

# RESUMEN

Los procesos de silenciamiento por RNA constituyen una de las principales respuestas de la planta frente a ácidos nucleicos exógenos, como transgenes, transposones o virus. Los RNA virales de doble cadena (dsRNA) activan este tipo de procesos y son digeridos por un tipo particular de enzima con actividad RNasa III, llamada DCL (*Dicer-like*), cuya acción genera pequeños RNA (sRNA) de entre 20 y 24 nt. A continuación, una de las cadenas del sRNA es reclutada por un complejo multiproteico conocido como RISC (*RNA-induced silencing complex*), cuya molécula efectora es una proteína Argonauta (AGO). RISC es dirigido por el sRNA hasta un RNA de secuencia complementaria al que este complejo se une promoviendo su degradación. Las RNA polimerasas RNA dependientes celulares, particularmente RDR6, potencian el silenciamiento antiviral al generar más dsRNA, a partir de los productos de corte de RISC u otros RNA aberrantes, que son procesados por DCL dando lugar a sRNA secundarios. Con el fin de evadir esta barrera defensiva del huésped, la mayoría de los virus de plantas codifican supresores del silenciamiento por RNA (VSR), cuyos mecanismos de acción son diversos y complejos y en muchos casos no se comprenden del todo. Aunque todas las etapas de la ruta pueden ser inhibidas, los sRNA y las proteínas AGO parecen ser las dianas más frecuentes. Se ha postulado que motivos GW/WG podrían ser fundamentales para la actividad de algunos VSR al intervenir en la interacción con proteínas AGO.

En este trabajo se ha pretendido seguir profundizando en el estudio de la respuesta antiviral en plantas y de los mecanismos de

acción de los supresores de silenciamiento. El primer objetivo abordado ha sido analizar la posible actividad como VSR de las proteínas codificadas por el virus del arabesco del *Pelargonium* (*Pelargonium line pattern virus*, PLPV), un miembro del género *Pelarspovirus* dentro de la amplia familia *Tombusviridae* que causa infecciones frecuentes en geranio. Los resultados han mostrado que la proteína de cubierta del virus (p37) es capaz de inhibir de manera eficiente el silenciamiento inducido por RNA. Para tratar de obtener más datos acerca del modo de acción de este supresor, se han modificado mediante mutagénesis dirigida distintos motivos de la proteína, incluido un motivo GW que está conservado en proteínas homólogas, y se ha obtenido una batería de moléculas capaces e incapaces de actuar como VSR y/o de empaquetar el RNA viral. Esta batería de mutantes ha permitido, por una parte, evaluar la importancia de ambas funciones de la proteína (encapsidación y supresión del silenciamiento) para la infección viral y, por otra parte, analizar distintas interacciones moleculares de p37 (unión a sRNA, dimerización, localización subcelular, asociación con proteínas AGO) y establecer posibles correlaciones entre las mismas y la actividad supresora. Los resultados nos han permitido sacar dos conclusiones principales: (i) tanto la función de supresión del silenciamiento como la función de encapsidación son esenciales para que el PLPV alcance una infección sistémica y (ii) p37, a pesar de contener un motivo GW funcional e interaccionar con distintas AGO, emplea el secuestro de sRNA como estrategia principal para inhibir el silenciamiento. Además, los datos de este trabajo también han mostrado el solapamiento considerable entre señales de secuencia implicadas en distintas propiedades de la proteína, una situación que no es exclusiva

de este producto viral y que introduce un grado adicional de dificultad para establecer relaciones estructura-función en VSR.

A pesar de que ambas funciones conocidas de p37, supresión del silenciamiento y encapsidación, deben ser llevadas a cabo esencialmente en el citoplasma, el análisis de la localización subcelular de la proteína mostró que se localiza en citoplasma y núcleo, con gran acumulación en nucleolo. Esta localización nuclear/nucleolar se ha descrito para otras proteínas virales, aunque los determinantes moleculares y/o el significado biológico de la misma no se conocen en la mayoría de los casos. El segundo objetivo de este trabajo ha sido identificar señales en la secuencia de p37 e interacciones con factores del huésped involucrados en la localización nucleolar de esta proteína, así como conocer la relevancia de dicha localización en el ciclo infeccioso del virus. El análisis de la localización subcelular de versiones truncadas de p37 mediante microscopia confocal, nos ha permitido acotar la presencia de una señal de localización nucleolar (NoLS) en los primeros 45 aminoácidos de la molécula. La mayoría de proteínas emplea la clásica ruta de importinas para acceder al núcleo celular. Además, las importinas  $\alpha$ , adaptadores moleculares del transporte nucleocitoplasmático, se han relacionado con la localización nucleolar de proteínas virales y celulares. Empleando aproximaciones distintas, hemos observado que p37 interacciona con diferentes miembros de la familia de las importinas  $\alpha$ , y que esta interacción es esencial para la localización nucleolar de la proteína. Además, la anulación de la localización nucleolar de p37 mediante el silenciamiento de importinas  $\alpha$  se ha correlacionado con una disminución de acumulación del virus, lo que sugiere que dicha localización es ventajosa para la infección viral.

Por último, estudios previos realizados con el PLPV mostraron que plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con este virus presentan una enorme cantidad de sRNA virales (vsRNA) que, además, son independientes de la actividad de RDR6. En estos estudios se sugirió que la actividad DCL, encargada de generar los vsRNA, podría ser la principal responsable del silenciamiento antiviral, ya que su función no estaría inhibida por la acción del VSR del virus, un supresor que secuestra vsRNA. Para intentar conocer más datos acerca de los factores de la ruta de silenciamiento que están implicados en la defensa frente al PLPV, analizamos la infección viral en líneas transgénicas de *N. benthamiana* con la expresión o actividad distintos componentes de la ruta comprometida. Los resultados han mostrado que DCL4 y, en menor medida, DCL2 afectan a la infección viral y que ambas tienen un efecto aditivo, tal y como se ha descrito en diversas interacciones virus-planta. Adicionalmente, AGO2 también se ha revelado como un factor clave en la respuesta frente al PLPV, ampliando el número de virus que están afectados por esta endonucleasa particular. En conjunto, los resultados obtenidos muestran que tanto el procesamiento de dsRNA mediado por enzimas DCL como el corte de RNA mediado AGO, contribuyen a la defensa de *N. benthamiana* frente al PLPV.