

ÍNDICE

RESÚMENES.....	3
Resumen.....	3
Resum.....	5
Summary.....	7
INTRODUCCIÓN.....	11
1. Los viroides.....	11
1.1 Características generales de los viroides.....	11
1.2 Estructura y clasificación de los viroides.....	12
1.2.1 Familia <i>Pospiviroidae</i>	14
1.2.2 Familia <i>Avsunviroidae</i>	18
1.3 Replicación de los viroides.....	19
1.3.1 Transcripción: enzimas implicadas y sitio de inicio.....	21
1.3.2 Corte: estructuras y enzimas implicadas.....	24
1.3.3 Ligación.....	27
1.4 Movimiento de los viroides.....	29
1.4.1 Movimiento intracelular.....	29
1.4.2 Movimiento célula a célula.....	30
1.4.3 Movimiento a larga distancia.....	31
1.5 El silenciamiento génico en el contexto de la infección viroidal.....	32
2. Las ligasas.....	35
2.1 La superfamilia de las nucleotidiltransferasas covalentes.....	35
2.2 Las RNA ligasas.....	39
2.2.1 Las RNA ligasas del fago T4.....	41
2.2.2 La tRNA ligasa.....	45
2.3 Las DNA ligasas.....	50
2.3.1 DNA ligasas dependientes de NAD ⁺	50
2.3.2 Las DNA ligasas dependientes de ATP.....	52
OBJETIVOS.....	59

MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
1. Material biológico.....	63
1.1 Material vegetal.....	63
1.2 Bacterias.....	63
2. Manipulación de microorganismos.....	64
2.1 Obtención de células de <i>E. coli</i> DH5 α competentes para su transformación por electroporación.....	64
2.2 Transformación de células de <i>E. coli</i> DH5 α competentes mediante electroporación.....	64
3. Electroforesis de ácidos nucleicos.....	64
3.1 Geles de poliacrilamida (PAGE).....	64
3.1.1 Condiciones no desnaturalizantes.....	64
3.1.2 Condiciones desnaturalizantes.....	65
3.1.3 Elución de ácidos nucleicos de geles de poliacrilamida.....	65
3.2 Geles de agarosa.....	66
3.2.1 Condiciones no desnaturalizantes.....	66
3.2.2 Condiciones desnaturalizantes.....	66
4. Hibridación <i>Northern</i>.....	66
4.1 Electrotransferencia de RNAs a membranas de hibridación.....	66
4.2 Prehibridación e hibridación.....	67
5. Transcripción <i>in vitro</i> de RNA.....	67
6. Modificaciones de los ácidos nucleicos.....	68
6.1 Fosforilación.....	68
6.2 Desfosforilación.....	68
7. Ligación de insertos.....	69
8. Purificación de plásmidos bacterianos.....	69
9. Análisis de secuencias.....	69
9.1 Secuenciación de plásmidos bacterianos.....	69
9.2 Búsqueda en base de datos.....	69
9.3 Alineamiento de secuencias.....	69
9.4 Traducción <i>in silico</i>	69

9.5 Predicción de motivos.....	70
10. Obtención de una fracción de proteínas de tomate con actividad RNA ligasa.....	70
11. Síntesis <i>in vitro</i> de RNAs sustrato.....	70
11.1 Viroides nucleares.....	70
11.2 Viroides cloroplásticos.....	72
12. Análisis de la actividad RNA ligasa.....	73
13. Pretratamientos de degradación proteolítica y desnaturalización térmica.....	73
14. Experimentos de adenilación.....	74
15. Ensayos biológicos de infectividad.....	74
16. Extracción y purificación de RNA.....	74
17. Amplificación de ácidos nucleicos.....	75
17.1 Transcripción inversa (<i>reverse transcription</i> , RT).....	75
17.2 Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR).....	75
18. Amplificación rápida de los extremos de un cDNA (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>, RACE).....	75
18.1 3'-RACE.....	75
18.2 5'-RACE.....	76
18.3 Análisis de los productos obtenidos en los experimentos de RACE.....	76
19. Cebadores.....	78
19.1 Amplificación del monómero circular del PSTVd.....	78
19.2 Clonación de la DNA ligasa 1 de tomate (Dnl1SI).....	78
19.3 Clonación de la tRNA ligasa de berenjena (tRnlSm).....	79
19.3.1 3' y 5' RACE.....	79
19.3.2 Clonación en el vector pET23d(+).....	81
19.4 Clonación del péptido de tránsito de la tRNA ligasa de <i>A. thaliana</i> (tRnlAt).....	82
19.4.1 5' RACE.....	82
19.4.2 Clonación en el vector pERnl.....	82
20. Expresión de proteínas en <i>E.coli</i> Rosetta 2.....	83
20.1 Inducción.....	83

20.2 Extracción.....	83
20.3 Purificación.....	83
21. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (PAGE-SDS).....	84
22. Tinción de geles PAGE-SDS.....	84
23. Detección mediante análisis <i>Western</i>.....	85
24. Identificación de proteínas por espectrometría de masas.....	85
24.1 Preparación de las muestras.....	85
24.2 Identificación mediante LC-MS/MS.....	86
RESULTADOS.....	89
1. Circularización de los viroides nucleares (familia <i>Pospiviroidae</i>).....	89
1.1 Identificación de una actividad RNA ligasa de tomate capaz de unir extremos 5'-P y 3'-OH.....	90
1.2 Caracterización de la actividad RNA ligasa de tomate.....	92
1.2.1 Degradación proteolítica y desnaturalización térmica de la actividad enzimática.....	92
1.2.2 Clonación y secuenciación del producto ligado.....	93
1.2.3 Extremos requeridos por la actividad RNA ligasa de tomate.....	94
1.2.4 Condiciones óptimas de ligación: efecto del MgCl ₂ , el pH y la fuerza iónica en la actividad RNA ligasa de tomate.....	95
1.3 Requerimiento de ribonucleósidos trifosfato (NTPs) de la actividad RNA ligasa de tomate y cinética de la reacción.....	97
1.4 Especificidad de sustrato de la nueva actividad RNA ligasa de tomate.....	100
1.5 Actividad adeniltransferasa de la RNA ligasa de tomate.....	103
1.6 Identificación de la proteína responsable de la actividad RNA ligasa de tomate por espectrometría de masas.....	106
1.7 Clonación del cDNA de la DNA ligasa 1 de tomate en un vector de expresión..	112
1.8 Expresión de la DNA ligasa 1 de tomate en <i>E. coli</i> : análisis de las actividades RNA ligasa y adeniltransferasa.....	113
1.9 Especificidad de sustrato de la DNA ligasa 1 de tomate.....	115
1.10 Infectividad de los RNAs monoméricos circulares del PSTVd generados por la DNA ligasa 1 de tomate.....	116

2. Circularización de los viroides cloroplásticos (familia <i>Avsunviroidae</i>).....	118
2.1 Clonación de la tRNA ligasa de berenjena.....	119
2.2 Clonación de la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto de la tRNA ligasa de <i>A. thaliana</i>	125
2.3 Expresión en <i>E. coli</i> de las tRNA ligasas de berenjena y <i>A. thaliana</i> y análisis de su actividad enzimática.....	125
2.4 Caracterización de la actividad ligasa de la tRNA ligasa de berenjena.....	127
2.4.1 Condiciones óptimas de la reacción de ligación: efecto del MgCl ₂ , el pH y la fuerza iónica en la actividad.....	127
2.4.2 Requerimiento de ribonucleósido trifosfato.....	129
2.5 Especificidad de sustrato de la tRNA ligasa de berenjena.....	130
DISCUSIÓN.....	135
1. Circularización de los viroides nucleares (familia <i>Pospiviroidae</i>).....	137
2. Circularización de los viroides cloroplásticos (familia <i>Avsunviroidae</i>).....	142
CONCLUSIONES.....	149
BIBLIOGRAFÍA.....	153
AGRADECIMIENTOS.....	175

