

RESUM

El gènere *Carmovirus* (família *Tombusviridae*) representa almenys 19 espècies de virus de plantes que afecten nombroses espècies conreades, en molts casos amb una gran repercussió econòmica. El genoma del MNSV (gRNA) està compost per una molècula de RNA monocatenari de polaritat positiva de 4,3 kb, amb un extrem 5' sense estructura "cap" (m7G5pppNp) i un extrem 3' no poliadenilat. El genoma del MNSV codifica 5 proteïnes funcionals flanquejades per dues regions no traduïbles de 95 nt (a l'extrem 5') i 280 nt (a l'extrem 3'). La ORF més propera a l'extrem 5' és una proteïna de 29 kDa (p29) que finalitza amb un codó ambre i codifica la RNA polimerasa RNA dependent (RdRp). Continuant amb la lectura a través d'aquest codó s'obté una proteïna de 89 kDa (p89), també implicada en la replicació del virus. Les dues ORFs situades a la part central del genoma, codifiquen dues petites MPs, denominades generalment DGBp1 i DGBp2 (*double gene block of proteins*, DGBps). DGBp1 és una proteïna que uneix RNA necessària per al transport intercel·lular del genoma viral, mentre que DGBp2 és una proteïna associada a membrana amb una localització en el PD que és imprescindible per al moviment cèl·lula a cèl·lula del virus. Finalment, l'ORF de l'extrem 3' representa la proteïna de coberta (CP). En el cas del MNSV el virió està format per partícules isomètriques d'uns 30 nm de diàmetre, constituïdes aproximadament per 180 subunitats d'aquesta proteïna.

Resultats previs obtinguts en el grup de recerca on s'ha realitzat la present Tesi havien posat de manifest que el MNSV utilitza la ruta de secreció cel·lular, a través de la seva proteïna de membrana DGBp2 (p7B), per arribar-hi a la perifèria cel·lular. Fins al moment de realitzar la present Tesi els coneixements sobre els senyals/motius de les proteïnes de membrana que faciliten o permeten aquest transport eren més aviat escassos. En aquest treball hem determinat els residus implicats en el transport d'una proteïna transmembrana viral a través de la ruta de secreció primerenca (DGBp2, p7B MNSV). Els residus implicats es troben tant a la regió Nt (citosòlica) com en la Ct (luminal) sent aquest un dels primers exemples descrits en plantes de senyal luminal de sortida de RE. Amb totes aquestes dades s'ha proposat un model en el qual després

de la inserció i correcte plegament de la proteïna en la membrana del RE, el Ct luminal de p7B interacciona a través del residu K₄₉ amb un adaptador transmembrana associat al citoesquelet d'actina per al seu moviment i concentració en el RE cortical. El motiu Nt citoplasmàtic caldria per a l'acoblament de la vesícula COPII.

D'altra banda s'ha aprofundit en l'estudi del interactoma de les MPs dels carmovirus i s'han identificat, mitjançant un assaig de doble híbrid (Y2H), tres proteïnes cel·lulars capaces d'interaccionar amb tres DGBp1 procedents de tres Carmovirus diferents (MNSV, TCV i CarMV). Aquests factors cel·lulars són la proteïna P3 del ribosoma 60S (RPP3A), la subunitat g del factor d'iniciació de la traducció 3 (eIF3g) i el factor de transcripció WRKY36. Aquestes interaccions van ser confirmades per BiFC. A més, mitjançant assajos de mutagènesi es va demostrar que el domini d'unió d'aquestes DGBp1 és un domini Ct (FNF) conservat. El fet que aquestes tres proteïnes interaccionen amb els mateixos factors suggereix un possible mecanisme comú per a tots o la major part dels carmovirus.

Les CPs virals constitueixen el paradigma de la multifuncionalitat proteica i, a més del seu obvi paper estructural, intervenen en un gran nombre de processos del cicle viral, incloent el transport de l'RNA viral. La regió Nt desestructurada de la CP del MNSV, igual que per altres virus de RNA, generalment és l'encarregada d'unir l'RNA viral pel que se li sol cridar domini R. Mitjançant mutants de deleció i substitució s'ha demostrat que aquest domini R (que en el MNSV comprèn els primers 94 residus) no intervé només a la encapsidació i unió del genoma viral, sinó que és la responsable de la multifuncionalitat de la CP. Mitjançant EMSAs amb mutants de deleció es va poder determinar que el domini R essencial per a la unió de l'RNA. A més es va observar que dins del domini R es troba una regió conservada entre els aa 60 al 91, que sembla tenir un paper tant en la unió de RNA genòmic in vitro com en l'encapsidació de RNAs subgenòmics. No obstant això, en assajos d'encapsidació es va observar que tot el domini R és essencial per a l'encapsidació del genoma complet i que la regió compresa entre el residu 31 i el 91 és essencial per al moviment tant cèl·lula a cèl·lula com sistèmic. Finalment, utilitzant PVX com a vector d'expressió, es va demostrar que la CP del MNSV pot actuar com un supressor de silenciament mitjançant la unió als sRNAs.

Amb molt comptades excepcions, els virus de plantes utilitzen el floema per traslladar-se cap a les parts distals de la planta des dels llocs d'infecció. Amb l'objecte de conèixer el proteoma del floema de plantes infectades i poder en el futur identificar possibles proteïnes de l'hoste que facilitin o dificultin el transport sistèmic dels virus, en l'últim capítol es va dur a terme una anàlisi proteòmic comparatiu, mitjançant 2D-DIGE, entre floemas de plantes de meló infectades amb MNSV i plantes sanes. Es van detectar 1046 espots dels quals 25 tenien canvis significatius entre les dues condicions. Després de sotmetre les proteïnes a una anàlisi d'espectrometria de masses, es van identificar 19 proteïnes que corresponien a 22 espots (13 dels quals estaven sobrerrepresentats i en 9 havia disminuït la seva expressió). Moltes de les proteïnes identificades estan involucrades en mort cel·lular i el control de l'homeòstasi redox. Dues d'aquestes 19 proteïnes no havien estat descrites prèviament en assajos proteòmics: una carboxilesterasa amb homologia amb la hsr203J de tabac i la fumarilacetoacetat hidrolasa 1, ambdues considerades com a reguladors negatius de la mort cel·lular. Els resultats obtinguts apunten que la resposta de defensa a causa de la infecció viral pot ser transferida al del floema mitjançant una variació dels nivells de les proteïnes que es troben en ell per a actuar com a reguladors clau d'aquesta defensa enfront de patògens mantenint la senyalització sistèmica.