulcombe, D.C.** (2015) VIGS, HIGS and FIGS: small RNA silencing in the interactions of viruses or filamentous organisms with their plant hosts. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **26**, 141–146.
- Baumberger, N; Baulcombe, DC., N.** (2005) Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **Aug. 16**, 11928–11933.
- Baumberger, N. and Baulcombe, D.C.** (2005) Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 11928–33.

- Baumberger, N., Tsai, C.-H., Lie, M., Havecker, E. and Baulcombe, D.C.** (2007) The Pterovirus silencing suppressor PO targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr. Biol.*, **17**, 1609–14.
- Bazzini, A.A., Hopp, H.E., Beachy, R.N. and Asurmendi, S.** (2007) Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 12157–62.
- Berger, S., Sinha, A.K. and Roitsch, T.** (2007) Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.*, **58**, 4019–26.
- Bhattacharjee, S., Zamora, A., Azhar, M.T., Sacco, M.A., Lambert, L.H. and Moffett, P.** (2009) Virus resistance induced by NB-LRR proteins involves Argonaute4-dependent translational control. *Plant J.*, **58**, 940–51.
- Bies-Etheve, N., Pontier, D., Lahmy, S., Picart, C., Vega, D., Cooke, R. and Lagrange, T.** (2009) RNA-directed DNA methylation requires an AGO4-interacting member of the SPT5 elongation factor family. *EMBO Rep.*, **10**, 649–654.
- Binder, S.** (2010) Branched-chain amino acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arab. B.*, **8**, e0137.
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Beknazariants D, Si-Ammour A, Park HS, Vazquez F, Robertson D, Meins F Jr, Hohn T,** (2006) Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 6233–46..
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. and Benning, C.** (1998) AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J.*, **17**, 170–80.
- Bologna, N.G. and Voinnet, O.** (2014) The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **65**, 473–503.
- Bolouri Moghaddam, M.R. and Ende, W. Van den** (2012) Sugars and plant innate immunity. *J. Exp. Bot.*, **63**, 3989–98.

Bibliografia

- Bolton, M.D.** (2009) Primary metabolism and plant defense--fuel for the fire. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, **22**, 487–97.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R. and Zhu, J.-K.** (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell*, **123**, 1279–91
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P. and Ziegler-Graff, V.** (2007) The Polerovirus F Box Protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr. Biol.*, **17**, 1615–1621.
- Bouché, N., Laressergues, D., Gascioli, V. and Vaucheret, H.** (2006) An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *EMBO J.*, **25**, 3347–56.
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S. and Ohad, N.** (2004) Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.*, **40**, 419–27.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B. and Cohen, S.M.** (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.*, **3**, e85.
- Brigneti, G., Martín-Hernández, A.M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D.C., Baker, B. and Jones, J.D.G.** (2004) Virus-induced gene silencing in Solanum species. *Plant J.*, **39**, 264–72.
- Brodersen Voinnet, O., P.** (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.*, **22**, 268–280.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L. and Voinnet, O.** (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, **320**, 1185–90.
- Brodersen, P. and Voinnet, O.** (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.*, **22**, 268–80.
- Brosseau, C. and Moffett, P.** (2015) Functional and genetic analysis identify a role for Arabidopsis ARGONAUTE5 in antiviral RNA silencing. *Plant Cell*, **27**, 1742–54.

- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., et al.** (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *Plant J.*, **42**, 567–585.
- Burch-Smith, T.M., Schiff, M., Liu, Y. and Dinesh-Kumar, S.P.** (2006) Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **142**, 21–7.
- Burdisso, P., Suarez, I.P., Bologna, N.G., Palatnik, J.F., Bersch, B. and Rasia, R.M.** (2012) Second Double-Stranded RNA Binding Domain of Dicer-like Ribonuclease 1: Structural and Biochemical Characterization. *Biochemistry*, **51**, 10159–10166.
- Burgyán, J. and Havelda, Z.** (2011) Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.*, **16**, 265–272.
- Calabrese, J.M. and Sharp, P.A.** (2006) Characterization of the short RNAs bound by the P19 suppressor of RNA silencing in mouse embryonic stem cells. *RNA*, **12**, 2092–102.
- Canto, T., Uhrig, J.F., Swanson, M., Wright, K.M. and MacFarlane, S.A.** (2006) Translocation of Tomato bushy stunt virus P19 protein into the nucleus by ALY proteins compromises its silencing suppressor activity. *J. Virol.*, **80**, 9064–72.
- Carbonell, A. and Carrington, J.C.** (2015) Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **27**, 111–117.
- Carlsbecker, A., Lee, J.-Y., Roberts, C.J., Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vatén A, Thitamadee S, Campilho A, Sebastian J, Bowman JL, Helariutta Y, Benfey PN.** (2010) Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*, **465**, 316–21.
- Chapman, E.J., Prokhnevsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V. V and Carrington, J.C.** (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.*, **18**, 1179–86.
- Chellappan, P., Vanitharani, R. and Fauquet, C.M.** (2005) MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 10381–6.

Bibliografia

- Chellappan, P., Xia, J., Zhou, X., Gao, S., Zhang, X., Coutino, G., Vazquez, F., Zhang, W. and Jin, H.** (2010) siRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 6883–94.
- Chen, J., Li, W.X., Xie, D., Peng, J.R. and Ding, S.W.** (2004) Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell*, **16**, 1302–13.
- Chen, X.** (2004) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, **303**, 2022–5.
- Chen, X.** (2009) Small RNAs and their roles in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **25**, 21–44.
- Chisholm, S.T., Mahajan, S.K., Whitham, S.A., Yamamoto, M.L. and Carrington, J.C.** (2000) Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 489–94.
- Chitwood, D.H., Nogueira, F.T.S., Howell, M.D., Montgomery, T.A., Carrington, J.C. and Timmermans, M.C.P.** (2009) Pattern formation via small RNA mobility. *Genes Dev.*, **23**, 549–54.
- Chiu, M.-H., Chen, I.-H., Baulcombe, D.C. and Tsai, C.-H.** (2010) The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol. Plant Pathol.*, **11**, no–no.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L.** (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 2110–4.
- Coller, J. and Parker, R.** (2005) General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell*, **122**, 875–86.
- Crowe, M.L., Serizet, C., Thareau, V., Aubourg S, Rouzé P, Hilson P, Beynon J, Weisbeek P, van Hummelen P, Reymond P, Paz-Ares J, Nietfeld W, Trick M.** (2003) CATMA: a complete Arabidopsis GST database. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 156–8.

- Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T. and Burgyan, J.** (2007) The p122 Subunit of Tobacco mosaic virus replicase is a potent silencing suppressor and sompromises both small interfering RNA- and MicroRNA-mediated pathways. *J. Virol.*, **81**, 11768–11780.
- Csorba, T., Kontra, L. and Burgyán, J.** (2015) viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, **479-480**, 85–103.
- Csorba, T., Lózsza, R., Hutvágner, G. and Burgyán, J.** (2010) Polerovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J.*, **62**, 463–472.
- Cuevas, J.C., López-Cobollo, R., Alcázar, R., Zarza, X., Koncz, C., Altabella, T., Salinas, J., Tiburcio, A.F. and Ferrando, A.** (2008) Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiol.*, **148**, 1094–105.
- Cullen, B.R. ed.** (2013) *Intrinsic Immunity*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Curaba, J. and Chen, X.** (2007) Biochemical activities of Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase 6. *J. Biol. Chem.*, **283**, 3059–3066.
- Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H. and Baulcombe, D.C.** (2001) SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *EMBO J.*, **20**, 2069–78.
- Deleris, A., Gallego-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.
- Deng, X., Kelloniemi, J., Haikonen, T., Vuorinen, A.L., Elomaa, P., Teeri, T.H. and Valkonen, J.P.T.** (2013) Modification of Tobacco rattle virus RNA1 to serve as a VIGS vector reveals that the 29K movement protein is an RNA silencing suppressor of the virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **26**, 503–514.
- Diao, A., Chen, J., Ye, R., Zheng, T., Yu, S., Antoniw, J.F. and Adams, M.J.** (1999) Complete sequence and genome properties of Chinese wheat mosaic virus, a new furovirus from China. *J. Gen. Virol.*, **80 (Pt 5)**, 1141–5.

Bibliografía

- Díaz-Pendón, J.A. and Ding, S.-W.** (2008) Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **46**, 303–26.
- Díaz-Pendón, J.A., Li, F., Li, W.X. and Ding, S.W.** (2007) Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell*, **19**, 2053–2063.
- Díaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M.J., Rubio, M., Olmos, E., García, J.A., Martínez-Gómez, P. and Hernández, J.A.** (2008) Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to plum pox virus. *J. Exp. Bot.*, **59**, 2147–2160.
- Dinesh-Kumar, S.P., Anandalakshmi, R., Marathe, R., Schiff, M. and Liu, Y.** (2003) Virus-induced gene silencing. *Methods Mol. Biol.*, **236**, 287–94.
- Ding, S.W.** (2010) RNA-based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 632–644.
- Ding, S.-W. and Voinnet, O.** (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, **130**, 413–26.
- Donaire, L., Barajas, D., Martínez-García, B., Martínez-Priego, L., Pagán, I. and Llave, C.** (2008) Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *J. Virol.*, **82**, 5167–77.
- Donaire, L., Wang, Y., Gonzalez-Ibeas, D., Mayer, K.F., Aranda, M.A. and Llave, C.** (2009) Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology*, **392**, 203–14.
- Donald, R.G. and Jackson, A.O.** (1994) The barley stripe mosaic virus gamma b gene encodes a multifunctional cysteine-rich protein that affects pathogenesis. *Plant Cell*, **6**, 1593–606.
- Du, P., Wu, J., Zhang, J., Zhao, S., Zheng, H., Gao, G., Wei, L. and Li, Y.** (2011) Viral infection induces expression of novel phased microRNAs from conserved cellular microRNA precursors R. Andino, ed. *PLoS Pathog.*, **7**, e1002176.

- Duan, C.-G., Fang, Y.-Y., Zhou, B.-J., Zhao, J.-H., Hou, W.-N., Zhu, H., Ding, S.-W. and Guo, H.-S.** (2012) Suppression of Arabidopsis ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the Cucumber mosaic virus 2b protein. *Plant Cell*, **24**, 259–274.
- Dugas, D. V and Bartel, B.** (2004) MicroRNA regulation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**, 512–20.
- Dunoyer, P., Brosnan, C.A., Schott, G., Wang, Y., Jay, F., Alioua, A., Himber, C. and Voinnet, O.** (2010) An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO J.*, **29**, 1699–712.
- Dunoyer, P., Himber, C., Ruiz-Ferrer, V., Alioua, A. and Voinnet, O.** (2007) Intra- and intercellular RNA interference in Arabidopsis thaliana requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. *Nat. Genet.*, **39**, 848–856.
- Dunoyer, P., Himber, C. and Voinnet, O.** (2005) DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat Genet*, **37**, 1356–1360.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.-H., Parizotto, E.A., Himber, C. and Voinnet, O.** (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell*, **16**, 1235–50
- Dunoyer, P., Pfeffer, S., Fritsch, C., Hemmer, O., Voinnet, O. and Richards, K.E.** (2002) Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant J.*, **29**, 555–67.
- Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J.C. and Voinnet, O.** (2010) Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science*, **328**, 912–6.
- Dunoyer, P. and Voinnet, O.** (2005) The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 415–23.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T.** (2001) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. *EMBO J.*, **20**, 6877–88.

Bibliografía

- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun L, Picart C, Vega D, Hakimi MA, Jacobsen SE, Cooke R, Lagrange T.** (2007) Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev.*, **21**, 2539–44.
- Endres, M.W., Gregory, B.D., Gao, Z., Foreman AW, Mlotshwa S, Ge X, Pruss GJ, Ecker JR, Bowman LH, Vance V.** (2010) Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing S.-W. Ding, ed. *PLoS Pathog.*, **6**, e1000729.
- Espinoza, C., Medina, C., Somerville, S. and Arce-Johnson, P.** (2007) Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*, **58**, 3197–212.
- Fahlgren, N., Howell, M.D., Kasschau, K.D., Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangl JL, Carrington JC.** (2007) High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: Evidence for frequent birth and death of MIRNA Genes. *PLoS One*, **2**, e219.
- Fang Spector, D.L, Y.** (2007) Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Curr Biol.*, **17**, 818–823.
- Fang, W. and Bartel, D.P.** (2015) The Menu of Features that Define Primary MicroRNAs and Enable De Novo Design of MicroRNA Genes. *Mol. Cell*, **60**, 131–45.
- Fang, Y. and Spector, D.L.** (2007) Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Curr. Biol.*, **17**, 818–23.
- Feng, J., Lai, L., Lin, R., Jin, C. and Chen, J.** (2012) Differential effects of Cucumber mosaic virus satellite RNAs in the perturbation of microRNA-regulated gene expression in tomato. *Mol. Biol. Rep.*, **39**, 775–84.
- Fernández-Calvino, L., Guzmán-Benito, I., Toro, F.J. Del, Donaire, L., Castro-Sanz, A.B., Ruíz-Ferrer, V. and Llave, C.** (2015) Activation of senescence-associated Dark-inducible (DIN) genes during infection contributes to enhanced susceptibility to plant viruses. *Mol. Plant Pathol.*

- Fernandez-Calvino, L., Osorio, S., Hernandez, M.L., Hamada IB, del Toro FJ, Donaire L, Yu A, Bustos R, Fernie AR, Martínez-Rivas JM, Llave C.** (2014) Virus-induced alterations in primary metabolism modulate susceptibility to Tobacco rattle virus in Arabidopsis. *PLANT Physiol.*, **166**, 1821–1838
- Fujii, H., Chiou, T.-J., Lin, S.-I., Aung, K. and Zhu, J.-K.** (2005) A miRNA involved in phosphate-starvation response in Arabidopsis. *Curr. Biol.*, **15**, 2038–43.
- Fukunaga, R. and Doudna, J.A.** (2009) dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *EMBO J.*, **28**, 545–55.
- Fusaro, A.F., Matthew, L., Smith, N.A., Curtin SJ, Dedic-Hagan J, Ellacott GA, Watson JM, Wang MB, Brosnan C, Carroll BJ, Waterhouse PM.** (2006) RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO Rep.*, **7**, 1168–1175.
- Garcia, D., Garcia, S., Pontier, D., Marchais, A., Renou, J.P., Lagrange, T. and Voinnet, O.** (2012) Ago hook and RNA helicase motifs underpin dual roles for SDE3 in antiviral defense and silencing of nonconserved intergenic regions. *Mol. Cell*, **48**, 109–20.
- García-Marcos, A., Pacheco, R., Martiáñez, J., González-Jara, P., Díaz-Ruiz, J.R. and Tenllado, F.** (2009) Transcriptional changes and oxidative stress associated with the synergistic interaction between Potato virus X and Potato virus Y and their relationship with symptom expression. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **22**, 1431–1444.
- Garcia-Ruiz, H., Carbonell, A., Hoyer, J.S., Fahlgren N, Gilbert KB, Takeda A, Giampetruzzi A, Garcia Ruiz MT, McGinn MG, Lowery N, Martinez Baladejo MT, Carrington J.C.** (2015) Roles and programming of Arabidopsis ARGONAUTE proteins during Turnip mosaic virus infection. *PLoS Pathog.*, **11**, e1004755.
- Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Brempelis, K.J. and Carrington, J.C.** (2010) Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and Dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip mosaic virus infection. *Plant Cell*, **22**, 481–496.
- Gepstein, S., Sabehi, G., Carp, M.-J., Hajouj, T., Neshher, M.F.O., Yariv, I., Dor, C. and Bassani, M.** (2003) Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant J.*, **36**, 629–42.

Bibliografía

- Ghazala, W. and Varrelmann, M.** (2007) Tobacco rattle virus 29K movement protein is the elicitor of extreme and hypersensitive-like resistance in two cultivars of *Solanum tuberosum*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, **20**, 1396–405.
- Ghazala, W., Waltermann, A., Pilot, R., Winter, S. and Varrelmann, M.** (2008) Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of tobacco rattle virus. *J. Gen. Virol.*, **89**, 1748–58.
- Ghildiyal, M. and Zamore, P.D.** (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 94–108.
- Ghoshal, B. and Sanfaçon, H.** (2014) Temperature-dependent symptom recovery in *Nicotiana benthamiana* plants infected with tomato ringspot virus is associated with reduced translation of viral RNA2 and requires ARGONAUTE 1. *Virology*, **456-457**, 188–197.
- Giner, A., Lakatos, L., García-Chapa, M., López-Moya, J.J. and Burgyán, J.** (2010) Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathog.*, **6**, e1000996.
- Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, 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. U. S. A.*, **105**, 157–61.
- Godge, M.R., Purkayastha, A., Dasgupta, I. and Kumar, P.P.** (2007) RETRACTED ARTICLE: Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes. *Plant Cell Rep.*, **27**, 209–219.
- González, I., Martínez, L., Rakitina, D.V., Lewsey M.G., Atencio F.A., Llave C, Kalinina N.O., Carr J.P., Palukaitis P, Canto T.** (2010) Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, **23**, 294–303.
- González, I., Rakitina, D., Semashko, M., Taliansky, M., Praveen, S., Palukaitis, P., Carr, J.P., Kalinina, N. and Canto, T.** (2012) RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of Cucumber mosaic virus 2b protein than nuclear localization. *RNA*, **18**, 771–82.

- Gustafson, A.M., Allen, E., Givan, S., Smith, D., Carrington, J.C. and Kasschau, K.D.** (2005) ASRP: the Arabidopsis Small RNA Project Database. *Nucleic Acids Res.*, **33**, D637–40.
- Haas, G., Azevedo, J., Moissiard, G., Geldreich, A., Himber, C., Bureau, M., Fukuhara, T., Keller, M. and Voinnet, O.** (2008) Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J.*, **27**, 2102–12.
- Hamera, S., Song, X., Su, L., Chen, X. and Fang, R.** (2012) Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J.*, **69**, 104–15.
- Hamilton, W.D., Boccarda, M., Robinson, D.J. and Baulcombe, D.C.** (1987) The complete nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA-1. *J. Gen. Virol.*, **68 (Pt 10)**, 2563–75.
- Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E.R., Robertson, D. and Mansoor, S.** (2013) Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 777–88.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S. and Robertson, D.** (2000) Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **35**, 105–40.
- Harrison, B.D. and Robinson, D.J.** (1988) Molecular variation in vector-borne plant viruses: epidemiological significance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **321**, 447–62.
- Harvey, J.J.W., Lewsey, M.G., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J.P. and Baulcombe, D.C.** (2011) An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One*, **6**, e14639.
- Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H. and Baulcombe, D.C.** (2010) The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell*, **22**, 321–34.
- He, X.-J., Hsu, Y.-F., Zhu, S., Wierzbicki AT, Pontes O, Pikaard CS, Liu HL, Wang CS, Jin H, Zhu JK.** (2009) An effector of RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell*, **137**, 498–508.

Bibliografia

- Heinlein, M.** (2015) Plant virus replication and movement. *Virology*, **479-480**, 657–71.
- Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J. and Jacobsen, S.E.** (2006) Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat. Genet.*, **38**, 721–5.
- Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R.K.** (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 7351–67.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C. and Voinnet, O.** (2003) Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.*, **22**, 4523–33.
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura Y, Aizawa D, Murai Y, Koiwa H, Seki M, Shinozaki K, Fukuhara T.** (2005) Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB- family dsRNA-binding proteins in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.*, **57**, 173–188.
- Hu, Q., Hollunder, J., Niehl, A., Kørner CJ, Gereige D, Windels D, Arnold A, Kuiper M, Vazquez F, Pooggin M, Heinlein M.** (2011) Specific impact of tobamovirus infection on the Arabidopsis small RNA profile. *PLoS One*, **6**, e19549.
- Hull, R.** (2015) *Plant Virology* 4th Editio. Academic Press, ed.,.
- Hull, R., Covey, S.N. and Maule, A.J.** (1987) Structure and replication of caulimovirus genomes. *J. Cell Sci. Suppl.*, **7**, 213–29.
- Hutvagner, G. and Simard, M.J.** (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 22–32.
- Hutvagner, G. and Zamore, P.D.** (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, **297**, 2056–60.
- Irvine, D. V.** (2006) Argonaute Slicing Is Required for Heterochromatic Silencing and Spreading. *Science (80-)*, **313**, 1134–1137.

- Jamalkandi, S.A. and Masoudi-Nejad, A.** (2009) Reconstruction of *Arabidopsis thaliana* fully integrated small RNA pathway. *Funct. Integr. Genomics*, **9**, 419–32.
- Jamous, R.M., Boonrod, K., Fuellgrabe, M.W., Ali-Shtayeh, M.S., Krczal, G. and Wassenegger, M.** (2011) The helper component-proteinase of the Zucchini yellow mosaic virus inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity in vitro. *J. Gen. Virol.*, **92**, 2222–6.
- Jauvion, V., Elmayan, T. and Vaucheret, H.** (2010) The conserved RNA trafficking proteins HPR1 and TEX1 are involved in the production of endogenous and exogenous small interfering RNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **22**, 2697–709.
- Jauvion, V., Rivard, M., Bouteiller, N., Elmayan, T. and Vaucheret, H.** (2012) RDR2 partially antagonizes the production of RDR6-dependent siRNA in sense transgene-mediated PTGS. *PLoS One*, **7**, e29785.
- 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**, 930–8.
- Jones, J.D., Shlumukov, L., Carland, F., English, J., Scofield, S.R., Bishop, G.J. and Harrison, K.** (1992) Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants. *Transgenic Res.*, **1**, 285–97.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B.** (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 19–53.
- Jovel, J., Walker, M. and Sanfaçon, H.** (2007) Recovery of *Nicotiana benthamiana* plants from a necrotic response induced by a nepovirus is associated with RNA silencing but not with reduced virus titer. *J. Virol.*, **81**, 12285–97.
- Kalantidis, K., Schumacher, H.T., Alexiadis, T. and Helm, J.M.** (2008) RNA silencing movement in plants. *Biol. Cell*, **100**, 13–26.
- Karlowski, W.M., Zieleszinski, A., Carrère, J., Pontier, D., Lagrange, T. and Cooke, R.** (2010) Genome-wide computational identification of WG/GW Argonaute-binding proteins in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 4231–45.

Bibliografia

- Kasschau, K.D., Fahlgren, N., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Cumbie, J.S., Givan, S.A. and Carrington, J.C.** (2007) Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS Biol.*, **5**, e57.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A. and Carrington, J.C.** (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA uncton. *Dev. Cell*, **4**, 205–17.
- Katiyar-Agarwal, S., Gao, S., Vivian-Smith, A. and Jin, H.** (2007) A novel class of bacteria-induced small RNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.*, **21**, 3123–34.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Zhu, J.-K., Staskawicz, B.J. and Jin, H.** (2006) A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 18002–7.
- Kervestin, S. and Jacobson, A.** (2012) NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 700–12.
- Khraiwesh, B., Arif, M.A., Seumel, G.I., Ossowski, S., Weigel, D., Reski, R. and Frank, W.** (2010) Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell*, **140**, 111–22.
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S.D.** (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, **115**, 209–16.
- Kim, V.N.** (2008) Sorting out small RNAs. *Cell*, **133**, 25–6.
- Kim, Y.J., Zheng, B., Yu, Y., Won, S.Y., Mo, B. and Chen, X.** (2011) The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in Arabidopsis thaliana. *EMBO J.*, **30**, 814–22.
- Kirsch, C., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E.** (1997) Rapid and transient induction of a parsley microsomal delta 12 fatty acid desaturase mRNA by fungal elicitor. *Plant Physiol.*, **115**, 283–9.
- Kurihara, Y. and Watanabe, Y.** (2004) Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 12753–8.

- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja VV, Calvino LF, López-Moya JJ, Burgyán J.** (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.*, **25**, 2768–80.
- Lam, H.M., Hsieh, M.H. and Coruzzi, G.** (1998) Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **16**, 345–53.
- Lanet, E., Delannoy, E., Sormani, R., Floris, M., Brodersen, P., Crété, P., Voinnet, O. and Robaglia, C.** (2009) Biochemical evidence for translational repression by *Arabidopsis* microRNAs. *Plant Cell*, **21**, 1762–8.
- Lecellier, C.-H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., Saïb, A. and Voinnet, O.** (2005) A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, **308**, 557–60.
- Lee, T., Gurazada, S.G.R., Zhai, J., Li, S., Simon, S.A., Matzke, M.A., Chen, X. and Meyers, B.C.** (2014) RNA polymerase V-dependent small RNAs in *Arabidopsis* originate from small, intergenic loci including most SINE repeats. *Epigenetics*, **7**, 781–795.
- Li, C.F., Pontes, O., El-Shami, M., Henderson, I.R., Bernatavichute, Y. V, Chan, S.W.-L., Lagrange, T., Pikaard, C.S. and Jacobsen, S.E.** (2006) An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, **126**, 93–106.
- Li, F. and Ding, S.-W.** (2006) Virus Counterdefense: Diverse Strategies for Evading the RNA-Silencing Immunity. *Annu. Rev. Microbiol.*, **60**, 503–531.
- Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J.O., Cohn, M.M., Tung, J., Sun, H., Kumar, P. and Baker, B.** (2012) MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 1790–5.
- Li, J., Reichel, M., Li, Y. and Millar, A.A.** (2014) The functional scope of plant microRNA-mediated silencing. *Trends Plant Sci.*, **19**, 750–6.
- Li, Y., Zhang, Q., Zhang, J., Wu, L., Qi, Y. and Zhou, J.-M.** (2010) Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiol.*, **152**, 2222–31.

Bibliografia

- Lin, J.-F. and Wu, S.-H.** (2004) Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. *Plant J.*, **39**, 612–28.
- Lin, S.-S., Wu, H.-W., Elena, S.F., Chen, K.-C., Niu, Q.-W., Yeh, S.-D., Chen, C.-C. and Chua, N.-H.** (2009) Molecular evolution of a viral non-coding sequence under the selective pressure of amiRNA-mediated silencing. *PLoS Pathog.*, **5**, e1000312.
- Liu, D.H., Robinson, D.J., Duncan, G.H. and Harrison, B.D.** (1991) Nuclear location of the 16K non-structural protein of tobacco rattle virus. *J. Gen. Virol.*, **72 (Pt 8)**, 1811–7.
- Liu, H., Reavy, B., Swanson, M. and MacFarlane, S.A.** (2002) Functional replacement of the tobacco rattle virus cysteine-rich protein by pathogenicity proteins from unrelated plant viruses. *Virology*, **298**, 232–9.
- Liu, Q., Feng, Y. and Zhu, Z.** (2009) Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Funct. Integr. Genomics*, **9**, 277–86.
- Liu, Y., Schiff, M. and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002) Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.*, **31**, 777–86.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R. and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002) Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.*, **30**, 415–29.
- Llave, C.** (2004) MicroRNAs: more than a role in plant development? *Mol. Plant Pathol.*, **5**, 361–6.
- Llave, C.** (2010) Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci.*, **15**, 701–7.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A. and Carrington, J.C.** (2002) Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, **14**, 1605–19.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C.** (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*, **297**, 2053–6.
- Lobbes, D., Rallapalli, G., Schmidt, D.D., Martin, C. and Clarke, J.** (2006) SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep.*, **7**, 1052–8.

- Lózsa, R., Csorba, T., Lakatos, L. and Burgyán, J.** (2008) Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4099–107.
- Lu, R., Martin-Hernandez, A.M., Peart, J.R., Malcuit, I. and Baulcombe, D.C.** (2003) Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, **30**, 296–303.
- Lu, X.-Y. and Huang, X.-L.** (2008) Plant miRNAs and abiotic stress responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **368**, 458–62.
- Lurin, C.** (2004) Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *PLANT CELL ONLINE*, **16**, 2089–2103.
- Ma, X., Nicole, M.-C., Meteignier, L.-V., Hong, N., Wang, G. and Moffett, P.** (2015) Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants. *J. Exp. Bot.*, **66**, 919–32.
- MacFarlane, S.A.** (1999) Molecular biology of the tobnaviruses. *J. Gen. Virol.*, **80** (Pt 11, 2799–807.
- Macfarlane, S.A.** (2010) Tobnaviruses--plant pathogens and tools for biotechnology. *Mol. Plant Pathol.*, **11**, 577–583.
- MacRae, I.J.** (2006) Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* (80-), **311**, 195–198.
- MacRae, I.J., Zhou, K. and Doudna, J.A.** (2007) Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 934–40.
- Mallory, A. and Vaucheret, H.** (2010) Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell*, **22**, 3879–89.
- Mallory, A.C., Bartel, D.P. and Bartel, B.** (2005) MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell*, **17**, 1360–75.

Bibliografia

- Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe R, Anandalakshmi R, Fagard M, Vaucheret H, Pruss G, Bowman L, Vance V.B.** (2001) HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell*, **13**, 571–83.
- Mallory, A.C., Mlotshwa, S., Bowman, L.H. and Vance, V.B.** (2003) The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. *Plant J.*, **35**, 82–92.
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Jones-Rhoades, M.W., Tang, G., Zamore, P.D., Barton, M.K. and Bartel, D.P.** (2004) MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J.*, **23**, 3356–64.
- Mallory, A.C. and Vaucheret, H.** (2009) ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO Rep.*, **10**, 521–526.
- Margis, R., Fusaro, A.F., Smith, N.A., Curtin, S.J., Watson, J.M., Finnegan, E.J. and Waterhouse, P.M.** (2006) The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Lett.*, **580**, 2442–50.
- Martínez-Priego, L., Donaire, L., Barajas, D. and Llave, C.** (2008) Silencing suppressor activity of the Tobacco rattle virus-encoded 16-kDa protein and interference with endogenous small RNA-guided regulatory pathways. *Virology*, **376**, 346–56.
- Martin-Hernandez, A.M. and Baulcombe, D.C.** (2008) Tobacco rattle virus 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. *J. Virol.*, **82**, 4064–4071.
- Matzke, M.A., Kanno, T. and Matzke, A.J.M.** (2015) RNA-directed DNA methylation: The evolution of a complex epigenetic pathway in flowering plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **66**, 243–67.
- Maule, A., Leh, V. and Lederer, C.** (2002) The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**, 279–84.
- Mayers, C.N., Palukaitis, P. and Carr, J.P.** (2000) Subcellular distribution analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein. *J. Gen. Virol.*, **81**, 219–26.

- Mayo, M.A. and Ziegler-Graff, V.** (1996) Molecular biology of luteoviruses. *Adv. Virus Res.*, **46**, 413–60.
- Melnyk, C.W., Molnar, A. and Baulcombe, D.C.** (2011) Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.*, **30**, 3553–3563.
- Meng, Y., Shao, C., Ma, X., Wang, H. and Chen, M.** (2012) Expression-based functional investigation of the organ-specific microRNAs in Arabidopsis. *PLoS One*, **7**, e50870.
- Mérai, Z., Kerényi, Z., Kertész, 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**, 5747–56.
- Mérai, Z., Kerényi, Z., Molnár, A., Barta, E., Válóczy, 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**, 7217–26.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen Y, Hodges E, Ni F, Wu L, Li S, Zhou H, Long C, Chen S, Hannon GJ, Qi Y.** (2008) Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, **133**, 116–27.
- Moazed, D.** (2009) Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature*, **457**, 413–420
- Moissiard, G., Parizotto, E.A., Himber, C. and Voinnet, O.** (2007) Transitivity in Arabidopsis can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA*, **13**, 1268–78.
- Moissiard, G. and Voinnet, O.** (2006) RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 19593–8.
- Molnar, A., Melnyk, C. and Baulcombe, D.C.** (2011) Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs. *Genome Biol.*, **12**, 215.
- Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R. and Baulcombe, D.C.** (2010) Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, **328**, 872–5.

Bibliografía

- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li D, Hansen JE, Alexander AL, Chapman EJ, Fahlgren N, Allen E, Carrington J.C.** (2008) Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell*, **133**, 128–41.
- Mourrain, P., Béclin, C., Elmayer, T., et al.** (2000) Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, **101**, 533–42.
- Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M.E., Delgado, S., Flores, R. and Serio, F. Di** (2012) Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast-replicating viroid guide the degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. *Plant J.*, **70**, 991–1003.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y. and Shigeoka, S.** (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *PLANT Physiol.*, **147**, 1251–1263.
- Niu, Q.-W., Lin, S.-S., Reyes, J.L., Chen, K.-C., Wu, H.-W., Yeh, S.-D. and Chua, N.-H.** (2006) Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance. *Nat. Biotechnol.*, **24**, 1420–1428.
- Omoto, S. and Fujii, Y.R.** (2005) Regulation of human immunodeficiency virus 1 transcription by nef microRNA. *J. Gen. Virol.*, **86**, 751–5.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C. and Weigel, D.** (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, **425**, 257–63.
- Pant, B.D., Buhtz, A., Kehr, J. and Scheible, W.-R.** (2008) MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J.*, **53**, 731–8.
- Pantaleo, V., Szittyá, G. and Burgyán, J.** (2007) Molecular bases of viral RNA targeting by viral small interfering RNA-programmed RISC. *J. Virol.*, **81**, 3797–806.
- Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H. and Poethig, R.S.** (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 3691–6.

- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. and Chen, X.** (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.*, **12**, 1484–95.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H.L. and Poethig, R.S.** (2004) SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, **18**, 2368–79.
- Pérez-Cañamás, M. and Hernández, C.** (2015) Key Importance of small RNA binding for the activity of a glycine-tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *J. Biol. Chem.*, **290**, 3106–3120.
- Pikaard, C.S., Haag, J.R., Ream, T. and Wierzbicki, A.T.** (2008) Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci.*, **13**, 390–7.
- Poethig, R.S.** (2009) Small RNAs and developmental timing in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **19**, 374–378.
- Pontes, O., Li, C.F., Costa Nunes, P., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S.E. and Pikaard, C.S.** (2006) The *Arabidopsis* chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell*, **126**, 79–92.
- Pontes, O., Vitins, A., Ream, T.S., Hong, E., Pikaard, C.S. and Costa-Nunes, P.** (2013) Intersection of small RNA pathways in *Arabidopsis thaliana* sub-nuclear domains. *PLoS One*, **8**, e65652.
- Pontier, D., Gan, S., Amasino, R.M., Roby, D. and Lam, E.** (1999) Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Mol. Biol.*, **39**, 1243–55.
- Poulsen, C., Vaucheret, H. and Brodersen, P.** (2013) Lessons on RNA silencing mechanisms in plants from eukaryotic argonaute structures. *Plant Cell*, **25**, 22–37.
- Pumplin, N. and Voinnet, O.** (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 745–60.
- Purkayastha, A. and Dasgupta, I.** (2009) Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiol. Biochem.*, **47**, 967–76.

Bibliografia

- Qi, X., Bao, F.S. and Xie, Z.** (2009) Small RNA deep sequencing reveals Role for Arabidopsis thaliana RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis R. Aramayo, ed. *PLoS One*, **4**, e4971.
- Qi, Y., Denli, A.M. and Hannon, G.J.** (2005) Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Mol Cell*, **19**, 421–428.
- Qi, Y., He, X., Wang, X.-J., Kohany, O., Jurka, J. and Hannon, G.J.** (2006) Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, **443**, 1008–12.
- Qu, F., Ye, X., Hou, G., Sato, S., Clemente, T.E. and Morris, T.J.** (2005) RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *J. Virol.*, **79**, 15209–17.
- Qu, F., Ye, X. and Morris, T.J.** (2008) Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 14732–7.
- Quirino, B.F., Normanly, J. and Amasino, R.M.** (1999) Diverse range of gene activity during Arabidopsis thaliana leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Mol. Biol.*, **40**, 267–78.
- Raja, P., Jackel, J.N., Li, S., Heard, I.M. and Bisaro, D.M.** (2014) Arabidopsis double-stranded RNA binding protein DRB3 participates in methylation-mediated defense against geminiviruses. *J. Virol.*, **88**, 2611–22.
- Raja, P., Sanville, B.C., Buchmann, R.C. and Bisaro, D.M.** (2008) Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J. Virol.*, **82**, 8997–9007.
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J. and Bartel, D.P.** (2006) A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev.*, **20**, 3407–25
- Ratcliff, F., MacFarlane, S. and Baulcombe, D.** (1999) Gene silencing without DNA. rna-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell*, **11**, 1207–16.

- Reavy, B., Dawson, S., Canto, T. and MacFarlane, S.A.** (2004) Heterologous expression of plant virus genes that suppress post-transcriptional gene silencing results in suppression of RNA interference in *Drosophila* cells. *BMC Biotechnol.*, **4**, 18.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. and Bartel, D.P.** (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev.*, **16**, 1616–26.
- Restrepo, M.A., Freed, D.D. and Carrington, J.C.** (1990) Nuclear transport of plant potyviral proteins. *Plant Cell*, **2**, 987–98.
- Rodríguez-Negrete, E., Lozano-Durán, R., Piedra-Aguilera, A., Cruzado, L., Bejarano, E.R. and Castillo, A.G.** (2013) Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing. *New Phytol.*, **199**, 464–75.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O. and Baulcombe, D.C.** (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, **10**, 937–946.
- Ruiz-Ferrer, V. and Voinnet, O.** (2009) Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**, 485–510.
- Sambrook, J. and Russell, D.W.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Third., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasaki, T., Lee, T., Liao, W.W., Naumann U, Liao JL, Eun C, Huang YY, Fu JL, Chen PY, Meyers BC, Matzke AJ, Matzke M.** (2014) Distinct and concurrent pathways of Pol II- and Pol IV-dependent siRNA biogenesis at a repetitive trans-silencer locus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **79**, 127–38.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Rusu, A.G., Manners, J.M. and Maclean, D.J.** The SEN1 gene of *Arabidopsis* is regulated by signals that link plant defence responses and senescence. *Plant Physiol. Biochem.*, **43**, 997–1005.
- Schiebel, W., Pélissier, T., Riedel, L., Thalmeir, S., Schiebel, R., Kempe, D., Lottspeich, F., Sängler, H.L. and Wassenegger, M.** (1998) Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell*, **10**, 2087–101.

Bibliografía

- Schott, G., Mari-Ordonez, A., Himber, C., Alioua, A., Voinnet, O. and Dunoyer, P.** (2012) Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. *EMBO J.*, **31**, 2553–65.
- Schuck, J., Gursinsky, T., Pantaleo, V., Burgyán, J. and Behrens, S.-E.** (2013) AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 5090–103.
- Schwab, R., Palatnik, J.F., Rieger, M., Schommer, C., Schmid, M. and Weigel, D.** (2005) Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev. Cell*, **8**, 517–27.
- Schwach, F., Vaistij, F.E., Jones, L. and Baulcombe, D.C.** (2005) An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol.*, **138**, 1842–52.
- Schwarz, D.S., Hutvágner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D.** (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, **115**, 199–208.
- Sclap, G., Allemeersch, J., Liechti, R., De Meyer B, Beynon J, Bhalerao R, Moreau Y, Nietfeld W, Renou JP, Reymond P, Kuiper MT, Hilson P.** (2007) CATMA, a comprehensive genome-scale resource for silencing and transcript profiling of Arabidopsis genes. *BMC Bioinformatics*, **8**, 400.
- Senthil-Kumar, M. and Mysore, K.S.** (2011) New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends Plant Sci.*, **16**, 656–65.
- Shimura, H., Pantaleo, V., Ishihara, T., Myojo, N., Inaba, J., Sueda, K., Burgyán, J. and Masuta, C.** (2011) A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery S.-W. Ding, ed. *PLoS Pathog.*, **7**, e1002021.
- Shivaprasad, P. V, Chen, H.-M., Patel, K., Bond, D.M., Santos, B.A.C.M. and Baulcombe, D.C.** (2012) A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell*, **24**, 859–74.
- Silhavy, D. and Burgyán, J.** (2004) Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci.*, **9**, 76–83.

- Silhavy, D., Molnár, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M. and Burgyán, J.** (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.*, **21**, 3070–80.
- Simón-Mateo, C. and García, J.A.** (2006) MicroRNA-guided processing impairs Plum pox virus replication, but the virus readily evolves to escape this silencing mechanism. *J. Virol.*, **80**, 2429–36.
- Smith, N.A., Eamens, A.L. and Wang, M.-B.** (2011) Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathog.*, **7**, e1002022.
- Souret, F.F., Kastenmayer, J.P. and Green, P.J.** (2004) AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Mol. Cell*, **15**, 173–83.
- Stav, R., Hendelman, A., Buxdorf, K. and Arazi, T.** (2010) Transgenic expression of tomato bushy stunt virus silencing suppressor P19 via the pOp/LhG4 transactivation system induces viral-like symptoms in tomato. *Virus Genes*, **40**, 119–29.
- Sullivan, C.S., Grundhoff, A.T., Tevethia, S., Pipas, J.M. and Ganem, D.** (2005) SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*, **435**, 682–6.
- Summerfelt, M. and** (1990) Improved binary vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.*, **14**, 269–276.
- Sunkar, R., Girke, T. and Zhu, J.-K.** (2005) Identification and characterization of endogenous small interfering RNAs from rice. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 4443–54.
- Szittyá, G., Moxon, S., Pantaleo, V., Toth, G., Rusholme Pilcher, R.L., Moulton, V., Burgyán, J. and Dalmay, T.** (2010) Structural and functional analysis of viral siRNAs. *PLoS Pathog.*, **6**, e1000838.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M. and Watanabe, Y.** (2008) The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol.*, **49**, 493–500.
- Taylor, R.G., Walker, D.C. and McInnes, R.R.** (1993) E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1677–8.

Bibliografia

- Te, J., Melcher, U., Howard, A. and Verchot-Lubicz, J.** (2005) Soilborne wheat mosaic virus (SBWMV) 19K protein belongs to a class of cysteine rich proteins that suppress RNA silencing. *Virology*, **2**, 18.
- Tian, J., Pei, H., Zhang, S., Chen J, Chen W, Yang R, Meng Y, You J, Gao J, Ma N.** (2013) TRV-GFP: a modified Tobacco rattle virus vector for efficient and visualizable analysis of gene function. *J. Exp. Bot.*, **65**, 311–322.
- Till, S., Lejeune, E., Thermann, R., Bortfeld, M., Hothorn, M., Enderle, D., Heinrich, C., Hentze, M.W. and Ladurner, A.G.** (2007) A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 897–903.
- Timm, S., Florian, A., Wittmiß, M., Jahnke, K., Hagemann, M., Fernie, A.R. and Bauwe, H.** (2013) Serine acts as a metabolic signal for the transcriptional control of photorespiration-related genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **162**, 379–89.
- Todesco, M., Rubio-Somoza, I., Paz-Ares, J. and Weigel, D.** (2010) A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.*, **6**, e1001031.
- Vaistij, F.E., Jones, L. and Baulcombe, D.C.** (2002) Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell*, **14**, 857–67.
- Valentine, T.** (2004) Efficient Virus-Induced gene silencing in roots using a modified Tobacco rattle virus vector. *PLANT Physiol.*, **136**, 3999–4009.
- Várallyay, É., Válóczy, A., Ágyi, Á., Burgyán, J. and Havelda, Z.** (2010) Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO J.*, **29**, 3507–3519.
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyán, J. and Hall, T.M.T.** (2003) Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell*, **115**, 799–811.
- Vaucheret, H.** (2009) AGO1 homeostasis involves differential production of 21-nt and 22-nt miR168 species by MIR168a and MIR168b. *PLoS One*, **4**, e6442.
- Vaucheret, H.** (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci.*, **13**, 350–8.

- Vaucheret, H., Mallory, A.C. and Bartel, D.P.** (2006) AGO1 homeostasis entails coexpression of miR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Mol. Cell*, **22**, 129–136.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P. and Bartel, D.P.** (2004) The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev.*, **18**, 1187–1197.
- Vazquez, F., Legrand, S. and Windels, D.** (2010) The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. *Trends Plant Sci.*, **15**, 337–45.
- Vazquez, F., Blevins, T., Ailhas, J., Boller, T. and Meins, F.** (2008) Evolution of Arabidopsis MIR genes generates novel microRNA classes. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 6429–38.
- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A.C., Hilbert, J.-L., Bartel, D.P. and Crété, P.** (2004) Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Mol. Cell*, **16**, 69–79.
- Voinnet, O.** (2005) Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Lett.*, **579**, 5858–5871. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16242131> [Accessed September 27, 2015].
- Voinnet, O.** (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, **136**, 669–687.
- Voinnet, O.** (2008) Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci.*, **13**, 317–328.
- Voinnet, O. and Baulcombe, D.C.** (1997) Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, **389**, 553.
- Wang, H., Chung, P.J., Liu, J., Jang, I.-C., Kean, M.J., Xu, J. and Chua, N.-H.** (2014) Genome-wide identification of long noncoding natural antisense transcripts and their responses to light in Arabidopsis. *Genome Res.*, **24**, 444–53.
- Wang, L., Song, X., Gu, L., Li, X., Cao, S., Chu, C., Cui, X., Chen, X. and Cao, X.** (2013) NOT2 proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple microRNA biogenesis factors in Arabidopsis. *Plant Cell*, **25**, 715–727.

Bibliografia

- Wang, M.-B., Masuta, C., Smith, N.A. and Shimura, H.** (2012) RNA silencing and plant viral diseases. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, **25**, 1275–85.
- Wang, X., Beno-Moualem, D., Kobiler, I., Leikin-Frenkel, A., Lichter, A. and Prusky, D.** (2004) Expression of Delta(12) fatty acid desaturase during the induced accumulation of the antifungal diene in avocado fruits. *Mol. Plant Pathol.*, **5**, 575–85.
- Wang, X.-B., Jovel, J., Udomporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W.-X., Gascioli, V., Vaucheret, H. and Ding, S.-W.** (2011) The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **23**, 1625–38.
- Wang, X.-B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W.-X., Chen, X., Yu, J.-L. and Ding, S.-W.** (2009) RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 484–489.
- Wassenegger, M. and Krczal, G.** (2006) Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.*, **11**, 142–51.
- Watson, J.M., Fusaro, A.F., Wang, M. and Waterhouse, P.M.** (2005) RNA silencing platforms in plants. *FEBS Lett.*, **579**, 5982–5987.
- Weinberg, M.S. and Morris, K. V** (2006) Are viral-encoded microRNAs mediating latent HIV-1 infection? *DNA Cell Biol.*, **25**, 223–31.
- Weinheimer, I., Jiu, Y., Rajamäki, M.L., Matilainen O, Kallijärvi J, Cuellar WJ, Lu R, Saarma M, Holmberg CI, Jääntti J, Valkonen JP.** (2015) Suppression of RNAi by dsRNA-degrading RNaseIII enzymes of viruses in animals and plants. *PLoS Pathog.*, **11**, e1004711.
- Wezel, R. Van, Liu, H., Wu, Z., Stanley, J. and Hong, Y.** (2003) Contribution of the zinc finger to zinc and DNA binding by a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.*, **77**, 696–700.
- Whitham, S.A., Yang, C. and Goodin, M.M.** (2006) Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, **19**, 1207–15.

- Wieczorek, P. and Obrepalska-Stęplowska, A.** Suppress to Survive-Implication of Plant Viruses in PTGS. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **33**, 335–346.
- Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R. and Pikaard, C.S.** (2009) RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat. Genet.*, **41**, 630–634.
- Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C. and Qi, Y.** (2010) DNA Methylation Mediated by a MicroRNA Pathway. *Mol. Cell*, **38**, 465–475
- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S.A. and Carrington, J.C.** (2005) Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiol.*, **138**, 2145–54.
- Xie, Z., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C.** (2003) Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr. Biol.*, **13**, 784–9.
- Yang, S.-J., Carter, S.A., Cole, A.B., Cheng, N.-H. and Nelson, R.S.** (2004) A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 6297–6302.
- Yang, S.W., Chen, H.-Y., Yang, J., Machida, S., Chua, N.-H. and Yuan, Y.A.** (2010) Structure of Arabidopsis HYPOPLASTIC LEAVES1 and its molecular implications for miRNA processing. *Structure*, **18**, 594–605.
- Ye, K., Malinina, L. and Patel, D.J.** (2003) Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature*, **426**, 874–8.
- Ye, R., Wang, W., Iki, T., Liu, C., Wu, Y., Ishikawa, M., Zhou, X. and Qi, Y.** (2012) Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of Arabidopsis Argonaute4/siRNA complexes. *Mol. Cell*, **46**, 859–70.
- Yelina, N.E., Savenkov, E.I., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y. and Valkonen, J.P.T.** (2002) Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families. *J. Virol.*, **76**, 12981–91.
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M.Y. and Poethig, R.S.** (2005) A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.*, **19**, 2164–75.

Bibliografia

- Yu, B., Chapman, E.J., Yang, Z., Carrington, J.C. and Chen, X.** (2006) Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in Arabidopsis. *FEBS Lett.*, **580**, 3117–3120.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R. and Chen, X.** (2005) Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, **307**, 932–5.
- Yu, D., Fan, B., MacFarlane, S.A. and Chen, Z.** (2003) Analysis of the involvement of an inducible Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol Plant Microbe Interact*, **16**, 206–216.
- Zhai, J., Jeong, D.H., De Paoli E, Park S, Rosen B.D., Li Y, González A.J., Yan Z, Kitto S.L., Grusak M.A., Jackson S.A., Stacey G, Cook D.R., Green P.J., Sherrier D.J., Meyers B.C.** (2011) MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes Dev.*, **25**, 2540–53.
- Zhang, W., Gao, S., Zhou, X., Xia, J., Chellappan, P., Zhou, X., Zhang, X. and Jin, H.** (2010) Multiple distinct small RNAs originate from the same microRNA precursors. *Genome Biol.*, **11**, R81.
- 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 Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.*, **20**, 3255–68.
- Zhang, X., Zhang, X., Singh, J., Li, D. and Qu, F.** (2012) Temperature-dependent survival of Turnip crinkle virus-infected arabidopsis plants relies on an RNA silencing-based defense that requires dcl2, AGO2, and HEN1. *J. Virol.*, **86**, 6847–54.
- Zhang, X., Zhu, Y., Liu, X., Hong X, Xu Y, Zhu P, Shen Y, Wu H, Ji Y, Wen X, Zhang C, Zhao Q, Wang Y, Lu J, Guo H.** (2015) Suppression of endogenous gene silencing by bidirectional cytoplasmic RNA decay in Arabidopsis. *Science (80-.)*, **348**, 120–123.
- Zhang, Z., Chen, H., Huang, X., Xia R, Zhao Q, Lai J, Teng K, Li Y, Liang L, Du Q, Zhou X, Guo H, Xie Q.** (2011) BSCTV C2 attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in Arabidopsis. *Plant Cell*, **23**, 273–88.

- Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A. and Zhu, J.K.** (2007) Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *Embo J*, **26**, 1691–1701.
- Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S.-H., Liou, L.W., Barefoot, A., Dickman, M. and Zhang, X.** (2011) Arabidopsis Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell*, **145**, 242–56
- Ziegler-Graff, V., Guilford, P.J. and Baulcombe, D.C.** (1991) Tobacco rattle virus RNA-1 29K gene product potentiates viral movement and also affects symptom induction in tobacco. *Virology*, **182**, 145–55.
- Zielezinski, A. and Karlowski, W.M.** (2011) Agos—a universal web tool for GW Argonaute-binding domain prediction. *Bioinformatics*, **27**, 1318–9.
- Zilberman, D., Cao, X. and Jacobsen, S.E.** (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, **299**, 716–9.
- Zilberman, D., Cao, X., Johansen, L.K., Xie, Z., Carrington, J.C. and Jacobsen, S.E.** (2004) Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr. Biol.*, **14**, 1214–20.