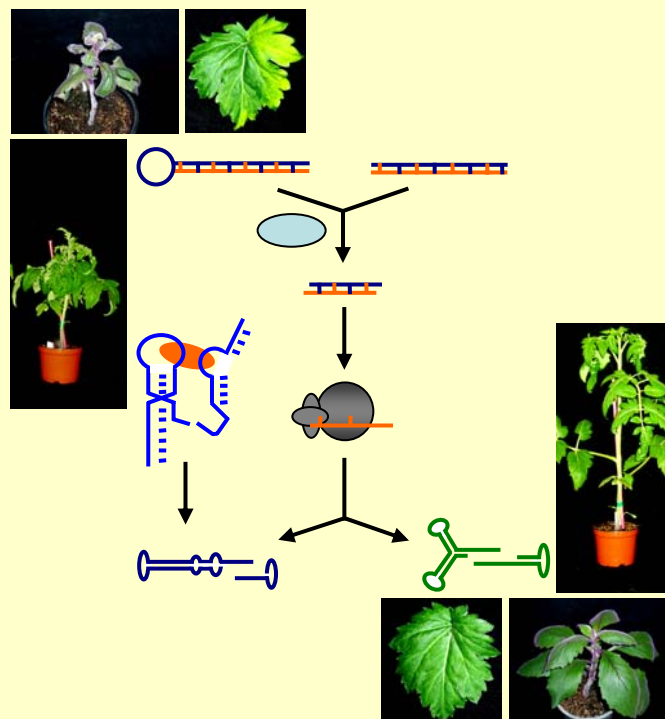




UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Resistencia a viroides inducida por ribozimas de cabeza de martillo y RNAs interferentes



Alberto-Tomás Carbonell Olivares
Valencia, 2008



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Departamento de Biotecnología



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS



RESISTENCIA A VIROIDES INDUCIDA POR RIBOZIMAS DE CABEZA DE MARTILLO Y RNAs INTERFERENTES

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

ALBERTO-TOMÁS CARBONELL OLIVARES

para optar al grado de

DOCTOR INGENIERO AGRÓNOMO

Directores

Ricardo Flores Pedauyé
Selma Gago Zachert

Valencia, 2008

Don Ricardo Flores Pedauy , Doctor en Ciencias Químicas, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y Doña Selma Gago Zachert, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora Postdoctoral, ambos pertenecientes al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Polit cnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia,

CERTIFICAN:

que Don Alberto-Tomás Carbonell Olivares ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título 'Resistencia a viroides inducida por ribozimas de cabeza de martillo y RNAs interferentes' presenta para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 26 de Febrero de 2008.

Fdo. Ricardo Flores Pedauy 

Fdo. Selma Gago Zachert

A mis padres

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
RESUMEN	V
SUMMARY	VII
RESUM.....	IX
INTRODUCCIÓN	3
1. Los viroides.....	3
1.1. Características generales.....	3
1.1.1. Los viroides y su descubrimiento.....	3
1.1.2. Clasificación y estructura.....	3
1.1.3. Biología.....	7
1.1.3.1. Gama de huéspedes.....	7
1.1.3.2. Síntomas y alteraciones citológicas y bioquímicas.....	8
1.1.3.3. Protección cruzada	9
1.1.3.4. Movimiento	10
1.1.3.4.1. Movimiento intracelular.....	10
1.1.3.4.2. Movimiento intercelular y a larga distancia.....	10
1.1.4. Difusión e impacto económico de las enfermedades viroidales	10
1.1.5. Localización subcelular	11
1.1.6. Replicación.....	12
1.1.6.1. Mecanismo de círculo rodante y sus variantes.....	12
1.1.6.2. Transcripción, corte y ligación del RNA	14
1.1.6.2.1. Transcripción.....	14
1.1.6.2.2. Corte	16
1.1.6.2.3. Ligación.....	18
1.2. Viroides objeto de estudio.	19
1.2.1. El viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd).	19
1.2.2. El viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd).....	21
1.2.3. El viroide del moteado clorótico del crisantemo (CChMVd).	23
1.2.4. El viroide latente de la berenjena (ELVd).....	24
2. Las ribozimas.....	26
2.1. Las ribozimas y su descubrimiento en los RNAs viroidales.....	26
2.2. Las ribozimas de cabeza de martillo	27
2.2.1. Variantes naturales con actividad en <i>cis</i>	27
2.2.1.1. Características generales.....	27
2.2.1.2. El papel clave de los bucles periféricos en la actividad catalítica	29
2.2.1.3. Estructuras de cabeza de martillo presentes en los RNAs viroidales ...	31
2.2.2. Ribozimas de cabeza de martillo artificiales con actividad en <i>trans</i>	33
2.2.2.1. Primeros diseños <i>in vitro</i>	33
2.2.2.2. Aplicaciones para el control de enfermedades producidas por virus de plantas	34
2.2.2.3. Una nueva generación de ribozimas más eficientes	36

2.2.2.4. Otros requisitos que idealmente deberían cumplir las ribozimas de cabeza de martillo como herramienta biotecnológica.....	38
3. El silenciamiento génico mediado por RNA	42
3.1. Aspectos generales	42
3.1.1. Indicios iniciales de su existencia.....	42
3.1.2. Funciones biológicas y etapas clave.	42
3.2. El silenciamiento génico mediado por RNA en plantas	44
3.2.1. sRNAs y enzimas.	44
3.2.2. Rutas.....	46
3.2.3. Aplicaciones del silenciamiento génico mediado por RNA para generar resistencia frente a virus	47
3.3. Los viroides y el silenciamiento génico mediado por RNA.....	49
3.3.1. Distintos sRNAs de origen viroidal se acumulan en infecciones naturales	50
3.3.2. Los vd-sRNAs.....	50
3.3.2.1. Características y biogénesis	50
3.3.2.2. Función de los vd-sRNAs	51
3.3.2.2.1. Regulación del título viroidal.....	51
3.3.2.2.2. Papel de los vd-sRNAs en la patogénesis.....	53
3.3.3. Los viroides y la supresión del PTGS.....	55
4. Control de enfermedades de plantas causadas por viroides.	56
OBJETIVOS.....	61
CAPÍTULO I: <i>Effects of the trinucleotide preceding the self-cleavage site on eggplant latent viroid hammerheads: differences in co- and post-transcriptional self-cleavage may explain the lack of AUC in most natural hammerheads.</i>	65
CAPÍTULO II: <i>In vitro and in vivo activity against a structured viroid RNA of trans-acting hammerhead ribozymes with tertiary stabilizing motifs.</i>	91
CAPÍTULO III: <i>Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families.</i>	117
DISCUSIÓN.....	145
1. Resistencia a viroides: antecedentes..	145
2. Las ribozimas de cabeza de martillo de polaridad (+) del ELVd: estudios previos en <i>cis</i>	146
2.1. Características especiales de las ribozimas de polaridad (+) del ELVd.....	146
2.2. Las ribozimas de polaridad (+) del ELVd con trinucleótidos GUC y AUC precediendo al sitio de autocorte son las catalíticamente más activas en condiciones postranscripcionales.....	147
2.3. El autocorte <i>in vivo</i> de las ribozimas de polaridad (+) del ELVd debe ocurrir durante la síntesis del RNA viroidal.....	148
3. Resistencia al PSTVd inducida por ribozimas de cabeza de martillo con motivos de estabilización terciaria.....	150
3.1. Ribozimas con distinto formato <i>trans</i> son activas <i>in vitro</i> a baja concentración de Mg ²⁺ frente a un RNA del PSTVd de polaridad (-) altamente estructurado..	151

3.2. La ribozima extendida derivada del PLMVd es activa <i>in vivo</i> y retrasa la infección del PSTVd.....	154
4. Resistencia a viroides mediante RNAs interferentes.....	155
4.1. ds- e ihpRNAs específicos retrasan o bloquean las infecciones causadas por ciertos viroides.....	155
4.2. Los RNAs viroidales son sustratos de RISC en ciertas condiciones	157
5. Ribozimas de cabeza de martillo <i>versus</i> RNAs interferentes.	160
CONCLUSIONES.	165
BIBLIOGRAFÍA.	169
AGRADECIMIENTOS.	191

Resumen

Los viroides, los agentes infecciosos conocidos más simples, están constituidos por una molécula circular de RNA monocatenario. A pesar de su pequeño tamaño (246-401 nt) y de no codificar proteínas, son capaces de replicarse autónomamente, moverse sistémicamente, y causar enfermedades en ciertas plantas. En el presente trabajo hemos profundizado en el estudio de dos metodologías para el control de viroides basadas en ribozimas de cabeza de martillo con motivos de estabilización terciaria, y en RNAs interferentes que inducen en la planta una respuesta defensiva de silenciamiento génico mediado por RNA.

Las ribozimas derivadas del viroide latente de la berenjena (*Eggplant latent viroid*, ELVd), que en su contexto natural median el autocorte de los RNAs multiméricos generados por un mecanismo de replicación de círculo rodante, son particularmente interesantes para adaptarlas a un formato *trans*. Hemos observado que la secuencia del trinucleótido que precede el sitio de autocorte de la ribozima de polaridad (+) del ELVd afecta a su actividad autocatalítica. Las constantes catalíticas de distintas variantes de este trinucleótido (AUA, AUC, GUA, GUC) determinadas *in vitro* a baja concentración de magnesio son diferentes en condiciones co- y postranscripcionales. Estos resultados sugieren que la ribozima de polaridad (+) del ELVd, y muy posiblemente otras ribozimas de cabeza de martillo naturales, han sido evolutivamente seleccionadas para actuar durante la transcripción de los RNAs viroidales, y que el trinucleótido AUC que precede al sitio de autocorte no se encuentra en la mayoría de las ribozimas de cabeza de martillo naturales por favorecer la adopción de estructuras metaestables catalíticamente inactivas durante la transcripción. La variante ELVd(+)-GUC, que presenta una constante catalítica alta e induce el corte de una amplia fracción del transcrito primario, fue seleccionada para diseñar variantes en *trans* frente al viroide del tubérculo fusiforme de la patata (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd).

Varias ribozimas de cabeza de martillo, con formato *trans* discontinuo o extendido y motivos de estabilización terciaria derivadas de las ribozimas de polaridad (+) del ELVd y (-) del viroide del mosaico latente del melocotonero (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd), catalizan *in vitro* a concentraciones fisiológicas de magnesio la degradación específica de un RNA muy estructurado de 464 nt del PSTVd. La variante más eficiente

resultó ser una ribozima con formato extendido basada en la de polaridad (-) del PLMVd. Experimentos de agroinfiltración en *N. benthamiana*, en los que se coagroinfiltran plásmidos recombinantes que expresan esta última variante y un RNA sustrato del PSTVd mostraron una reducción en la acumulación del mismo en las hojas infiltradas respecto a un control con una ribozima similar pero sin motivos de estabilización terciaria. Cuando la ribozima estabilizada se coexpresó con un RNA infeccioso del PSTVd retrasó la acumulación de las formas genómicas viroidales en las hojas superiores no infiltradas.

Por último, la coinoculación mecánica de RNAs genómicos viroidales con un exceso de RNAs bicatenarios (dsRNAs) homólogos indujo una reducción significativa de la infectividad en cuatro sistemas distintos [viroide de la exocortis de los cítricos (*Citrus exocortis viroid*, CEVd)-gynura, CEVd-tomate, PSTVd-tomate y viroide del moteado clorótico del crisantemo (*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, CChMVd)-crisantemo] que incluyen a miembros de las dos familias de viroides. Los efectos fueron específicos de secuencia, dependientes de la temperatura de cultivo de las plantas y, en algún caso, de la dosis de dsRNAs. En los sistemas CEVd-gynura y CEVd-tomate se observó un efecto similar al coinocular el viroide con un exceso de pequeños RNAs viroidales generados *in vitro*. Además, la coagroinfiltración de plásmidos recombinantes que expresan un RNA infeccioso del PSTVd y un RNA homólogo con plegamiento en horquilla (generado a partir de una construcción con secuencias del PSTVd invertidas separadas por un intrón) retrasó la acumulación del viroide en las hojas infiltradas y en las superiores no infiltradas. La especificidad de la protección obtenida con estas dos estrategias (coinoculación con dsRNAs y expresión transitoria de RNAs con plegamiento en horquilla) sugiere que en ciertas condiciones los viroides son dianas de RISC.

Summary

Viroids, the simplest infectious pathogens, are formed by a single-stranded circular RNA. Despite their small size (246-401 nt) and their inability for coding proteins, they replicate autonomously, move systemically, and incite diseases in certain plants. In the present work we have examined two methods for viroid control based on hammerhead ribozymes with tertiary stabilizing motifs, and on interfering RNAs that induce a plant defensive response.

Eggplant latent viroid (ELVd) hammerheads, which in its natural context mediate self-cleavage of the multimeric RNA intermediates generated in a rolling-circle mechanism of replication, appear particularly suited for a *trans*-cleaving design. We have observed that the trinucleotide preceding the self-cleavage site of ELVd (+) hammerhead affects its activity. The catalytic constants of some trinucleotide variants (AUA, AUC, GUA, GUC) measured *in vitro* at low Mg^{2+} concentration are different in co- and post-transcriptional conditions. These results suggest that the ELVd (+) hammerhead (and most likely other natural hammerheads) have been selected during evolution for acting during transcription, and that the AUC trinucleotide preceding the self-cleavage site is excluded from the majority of natural hammerheads for adopting catalytically-inactive metastable structures during transcription. The ELVd(+)-GUC variant, which has a high catalytic constant and induces cleavage of a large fraction of the primary transcript, was chosen for designing *trans*-cleaving variants against *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) RNA.

Trans-cleaving hammerheads with discontinuous or extended format and tertiary stabilizing motifs derived from ELVd (+) and *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) (-) hammerheads catalyzed cleavage of a structured PSTVd RNA of 464 nt *in vitro* at physiological Mg^{2+} concentration. The most efficient ribozyme had an extended format and was derived from the PLMVd (-) wild-type hammerhead. Agroinfiltration experiments in *N. benthamiana* in which recombinant plasmids expressing this later hammerhead and a PSTVd RNA substrate, showed a decrease of substrate accumulation in the infiltrated leaves with respect to a control with a similar hammerhead lacking the tertiary stabilizing motifs. When the stabilized hammerhead

was expressed simultaneously with an infectious PSTVd RNA the accumulation of the genomic viroid RNA in the upper non-infiltrated leaves was delayed.

Finally, mechanical co-inoculation of viroid genomic RNAs with an excess of their homologous dsRNAs led to a significant reduction of infectivity in four different systems [*Citrus exocortis viroid* (CEVd)-gynura, CEVd-tomato, PSTVd-tomato and *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd)-chrysanthemum] which include members of both viroid families. The effects were sequence specific, depended on the plant growing temperature and, in some cases, on the dose of dsRNAs. A similar effect was observed in the CEVd-gynura and CEVd-tomato systems when the viroid was co-inoculated with an excess of homologous viroid-small RNAs generated *in vitro*. Moreover, co-agroinfiltration of recombinant plasmids expressing an infectious PSTVd RNA and an homologous hairpin RNA (from a construct with an inverted repeat sequence from PSTVd separated by an intron) delayed viroid accumulation in the infiltrated and in the upper non-infiltrated leaves. The specificity of the protection afforded by these two different methodologies (co-inoculation with dsRNAs and transient expression of hairpin RNAs) suggests that, in certain conditions, viroids are substrates of RISC.

Resum

Els viroides, els agents infecciosos més simples coneguts, estan constituïts per una molècula circular de RNA monocatenari. Malgrat la seua petita mida (246-401 nt) i de no codificar cap proteïna, són capaços de replicar-se autònomament, moures sistèmicament, i causar malalties en certes plantes. Al present treball hem aprofundit en l'estudi de dues metodologies pel control de viroides basades en ribozims de cap de martell amb motius d'estabilització terciària i en RNAs interferents que indueixen en la planta una resposta defensiva.

Els ribozims derivats del viroide latent de l'albergínia (*Eggplant latent viroid*, ELVd), que al seu context natural intervenen a l'autotall dels RNAs multimèrics generats a través d'un mecanisme de replicació de cercle rodant, són particularment interessants per adaptar-los a un format *trans*. Hem observat que la seqüència del trinucleòtid que precedeix el lloc d'autotall del ribozim de polaritat (+) del ELVd afecta a la seua activitat autocatalítica. Les constants catalítiques de distintes variants d'aquest trinucleòtid (AUA, AUC, GUA, GUC) determinades *in vitro* a baixa concentració de magnesi són diferents en condicions cotranscripcionals i postranscripcionals. Els resultats suggereixen que el ribozim de polaritat (+) del ELVd ha estat seleccionat per actuar durant la transcripció dels RNAs viroidals, i que el trinucleòtid AUC no es troba a la majoria dels ribozims de cap de martell naturals perquè afavoreix l'adopció d'estructures metaestables catalíticament inactives durant la transcripció. La variant ELVd(+)-GUC, que presentà una constant catalítica alta i va induir el tall d'una ampla fracció del transcrit primari, fou seleccionada per a dissenyar variants en *trans* front al viroide del tubercle fusiforme de la creïlla (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd).

Varis ribozims de cap de martell amb format *trans* discontinu o estés i motius d'estabilització terciària derivades dels ribozims de polaritat (+) del ELVd i (-) del viroide del mosaic latent del presseguer (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) catalitzen *in vitro* a concentracions fisiològiques de magnesi la degradació específica d'un RNA molt estructurat de 464 nt del PSTVd. La variant més eficient resultà ser un ribozim amb format estés basat en el de polaritat (-) del PLMVd. Experiments d'agroinfiltració en *N. benthamiana* als quals es coagroinfiltraven plasmidis recombinants que expressen aquesta última variant i un RNA substrat del PSTVd mostraren una reducció en

l'acumulació d'aquest últim en les fulles infiltrades respecte d'un control amb un ribozim semblant però sense motius d'estabilització terciària. Una vegada el ribozim estabilitzat es coexpressà amb un RNA infecció del PSTVd retrasà l'acumulació de les formes genòmiques viroidals en fulles superiors no infiltrades.

Finalment, la coinoculació mecànica de RNAs genòmics viroidals amb un excés de RNAs bicatenaris (dsRNAs) homòlegs va induir una reducció significativa de la infectivitat en quatre sistemes distints [viroide de l'exocortis dels cítrics (*Citrus exocortis viroid*, CEVd)-gynura, CEVd-tomaca, PSTVd-tomaca i viroide del clapat cloròtic del crisantem (*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, CChMVd)-crisantem] que inclouen membres d'ambdues famílies de viroides. Els efectes sigueren específics de seqüència, dependents de la temperatura de cultiu de la planta i de vegades de la dosi de dsRNAs. Als sistemes CEVd-gynura i CEVd-tomaca s'observà un efecte semblant al coinocular el viroide amb un excés de petits RNAs viroidals generats *in vitro*. A més a més, la coagroinfiltració de plasmidis recombinants que expressen un RNA infecció del PSTVd i un RNA homòleg amb un plegament en forqueta va retardar l'acumulació del viroide en fulles infiltrades i en les fulles superiors no infiltrades. L'especificitat de la protecció obtinguda amb aquestes dues estratègies (coinoculació amb dsRNAs i expressió transitòria de RNAs amb un plegament en forqueta) distintes suggereix que en certes condicions els viroides són dianes de RISC.

Introducción

1. Los viroides

1.1. Características generales

1.1.1. Los viroides y su descubrimiento

Los viroides son pequeños RNAs circulares con un elevado contenido en estructura secundaria capaces de infectar plantas y causar enfermedades (Diener, 2003; Tabler y Tsagris, 2004; Flores *et al.*, 2005; Daròs *et al.*, 2006; Ding e Itaya, 2007). Son los agentes infecciosos más simples de la escala biológica (Diener, 1971a), ya que su tamaño es unas diez veces inferior al del genoma de los virus de RNA más sencillos. A pesar de este mínimo tamaño (246-401 nt) y de no codificar ninguna proteína (Diener, 1987), los viroides tienen capacidad para replicarse autónomamente parasitando la maquinaria transcripcional de sus huéspedes.

Theodor Diener fue su descubridor en 1970-71 (revisado en Diener, 2003), tras varios años de intensas investigaciones encaminadas a determinar el agente causal de la enfermedad del tubérculo fusiforme de la patata ('potato spindle tuber'), que había sido descrita en 1922 por Martin (mencionado en Diener, 1987). Durante más de cuarenta años, y debido a la naturaleza contagiosa de la enfermedad y a que no se encontraron bacterias u hongos asociados, se pensó que la misma estaba producida por un virus, que por entonces era el patógeno conocido más pequeño capaz de infectar plantas y causar enfermedad. Posteriormente, una serie de experimentos mostraron que el agente infeccioso tenía un bajo coeficiente de sedimentación, que era sensible al tratamiento con ribonucleasas (pero no con desoxiribonucleasas), fenol, cloroformo, n-butanol y etanol, y que estaba compuesto por pequeñas moléculas de RNA libre (no asociadas a proteínas). Fue entonces, después de desvelar sus propiedades físico-químicas atípicas, cuando se propuso el término 'viroide' (Diener, 1971a), denominándose *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) al agente causal de la enfermedad.

1.1.2. Clasificación y estructura

En la actualidad se han caracterizado biológica y molecularmente unas treinta especies de RNAs viroidales y numerosas variantes de secuencia de las mismas (Fig. 1). Recientemente se han recopilado y clasificado todas éstas (Flores *et al.*, 2005), y se ha creado una base de datos (Rocheleau y Pelchat, 2006) que contiene las secuencias y

estructuras secundarias de las variantes de los distintos viroides que se han descrito (<http://subviral.med.uottawa.ca>).

POSPIVIROIDAE	POSPIVIROID	PSTVd (Viroide del tubérculo fusiforme de la patata)	359 nt	Gross <i>et al.</i>, 1978
		TCDVd (Viroide del enanismo clorótico del tomate)	360 nt	Singh <i>et al.</i> , 1999
		MPVd (Viroide de la papita mexicana)	360 nt	Martínez-Soriano <i>et al.</i> , 1996
		TPMVd (Viroide de la planta macho del tomate)	360nt	Kiefer <i>et al.</i> , 1983
		CEVd (Viroide de la exocortis de los cítricos)	371 nt	Gross <i>et al.</i> , 1982
		CSVd (Viroide del enanismo del crisantemo)	356 nt	Haseloff y Symons, 1981
		TASVd (Viroide del enanismo apical del tomate)	360 nt	Kiefer <i>et al.</i> , 1983
		IrVd 1 (Viroide 1 de iresine)	370 nt	Spieker, 1996a
	CLVd (Viroide latente de columnea)	370 nt	Hammond <i>et al.</i> , 1989	
	HOSTUVIROID	HSVd (Viroide del enanismo del lúpulo)	297 nt	Ohno <i>et al.</i>, 1983
	COCADVIROID	CCCvD (Viroide del cadang-cadang del cocotero)	246 nt	Haseloff <i>et al.</i>, 1982
		CTIVd (Viroide del tinangaja del cocotero)	254 nt	Keese <i>et al.</i> , 1988
		HLVd (Viroide latente del lúpulo)	256 nt	Puchta <i>et al.</i> , 1988
		CVd-IV (Viroide IV de los cítricos)	284 nt	Puchta <i>et al.</i> , 1991
	APSCAVIROID	ASSVd (Viroide de la piel cicatrizada de la manzana)	329 nt	Hashimoto y Koganezawa, 1987
CVd-III (Viroide III de los cítricos)		294 nt	Rakowski <i>et al.</i> , 1994	
ADFVd (Viroide del fruto picado del manzano)		306 nt	Di Serio <i>et al.</i> , 1996	
GYSVd-1 (Viroide 1 del moteado amarillo de la vid)		367 nt	Koltunow y Rezaian, 1988	
GYSVd-2 (Viroide 2 del moteado amarillo de la vid)		363 nt	Koltunow <i>et al.</i> , 1989	
CBLVd (Viroide de la hoja curvada de los cítricos)		318 nt	Ashulin <i>et al.</i> , 1991	
PBCVd (Viroide de los chancros pustulosos del peral)		315 nt	Hernández <i>et al.</i> , 1992	
AGVd (Viroide australiano de la vid)	369 nt	Rezaian, 1990		
COLEVIROID	CbVd-1 (Viroide 1 del coleus blumei)	248 nt	Spieker <i>et al.</i>, 1990	
	CbVd-2 (Viroide 2 del coleus blumei)	301 nt	Spieker, 1996b	
	CbVd-3 (Viroide 3 del coleus blumei)	361 nt	Spieker <i>et al.</i> , 1996	
AVSUNVIROIDAE	AVSUNVIROID	ASBVd (Viroide del manchado solar del aguacate)	247 nt	Symons, 1981
	PELAMVIROID	PLMVd (Viroide del mosaico latente del melocotonero)	337 nt	Hernández y Flores, 1992
		CChMVd (Viroide del moteado clorótico del crisantemo)	399 nt	Navarro y Flores, 1997
	ELAVIROID*	ELVd (Viroide latente de la berenjena)	333 nt	Fadda <i>et al.</i>, 2003a

* Pendiente de aprobación por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus

Figura 1. Clasificación de los viroides caracterizados molecularmente (Flores *et al.*, 2005; Rocheleau y Pelchat, 2006). Éstos se agrupan en dos familias, *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, que se dividen en cinco y tres géneros, respectivamente. Las especies tipo de cada género se destacan con negrita sobre fondo gris. Para cada especie se indica la abreviatura de su nombre en inglés (junto con el nombre en castellano entre paréntesis), el tamaño en nucleótidos de la variante típica, y la referencia de la publicación en donde se describió su estructura molecular. Además, otros tres viroides de los cítricos [el viroide I-LSS (CVd-I-LSS, Ito *et al.*, 2000), el viroide OS (CVd-OS, Ito *et al.*, 2001) y el viroide V (CVd-V, Serra *et al.*, 2008)] han sido propuestos como miembros del género *Apscaviroid*.

El análisis de las estructuras primarias de los viroides conocidos ha conducido a clasificarlos en dos grandes familias: *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae* (Fig. 1). La especie tipo de la primera familia es el PSTVd (Gross *et al.*, 1978), y los distintos miembros que la componen se caracterizan por compartir entre sí una serie de motivos conservados de secuencia y estructura, que incluyen la región central conservada ('central conserved region', CCR), la región terminal conservada ('terminal conserved region',

TCR) y la horquilla terminal conservada ('terminal conserved hairpin', TCH) (Fig. 2A), por replicarse y acumularse en el núcleo, y por la ausencia de ribozimas de cabeza de martillo. La secuencia de la CCR, y la presencia o ausencia de TCR y TCH, permiten clasificar a los miembros de esta familia en cinco géneros. La especie tipo de la segunda familia es el viroide del manchado solar del aguacate (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) (Symons, 1981) que, junto a los otros tres miembros que la integran, carece de motivos conservados, se replica y acumula en el cloroplasto, y sus RNAs de ambas polaridades se autocortan por medio de ribozimas de cabeza de martillo (Flores *et al.*, 2005).

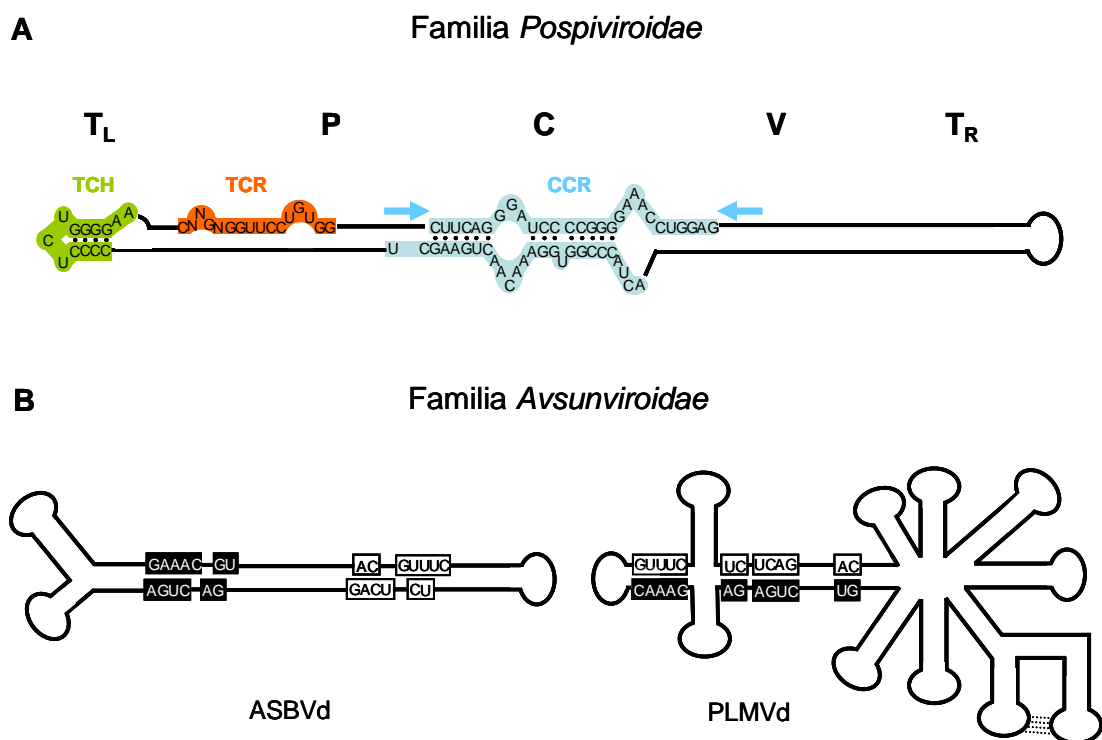


Figura 2. Estructura de los viroides. (A) Representación esquemática de la estructura secundaria de tipo varilla propuesta para los miembros del género *Pospiviroid* de la familia *Pospiviroidae*. La localización aproximada de los cinco dominios se indica en la parte superior de la figura: C (central), P (patogénico), V (variable) y T_L y T_R (terminal izquierdo y terminal derecho, respectivamente). Los nucleótidos que forman las regiones conservadas CCR, TCR y TCH se representan en negro sobre un fondo azul, naranja y verde, respectivamente. Las flechas que flanquean la rama superior de la CCR indican los nucleótidos que forman, junto con los estrictamente conservados, repeticiones invertidas imperfectas. N indica cualquier nucleótido. (B) Representación esquemática de las estructuras secundarias de tipo cuasi-varilla y ramificada del ASBVd y del PLMVd, respectivamente, de la familia *Avsunviroidae*. Los nucleótidos estricta o altamente conservados en las ribozimas de cabeza de martillo naturales se representan en recuadros con fondo negro y blanco para las polaridades positiva y negativa respectivamente. En el viroide del mosaico latente del melocotonero (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd), la interacción terciaria del tipo 'kissing-loops' se representa con líneas discontinuas.

Mediante cálculos termodinámicos se ha determinado la estructura secundaria de mínima energía libre que pueden adoptar los viroides *in vitro* en condiciones no desnaturalizantes. La conformación más estable propuesta para la mayoría de los miembros de la familia *Pospiviroidae* es de tipo varilla (Fig. 2A), que es la que se observa al microscopio electrónico con preparaciones purificadas del PSTVd (Sogo *et al.*, 1973; Sanger *et al.*, 1976), aunque también se han descrito otras conformaciones posibles de cuasi-varilla. En estas conformaciones de varilla o cuasi-varilla formadas como consecuencia de la gran autocomplementariedad de las secuencias viroidales, predominan regiones de apareamiento intramolecular que se alternan con pequeños bucles de bases desapareadas. Las repeticiones y deleciones observadas en varios miembros de la familia *Pospiviroidae* siempre preservan la estructura secundaria de tipo varilla, lo que indica su probable existencia *in vivo*.

A partir de comparaciones de secuencia se han definido cinco dominios en la estructura de tipo varilla del PSTVd y de otros viroides relacionados (Keese y Symons, 1985) (Fig. 2A): el dominio central (C) flanqueado por los dominios patogénico (P) y variable (V), y los dominios terminales derecho e izquierdo (TR y TL). La CCR está localizada en el dominio C, y la TCR y la TCH en el dominio TL. A estos dominios estructurales se les ha asociado funciones específicas. El dominio C contiene el sitio donde los RNAs viroidales multiméricos de polaridad (+) son cortados y ligados (Baumstark *et al.*, 1997; Gas *et al.*, 2007). El dominio P se asoció con los efectos patogénicos en el PSTVd y otros viroides relacionados, aunque trabajos posteriores mostraron que la expresión de síntomas también está regulada por determinantes discretos situados en otros dominios (Sano *et al.*, 1992; Reanwarakorn y Semancik, 1998; Qi y Ding, 2003b). Por último, el dominio TR parece estar implicado en fenómenos de recombinación (Keese y Symons, 1985) y el TL en modular la replicación o acumulación (Sano e Ishiguro, 1998).

Dentro de la familia *Avsunviroidae*, el ASBVd y el viroide latente de la berenjena (*Eggplant latent viroid*, ELVd) adoptan estructuras secundarias de cuasi-varilla (Fig. 2B) (Symons, 1981; Fadda *et al.*, 2003a). Sin embargo, el viroide del mosaico latente del melocotonero (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) (Hernández y Flores, 1992) y el del moteado clorótico del crisantemo (*Chrysanthemum chlorotic mottled viroid*, CChMVd)

(Navarro y Flores, 1997) presentan una conformación ramificada (Fig. 2B) estabilizada por elementos de estructura terciaria denominados seudonudos del tipo 'kissing-loops'. Dichas interacciones han sido identificadas en el PLMVd mediante experimentos *in vitro* (Bussière *et al.*, 2000), y en el CChMVd mediante bioensayos de infectividad con diferentes mutantes naturales y artificiales (Gago *et al.*, 2005). Además, las propiedades estructurales de estos dos viroides junto con su insolubilidad en LiCl 2 M, ha conducido a clasificarlos en un mismo género (*Pelamoviroid*). ASBVd es el único viroide con un alto contenido en A+U (62%) (Hutchins *et al.*, 1986) y forma un género (*Avsunviroid*) con una única especie, como también sucede con el ELVd (*Elaviroid*), cuyas propiedades se encuentran a mitad de camino entre las de los dos géneros anteriores (Fadda *et al.*, 2003a). Esta clasificación está avalada por reconstrucciones filogenéticas con las secuencias completas de los viroides (Flores *et al.*, 2005) y por la diferente localización subcelular de las especies tipo de las dos familias.

También se han caracterizado elementos de estructura terciaria en los miembros de la familia *Pospiviroidae*. Uno de los más interesantes es el llamado bucle E, identificado inicialmente en el 5S rRNA y posteriormente detectado *in vitro* en el PSTVd mediante radiación UV (Branch *et al.*, 1985) y modificación con dimetilsulfato (Gast *et al.*, 1996). Es un motivo de RNA mantenido por interacciones no canónicas, al que podría unirse alguna proteína involucrada en la replicación o el transporte intranuclear (Flores *et al.*, 1997). Trabajos recientes proponen un papel para el bucle E en la replicación del PSTVd (Baumstark *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 2006) y del viroide de la exocortis de los cítricos (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) (Gross *et al.*, 1982; Gas *et al.*, 2007), en la especificidad de huésped (Zhong *et al.*, 2006) y en la patogénesis (Qi y Ding, 2003b), a la vez que otros han confirmado su existencia *in vivo* (Eiras *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Recientemente, se ha caracterizado un elemento similar de estructura terciaria en el viroide cloroplástico PLMVd (Hernández *et al.*, 2006).

1.1.3. Biología

1.1.3.1. Gama de huéspedes

Los viroides son los agentes etiológicos de un importante número de enfermedades que afectan a cultivos herbáceos y leñosos de interés económico (patata, tomate,

pepino, lúpulo, palmera cocotera, vid), a frutales subtropicales y de clima templado (aguacate, melocotonero, ciruelo, manzano, peral y cítricos), y a algunas plantas ornamentales (crisantemo y coleo). Únicamente los viroides causantes del 'cadang-cadang' (*Coconut cadang-cadang viroid*, CCCVd) (Haseloff *et al.*, 1982) y del 'tinangaja' del cocotero (*Coconut tinangaja viroid*, CTiVd) (Keese *et al.*, 1988) infectan monocotiledóneas, mientras que los demás infectan dicotiledóneas. Algunos viroides, como el viroide del enanismo del lúpulo (*Hop stunt viroid*, HSVd) (Ohno *et al.*, 1983), tienen una amplia gama de huéspedes mientras que otros, como los miembros de la familia *Awsunviroidae*, infectan únicamente a los huéspedes naturales en que fueron inicialmente descritos y a especies relacionadas.

1.1.3.2. Síntomas y alteraciones citológicas y bioquímicas

A diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los virus, la replicación y acumulación de los viroides y la aparición de los síntomas que inducen se ven favorecidos por temperaturas elevadas (25-35 °C) (Sänger y Ramm, 1975) y por altas intensidades luminosas (Harris y Browning, 1980). Por ello, la mayoría de enfermedades viroidales se presentan en zonas tropicales y subtropicales, en áreas continentales con veranos cálidos, y en cultivos de invernadero.

Sin embargo, los síntomas ocasionados por los viroides en sus huéspedes son similares a los provocados por los virus. Las alteraciones más frecuentes incluyen: i) enanismo de la planta, ii) epinastia, distorsiones, clorosis, rugosidad y necrosis de las hojas, iii) necrosis, distorsiones y decoloraciones de los frutos, iv) agrietamientos del tallo y de la corteza, v) disminución del tamaño y estriados en los pétalos, y vi) malformaciones en semillas y órganos de reserva. Efectos menos aparentes incluyen retrasos en la brotación foliar, en la floración y en la maduración del fruto, así como en el patrón de desarrollo de los árboles adultos. Algunas infecciones por viroides causan la muerte de las plantas mientras que otras inducen síntomas suaves o son asintomáticas. Esta última situación suele ser común en plantas silvestres infectadas de forma natural, que pueden servir como reservorios (Flores *et al.*, 2005).

Por otra parte, mediante microscopía electrónica se han observado alteraciones citológicas inducidas por miembros de la familia *Pospiviroidae* consistentes en

malformaciones de la pared celular y acumulación de depósitos electrodensos (Lawson y Hearon, 1971; Semancik y Vanderwoude, 1976; Wahn *et al.*, 1980) y alteraciones de la estructura de los cloroplastos (Hari, 1980; Semancik y Conejero, 1987). Estudios paralelos con miembros de la familia *Avsunviroidae* han revelado distorsiones en cloroplastos y presencia de cuerpos membranosos en las regiones cloróticas de hojas infectadas con el ASBVd, mientras que en hojas totalmente cloróticas se observan lo que parecen proplastidios alterados en vez de cloroplastos (Desjardins, 1987). Esta última observación ha sido reproducida en hojas infectadas con el PLMVd, alguna de cuyas variantes inducen una clorosis extrema (calico) que en los casos más agudos cubre toda la superficie foliar (Malfitano *et al.*, 2003; Rodio *et al.*, 2006; Rodio *et al.*, 2007). En cuanto a alteraciones bioquímicas, en plantas infectadas por el CEVd se ha detectado la acumulación de varias proteínas del tipo PR ('pathogenesis related') (Conejero y Semancik, 1977; Conejero *et al.*, 1979; Rodrigo *et al.*, 1991) y cambios significativos en los niveles de ciertas hormonas y metabolitos como etileno y poliaminas (Bellés *et al.*, 1991; Bellés *et al.*, 1993; Vidal *et al.*, 2003; Bellés *et al.*, 2006). En plantas infectadas por las variantes del PLMVd que inducen la sintomatología calico se han observado alteraciones en la maduración de los RNAs ribosómicos (rRNAs) plastídicos (Rodio *et al.*, 2007).

1.1.3.3. Protección cruzada

Fenómenos de esta clase se pusieron de manifiesto al observar que la capacidad de los miembros de ambas familias para infectar un huésped puede estar influida por infecciones previas con otras cepas del mismo viroide o de otro relacionado (Niblett *et al.*, 1978; Khoury *et al.*, 1988; Pallás y Flores, 1989; De la Peña *et al.*, 1999; De la Peña y Flores, 2002). Más concretamente, cuando una planta infectada previamente con una variante suave de un viroide se reinocula con una variante agresiva del mismo viroide, no se expresan los síntomas típicos de la segunda variante, y su acumulación se atenúa o retrasa. La similitud de secuencia requerida en los fenómenos de protección cruzada sugiere la implicación de mecanismos relacionados con el silenciamiento génico mediado por RNA (ver más adelante).

1.1.3.4. Movimiento

1.1.3.4.1. Movimiento intracelular

El movimiento de los viroides dentro de la célula permite su localización en los orgánulos donde tiene lugar su replicación y acumulación. El transporte al núcleo parece ser un proceso específico y regulado en el PSTVd (Woo *et al.*, 1999). Además, este viroide es capaz de transportar a dicho orgánulo un RNA fusionado a él (Zhao *et al.*, 2001), lo que sugiere que tiene una señal de transporte nuclear todavía sin identificar. Por otro lado, se desconocen los mecanismos que controlan la entrada y salida del cloroplasto de los miembros de la familia *Awsunviroidae*.

1.1.3.4.2. Movimiento intercelular y a larga distancia

Los viroides son capaces de infectar sistémicamente a sus plantas huésped, y por tanto deben moverse desde las células que infectan inicialmente a otras vecinas para posteriormente invadir el resto de la planta. El movimiento célula a célula en el PSTVd tiene lugar vía plasmodesmos (Ding *et al.*, 1997), mientras que el movimiento a larga distancia ocurre a través del floema siguiendo la ruta de los fotoasimilados desde los órganos fuente a los órganos sumidero (Palukaitis, 1987; Zhu *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2007). Además, el PSTVd queda excluido de los ápices meristemáticos de plantas infectadas de tomate y *Nicotiana benthamiana* (Zhu *et al.*, 2001), mientras que el PLMVd sí que parece invadir células muy cercanas a dichos ápices meristemáticos de plantas de melocotonero infectadas (Rodio *et al.*, 2007). Estas observaciones sugieren que mecanismos distintos rigen esta clase de movimiento en los miembros de las dos familias.

La translocación de los viroides por el floema está mediada muy probablemente por proteínas del huésped, con las que formarían complejos capaces de interaccionar con los plasmodesmos y aumentar su límite de exclusión (Gómez y Pallás, 2001 y 2004; Owens *et al.*, 2001; Ding e Itaya, 2007).

1.1.4. Difusión e impacto económico de las enfermedades viroidales

Una de las principales vías por las que se produce la difusión natural de los viroides es a través de los instrumentos de poda y corte que previamente se han empleado con

plantas infectadas. Son raros los casos, como el del PSTVd en patata o el ASBVd en aguacate, de transmisión eficiente por polen o semilla (Fernow *et al.*, 1970; Desjardins *et al.*, 1979). La transmisión por insectos vectores se ha constatado para el PSTVd, que al menos es transmitido por áfidos de las especies *Macrosiphum euphorbiae* (De Bokx y Piron, 1981) y *Myzus persicae* (Querci *et al.*, 1997; Syller *et al.*, 1997). Además, la transmisión por esta última especie a plantas de patata y tomate se encuentra asistida por el polerovirus del enrollado de la hoja de patata (*Potato leaf roll virus*, PLRV), cuya proteína de cubierta encapsida al RNA viroidal permitiéndole así su difusión en condiciones de campo (Querci *et al.*, 1997; Syller *et al.*, 1997). El viroide de la planta macho del tomate (*Tomato planta macho viroid*, TPMVd) (Kiefer *et al.*, 1983) también parece ser transmitido por áfidos en condiciones ecológicas específicas (Galindo *et al.*, 1986).

Al igual que los virus, los viroides causan importantes pérdidas de rendimiento y calidad en los cultivos afectados. Sin embargo, para los viroides sólo se disponen de datos relativos a pérdidas económicas en algunos casos particulares. Por ejemplo, se ha estimado que el PSTVd causa entre un 17 y un 64% de pérdidas en la producción de tubérculos de patata dependiendo de la cepa de viroide y del cultivar empleado (Singh *et al.*, 1971), y si bien las pérdidas son menores el primer año de la infección, pueden alcanzar el 100% en generaciones posteriores (Pfannenstiel y Slack, 1980). Otro ejemplo a este respecto son las reducciones de entre un 40 y un 50% en la producción de pepinos causadas por el HSVd, que también dependen del cultivar y de la cepa de viroide (Sasaki y Shikata, 1977a y b; Kryczynski *et al.*, 1988). Sin embargo, el ejemplo más dramático son los 30 millones de palmeras cocoteras que se estima murieron hasta 1982 en Filipinas a causa de la enfermedad del cadang-cadang causada por el CCCVd (Zelazny *et al.*, 1982).

1.1.5. Localización subcelular

El sitio de localización subcelular de los miembros de la familia *Pospiviroidae* se estudió inicialmente mediante centrifugación diferencial, observándose la acumulación del PSTVd y viroides similares fundamentalmente en el núcleo (Diener, 1971b; Sanger, 1972; Takahashi y Diener, 1975; Semancik *et al.*, 1976; Schumacher *et al.*, 1983;

Spiesmacher *et al.*, 1983). Estudios posteriores de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes y microscopía láser confocal de preparaciones de núcleos purificados mostraron que el PSTVd se encuentra localizado en el nucleolo (Harders *et al.*, 1989). Otros estudios similares más recientes en protoplastos de *N. benthamiana* muestran que las cadenas de polaridad negativa del PSTVd se concentran en el nucleoplasma, mientras que las de polaridad positiva se detectan tanto en el nucleoplasma como en el nucleolo (Qi y Ding, 2003a). Estos datos sugieren que el PSTVd se transcribe en el nucleoplasma y que los intermediarios de polaridad positiva son transferidos y procesados en el nucleolo, donde también se procesan los precursores de otros RNAs celulares (Sirri *et al.*, 2008).

Los miembros de la familia *Avsunviroidae* se acumulan en el cloroplasto de células infectadas, donde se detectan las cadenas de ambas polaridades del ASBVd (Bonfiglioli *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1994; Navarro *et al.*, 1999) y del PLMVd (Bussière *et al.*, 1999), lo que sugiere que estos dos viroides también se replican en este orgánulo.

1.1.6. Replicación

1.1.6.1. Mecanismo de círculo rodante y sus variantes

La estructura circular de los viroides junto con la presencia en tejidos infectados por el PSTVd de otros RNAs viroidales oligoméricos de polaridad negativa (Branch *et al.*, 1981; Rohder y Sängler, 1981; Owens y Diener, 1982), así como de RNAs viroidales oligoméricos de ambas polaridades en tejidos infectados por el ASBVd (Bruening *et al.*, 1982; Hutchins *et al.*, 1985), condujeron a proponer un mecanismo de replicación de círculo rodante con sólo intermediarios de RNA (Branch y Robertson, 1984; Ishikawa *et al.*, 1984; Hutchins *et al.*, 1985).

Inicialmente se formuló un primer mecanismo de círculo rodante para explicar la replicación del PSTVd (Branch *et al.*, 1981) que más tarde se desglosó en dos variantes denominadas simétrica y asimétrica en función de si el molde de polaridad (-) empleado en la segunda parte del ciclo es circular o lineal respectivamente (Branch y Robertson, 1984).

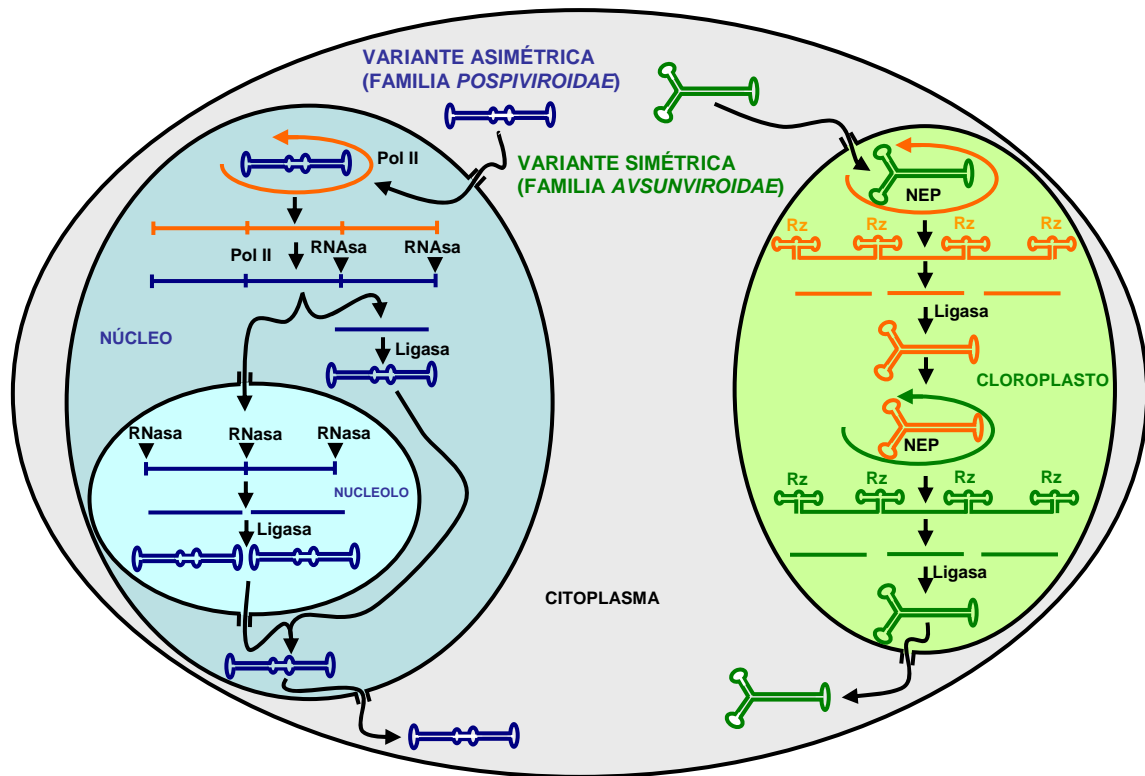


Figura 3. Mecanismo de círculo rodante con intermediarios de RNA propuesto para la replicación de los viroides (adaptado de Branch y Robertson, 1984; Symons, 1992; Daròs *et al.*, 1994; Flores *et al.*, 2005; Ding e Itaya, 2007). En la parte izquierda se representa la variante asimétrica con un único círculo rodante seguida por los miembros de la familia *Pospiviroidae* en el núcleo, donde una RNasa y una RNA ligasa del huésped median el corte de los intermediarios oligoméricos y la ligación de los monómeros resultantes respectivamente. En la parte derecha se representa la variante simétrica con dos círculos rodantes seguida por los miembros de la familia *Avsunviroidae* en el cloroplasto, donde los oligómeros viroidales se autocortan mediante ribozimas (Rz) generándose RNAs lineales de longitud completa con extremos 5'-OH y 2',3'-fosfodiéster que presumiblemente son ligados por una RNA ligasa del huésped o autocatalíticamente. Pol II y NEP son abreviaturas de RNA polimerasa II nuclear y de la RNA polimerasa cloroplástica codificada en el núcleo, respectivamente.

El RNA circular monomérico más abundante (al que se le asigna la polaridad positiva por convenio) es reconocido por una RNA polimerasa que, tras transcripción reiterada, da lugar a oligómeros de polaridad complementaria que pueden seguir dos caminos distintos (Fig. 3). En la variante asimétrica estos oligómeros sirven a su vez de molde para la síntesis de otros oligómeros de polaridad positiva, que son cortados posteriormente a monómeros lineales y ligados a las correspondientes moléculas circulares maduras. En la variante simétrica los oligómeros de polaridad negativa son cortados y ligados para dar lugar a moléculas circulares de la misma polaridad, que sirven como molde en un segundo círculo rodante que es simétrico del primero. Por lo

tanto, la presencia de la forma circular monomérica de polaridad negativa indica que la replicación sigue la variante simétrica del modelo. En tejidos infectados por el PSTVd sólo se detecta el monómero circular positivo, lo que indica que este viroide, y por extensión los de su familia, se replican siguiendo la variante asimétrica del modelo (Branch *et al.*, 1988). Por el contrario, la detección en tejidos infectados por los miembros de la familia *Avsunviroidae* de los monómeros circulares de polaridad negativa (Hutchins *et al.*, 1985; Daròs *et al.*, 1994; Bussièrè *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 1999; Delgado *et al.*, 2005), así como la observación de que los RNAs de ambas polaridades son capaces de autocortarse *in vitro* (Hutchins *et al.*, 1986; Hernández y Flores, 1992; Navarro y Flores, 1997; Fadda *et al.*, 2003a), indican que estos viroides se replican siguiendo la variante simétrica del modelo.

1.1.6.2. Transcripción, corte y ligación del RNA

Para completar su ciclo replicativo, los viroides requieren una serie de actividades catalíticas que median la transcripción (RNA polimerasa), el corte (RNasa), y la ligación (RNA ligasa) de sus cadenas de RNA.

1.1.6.2.1. Transcripción

La primera etapa del ciclo replicativo, la polimerización de las cadenas de RNA, conlleva que los viroides sean reconocidos y transcritos por RNA polimerasas celulares. A pesar de que en plantas se han identificado RNA polimerasas dependientes de RNA (Schiebel *et al.*, 1988), su localización citoplasmática es incompatible con la participación de las mismas en el ciclo replicativo de los viroides, que ocurre en el núcleo (familia *Pospiviroidae*) o el cloroplasto (familia *Avsunviroidae*). Por lo tanto, los viroides deben subvertir la especificidad de molde de alguna RNA polimerasa dependiente de DNA para forzarla a transcribir moldes de RNA.

Para investigar qué RNA polimerasa nuclear participa en la replicación de los miembros de la familia *Pospiviroidae* se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* con α -amanitina, un octapéptido fúngico que inhibe a las RNA polimerasas II y III a bajas y altas concentraciones respectivamente, pero no a la RNA polimerasa I (Roeder, 1976; Marzluff y Huang, 1984; Cox y Golberg, 1988). Siguiendo esta metodología se ha concluido que la enzima implicada en la transcripción del PSTVd (Schindler y

Mühlback, 1992) y del CEVd (Flores y Semancik, 1982; Semancik y Harper, 1984; Flores, 1989; Rivera-Bustamante y Semancik, 1989) y del HSVd (Mühlback y Sanger, 1979; Yoshikawa y Takahasi, 1986), es la RNA polimerasa II, hip3tesis sustentada por otros resultados donde se observ3 que dicha RNA polimerasa purificada de plantas de tomate sanas, transcribe *in vitro* un RNA de polaridad positiva del PSTVd (Rackwitz *et al.*, 1981). Varios a3os m3s tarde se demostr3 la interacci3n *in vivo* de la RNA polimerasa II y el CEVd pues, partiendo de una fracci3n enriquecida en cromatina de plantas de tomate infectadas por este viroide, se inmunoprecipit3 la RNA polimerasa II asociada a RNAs viroidales de ambas polaridades con un anticuerpo monoclonal espec3fico del dominio carboxiterminal de la subunidad mayor de dicha polimerasa (Warrilow y Symons, 1999). Adem3s, trabajos cristalogr3ficos recientes detallan las bases moleculares del proceso de s3ntesis por la RNA polimerasa II de cadenas de RNA a partir de moldes de RNA (Lehmann *et al.*, 2007).

En la familia *Avsunviroidae*, los primeros resultados con el ASBVd mostraron que la RNA polimerasa implicada en su replicaci3n es insensible a niveles altos de α -amanitina (Marcos y Flores, 1992), por lo que deb3a ser distinta de las RNA polimerasas II y III. Por lo tanto, la replicaci3n de los miembros de esta familia podr3a resultar de la actividad de una de las dos RNA polimerasas cloropl3sticas dependientes de DNA —la RNA polimerasa cloropl3stica codificada en el n3cleo ('nuclear encoded polymerase', NEP), con una 3nica subunidad como las RNA polimerasas de los fagos T3 y T7, y la RNA polimerasa cloropl3stica codificada en el genoma plast3dico ('plastid encoded polymerase', PEP) hom3loga a la de eubacterias y con m3ltiples subunidades (Stern *et al.*, 1997)— puesto que ambas son sensibles a α -amanitina. Para discernir entre estas alternativas se han realizado varios estudios con metodolog3as distintas que no conducen a la misma conclusi3n. Mientras que los resultados de un trabajo empleando preparaciones cloropl3sticas de aguacate infectado por el ASBVd en presencia de tagetitoxina, una toxina bacteriana que inhibe la PEP pero no la NEP, sugieren que 3sta 3ltima es la enzima implicada en la replicaci3n de dicho viroide (Navarro *et al.*, 2000), otros estudios de transcripci3n *in vitro* con el PLMVd y la RNA polimerasa de *Escherichia coli* sugieren la participaci3n de una RNA polimerasa de tipo PEP (Pelchat *et al.*, 2001 y 2002). Sin embargo, la implicaci3n de la PEP parece poco probable ya que la

replicación del PLMVd es particularmente activa en las áreas sintomáticas de hojas de melocotonero que presentan la clorosis extrema denominada 'calico'. En éstas áreas los proplastidios no se diferencian en cloroplastos debido a un defecto en el procesamiento de los precursores de los rRNAs plastídicos (Rodio *et al.*, 2007). Estas observaciones sugieren más bien la participación de una NEP en la replicación del PLMVd, puesto que dicha polimerasa actúa en los primeros estadios del desarrollo de los plastidios transcribiendo los genes implicados en la síntesis del aparato de transcripción y traducción de este orgánulo (Hajdukiewicz *et al.*, 1997).

1.1.6.2.2. Corte

La segunda actividad enzimática requerida en la replicación de los RNAs viroidales es una RNasa que cataliza el corte de los intermediarios oligoméricos y genera las correspondientes formas monoméricas lineales.

En los miembros de la familia *Avsunviroidae* dicha actividad está contenida en las propias cadenas de RNA pues se trata de una ribozima de cabeza de martillo y no de una enzima del huésped (Hutchins *et al.*, 1986; Prody *et al.*, 1986; Forster y Symons, 1987a; Hernández y Flores, 1992; Darós *et al.*, 1994; Navarro y Flores, 1997; Flores *et al.*, 2001; Fadda *et al.*, 2003a) (ver apartado 2.2.1.1. para más detalle). La actividad de estas ribozimas debe estar regulada durante la replicación viroidal para así compatibilizar el autocorte de los RNAs viroidales oligoméricos con la acumulación de un cierto nivel de RNAs monoméricos circulares necesarios como molde para las sucesivas rondas de replicación. Con este propósito parecen operar dos mecanismos. Algunas ribozimas de cabeza de martillo, como las del ASBVd (ver apartado 2.2.1.3.) tienen características estructurales que las hacen termodinámicamente inestables e ineficientes para mediar el autocorte de un RNA monomérico. Sin embargo, en los correspondientes intermediarios replicativos diméricos u oligoméricos las secuencias de dos ribozimas consecutivas pueden formar una estructura de doble cabeza de martillo que promueve un autocorte muy eficiente (Forster *et al.*, 1988). En los RNAs monoméricos que se autocortan eficientemente —como los del PLMVd, CChMVd y ELVd— se ha propuesto un segundo mecanismo en el que la formación de las estructuras de cabeza de martillo simples se vería dificultada por la adopción de una conformación

alternativa más estable que no promueve el autocorte. Ambos mecanismos tienen en común la alternancia entre dos conformaciones, una activa para el autocorte que se adoptaría transitoriamente durante la transcripción, y otra que lo bloquea al final de ésta y favorece la ligación de los RNAs monoméricos lineales (Forster y Symons, 1987b).

En los miembros de la familia *Pospiviroidae* no hay unanimidad acerca de si las actividades catalíticas que median el corte de los oligómeros de polaridad positiva (y la ligación de los monómeros lineales resultantes), residen o no en la propia molécula viroidal. En uno de los primeros trabajos que abordaron esta cuestión se observó que RNAs oligoméricos de ambas polaridades del PSTVd sintetizados *in vitro* eran incapaces de autocortarse o autoligarse al incubarlos en ausencia de proteínas (Tsagris *et al.*, 1987b). Trabajos posteriores mostraron el procesamiento correcto de RNAs oligoméricos del PSTVd sintetizados *in vitro* al incubarlos con extractos nucleares de patata, sugiriendo la participación de enzimas del huésped (Tsagris *et al.*, 1987a; Baumstark y Riesner, 1995; Baumstark *et al.*, 1997). También se ha observado que la T1, una ribonucleasa fúngica, cataliza *in vitro* el procesamiento correcto y completo de un transcrito del PSTVd de longitud superior a la unitaria, sugiriendo la posibilidad de que una endonucleasa celular pueda catalizar tanto la reacción de corte como la de ligación *in vivo* (Tsagris *et al.*, 1991; Steger *et al.*, 1992). Sin embargo, algunos autores han defendido la posible existencia de ribozimas (de una clase distinta a la de cabeza de martillo) en los miembros de la familia *Pospiviroidae*, atribuyendo la dificultad para encontrar las condiciones experimentales que permitan observar el autocorte *in vitro* al alto número de conformaciones que la molécula de RNA viroidal puede adoptar (Symons, 1992). Los proponentes de esta hipótesis mostraron que un transcrito *in vitro* conteniendo únicamente el dominio central del CCCVd es capaz de autocortarse en condiciones específicas (Liu y Symons, 1998). Recientemente, estudios sobre el procesamiento *in vivo* de dímeros del CEVd en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que los expresan (Daròs y Flores, 2004) han mostrado la presencia de dos nucleótidos 3' protuberantes en los monómeros lineales resultantes del corte, sugiriendo la participación de una RNAsa celular de tipo III (Gas *et al.*, 2007). Así pues,

en la familia *Pospiviroidae* el corte (y la ligación, ver más abajo) están mediadas por enzimas del huésped.

1.1.6.2.3. Ligación

La última actividad enzimática implicada en la replicación de los viroides es una RNA ligasa, que media la circularización de los monómeros lineales generados en la etapa anterior. Las RNA ligasas que catalizan dichas reacciones deben ser distintas para los miembros de las dos familias viroidales, ya que éstos se replican en orgánulos celulares diferentes.

En los miembros de la familia *Pospiviroidae*, aunque lo más probable es que en la etapa de circularización intervenga una RNA ligasa del huésped, se ha observado autoligación *in vitro* en ausencia de proteínas de los RNAs lineales monoméricos del PSTVd (Baumstark *et al.*, 1997). Por otra parte, los estudios mencionados en el apartado anterior sobre el procesamiento de transcritos del PSTVd de longitud superior a la unitaria con extractos nucleares de patata indican que la etapa de ligación también estaría mediada por una enzima del huésped. La correspondiente RNA ligasa podría tener propiedades similares a las presentes en extractos de germen de trigo (Konarska *et al.*, 1982) y *Chlamydomonas reinhardtii*, ya que ambas enzimas son capaces de circularizar *in vitro* moléculas lineales monoméricas del PSTVd aisladas de tejido infectado (Branch *et al.*, 1982; Kikuchi *et al.*, 1982) y, además, la primera actúa sobre RNAs con extremos 5'-OH y 2',3'-fosfodiéster cíclico consistentes con los generados por alguna RNasa nuclear. Sin embargo, estudios recientes mencionados anteriormente sobre el procesamiento *in vivo* de dímeros del CEVd (Daròs y Flores, 2004; Gas *et al.*, 2007) sugieren la implicación de una RNA ligasa del huésped distinta capaz de ligar las moléculas lineales de RNA con extremos 5'-fosfomonoéster y 3'-OH libre producidos presumiblemente por una RNasa celular de tipo III.

En los miembros de la familia *Avsunviroidae* también se ha observado autoligación *in vitro* en ausencia de proteínas de los RNAs lineales monoméricos del PLMVd (Lafontaine *et al.*, 1995). Sin embargo, el enlace fosfodiéster producido mayoritariamente en el PLMVd es 2'-5' (Côté y Perreault, 1997) y no 3'-5' como el que de forma natural se halla en el RNA, conduciendo a estos autores, que proponen que el

enlace 2'-5' también existe en moléculas circulares del PLMVd aisladas de tejido infectado (Côté *et al.*, 2001), a sugerir que el mecanismo de circularización *in vivo* para este viroide sería autocatalítico. Sin embargo, esta clase de enlaces atípicos 2'-5' no parecen existir en el ASBVd (Molina-Serrano *et al.*, 2007, y datos no publicados), lo que cuestiona la hipótesis anterior. Por otra parte, como los extremos producidos en las reacciones ribozimáticas de autocorte son del tipo 5'-OH y 2',3'-fosfodiéster cíclico, también se ha propuesto que la circularización de los mismos estaría mediada por una RNA ligasa de características similares a la de germen de trigo, pero de localización cloroplástica.

1.2. Viroides objeto de estudio

1.2.1. El viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd)

La enfermedad del tubérculo fusiforme de la patata fue descrita por primera vez en Estados Unidos por Martin (1922), pero hasta casi cincuenta años más tarde (1971) no se demostró que el agente causal era un RNA infeccioso de bajo peso molecular (Diener, 1971a) (ver apartado 1.1.1. para más detalle).

El PSTVd se ha detectado en Australia (Walter y McLeod, 1982), Brasil (Ávila *et al.*, 1990), Canadá (Singh y Crowley, 1985; Singh *et al.*, 1988), Chile (Shamloul *et al.*, 1997), China (Tien, 1985; Singh *et al.*, 1991), Costa Rica (Badilla *et al.*, 1999), Grecia (Puchta *et al.*, 1990), Reino Unido (Harris *et al.*, 1979), Estados Unidos (Martin, 1922; Diener, 1971a; Singh y Clark, 1971), India (Owens *et al.*, 1992), Nueva Zelanda (Puchta *et al.*, 1990) y Rusia (Huttinga *et al.*, 1987). Sin embargo, su distribución geográfica actual es limitada a causa de las estrictas medidas adoptadas por los países desarrollados para su control y erradicación (Singh *et al.*, 2003a). Dichas medidas han conducido a que Estados Unidos y Europa se encuentren libres de PSTVd (Owens, 2007).

Con anterioridad, la enfermedad causada por el PSTVd era muy común en el Norte y Noroeste de Estados Unidos y Canadá donde se cultivaba patata (Diener y Raymer, 1971). Los daños económicos provocados por la misma eran importantes como consecuencia de la pérdida de calidad comercial de los tubérculos, sin contar con el riesgo que suponía en la producción de material de propagación infectado y en su almacenamiento en bancos de germoplasma (Randles, 2003). Por ejemplo, durante el

periodo comprendido entre 1988 y 1990, las pérdidas en la producción de patata en Estados Unidos fueron de aproximadamente 200.000 toneladas (Oerke, 1994).

La gama de huéspedes del PSTVd es amplia. Infecta varias especies de la familia *Solanaceae* —incluidas patata y tomate— así como pepino (*Cucurbitaceae*), aguacate (*Lauraceae*), y otras especies de las familias *Compositae*, *Boraginaceae*, *Campanulaceae*, *Caryophyllaceae*, *Convolvulaceae*, *Dipsacaceae*, *Sapindaceae*, *Scrophulariaceae*, y *Valerianaceae* (Singh *et al.*, 2003b). El síntoma más característico en plantas de patata y que da nombre a la enfermedad es la deformación de los tubérculos, que adoptan forma ahusada (Fig. 4A) y además presentan ojos prominentes (Shultz y Folson, 1923) y brotes escamosos (Diener y Raymer, 1971). Como huéspedes experimentales se utilizan tomate, en el que provoca retardos en el crecimiento y epinastia de las hojas (Fig. 4B), y *N. benthamiana*, especie asintomática para la mayoría de cepas del PSTVd pero muy útil para experimentos de expresión transitoria de secuencias viroidales mediante agroinfiltración.

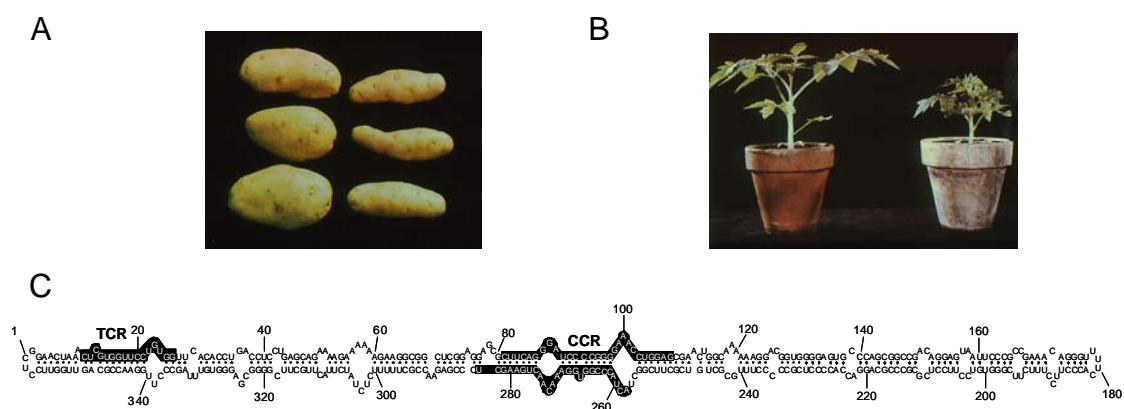


Figura 4. Viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd). (A) Sintomatología inducida en patata: tubérculos deformados (derecha) y controles sanos (izquierda). (B) Sintomatología inducida en tomate cv. Rutgers: retardo en el crecimiento y epinastia de las hojas (derecha) y control sano (izquierda). (C) Estructura secundaria de mínima energía libre de tipo varilla propuesta para el PSTVd (cepa intermedia) (Hammond y Owens, 1987). Los nucleótidos que forman parte de las regiones conservadas TCR y CCR se destacan sobre fondo negro.

El PSTVd pertenece al género *Pospiviroid* dentro de la familia *Pospiviroidae* (para una revisión reciente ver Owens, 2007). Fue el primer viroide secuenciado (Gross *et al.*, 1978) y es el mejor caracterizado molecularmente. La secuencia de referencia tiene 359 nt y existen más de 130 variantes de secuencia de distintos aislados depositadas en las

bases de datos, algunas de las cuales se han caracterizado biológicamente (Gross *et al.*, 1978; Schnoelzer *et al.*, 1985; Hammond y Owens, 1987; Lakshman y Tavantzis, 1993; Gruner *et al.*, 1995). Su estructura secundaria *in vitro* derivada de análisis bioquímicos y de observaciones con el microscopio electrónico (Sogo *et al.*, 1973; Sanger *et al.*, 1976) es de tipo varilla (Fig. 4C), con regiones apareadas separadas por bucles formados por bases desapareadas. Como ya se ha comentado, presenta cinco dominios estructurales, así como regiones conservadas (CCR y TCR) y carece de ribozimas de cabeza de martillo.

1.2.2. El viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd)

La enfermedad de la exocortis de los cítricos ('citrus exocortis disease') fue descrita por primera vez en 1948 en naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata*) en Estados Unidos (Fawcett y Klotz, 1948), pero hasta bastante más tarde no se demostró que el agente causal era un viroide (Semancik y Weathers, 1972a y b).

El CEVd se ha detectado en Australia (Gillings *et al.*, 1991; Broadbent y Dephoff, 1992), Chipre y otros países mediterráneos (Economides, 1976; Kyriakou, 1992) como España (Durán-Vila *et al.*, 1986) e Israel (Moresht *et al.*, 1998), Estados Unidos (Fawcett y Klotz, 1948; Semancik y Weathers, 1972b; Semancik y Vanderwoude, 1976), Japón (Takahashi, 1987) y Nueva Zelanda (Jagiello *et al.*, 1995). En la actualidad, este viroide se encuentra distribuido en todas las regiones en donde se cultivan cítricos, aunque la enfermedad sólo se manifiesta cuando el portainjerto utilizado es sensible. Las pérdidas económicas son considerables debido a la baja producción de los árboles enfermos, que presentan un tamaño inferior al normal (Durán-Vila y Semancik, 2003).

La gama de huéspedes del CEVd es amplia. Infecta especies del género *Citrus* y de la familia *Solanaceae* —incluidas patata, tomate, berenjena y petunia— así como pepino (*Cucurbitaceae*), haba (*Fabaceae*), zanahoria (*Apiaceae*), vid (*Vitaceae*) y nabo (*Brassicaceae*), además de crisantemo y *Zinnia elegans* (*Asteraceae*) (Singh *et al.*, 2003b). El síntoma que produce en cítricos y que da nombre a la enfermedad es el descortezamiento de los portainjertos sensibles, que se manifiesta en árboles de entre cuatro y ocho años de edad en los que la corteza se desprende en finas tiras después de agrietarse y secarse (Fig. 5A). Los huéspedes experimentales más utilizados son *Gynura aurantiaca* y

tomate, pues ambos expresan síntomas claros (enanismo, epinastia y distorsión de hojas) (Fig. 5B y 5C) en poco tiempo y acumulan altos niveles del viroide. El CEVd se transmite por propagación de material infectado, y también por las herramientas de corte y poda. Sin embargo, no se transmite por vectores ni por semillas (al menos en cítricos).

El CEVd pertenece al género *Pospiviroid* dentro de la familia *Pospiviroidae*. Su secuencia de referencia contiene 371 nt y existen más de 120 variantes de secuencia de distintos aislados en las bases de datos, algunos de las cuales se han caracterizado biológicamente (Gross *et al.*, 1982; Fadda *et al.*, 2003b; Gandía *et al.*, 2005; Chaffai *et al.*, 2007). Su estructura secundaria predicha *in vitro* es de tipo varilla (Fig. 5D) (Gross *et al.*, 1982). Al igual que el PSTVd, el CEVd presenta los cinco dominios estructurales propios de los miembros de su familia, así como la CCR y la TCR, y carece de ribozimas de cabeza de martillo.

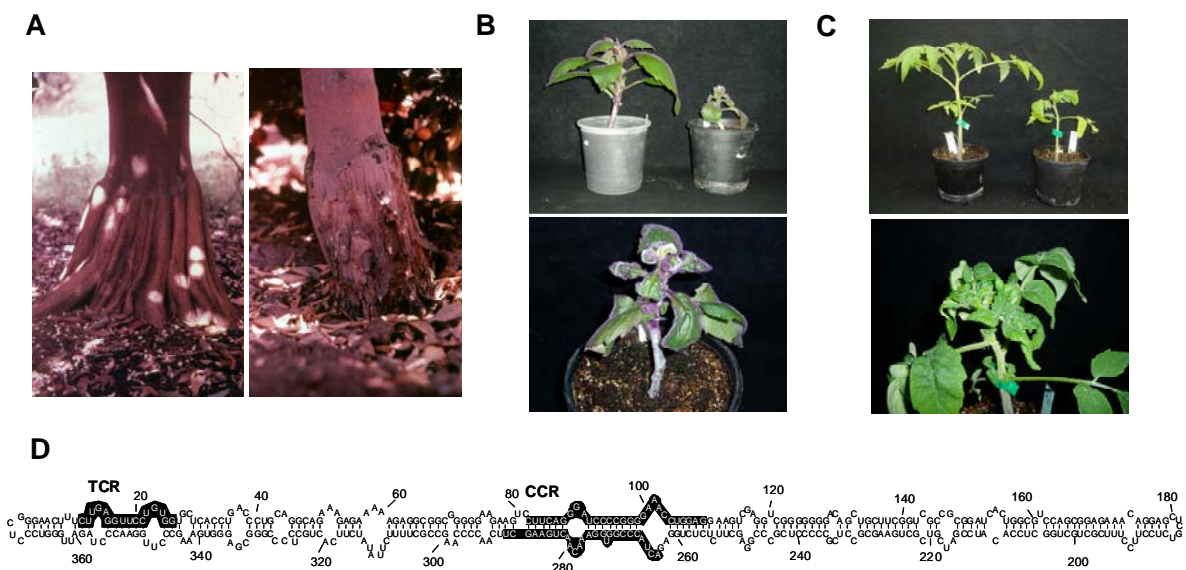


Figura 5. El viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd). (A) Sintomatología inducida en naranjo trifoliado: descortezamiento (derecha) y control sano (izquierda). (B) Sintomatología inducida en *Gynura aurantiaca*: arriba, planta con síntomas de retardo en el crecimiento y epinastia de las hojas (derecha) y control sano (izquierda); abajo, detalle de una planta infectada. (C) Sintomatología inducida en tomate cv. Rutgers: arriba, planta con síntomas de retardo en el crecimiento y epinastia de las hojas (derecha) y control sano (izquierda); abajo, detalle de una planta infectada. (D) Estructura secundaria de mínima energía libre de tipo varilla propuesta para el CEVd (aislado descrito en Semancik *et al.*, 1993). Los nucleótidos que forman parte de las regiones conservadas TCR y CCR se destacan sobre fondo negro.

1.2.3. El viroide del moteado clorótico del crisantemo (CChMVd)

La enfermedad del moteado clorótico del crisantemo ('chrysanthemum chlorotic mottle') fue descrita por primera vez hace más de cuarenta años en invernaderos comerciales del sur de Estados Unidos (Dimock y Geissinger, 1969). Sin embargo, el RNA causante de esta enfermedad se identificó y caracterizó veinte años más tarde (Navarro y Flores, 1997). El CChMVd, además de en Estados Unidos (Romaine y Horst, 1975), se ha detectado en Dinamarca, Francia e India (Horst, 1987).

La gama de huéspedes del CChMVd es muy restringida: sólo infecta algunos cultivares de crisantemo *Dendranthema grandiflora* Tzevelev (antes *Chrysanthemum morifolium*) como 'Bonnie Jean', 'Deep Ridge' y 'Yellow Delaware') y de *Chrysanthemum zawadskii* Herbich como 'Clara Curtiss' (Flores *et al.*, 2003). Las plantas exhiben inicialmente un moteado clorótico en las hojas que finalmente da lugar a una clorosis que llega a cubrir toda la superficie foliar (Fig. 6A) (Dimock *et al.*, 1971). Otros síntomas incluyen retrasos en el desarrollo floral y enanismo de la planta (Dimock *et al.*, 1971; Horst *et al.*, 1977).

El CChMVd pertenece al género *Pelamoviroid* dentro de la familia *Avsunviroidae* (para una revisión reciente ver Flores *et al.*, 2007b). La secuencia de la variante de referencia tiene 399 nt, existiendo más de 20 variantes de secuencia de distintos aislados en las bases de datos. La estructura de mínima energía libre predicha para este viroide es ramificada (Fig. 6B), con un 70% de los nucleótidos apareados (Navarro y Flores, 1997). La heterogeneidad de secuencia de las variantes CM1 y CM20 (Navarro y Flores, 1997) y de otras variantes naturales (De la Peña *et al.*, 1999; De la Peña y Flores, 2002; Gago *et al.*, 2005), no afecta a la estructura secundaria propuesta ya que los cambios se localizan en los bucles, o cuando afectan a los tramos apareados éstos son covariaciones o mutaciones compensatorias. Recientemente se ha propuesto la existencia de una interacción del tipo 'kissing-loops' en la secuencia de polaridad positiva del CChMVd (Fig. 6B) que es crítica para su plegamiento *in vitro* y viabilidad *in vivo* (Gago *et al.*, 2005). Asimismo, el CChMVd contiene en las cadenas de ambas polaridades los nucleótidos conservados y los elementos estructurales típicos de las ribozimas de cabeza de martillo (Navarro y Flores, 1997) (Fig. 6B) (para más detalles ver apartado 2.2.1.2.).

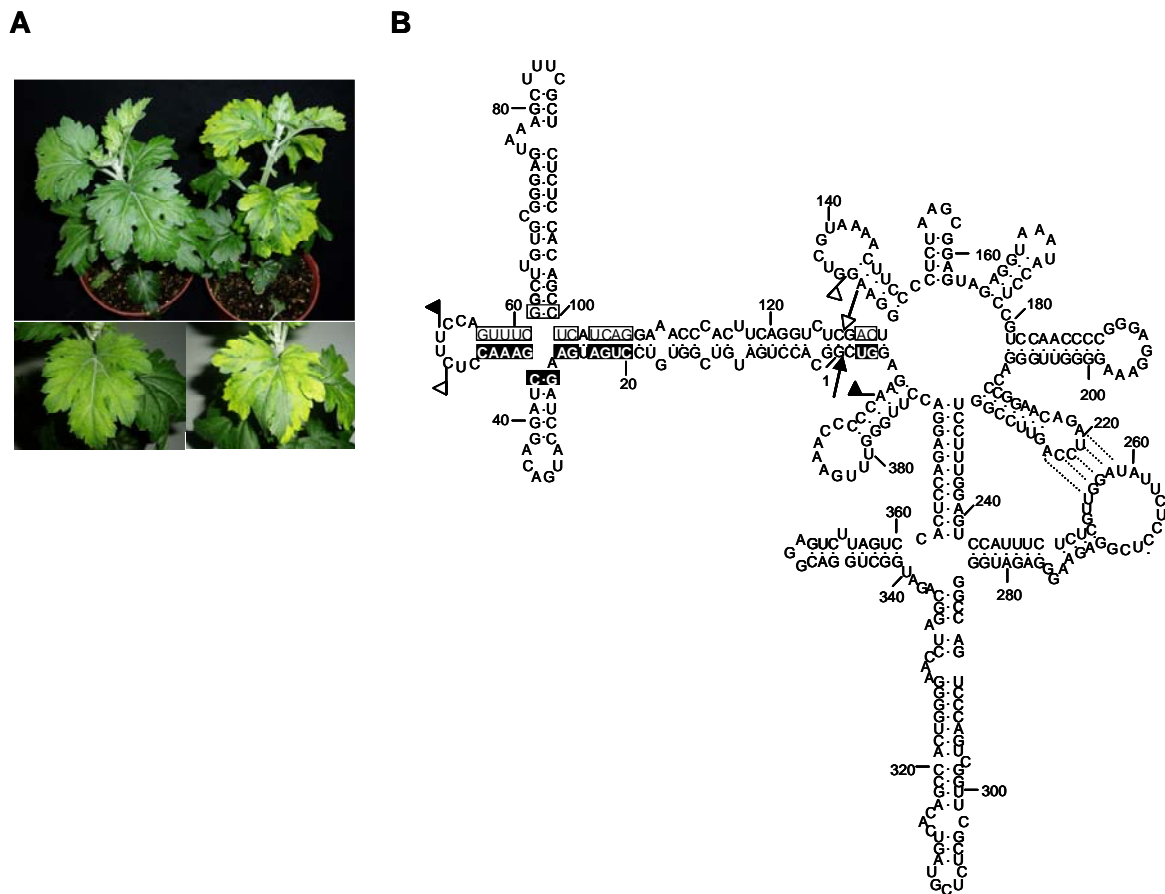


Figura 6. El viroide del moteado clorótico del crisantemo (CChMVd). (A) Sintomatología inducida en crisantemo: arriba, planta con síntomas de moteado clorótico en las hojas más jóvenes (derecha) y control sano (izquierda); abajo, detalle de una hoja sana (izquierda) y de otra sintomática (derecha). (B) Estructura secundaria de mínima energía libre propuesta para el CChMVd (variante CM20) (Navarro y Flores, 1997) en la que se indica con líneas punteadas una interacción terciaria (seudonudo del tipo 'kissing-loops') (Gago *et al.*, 2005). Los banderines delimitan las estructuras de cabeza de martillo de ambas polaridades, en los que se destacan mediante cajas los nucleótidos conservados en la mayoría de las ribozimas naturales de esta clase y las flechas indican los sitios de autocorte. Los símbolos con fondo negro y blanco denotan la polaridad positiva y negativa respectivamente.

1.2.4. El viroide latente de la berenjena (ELVd)

El viroide latente de la berenjena (*Eggplant latent viroid*, ELVd) (Fadda *et al.*, 2003a) fue descubierto en plantas de berenjena (*Solanum melongena* L. cv. Sonja) durante una prospección para detectar pequeños RNAs infecciosos en cultivos del Este de España (Fagoaga *et al.*, 1994). La inoculación de plantas de berenjenas con preparaciones del RNA viroidal mostró la replicación del mismo, sin que éstas expresaran síntomas (Fadda *et al.*, 2003a) (Fig. 7A), por lo que dicho RNA se denominó viroide latente de la berenjena.

El ELVd no ha sido descrito en otras áreas del mundo donde se cultiva esta especie lo que en parte puede deberse a la naturaleza asintomática de la infección. Los intentos dirigidos a transmitir el ELVd a otras especies como tomate, crisantemo, pepino y cidro, que son huéspedes naturales o experimentales de varios viroides han fracasado (Fagoaga *et al.*, 1994), lo que sugiere una gama de huéspedes restringida, propiedad ésta que parece común a todos los miembros de la familia a la que pertenece (Flores *et al.*, 2000).

El ELVd, propuesto como especie tipo del género *Elaviroid* (Fadda *et al.*, 2003a), pertenece a la familia *Avsunviroidae*. Su secuencia de referencia tiene 333 nt, con aproximadamente otras diez variantes de secuencia depositadas en las bases de datos. El ELVd adopta una estructura secundaria de mínima energía libre de tipo cuasi-varilla (Fig. 7B). Su secuencia, que presenta una notable variabilidad nucleotídica compatible con esta estructura, es capaz de formar ribozimas de cabeza de martillo en sus cadenas de ambas polaridades (Fadda *et al.*, 2003a) (Fig. 7B) (para más detalle ver apartado 2.2.1.2.).

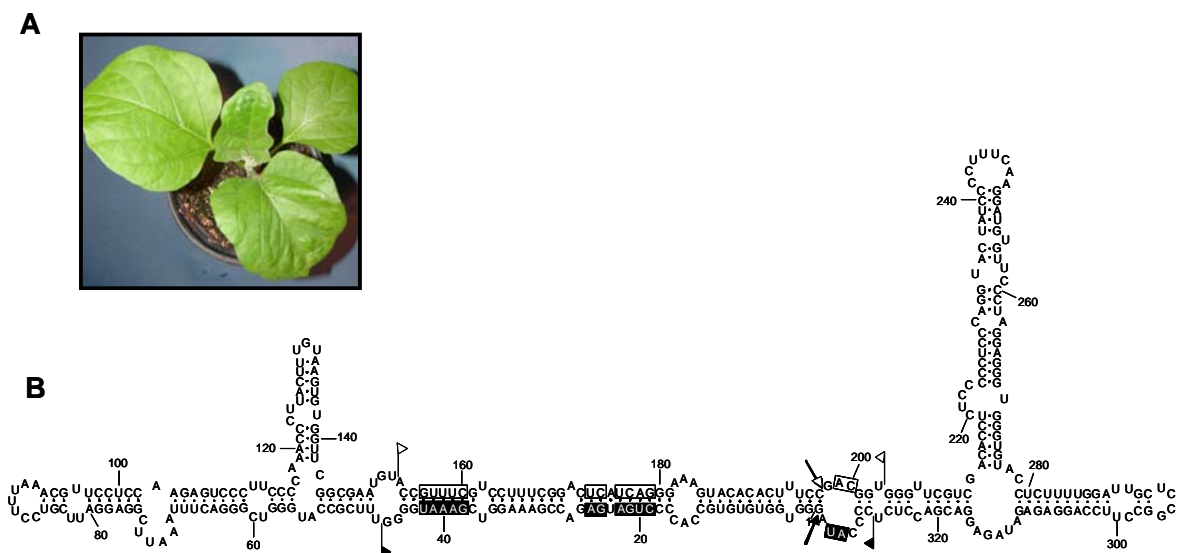


Figura 7. El viroide latente de la berenjena (ELVd). (A) Planta asintomática de berenjena infectada por el ELVd. (B) Estructura secundaria de mínima energía libre propuesta para la variante de referencia (ELVd-2) (Fadda *et al.*, 2003a). Los banderines delimitan las estructuras de cabeza de martillo de ambas polaridades. Los demás símbolos se describen en la Figura 6B.

2. Las ribozimas

2.1. Las ribozimas y su descubrimiento en los RNAs viroidales

Las ribozimas son enzimas de RNA capaces de catalizar la ruptura y la formación de enlaces covalentes (Symons, 1991). La mayoría o bien median el autocorte del RNA que las contiene por una reacción de transesterificación, o bien inducen el corte de otra molécula de RNA por una reacción de hidrólisis, mientras que al menos una ribozima está implicada en la formación de enlaces peptídicos (Fedor y Williamson, 2005).

A comienzos de los 80 del pasado siglo se descubrió que algunos RNAs eran capaces de catalizar reacciones bioquímicas, al demostrarse el autoprosesamiento del intrón del RNA ribosomal de *Tetrahymena* en ausencia de proteínas (Cech *et al.*, 1981; Kruger *et al.*, 1982). Sin embargo, la primera prueba de la actividad catalítica de una verdadera ribozima capaz de mediar el corte en *trans* de otros RNAs, manteniéndose invariable al final de la reacción y presentando por lo tanto capacidad de recambio, se obtuvo con la RNasa P bacteriana (Guerrier-Takada *et al.*, 1983).

A la vista de estos resultados, se consideró la posible presencia de ribozimas en los RNAs viroidales debido a su falta de capacidad codificante (Symons, 1992). Esta hipótesis se confirmó más tarde al encontrarse ribozimas de cabeza de martillo en algunos RNAs viroidales, en los que catalizan el procesamiento a formas monoméricas de los RNAs oligoméricos resultantes de su replicación por un mecanismo de círculo rodante (Hutchins *et al.*, 1986; Prody *et al.*, 1986; Forster y Symons, 1987a). Las ribozimas contenidas en estos RNAs catalizan una transesterificación teóricamente reversible en la que, en presencia de un catión divalente (generalmente el Mg^{2+}), se produce un ataque nucleofílico de un grupo 2'-OH al fósforo del enlace fosfodiéster adyacente. Estudios cristalográficos recientes con una ribozima natural, atribuyen al Mg^{2+} el papel de estabilizar las estructuras terciarias necesarias para la catálisis (Martick y Scott, 2006). Los productos liberados tras la reacción tienen extremos 5'-OH y 2'-3' fosfodiéster cíclico (Fig. 8).

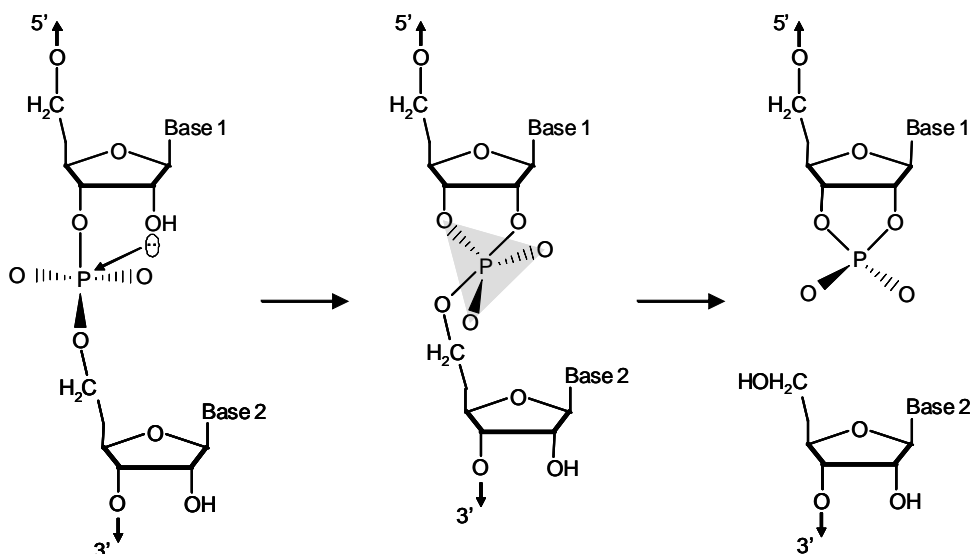


Figura 8. Mecanismo de autocorte de una ribozima presente en un RNA viroidal (reproducida de Flores *et al.*, 2007a). Mediante una reacción de transesterificación, en presencia de Mg^{2+} se produce un ataque nucleofílico de un grupo 2' hidroxilo al fósforo del enlace fosfodiéster adyacente. Dicho átomo de fósforo queda pentacoordinado en un estado de transición de bpirámide trigonal en el que los enlaces (2'-oxígeno)-fósforo-(5'-oxígeno) quedan alineados. Los productos resultantes tienen extremos 5' hidroxilo y 2'-3' fosfodiéster cíclico. Los triángulos con fondo negro y rayado representan los enlaces que sitúan los átomos en un plano más cercano o lejano respectivamente.

2.2. Las ribozimas de cabeza de martillo

2.2.1. Variantes naturales con actividad en *cis*

2.2.1.1. Características generales

Las ribozimas de cabeza de martillo son las estructuras ribozimáticas más comunes y sencillas. En la naturaleza, están presentes en las cadenas de ambas polaridades de los cuatro miembros de la familia *Avsunviroidae* (ASBVd, PLMVd, CChMVd y ELVd) (Hutchins *et al.*, 1986; Hernández y Flores, 1992; Navarro y Flores, 1997; Fadda *et al.*, 2003a), de dos RNAs satélites de tipo viroidal (Forster y Symons, 1987a; Miller *et al.*, 1991), de un RNA circular de cerezo (Di Serio *et al.*, 1997) y del RNA de un elemento retroviroidal de clavel (Daròs y Flores, 1995), así como en las cadenas de polaridad positiva de otros siete RNAs satélites viroidales (Bruening, 1989; Symons 1992 y 1997; Collins *et al.*, 1998) y en varios RNAs de origen animal que incluyen el transcrito del DNA satélite II del tritón (Epstein y Gall, 1987) y de otros anfibios (Zhang y Epstein, 1996), el transcrito del DNA satélite Sma del gusano *Schistosoma mansoni* (Ferbeyre *et al.*, 1998) y el transcrito del DNA satélite de la familia pDo500 de varias especies de

grillos del género *Dolichopoda* (Rojas *et al.*, 2000). Además, recientemente se han descubierto dos estructuras de esta clase en el cromosoma IV de *A. thaliana* (Przybilski *et al.*, 2005).

Los primeros resultados *in vitro* de una actividad ribozimática se obtuvieron con el RNA satélite del virus de las manchas anulares del tabaco (*Tobacco ringspot virus satellite RNA*, sTRSV) (Prody *et al.*, 1986) y el ASBVd (Hutchins *et al.*, 1986), al detectarse el autocorte específico de sus RNAs diméricos en ausencia de proteínas. Más tarde se demostró el autocorte *in vitro* de otros RNAs satélites viroidales y, al comparar sus secuencias, se propuso un modelo de estructura bidimensional entorno al sitio de autocorte (Forster y Symons, 1987a). Esta estructura modelo (Fig. 9A), que recibió el nombre de cabeza de martillo por su morfología, está constituida por tres dobles hélices (I, II y III) sin restricciones de secuencia excepto en las posiciones 15.1 y 16.1, (que forman un par A-U), y 15.2 y 16.2 por un lado, y 10.1 y 11.1 por otro, que usualmente forman pares C-G y G-C, respectivamente. Las hélices, que pueden estar abiertas o cerradas por bucles terminales (1, 2 y 3), están dispuestas alrededor de una región central compuesta por 13 nt esencialmente conservados distribuidos en cuatro segmentos. Estos 13 nt, junto con el nucleótido que precede al sitio de corte, forman el centro catalítico de la ribozima (Fig. 9A) (Flores *et al.*, 2001).

La ribozima de cabeza de martillo ha sido objeto de múltiples análisis bioquímicos y estructurales encaminados a entender su mecanismo catalítico. Hasta muy recientemente la mayoría de dichos análisis emplearon una versión mínima de la ribozima ('ribozima mínima'), que no incluía regiones periféricas a la región central con el sitio de corte que se presumían sin papel catalítico alguno. Por un lado, estudios por mutagénesis dirigida de una ribozima mínima de cabeza de martillo artificial explicaron la conservación de los nucleótidos del bucle central, ya que su sustitución produjo una caída de la constante catalítica de corte (Ruffner *et al.*, 1990). Por otro lado, estudios de cristalografía de rayos X con ribozimas de cabeza de martillo artificiales, también con formato mínimo (Pley *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1995), revelaron una compleja distribución de interacciones entre los nucleótidos del bucle central, y más específicamente la existencia de tres pares de bases no canónicos (entre A9 y G12, G8 y A13, y U7 y A14, que extienden la hélice II), y de un motivo de 'giro de uridina'

constituido por el motivo CUGA (posiciones 3-6) que formaría el bolsillo catalítico alrededor del sitio de corte (Fig. 9B). De acuerdo con estos últimos estudios, la estructura espacial de la ribozima de cabeza de martillo se asemejaría más bien a una Y deformada, con la base formada por la hélice III y los dos brazos superiores por las hélices I y II (siendo esta última casi colineal con la hélice III) (Fig. 9B).

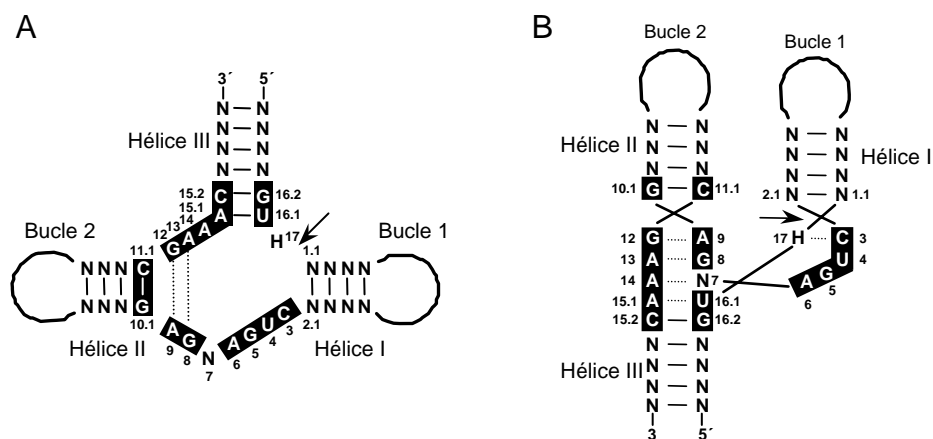


Figura 9. Estructura de la ribozima de cabeza de martillo (reproducido de Flores *et al.*, 2007a). (A) Representación esquemática de la estructura consenso propuesta originalmente con el sistema de numeración de Hertel *et al.* (1992). (B) Representación esquemática de la estructura consenso de acuerdo a los primeros datos de cristalografía de rayos X obtenidos con ribozimas artificiales mínimas (Pley *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1995). N representa cualquier nucleótido, y H cualquier nucleótido excepto G. El sitio de autocorte se señala con una flecha y las líneas continuas y punteadas indican pares de Watson-Crick e interacciones no canónicas, respectivamente.

2.2.1.2. El papel clave de los bucles periféricos en la actividad catalítica

Además del bucle central conservado otras características estructurales, como la secuencia y el tamaño de las hélices adyacentes y de los bucles periféricos que las cierran, pudieran haber sido también seleccionadas evolutivamente para mejorar la actividad catalítica de las ribozimas de cabeza de martillo en su contexto natural. En efecto, resultados *in vitro* e *in vivo* publicados posteriormente (De la Peña *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003), han demostrado que modificaciones de los bucles periféricos 1 y 2 de ribozimas de cabeza de martillo naturales provocan una reducción drástica de sus constantes catalíticas de autocorte. Estos datos indican que regiones externas al bucle central conservado desempeñan un papel crítico en la catálisis, al tiempo que sugieren la existencia de interacciones terciarias entre los bucles periféricos 1 y 2 que ayudarían

a estabilizar el sitio activo, facilitando así la actividad catalítica a las bajas concentraciones de Mg^{2+} existentes en condiciones fisiológicas (Fig. 10). Además, dichas interacciones podrían ser estabilizadas por proteínas, como sugiere la observación de que una proteína cloroplástica facilita *in vitro*, y presumiblemente *in vivo*, el autocorte de un RNA viroidal dimérico del ASBVd (Daròs y Flores, 2002).

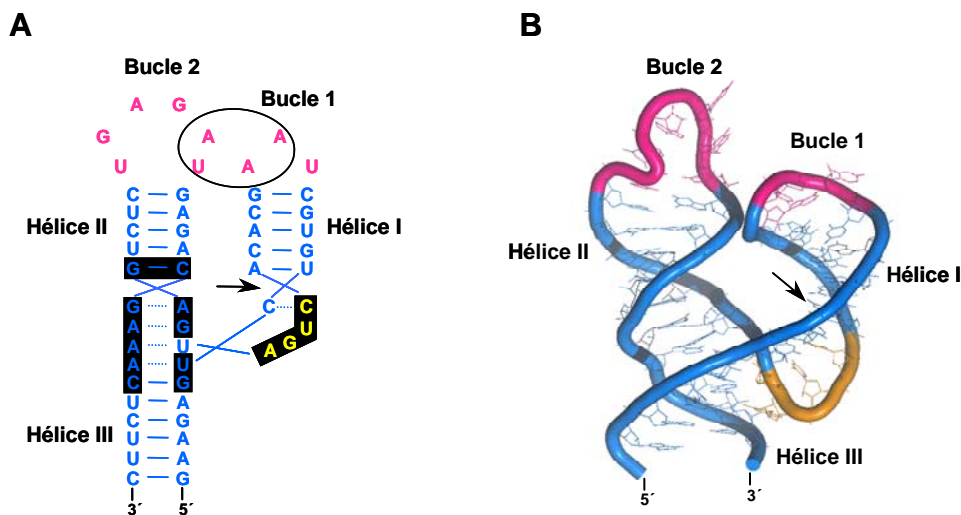


Figura 10. Interacción entre elementos periféricos de una ribozima de cabeza de martillo natural (reproducido de Flores *et al.*, 2007a). (A) Representación esquemática de la ribozima de polaridad positiva del PLMVd, en la que mediante un círculo se indica la interacción terciaria propuesta entre los bucles 1 y 2. (B) Modelo tridimensional (De la Peña *et al.*, 2003). Las hélices I, II y III se indican en azul, los bucles 1 y 2 en magenta y el bolsillo catalítico en amarillo.

Estas observaciones impulsaron el interés en cristalizar una estructura de cabeza de martillo natural con dichos elementos de estabilización terciaria, resultado que se obtuvo algo más tarde con la ribozima de *S. mansoni* (Martick y Scott, 2006). La estructura cristalizada, que contiene dichos elementos periféricos, presenta un bolsillo catalítico muy distinto al de las anteriores estructuras cristalizadas de ribozimas de cabeza de martillo mínimas (Pley *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1995). En particular, la hélice II está superenrollada (al contrario que la I), provocando un reordenamiento del centro catalítico con nuevas interacciones que no aparecían antes: la interacción no canónica entre A13 y G8 se rompería y se formaría una nueva interacción de Watson-Crick entre G8 y C3, que situaría al nucleótido N7 junto al motivo del giro de uridina y dejaría a los nucleótidos A13 y A14 desapareados. Además, el nucleótido H que precede al sitio de corte se situaría en una posición más interna (Fig. 11). Esta nueva estructura

confirma la importancia de los bucles periféricos en el correcto posicionamiento de los nucleótidos del sitio activo, permitiendo la catálisis a concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} . Además, también explica muchas de las discrepancias surgidas en los últimos años entre los datos cristalográficos y los bioquímicos obtenidos con las ribozimas artificiales mínimas.

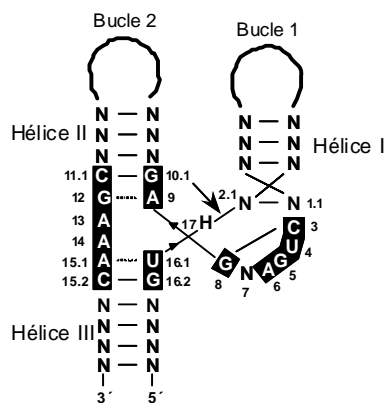


Figura 11. Representación esquemática de la estructura consenso de una ribozima de cabeza de martillo según los datos de cristalografía de rayos X obtenidos con la ribozima natural de *S. mansoni* con los elementos periféricos externos al centro catalítico (Martick y Scott, 2006). Otros detalles como en la Figura 9.

2.2.1.3. Estructuras de cabeza de martillo presentes en los RNAs viroidales

Los RNAs de los cuatro miembros de la familia *Avsunviroidae* contienen ribozimas de cabeza de martillo en sus cadenas de ambas polaridades (Fig. 11), las características más importantes de las cuales se detallan a continuación. En las estructuras de cabeza de martillo del ASBVd (Hutchins *et al.*, 1986), las hélices I y II no están cerradas por bucles, y la hélice III es termodinámicamente inestable porque tan sólo consta de dos y tres pares de bases en las ribozimas de polaridad positiva y negativa, respectivamente, cerradas en ambos casos por bucles de tres nucleótidos (Fig. 12). El autocorte ocurre eficientemente a través de la adopción de una estructura de doble cabeza de martillo termodinámicamente muy estable que puede formarse en moléculas diméricas cuando las hélices III de dos estructuras de cabeza de martillo simples se combinan y generan una hélice III más larga y estable (Forster *et al.*, 1988).

Las ribozimas de ambas polaridades del PLMVd (Hernández y Flores, 1992) comparten entre ellas una gran similitud de secuencia (Fig. 12) y presentan un bucle 1 de tan sólo tres nucleótidos (Fig. 12), que es el más pequeño de los descritos en las estructuras de cabeza de martillo naturales.

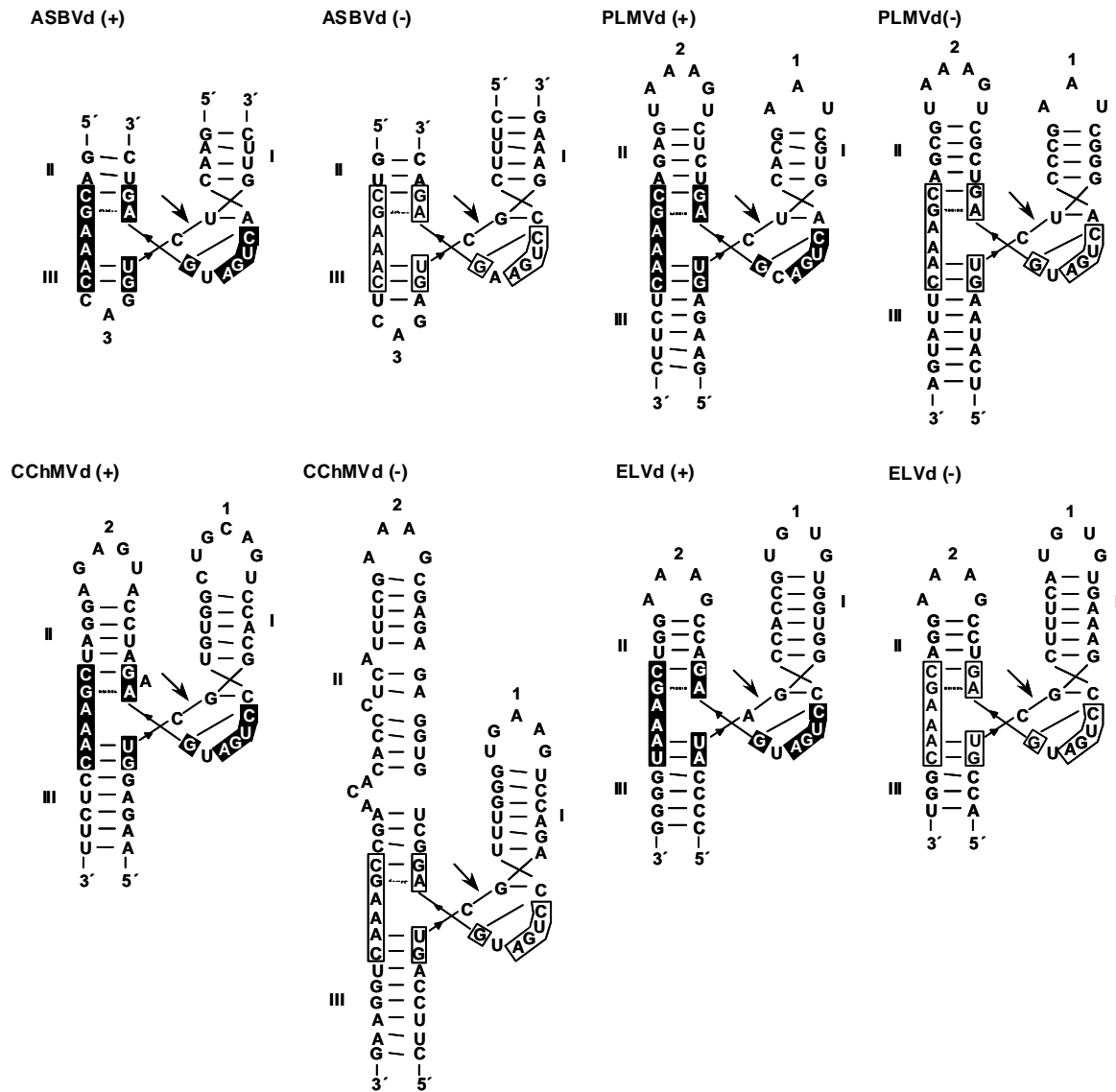


Figura 12. Representación esquemática de las ribozimas de cabeza de martillo presentes en los RNAs viroidales de acuerdo con los datos de cristalografía obtenidos para la ribozima natural de *S. mansoni* (Martick y Scott, 2006). Otros detalles como en las figuras 9 y 11.

En cuanto a las ribozimas del CChMVd (Navarro y Flores, 1997), la de polaridad (+) contiene una A extra en el centro catalítico (Fig. 12). Por otro lado, la estructura de cabeza de martillo de polaridad negativa presenta una hélice II excepcionalmente larga (Fig. 12), situación similar a la descrita en una de las ribozimas de cabeza de martillo del RNA satélite del virus del enanismo amarillento de los cereales (*Cereal yellow dwarf virus-RPV satellite RNA, sCYDV-RPV*) (Miller *et al.*, 1991).

Finalmente, las ribozimas de ambas polaridades del ELVd (Fadda *et al.*, 2003a) contienen unas hélices I especialmente largas formadas por siete pares de bases (Fig.

12), siendo la de polaridad (+) particularmente estable porque cinco de los siete pares son G-C. En cuanto a su secuencia, el trinucleótido que precede el sitio de autocorte de la ribozima de polaridad (+) es AUA (Fig. 12), que junto con GUA presente también en otras estructuras de cabeza de martillo naturales, difiere del GUC característico de la mayoría de las ribozimas naturales [incluyendo la de polaridad (-) del ELVd y las de ambas polaridades de los otros viroides].

2.2.2. Ribozimas de cabeza de martillo artificiales con actividad en *trans*

2.2.2.1. Primeros diseños *in vitro*

Uhlenbeck (1987) fue el primero en manipular una ribozima de cabeza de martillo natural para que actuara en *trans* específicamente sobre otra molécula de RNA *in vitro*: con este fin la descompuso en la ribozima propiamente dicha de sólo 19 nt y en un sustrato de 24 nt mediante la apertura del bucle 1 que en principio parecía prescindible (Fig. 13). Estos resultados mostraron que era posible diseñar ribozimas capaces de cortar específicamente un RNA determinado siempre que éste contuviera un triplete GUH (siendo H cualquier nucleótido excepto G). Dichas ribozimas deben sintetizarse de manera que sus brazos formen las hélices I y III con las secuencias del sustrato que flanquean el sitio de corte (Fig. 13). En la reacción en *trans* una misma molécula de ribozima puede actuar sobre varias de sustrato (mecanismo de recambio múltiple), comportándose así como un auténtico catalizador. Estos resultados se confirmaron más tarde y condujeron a un protocolo con claras implicaciones biotecnológicas que permitía diseñar ribozimas en *trans* frente a diferentes RNAs (Haseloff y Gerlach, 1988).

Posteriormente, una serie de estudios delimitaron mejor las características de las ribozimas de cabeza de martillo para que su acción en *trans* fuera más eficiente. Por un lado se observó que una hélice I de tan sólo tres pares de bases bastaba para que la ribozima mantuviera su capacidad catalítica, poniendo de manifiesto ciertas ventajas de un diseño asimétrico con hélices I y III de distinta longitud (Tabler *et al.*, 1994), y que la hélice II podía ser reducida a unos pocos nucleótidos dando lugar a lo que se denominaron minizimas (McCall *et al.*, 1992). Por otro lado, se comprobó que existían alternativas catalíticamente activas al trinucleótido GUH que precede al sitio de corte,

con AUA como el caso más significativo, lo que llevó a proponer NHH como el trinucleótido consenso (siendo N cualquier nucleótido y H cualquier nucleótido excepto G) (Kore *et al.*, 1998).

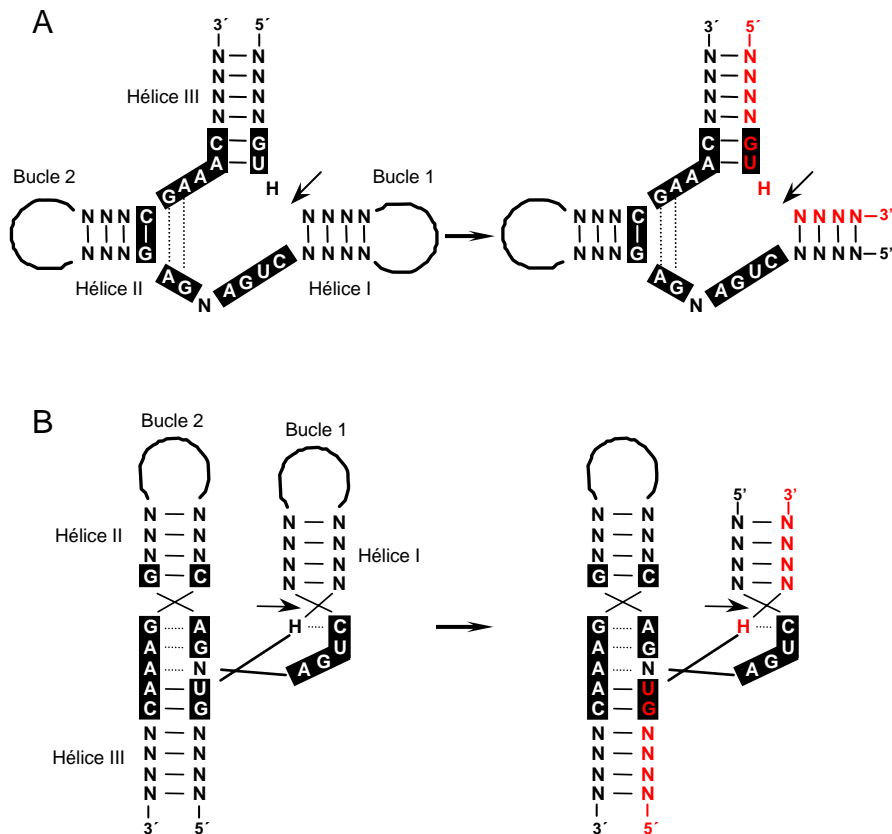


Figura 13. Transformación del formato *cis* de las ribozimas de cabeza de martillo naturales a un formato *trans* (reproducido de Flores *et al.*, 2007a). (A) Esquema de la representación original. (B) Esquema de la estructura derivada de datos cristalográficos obtenidos con ribozimas artificiales mínimas (Pley *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1995). La ribozima propiamente dicha se indica en negro y el sustrato en rojo. Las demás símbolos se describen en las Figuras 9 y 11.

2.2.2.2. Aplicaciones para el control de enfermedades producidas por virus de plantas

Las ribozimas de cabeza de martillo mínimas han sido empleadas como herramienta biotecnológica para controlar enfermedades virales en plantas (Tabla 1). Una de las primeras aplicaciones consistió en obtener plantas transgénicas de tabaco expresando una ribozima mínima, o un RNA antisentido, frente al RNA del virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV). Tras inocular estas plantas se observó que la ribozima no mejoraba el grado de resistencia frente al TMV con respecto del RNA

antisentido (De Feyter *et al.*, 1996). Experimentos similares, también en plantas de tabaco transgénicas pero esta vez expresando una ribozima mínima dirigida contra secuencias conservadas de los RNAs 1 y 2 del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), mostraron cierta resistencia frente a dicho virus (Kwon *et al.*, 1997), aunque al no incluir como control un RNA antisentido la resistencia obtenida podría no ser ribozimática. Por otra parte, plantas transgénicas de arroz expresando una ribozima mínima contra el segmento 5 del RNA del virus del enanismo del arroz (*Rice dwarf virus*, RDV) sí mostraron resistencia a la infección por dicho virus (y no así un control con la ribozima inactivada por una mutación en su centro catalítico), aunque dicha resistencia se perdió en las siguientes generaciones de plantas debido a la metilación del transgén (Han *et al.*, 2000).

Otros experimentos llevados a cabo en *Nicotiana clevelandii* en que se expresó episómicamente [mediante recombinantes del virus X de la patata (*Potato virus X*, PVX)] un RNA antisentido contra el RNA del virus de la sharka (*Plum pox virus*, PPV) o una variante del RNA antisentido a la que se había incorporado el dominio catalítico de una ribozima de cabeza de martillo mínima mostraron que, tras ser inoculadas con PPV, las plantas presentaron únicamente un cierto retraso en la aparición de síntomas que fue más acentuado con la segunda variante (Liu *et al.*, 2000). También se han transformado plantas de melón con transgenes que incluyen diversas ribozimas mínimas frente a varios miembros de la familia *Potyviridae*, que tras ser inoculadas con algunos de estos virus mostraron diversos grados de resistencia (Huttner *et al.*, 2001). Recientemente, utilizando levadura como sistema modelo para luego extrapolar los resultados obtenidos a plantas (con la ventaja de que en este microorganismo no existe silenciamiento génico), se ha observado la capacidad de ciertas ribozimas mínimas para degradar el RNA mensajero (mRNA) de la proteína Rep de miembros de la familia *Geminiviridae* (Chilakamarthi *et al.*, 2007).

Todos estos ejemplos (Tabla 1) muestran que las ribozimas de cabeza de martillo mínimas pueden ser activas *in vivo*, aunque su baja eficiencia en la mayoría de casos limita su aplicación para controlar enfermedades virales de plantas.

Tabla 1. Ejemplos de aplicación de las ribozimas de cabeza de martillo mínimas para generar resistencia frente a virus de plantas

Expresión	Virus diana*	Planta	Observaciones	Referencia
Estable	TMV	<i>Nicotiana tabacum</i>	Resistencia antisentido	De Feyter <i>et al.</i> , 1996
	CMV	<i>Nicotiana tabacum</i>	Resistencia (ribozimática?)	Kwon <i>et al.</i> , 1997
	RDV	<i>Oryza sativa</i>	Resistencia ribozimática que se pierde en la progenie por silenciamiento del transgén	Han <i>et al.</i> , 2000
	<i>Potyviridae</i>	<i>Cucumis melo</i>	Resistencia ribozimática	Huttner <i>et al.</i> , 2001
Episómica (PVX)	PPV	<i>Nicotiana clevelandii</i>	Resistencia ribozimática	Liu <i>et al.</i> , 2000

* CMV, *Cucumber mosaic virus*; PPV, *Plum pox virus*; PVX, *Potato virus X*; RDV, *Rice dwarf virus*; TMV, *Tobacco mosaic virus*

2.2.2.3. Una nueva generación de ribozimas más eficientes

El descubrimiento del papel catalítico clave de regiones periféricas al centro activo de las ribozimas naturales, y en particular de la interacción entre sus bucles (De la Peña *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003) (ver apartado 2.2.1.2.), permite explicar por qué las ribozimas de cabeza de martillo en *trans* requerían concentraciones de Mg²⁺ en torno a 5 mM (unas 10 veces más altas que la fisiológica que no supera 0,5 mM) para ser eficientes *in vitro* (Flores *et al.*, 2007a), y por qué su eficiencia era baja *in vivo*. El diseño original (Uhlenbeck, 1987), si bien fue innovador y contribuyó al desarrollo de las ribozimas para su uso biotecnológico, debe ser reexaminado pues la apertura de la ribozima por el bucle 1 anula la interacción entre los bucles 1 y 2 y conduce a una caída notable en su actividad catalítica.

Los elementos de estabilización terciaria (bucles 1 y 2) han sido incluidos en una nueva generación de ribozimas de cabeza de martillo con formato *trans* más eficientes en condiciones fisiológicas de Mg²⁺ (Saksmerprome *et al.*, 2004; Burke y Greathouse, 2005; Weinberg y Rossi, 2005). La transformación del formato *cis* de una ribozima natural al formato *trans* de una ribozima artificial que mantiene los bucles periféricos se ha realizado con éxito mediante dos diseños (Fig. 14): i) el formato *trans* hélice I discontinua (ribozimas discontinuas), situando los extremos 5' de la ribozima y 3' del sustrato en la hélice I (Burke y Greathouse, 2005), y ii) el formato *trans* hélice I extendida (ribozimas extendidas), prolongando la hélice I e incluyendo el bucle 1 como un bucle interno en dicha hélice (Saksmerprome *et al.*, 2004; Weinberg y Rossi, 2005). En principio, el formato *trans* hélice I discontinua mantiene mejor el posicionamiento

original de los bucles periféricos (aumentando su estabilidad y eficiencia a bajas concentraciones de Mg^{2+}) (Fig. 14). Sin embargo, la fragmentación de la hélice I de la ribozima podría limitar la formación del bucle 1 y la unión con el extremo 5' del sustrato.

Las ribozimas discontinuas derivadas de la de polaridad (+) del sTRSV fueron las más activas *in vitro* frente a RNAs cortos a concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} en comparación con ribozimas similares derivadas de la de polaridad (-) del PLMVd (Burke y Greathouse, 2005). Estos resultados podrían explicarse por el menor tamaño de la hélice I de las ribozimas derivadas del PLMVd (cinco pares de bases frente a los seis de las del sTRSV), que probablemente limita la estabilidad de dicha hélice y de su bucle. Sin embargo, en las mismas condiciones ribozimas extendidas derivadas de la de polaridad (-) del PLMVd se han mostrado más activas que otras derivadas de la de polaridad (+) del sTRSV y del CChMVd (Weinberg y Rossi, 2005). Otros estudios de selección *in vitro* han identificado una variante de la ribozima de polaridad (-) del PLMVd, con dos cambios en el bucle 2 con respecto a la secuencia natural, como la ribozima con mayor actividad autocatalítica a bajas concentraciones de Mg^{2+} . A partir de dicha variante, se diseñó una ribozima con formato *trans* extendido capaz de degradar específicamente un RNA artificial con la secuencia de un fragmento del genoma del virus 1 de la inmunodeficiencia humana (*Human immunodeficiency virus*, HIV) a una concentración de Mg^{2+} de 0,5 mM (Saksmerprome *et al.*, 2004).

A pesar de las expectativas que generan estos resultados en cuanto a la posibilidad de obtener ribozimas con una alta actividad catalítica en condiciones intracelulares, hay que destacar que todos ellos han sido obtenidos *in vitro* (Saksmerprome *et al.*, 2004; Burke y Greathouse, 2005; Weinberg y Rossi, 2005), y empleando como sustratos RNAs cortos y no estructurados (Burke y Greathouse, 2005; Weinberg y Rossi, 2005). Estas condiciones difieren sustancialmente de las existentes en el interior de la célula, donde muchos de los RNAs diana son largos y estructurados. Por otro lado, estudios anteriores *in vitro* empleando ribozimas mínimas con formato *trans* revelaron que éstas tienen una actividad 100 veces inferior frente a este tipo de sustratos largos, disminuyendo su eficiencia a medida que se extiende el extremo 3' del mismo probablemente como consecuencia de la formación de interacciones alternativas con el

sustrato (Hormes y Sczakiel, 2002). Por lo tanto, la eficiencia de esta nueva generación de ribozimas con motivos de estabilización terciaria ('tertiary stabilizing motifs', TSMs) y distintos formatos *trans* debe ser evaluada *in vitro* antes de su posible empleo *in vivo*.

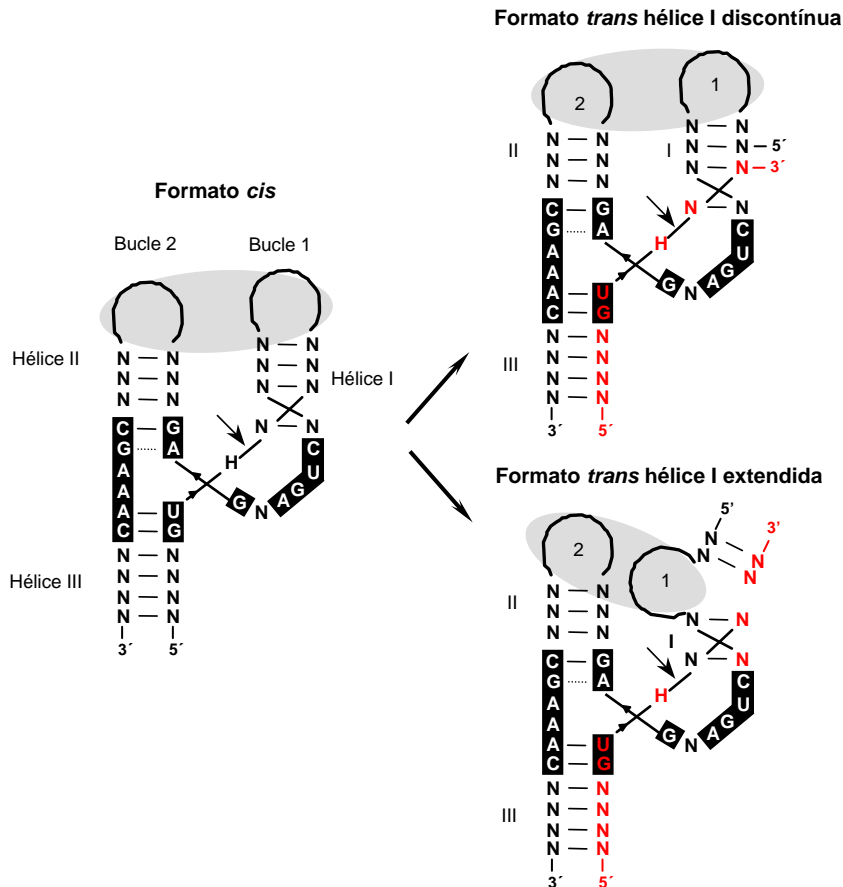


Figura 14. Transformación del formato *cis* de las ribozimas de cabeza de martillo naturales (izquierda) a los formatos *trans* hélice I discontinua (arriba) y *trans* hélice I extendida (abajo), de acuerdo con los datos cristalográficos obtenidos con la ribozima natural de *S. mansoni* (Martick y Scott, 2006). Los bucles periféricos 1 y 2 de la ribozima se indican sobre fondo gris para representar las interacciones terciarias entre ambos. Los demás detalles se describen en las figuras 9, 11 y 13.

2.2.2.4. Otros requisitos que idealmente deberían cumplir las ribozimas de cabeza de martillo como herramienta biotecnológica

Si bien las ribozimas de cabeza de martillo ofrecen una alternativa muy prometedora para degradar de forma específica ciertos RNAs *in vivo*, los ejemplos anteriores en plantas (De Feyter *et al.*, 1996; Kwon *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Huttner *et al.*, 2001) (apartado 2.2.1.2.) ponen de manifiesto que aún siendo

algunas de ellas activas *in vivo*, quedan por resolver dificultades antes de que esta tecnología sea aplicable.

Una ribozima efectiva requiere: i) estabilidad intracelular frente a RNAsas que la puedan degradar, ii) accesibilidad a la región del RNA diana contra la que está diseñada, iii) colocalización en el mismo compartimento subcelular donde se encuentra el RNA diana, iv) alta expresión cuando su síntesis es intracelular, y v) eficiencia a concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} .

En primer lugar, la estabilidad de las ribozimas sintetizadas *in vitro* y que posteriormente se transfieren puede incrementarse sustituyendo los grupos 2'-OH de las ribosas por otros grupos (Beigelman *et al.*, 1995). Por otro lado, la inclusión de una ribozima dentro de un RNA de transferencia (tRNA) aumenta su eficiencia *in vivo* con respecto al control con sólo la secuencia ribozimática, muy probablemente a causa de la mayor estabilidad de la construcción quimérica (Perriman *et al.*, 1995).

En segundo lugar, la ribozima debe acceder a la región del RNA sustrato que contiene el sitio de corte, aspecto que resulta difícil de predecir considerando que dicha región puede formar estructuras secundarias o terciarias estables, o estar asociada a proteínas. El uso de programas de predicción *in silico* de estructuras secundarias de mínima energía libre como el Mfold (Zuker, 2003) son útiles pero no aseguran que el sitio sea accesible *in vivo*. Otros programas informáticos permiten encontrar el conjunto de trinucleótidos de corte presentes en una secuencia diana y estimar para cada uno de ellos la accesibilidad teórica de la ribozima en función de la estructura secundaria de la región que los contiene (Mercatanti *et al.*, 2002). Diversas metodologías *in vitro* se han basado en la expresión de librerías de ribozimas (Lieber y Strauss, 1995; Pan y Clawson, 2004) y en el diseño de oligonucleótidos de DNA complementarios a las distintas regiones identificadas previamente en el RNA diana, y en la medida de la accesibilidad a dichas regiones mediante digestión con RNAsa H (activa frente a los híbridos RNA-DNA) (Scherr y Rossi, 1998; Scherr *et al.*, 2000). Finalmente, una solución que palia los efectos de la estructura secundaria del RNA diana en torno al sitio de corte consiste en el diseño de ribozimas producidas intracelularmente y unidas a un motivo de RNA que recluta RNA helicasas endógenas, creando así ribozimas híbridas

con actividad catalítica significativamente mayor *in vivo* (Warashina *et al.*, 2001; revisado en Kawasaki y Taira, 2004).

En tercer lugar, se han utilizado dos estrategias distintas para colocalizar la ribozima y el RNA diana en el mismo compartimento subcelular. La primera consiste en emplear ciertos RNAs como vectores para el transporte dirigido de la ribozima, coexpresando dentro de la misma célula animal dos vectores retrovirales, uno codificando una ribozima de cabeza de martillo contra un RNA diana artificial y el otro dicho RNA sustrato. A causa de la señal de empaquetamiento retroviral común, la ribozima y el sustrato se colocalizan, lo que se traduce en una reducción (en torno al 90%) del título del virus infeccioso fusionado al RNA diana, y no observándose efecto alguno sobre el RNA diana control fusionado al vector viral (Sullenger y Cech, 1993). Alternativamente, esta vez empleando levaduras como sistema modelo, una ribozima de cabeza de martillo fue fusionada a un pequeño RNA nucleolar dirigiéndola así al nucleolo, donde se encuentra su RNA diana (otro RNA nucleolar). Dicha colocalización condujo a una eficiencia de corte de cerca del 100% (Samarsky *et al.*, 1999). Esta estrategia ha sido empleada igualmente con éxito en células humanas inhibiendo la replicación del HIV (Michienzi *et al.*, 2000; Castanotto *et al.*, 2002). Otro factor clave que en este contexto determina la localización es el casete de expresión utilizado (revisado en Castanotto *et al.*, 2000), y más concretamente el tipo de promotor, las modificaciones postranscripcionales *in vivo* de los dos extremos del transcrito, y las secuencias que lo flanquean. La utilización de promotores de la RNA polimerasa II [el 35S del virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) en plantas y el del gen tRNA^{val} en animales han sido los más utilizados] conlleva la adición de una estructura caperuza y de una cola poli-A en los extremos 5' y 3' del transcrito, respectivamente, lo que favorece su estabilidad y localización citoplasmática. Sin embargo, la adición de nucleótidos en el extremo 3' del transcrito puede interferir con el plegamiento correcto de la ribozima. El empleo de promotores de la RNA polimerasa III para expresar RNAs antisentido y ribozimas ha suscitado un interés creciente debido a que los niveles de expresión son mucho más elevados en cualquier tipo de tejido y los transcritos son muy estables debido a su pequeño tamaño. Además, sólo contienen cuatro o cinco Us en el extremo 3' (que no debería así interferir con el correcto plegamiento de la

ribozima) quedarían localizados en el núcleo. Como ejemplo, genes quiméricos formados por secuencias antisentido o ribozimáticas insertadas en la región anticodón del tRNA^{Tyr} de tabaco o junto al extremo 3' del 7SL RNA de *A. thaliana*, fueron expresados eficientemente bajo promotores de la RNA polimerasa III en extractos de tabaco enriquecidos en fracciones nucleares (Yukawa *et al.*, 2002). Asimismo, utilizando plantas transgénicas se ha logrado expresar de forma estable bajo el control de los promotores de los genes H1 y 7SL, de humanos y de *A. thaliana* respectivamente, siRNAs (ver más abajo) que silenciaron en más de un 80% a un gen delator (Lu *et al.*, 2004).

Finalmente, la eficiencia de una ribozima de cabeza de martillo en condiciones fisiológicas puede verse favorecida por la incorporación de los TSMs presentes en las ribozimas naturales (ver apartado 2.2.2.3.). La disección molecular de las interacciones terciarias entre nucleótidos de los bucles periféricos de ribozimas naturales (Martick y Scott, 2006) muy posiblemente mejorará el diseño de las ribozimas futuras.

3. El silenciamiento génico mediado por RNA

3.1. Aspectos generales

3.1.1. Indicios iniciales de su existencia

Las primeras observaciones que sugirieron la existencia de mecanismos de silenciamiento génico mediado por RNA se realizaron en plantas en 1990. Dos grupos de investigación comprobaron independientemente que la sobreexpresión del gen de la chalcona sintetasa en petunias transgénicas provocaba, en contra de lo esperado, que los pétalos perdieran su pigmentación en vez de intensificarla, lo que sugirió una co-supresión del transgén y del gen homólogo endógeno (Napoli *et al.*, 1990; Van der Krol *et al.*, 1990). Así pues, en vez de aumentar la expresión del producto génico ésta disminuía o se anulaba debido a que los niveles del correspondiente mRNA se reducían inesperadamente. Algo más tarde se identificaron procesos similares en otros organismos eucariotas (Fire *et al.*, 1998; Kennerdell y Carthew, 1998), lo que impulsó definitivamente la caracterización bioquímica y molecular de estos procesos, englobados bajo el término de silenciamiento génico mediado por RNA, y contribuyó a descifrar su papel en dichos organismos (Zamore y Haley, 2005).

3.1.2. Funciones biológicas y etapas clave

Bajo el término silenciamiento génico mediado por RNA se engloban una serie de procesos que operan a nivel transcripcional ('transcriptional gene silencing', TGS) o postranscripcional ('post-transcriptional gene silencing', PTGS) en organismos de los cuatro reinos eucarióticos (protozoos, hongos, plantas y animales), y que tienen en común el reconocimiento específico de secuencias de DNA o RNA por pequeñas moléculas de RNA ('small RNAs', sRNAs). Estos procesos regulan la estabilidad del genoma (Baulcombe, 2004; Chan *et al.*, 2004; Ekwall, 2004; Wassenegger, 2005; Vaucheret, 2006), la expresión de genes relacionados con la proliferación y el desarrollo (Carrington y Ambros, 2003; Bartel, 2004; Baulcombe, 2004; Dugas y Bartel, 2004; Chen, 2005; Carthew, 2006; Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Chapman y Carrington, 2007) y la defensa frente a virus, transposones y transgenes (Voinnet, 2001; Waterhouse *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2004; Lecellier y Voinnet, 2004; Dunoyer y Voinnet 2005; Li y Ding, 2005; Voinnet 2005a; Ding y Voinnet, 2007).

El silenciamiento génico mediado por RNA se induce a partir de RNAs bicatenarios (dsRNAs) o monocatenarios (ssRNAs) muy estructurados que son reconocidos por RNAsas de tipo III denominadas Dicer ('Dicer-like', DCLs, en plantas) (Fire *et al.*, 1998; Berstein *et al.*, 2001; Molnar *et al.*, 2005) y digeridos a sRNAs (Fig. 15). Dichos sRNAs tienen un tamaño de 21 a 30 nt y presentan dos nucleótidos protuberantes en los extremos 3' de sus cadenas de ambas polaridades. Estas últimas son separadas por una helicasa y una de ellas (la cadena guía o pasajera del sRNA) es incorporada a un complejo efector, al que proporciona especificidad, que contiene una proteína de la familia Argonauta (AGO). En el TGS el complejo efector RITS ('RNA-induced transcriptional silencing complex') (Verdel *et al.*, 2004) es guiado hasta un DNA de secuencia complementaria al que se une, induce su metilación y bloquea su transcripción, participando en la formación de la heterocromatina (Chan *et al.*, 2004; Matzke y Birchler, 2005; Wassenegger, 2005). En el PTGS el complejo efector RISC ('RNA-induced silencing complex') (Hammond *et al.*, 2000) es guiado hasta un RNA de secuencia complementaria al que se une, bloqueando su traducción o degradándolo mediante la actividad RNasa H del dominio Piwi de su proteína AGO (Baumberger y Baulcombe, 2005). La respuesta de silenciamiento génico puede amplificarse mediante la síntesis de nuevos dsRNAs por la acción de una RNA polimerasa celular dependiente de RNA ('RNA-dependent RNA polymerase', RDR) sobre los ssRNAs generados tras el corte por el complejo RISC o sobre otros ssRNAs aberrantes (sin estructura caperuza o sin cola poli A en sus extremos 5' y 3', respectivamente). Los dsRNAs resultantes son digeridos por una DCL, generando nuevos sRNAs denominados sRNAs secundarios (Sijen *et al.*, 2001; Vaistij *et al.*, 2002). Por último, la señal de silenciamiento génico puede propagarse célula a célula o de forma sistémica (Voinnet, 2005b; Kalantidis *et al.*, 2008) (Fig. 15).

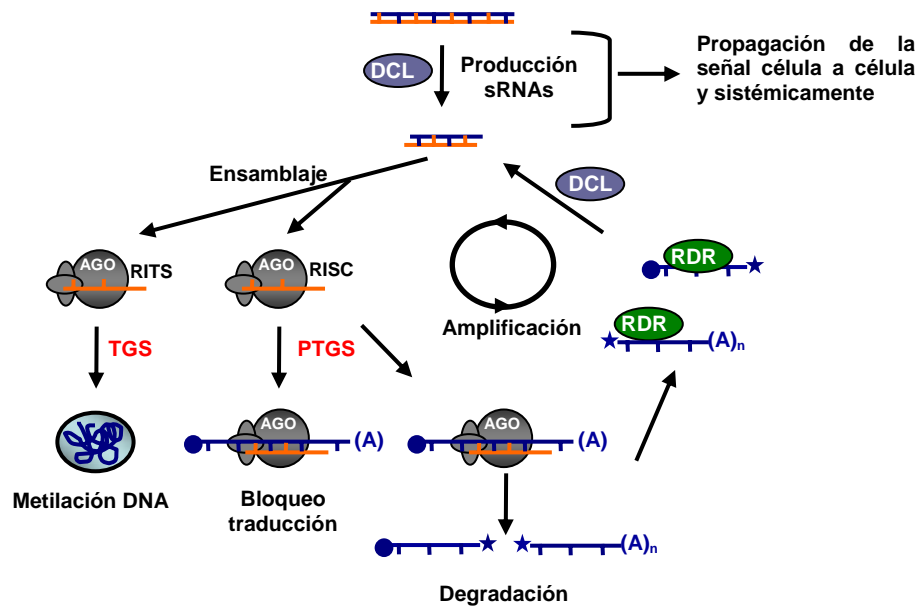


Figura 15. Etapas clave en el silenciamiento génico mediado por RNA. El proceso se inicia con la digestión de dsRNAs por una DCL, generándose sRNAs. Una de las cadenas del sRNA es reclutada por un complejo efector (RITS o RISC) y le sirve de guía para la metilación de un DNA de secuencia complementaria (TGS), o para bloquear la traducción o inducir la degradación de un RNA de secuencia complementaria (PTGS). La respuesta de silenciamiento génico puede amplificarse mediante la síntesis de sRNAs secundarios, generados tras la digestión por una DCL de dsRNAs producidos por una RDR. La propagación de la señal de silenciamiento génico ocurre célula a célula o de forma sistémica.

3.2. El silenciamiento génico mediado por RNA en plantas

3.2.1. sRNAs y enzimas

En plantas se han identificado diversos tipos de sRNAs con distinta biogénesis y función (Tabla 2). Dichos sRNAs se clasifican en dos grupos de acuerdo a la estructura de su RNA precursor: los microRNAs ('microRNAs', miRNAs) generados a partir de transcritos que adoptan un plegamiento en horquilla con tallo parcialmente apareado, y los pequeños RNAs interferentes ('small interfering RNAs', siRNAs) resultantes del procesamiento mediante DCLs de dsRNAs o de ssRNAs en horquilla con tallo totalmente apareado. Los microRNAs están implicados en la regulación postranscripcional de genes relacionados con procesos de proliferación y desarrollo, mientras que los siRNAs participan en: i) la formación y mantenimiento de la heterocromatina, ii) la defensa frente a virus, transgenes y transposones, iii) la regulación postranscripcional de ciertos transcritos sintetizados por genes de defensa frente a patógenos y de respuesta a estrés, y iv) la amplificación de la señal de silenciamiento génico (Chapman y Carrington, 2007) (Tabla 2).

Tabla 2. Tipos de sRNAs identificados en plantas (Chapman y Carrington, 2007)

Clase	Descripción	Biogénesis	Función
miRNA	MicroRNA	Procesamiento por DCL1 de transcritos de genes miRNA	Regulación postranscripcional de transcritos de una amplia gama de genes
siRNA primario	Pequeño RNA interferente	Procesamiento por DCLs de dsRNAs o de ssRNAs que adoptan un plegamiento en horquilla con tallo totalmente apareado	Unión al RNA complementario; guía para la iniciación de la síntesis de siRNAs secundarios por RDRs
siRNA secundario	Pequeño RNA interferente	Procesamiento por DCLs de dsRNAs largos o ssRNAs estructurados generados por RDRs	Regulación postranscripcional de transcritos; formación y mantenimiento de la heterocromatina
tasiRNA	siRNA actuando en <i>trans</i>	Corte de transcritos de genes TAS (por miRNAs) y conversión de éstos a dsRNAs (por RDRs) que son procesados por DCL4	Regulación postranscripcional de transcritos
natsiRNA	siRNA derivado de un transcrito antisentido natural	Procesamiento por DCLs de dsRNAs producidos por apareamiento de transcritos complementarios	Regulación postranscripcional de genes involucrados en defensa frente a patógenos y en respuesta a estrés

En *A. thaliana* ambos tipos de sRNAs son producidos por al menos una de las cuatro DCLs (DCL1 a DCL4) identificadas, con redundancia funcional (Deleris *et al.*, 2006; Henderson, 2006) y localización nuclear (aunque no se descarta su relocalización en otros compartimentos subcelulares al menos durante una infección viral) excepto DCL2 que es citoplasmática (Moissard y Voinnet, 2006). DCL1 está implicada en la biogénesis de los miRNAs de 21 a 24 nt en el núcleo (Bartel, 2004). DCL3 produce siRNAs de 24 nt que dirigen la metilación del DNA y la formación de heterocromatina (Xie *et al.*, 2004). DCL4 genera siRNAs de 21 nt (*'trans-acting siRNAs'*, tasiRNAs) (Gascioli *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005) que regulan la expresión de algunos genes endógenos y de los transgenes que inducen RNAi (Dunoyer *et al.*, 2005). Finalmente, DCL2 sintetiza siRNAs de 22 nt como los natsiRNAs (a partir de los *'natural antisense transcripts'*, transcritos antisentido naturales) implicados en estrés, los siRNAs virales (Xie *et al.*, 2004; Deleris *et al.*, 2006) y, en plantas mutantes *dcl4*, suple a DCL4 en la producción de los siRNAs derivados de los precursores de los natsiRNAs (Gascioli *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005).

Por otro lado se han identificado seis RDRs (RDR1, RDR2, RDR3a, RDR3b, RDR3c y RDR6) que participan en las rutas de silenciamiento génico (Wasseneger y Krczal, 2006). RDR1 debe ser la RDR inducida por ciertas infecciones virales (Zabel *et al.*, 1974; Dorssers *et al.*, 1984), viroidales (Khan *et al.*, 1986) y por tratamientos con ácido salicílico (Xie *et al.*, 2001), y participa en la defensa frente a virus (Xie *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003). RDR2 participa en la metilación del DNA y en la formación de heterocromatina (Chan *et al.*, 2004), y RDR6 en la respuesta de amplificación del

silenciamiento génico mediado por RNA de transgenes (Béclin *et al.*, 2002) y de virus (Mourrain *et al.*, 2000; Dalmay *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 2005; Schwach *et al.*, 2005), y en la biogénesis de los tasiRNAs (Vázquez *et al.*, 2004).

3.2.2. Rutas

Las diversas rutas de silenciamiento génico pueden ser agrupadas en dos grandes grupos dependiendo de la naturaleza de los sRNAs involucrados en ellas. La primera ruta es la mediada por los miRNAs (Fig. 16A), sRNAs de 20 a 24 nt originados en el núcleo tras el procesamiento por DCL1, primero de un transcrito endógeno altamente estructurado (como consecuencia de contener repeticiones invertidas imperfectas) llamado pri-miRNA ('primary microRNA'), y de un pre-miRNA ('precursor microRNA'), generando finalmente el microRNA (Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Chapman y Carrington, 2007). Los miRNAs ejercen su acción en el citoplasma sobre el RNA complementario bloqueando su traducción o induciendo su degradación.

La segunda ruta es la mediada por los siRNAs (Fig. 16B), inducida por los dsRNAs producidos por un virus (por ejemplo, los intermediarios de replicación), por genes endógenos bajo el control de promotores invertidos, y por genes endógenos o transgenes con secuencias invertidas (Chapman y Carrington, 2007). Estos dsRNAs pueden ser digeridos por DCL2 (cuando resultan de una infección viral) o DCL4 a siRNAs de 22 y 21 nt, respectivamente, y ser incorporados a RISC para impedir la traducción o dirigir la degradación de un RNA de secuencia complementaria (PTGS) (Deleris *et al.*, 2006), o por DCL3 para generar siRNAs de 24 nt que dirigen la metilación de DNAs de secuencia complementaria (TGS) (Xie *et al.*, 2004). Finalmente, los tasiRNAs se sintetizan tras la digestión por DCL4 de un dsRNA generado por la RDR6 empleando los fragmentos resultantes de la degradación del transcrito de un gen TAS por un complejo RISC-miRNA (Gascioli *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005).

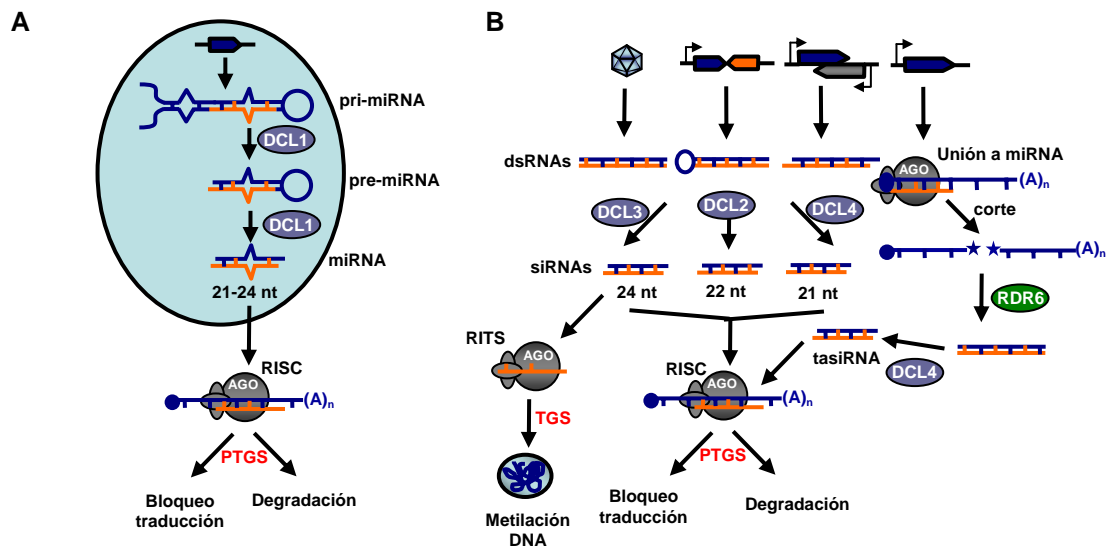


Figura 16. Rutas de silenciamiento génico mediado por RNA en plantas. (A) Ruta de los miRNAs, generados en el núcleo por DCL1 a partir de un transcrito altamente estructurado, y ejerciendo su acción en el citoplasma bloqueando la traducción o dirigiendo la degradación del RNA de secuencia complementaria (PTGS). (B) Ruta de los siRNAs, inducida por dsRNAs resultantes de la replicación de un virus, o de la transcripción de genes endógenos o transgenes con secuencias invertidas o con promotores invertidos. DCL3 genera los siRNAs de 24 nt que dirigen la metilación de las cadenas de DNA complementarias (TGS), y DCL2 y DCL4 generan los siRNAs de 22 (sólo en infecciones virales) y 21 nt, respectivamente, que bloquean la traducción o inducen la degradación del RNA complementario (PTGS). Por último, se muestra la ruta de biogénesis de los tasiRNAs, resultantes de la digestión de un dsRNA generado por la RDR6 empleando un transcrito de un gen TAS previamente degradado por un complejo RISC-miRNA.

3.2.3. Aplicaciones del silenciamiento génico mediado por RNA para generar resistencia frente a virus

Este mecanismo regulador de la expresión génica puede ser utilizado para estudiar la función de genes (Waterhouse y Heliwell, 2003), o como herramienta biotecnológica para generar resistencia frente a virus (Haasnoot *et al.*, 2007). La esencia de esta técnica radica en suministrar dsRNAs que actúen como potentes activadores del mecanismo de silenciamiento con el fin de inducir la degradación específica de RNAs homólogos (que en animales se conoce como interferencia mediada por RNA o RNAi). En mamíferos, la inducción de RNAi mediante la expresión de dsRNAs presenta problemas, ya que éstos activan proteín-quinasas que promueven respuestas inespecíficas que conducen a la muerte celular. Estos problemas pueden solventarse mediante la expresión o la aplicación directa de siRNAs, que no activan estas respuestas inespecíficas. De hecho, la tecnología basada en el RNAi aparece como muy

prometedora para combatir enfermedades como el cáncer u otras inducidas por virus (revisado en Aagaard y Rossi, 2007 y en Kim y Rossi, 2007), a veces en combinación con tratamientos basados en ácidos nucleicos antisentido, ribozimas o dnazimas (revisado en Sioud e Iversen, 2005).

En los últimos diez años se han descrito numerosos ejemplos de aplicación de la utilidad de esta tecnología para generar resistencia frente a virus de plantas (Tabla 3). En la mayoría de los casos la estrategia ha consistido en obtener plantas transgénicas que expresan dsRNAs con secuencias del virus de interés a partir de la coexpresión de RNAs sentido (seRNAs) y antisentido (aseRNAs), y sobre todo de RNAs con plegamiento en horquilla como consecuencia de tener repeticiones invertidas ('hairpin RNAs', hpRNAs). La inclusión de un intrón para separar dichas repeticiones, que permite su procesamiento *in vivo* y la génesis de los dsRNAs (en este caso llamados ihpRNAs de 'intron-spliced hairpin RNAs'), se ha generalizado debido a que la interferencia obtenida es mayor (Smith *et al.*, 2000). Sin embargo, se han buscado soluciones alternativas al uso de plantas transgénicas consistentes en la aplicación directa de dsRNAs sintetizados exógenamente. Por ejemplo, se ha comprobado que la coinoculación del virus del moteado suave del pimiento (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV), del virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV) y del virus del mosaico de la alfalfa (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) junto con sus dsRNAs homólogos, interfiere específicamente con la infección viral (Tenllado y Díaz-Ruiz, 2001). En todos los casos se comprobó que la coinoculación de uno de estos virus con dsRNAs de otro virus diferente no provocaba efecto alguno sobre la infección, indicando que la resistencia generada es específica. Además, el efecto protector es dependiente de la dosis y no se induce por ssRNAs homólogos. Este trabajo motivó la búsqueda de nuevos métodos para la síntesis a bajo coste y a gran escala de dsRNAs para su aplicación en campo como tratamiento frente a infecciones virales, y condujo a la producción de dsRNAs utilizando bacterias deficitarias en RNAsa III (Tenllado *et al.*, 2003b). Tras pulverizar las plantas con extractos sin fraccionar de dichas bacterias, conteniendo los dsRNAs específicos obtenidos tras lisar los sedimentos bacterianos con una prensa francesa, se comprobó que éstos bloqueaban la infección del PMMoV.

Tabla 3. Ejemplos de la utilización de la tecnología del RNAi para generar resistencia frente a virus de plantas

Aplicación	RNAs interferentes	Virus diana*	Planta	Referencia	
Inoculación mecánica	dsRNAs sintetizados <i>in vitro</i>	PMMoV	<i>Capsicum chinense</i> <i>Nicotiana benthamiana</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	Tenllado y Díaz-Ruiz, 2001	
		TEV	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tenllado y Díaz-Ruiz, 2001	
		AMV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Tenllado y Díaz-Ruiz, 2001	
	Extractos no purificados con dsRNAs sintetizados por bacterias	PMMoV, PPV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Tenllado <i>et al.</i> , 2003a	
Pulverización	Extractos no purificados con dsRNAs sintetizados por bacterias	PMMoV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Tenllado <i>et al.</i> , 2003a	
Agroinfiltración	seRNAs + aseRNAs	PMMoV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Tenllado y Díaz-Ruiz, 2001	
	hpRNAs	PMMoV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Tenllado <i>et al.</i> , 2003b	
Expresión estable	seRNAs + aseRNAs	PVY	<i>Nicotiana tabacum</i>	Waterhouse <i>et al.</i> , 1998	
		hpRNAs	BYDV CMV	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	Wang <i>et al.</i> , 2000 Kalantidis <i>et al.</i> , 2002
	ihpRNAs	PVY	<i>Nicotiana tabacum</i>	Smith <i>et al.</i> , 2000	
		PPV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Pandolfini <i>et al.</i> , 2003, Di Nicola-Negri <i>et al.</i> , 2005	
	miRNAs	miRNAs	TSWV, GRSV, TCSV, WSMoV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Bucher <i>et al.</i> , 2006
			CTV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Batuman <i>et al.</i> , 2006
			SDV	<i>Glycine max</i>	Tougou <i>et al.</i> , 2006
			BGMV	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Bonfim <i>et al.</i> , 2007
			ToCMoV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2007
	miRNAs	miRNAs	TYMV, TuMV	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Niu <i>et al.</i> , 2006
			CMV	<i>Nicotiana tabacum</i>	Qu <i>et al.</i> , 2007

* AMV, Alfalfa mosaic virus; BGMV, Bean golden mosaic virus; BYDV, Barley yellow dwarf virus; CMV, Cauliflower mosaic virus; CTV, Citrus tristeza virus; GRSV, Groundnut ringspot virus; PMMoV, Pepper mild mottle virus; PPV, Plum pox virus; PVY, Potato virus Y; SDV, Soybean dwarf virus; TCSV, Tomato chlorotic spot virus; TEV, Tobacco etch virus; ToCMoV, Tomato chlorotic mottle virus; TSWV, Tomato spotted wilt virus; TuMV, Turnip mosaic virus; TYMV, Turnip yellow mosaic virus; WSMoV, Watermelon silver mottle virus

3.3. Los viroides y el silenciamiento génico mediado por RNA

El primer trabajo que relacionó a los viroides con procesos biológicos implicados en el silenciamiento génico mediado por RNA condujo al descubrimiento de que moléculas de RNA son capaces de dirigir la metilación del DNA de secuencia complementaria (Wassenegger *et al.*, 1994). En la actualidad, se admite que éste es un mecanismo fundamental que opera en la regulación génica y en la formación de heterocromatina en múltiples organismos (Chan *et al.*, 2004; Matzke y Birchler, 2005; Wassenegger, 2005).

3.3.1. Distintos sRNAs de origen viroidal se acumulan en infecciones naturales

Mediante técnicas de hibridación molecular de tipo Northern se han detectado sRNAs viroidales ('viroid-derived small RNAs', vd-sRNAs) en diversas plantas infectadas por miembros de las dos familias: PSTVd en tomate (Itaya *et al.*, 2001; Papaefthimiou *et al.*, 2001; Machida *et al.*, 2007), CEVd también en tomate (Martín *et al.*, 2007) y en gynura (Markarian *et al.*, 2004), PLMVd y CChMVd en melocotonero y crisantemo, respectivamente (Martínez de Alba *et al.*, 2002), y ASBVd en aguacate (Markarian *et al.*, 2004). La presencia de estos vd-sRNAs en plantas infectadas sugiere que los viroides son inductores y dianas del silenciamiento génico mediado por RNA.

3.3.2. Los vd-sRNAs

3.3.2.1. Características y biogénesis

Los vd-sRNAs presentan características típicas de los siRNAs como son su tamaño de entre 21 y 23 nt (Itaya *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2007), y la presencia de un grupo fosforilo y de otro metilo en sus extremos 5' y 3', respectivamente (Martín *et al.*, 2007).

La presencia de vd-sRNAs en infecciones viroidales implica la participación en su biogénesis de alguna DCL que actúe sobre los RNAs genómicos muy estructurados y/o sobre sus intermediarios replicativos de dsRNA. Si bien los intermediarios de replicación bicatenarios son sustratos idóneos para las DCLs, la participación de alguna de ellas en la digestión de los RNAs genómicos viroidales se ha cuestionado. Aunque experimentos *in vitro* sugirieron inicialmente que las formas maduras del PSTVd y del ASBVd son resistentes a DICER humana (Chang *et al.*, 2003), otros experimentos han mostrado que tanto una región estructurada del PLMVd como el RNA genómico del PSTVd son sustrato de una o más DCLs al ser incubadas con extractos de germen de trigo y de *A. thaliana*, respectivamente (Landry y Perreault, 2005; Itaya *et al.*, 2007). Además, como la mayoría de los vd-sRNAs clonados de plantas infectadas por el PSTVd y el CEVd son de polaridad positiva (Itaya *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2007), dichos vd-sRNAs deberían provenir de la digestión de la molécula madura más que de los intermediarios replicativos, porque en tal caso debería haber aproximadamente la misma cantidad de vd-sRNAs de ambas polaridades. Sin embargo, la metodología de clonación de los siRNAs es cuestionable porque podría no rescatar los siRNAs

secundarios (Pak y Fire, 2007; Sijen *et al.*, 2007). Además, en un trabajo reciente la mayoría de los vd-sRNAs clonados de preparaciones de tomate infectado por el PSTVd son de polaridad (-) (Machida *et al.*, 2007). Por lo tanto, no se puede excluir que los vd-sRNAs provengan también de los intermediarios replicativos.

Tanto los mecanismos moleculares que generan los vd-sRNAs en una infección viroidal como la identidad de las DCLs implicadas en su biogénesis no se conocen todavía. Esta situación es debida en parte a la imposibilidad de utilizar los mutantes de los genes que codifican las DCLs (*dcl1-dcl4*) de *A. thaliana*, pues esta especie no es infectada sistémicamente por viroides (Darós y Flores, 2004). En principio, análogamente a lo que ocurre con los ribovirus (Deleris *et al.*, 2006), los vd-sRNAs primarios podrían originarse en el citoplasma por la acción de DCL2 o DCL4 sobre los RNAs viroidales maduros, que debido a su alto contenido en estructura secundaria y a que no están encapsidados parecen particularmente vulnerables a enzimas de este tipo. Por otra parte, los vd-sRNAs secundarios podrían provenir del procesamiento por DCL2 o DCL4 de dsRNAs generados por la acción de la RDR6 citoplasmática sobre los ssRNAs viroidales, bien transcribiendo directamente los mismos bien utilizando ciertos vd-sRNAs primarios como cebadores. Además, en los miembros de la familia *Pospiviroidae*, DCL1 podría actuar en el núcleo sobre las forma viroidales maduras o sobre los dsRNAs resultantes de su replicación. En los miembros de la familia *Avsunviroidae* la producción de los vd-sRNAs debería ocurrir exclusivamente en el citoplasma durante el movimiento célula a célula del RNA genómico, ya que no se han identificado DCLs cloroplásticas (Fig. 17) (Flores *et al.*, 2005).

3.3.2.2. Función de los vd-sRNAs

3.3.2.2.1. Regulación del título viroidal

Al igual que ocurre con los virus de RNA de plantas (Omarov *et al.*, 2007; Pantaleo *et al.*, 2007), los vd-sRNAs podrían actuar como verdaderos siRNAs guiando a RISC para degradar los RNAs viroidales (Fig. 17), contribuyendo así junto a las DCLs a regular el título del viroide. Sin embargo, los datos experimentales existentes en torno a esta cuestión son contradictorios.

Por una parte, varios resultados sugieren que los viroides no son dianas de RISC: i) secuencias no replicativas del PSTVd fusionadas a un gen delator y expresadas transgénicamente son resistentes a siRNAs derivados de una construcción con secuencias invertidas de dicho viroide expresada sobre el fondo de éstas plantas (Wang *et al.*, 2004), ii) la replicación del PSTVd en protoplastos no se ve afectada cuando el RNA viroidal se co-transfecta con dsRNAs o sRNAs homólogos (Itaya *et al.*, 2007), si bien las dosis empleadas de estos últimos fueron bajas, y iii), las formas genómicas del HSVd resultantes del procesamiento de transcritos diméricos de dicho viroide generados transgénicamente en *N. benthamiana* son resistentes al silenciamiento génico inducido al expresar transitoriamente en dichas plantas fragmentos no infecciosos del HSVd fusionados a un gen delator (Gómez y Pallás, 2007), aunque no se ha examinado si el viroide se replica en esta planta.

Por otra parte, los siguientes resultados sí sugieren que los vd-sRNAs producidos durante una infección viroidal son activos y podrían regular el título del viroide: i) la infección con el PSTVd de plantas transgénicas que expresan un gen delator fusionado en 3' a una secuencia parcial de dicho viroide, activa la degradación del transcrito recombinante y la metilación de las secuencias del transgén (Vogt *et al.*, 2004), ii) la fluorescencia generada por una construcción que incluye una secuencia complementaria al RNA del PSTVd fusionada al gen de la proteína verde fluorescente (GFP) se reduce al expresar dicha construcción en plantas de tomate infectadas por el viroide (Itaya *et al.*, 2007), iii) la expresión en *N. benthamiana* de fragmentos no infecciosos parciales o completos del HSVd fusionados a la región codificante de la GFP también es suprimida en plantas transgénicas que expresan dímeros del HSVd (Gómez y Pallás, 2007), iv) experimentos de hibridación Northern con preparaciones de plantas infectadas con miembros de la familia *Awsunviroidae* mostraron una correlación inversa entre la acumulación de las formas viroidales maduras y la de sus correspondientes vd-sRNAs: las concentraciones *in vivo* del PLMVd y del CChMVd son bajas pero sus vd-sRNAs son fácilmente detectables (Martínez de Alba *et al.*, 2002), mientras que en tejidos que acumulan una alta cantidad del ASBVd sus correspondientes vd-sRNAs son indetectables (Martínez de Alba *et al.*, 2002) o su cantidad es sensiblemente menor que la de las formas genómicas (Markarian *et al.*,

2004), y v) la acumulación de vd-sRNAs del PSTVd precede al fenómeno de recuperación que muestran plantas de tomate infectadas por dicho viroide en periodos tardíos de la infección (Sano y Matsuura, 2004).

En resumen, aunque algunos trabajos sostienen que las formas maduras de ciertos viroides son resistentes a RISC, otros indican que los vd-sRNAs pueden actuar específicamente sobre dichos RNAs y controlar su título en infecciones naturales.

3.3.2.2.2. Papel de los vd-sRNAs en la patogénesis

La expresión de síntomas en infecciones inducidas por virus de plantas puede explicarse, al menos para aquellos que codifican supresores de silenciamiento génico, por la interferencia de dichos supresores con las rutas de los miRNAs endógenos (Kasschau *et al.*, 2003), y en las inducidas por virus animales de DNA por la acción específica de ciertos miRNAs codificados en su genoma sobre algunos mRNAs celulares (Pfeffer *et al.*, 2004 y 2005; Sullivan *et al.*, 2005; Sullivan y Ganem, 2005; Cullen, 2006).

En el caso de los viroides se ha propuesto que algunos vd-sRNAs podrían dirigir la metilación de regiones del DNA del huésped y bloquear la expresión de ciertos genes (Pellissier y Wassenegger, 2000), o actuar como miRNAs dirigiendo la degradación o inhibiendo la traducción de mRNAs del huésped, causando así la aparición de síntomas (Papaefthimiou *et al.*, 2001; Markarian *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; para revisiones ver Flores *et al.*, 2004 y 2005; Ding e Itaya, 2007). En concordancia con esta última hipótesis, en el PSTVd y el ASBVd se ha observado una correlación directa entre la intensidad de los síntomas y los niveles de vd-sRNAs (Itaya *et al.*, 2001; Markarian *et al.*, 2004), aunque una correlación similar también se observa con los RNAs viroidales genómicos. Además, la expresión de síntomas en plantas de tomate transgénicas que expresan repeticiones invertidas incompletas del PSTVd está correlacionada con la producción de siRNAs, mientras que ni se detectan síntomas ni se acumulan siRNAs en plantas transgénicas que expresan una construcción control con repeticiones directas (Wang *et al.*, 2004). Sin embargo, otros datos no sostienen esta hipótesis ya que: i) los niveles de acumulación de vd-sRNAs inducidos por cepas sintomáticas y no sintomáticas del PSTVd y del CChMVd son esencialmente los mismos (Papaefthimiou

et al., 2001; Martínez de Alba *et al.*, 2002), ii) muy pocos vd-sRNAs proceden del dominio de patogénesis (Itaya *et al.*, 2007; Machida *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2007), iii) una serie de mRNAs regulados por miRNAs no se ven alterados durante la infección por el CEVd (Martín *et al.*, 2007), y iv) los presumibles mRNAs diana identificados *in silico* no se han examinado *in vivo* (Wang *et al.*, 2004). Por lo tanto, este conjunto de resultados en parte contradictorios deja abierta la posibilidad de que los efectores primarios de la patogénesis viroidal sean tanto las formas genómicas maduras como los vd-sRNAs (o la acción combinada de ambos).

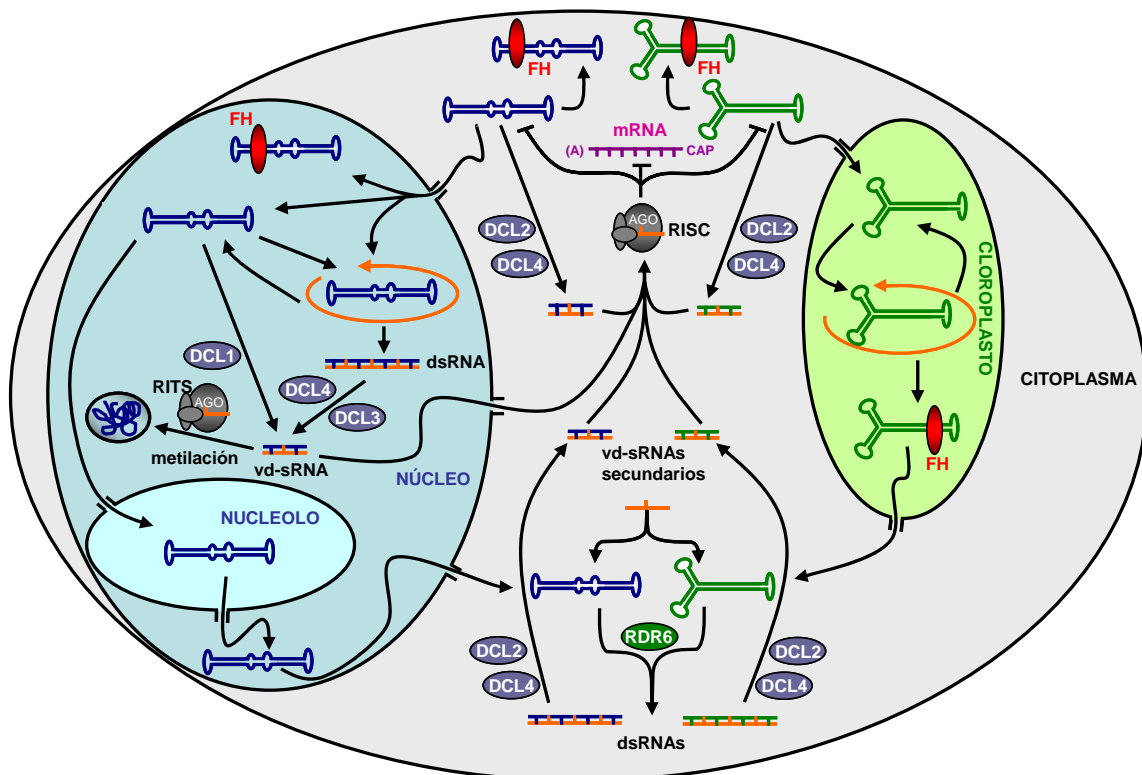


Figura 17. Modelo de silenciamiento génico mediado por RNA propuesto para los viroides, en el que pueden ser inductores y dianas del PTGS (adaptado de Flores *et al.*, 2005). El proceso se desencadena al actuar una DCL sobre un intermediario de replicación o sobre la molécula madura. Los vd-sRNAs resultantes son incorporados a RISC y le sirven de guía para degradar tanto las formas genómicas viroidales (y controlar su título) como los mRNAs endógenos con secuencia complementaria (y causar los síntomas). Alternativamente, los síntomas pueden ser causados por la interacción directa del RNA genómico viroidal con un factor del huésped (FH, proteína o RNA), bien en el orgánulo donde el viroide se replica y se acumula, bien en el citoplasma durante su movimiento célula a célula. Además, en los miembros de la familia *Pospiviroidae*, los vd-sRNAs pueden a través de RITS dirigir la metilación de regiones del DNA con secuencia complementaria. La amplificación de la respuesta ocurre en el citoplasma mediante la acción de la RDR6 sobre los RNAs viroidales transcribiendo directamente los mismos o utilizando los vd-sRNAs primarios como cebadores.

3.3.3. Los viroides y la supresión del PTGS

Numerosos estudios aparecidos en los últimos años han demostrado que la mayoría de los virus de plantas, además de inducir y ser diana del PTGS, son capaces de contrarrestarlo mediante la síntesis de distintas clases de proteínas supresoras de silenciamiento génico codificadas en su genoma (revisado por Li y Ding, 2006). Sin embargo, los viroides no pueden evadir el PTGS por un mecanismo similar ya que no codifican proteína alguna y por lo tanto su presumible estrategia contradefensiva debe basarse en otra clase de mecanismos.

Con respecto a sus propiedades estructurales, algunos trabajos sugieren que los viroides podrían haber evolucionado hacia una estructura secundaria compacta, pero no estrictamente de dsRNA, que les hiciera parcialmente resistentes a las DCLs (Wang *et al.*, 2004), y totalmente resistentes a RISC (Wang *et al.*, 2004; Gómez y Pallás, 2007; Itaya *et al.*, 2007), que actúan mejor sobre RNAs muy y poco estructurados, respectivamente. Sin embargo, la estructura secundaria de los viroides podría haber evolucionado hacia una situación de compromiso que les permitiera establecer la infección aún siendo sustrato de las DCLs y de RISC. Otros factores biológicos que pueden además conferir resistencia a los viroides frente al PTGS son su alta tasa de replicación, su posible asociación con proteínas que los protegerían, y su compartimentalización en orgánulos exentos de actividad RISC como el nucleolo y el cloroplasto (discutido en Denti *et al.*, 2004 y en Flores *et al.*, 2005).

Los viroides, por último, podrían utilizar algunos de sus RNAs no genómicos para reclutar parte de la maquinaria implicada en la defensa por silenciamiento génico, permitiendo así su infección. Una situación de esta clase ha sido descrita en células humanas infectadas por un adenovirus que utiliza alguno de sus RNAs subgenómicos (VAI) para secuestrar enzimas implicadas en la respuesta defensiva de PTGS (DCLs, RISC o exportinas) y favorecer así su infección (Lu y Cullen, 2004; Andersson *et al.*, 2005; Sano *et al.*, 2006), y en plantas infectadas por el virus del mosaico necrótico del trébol rojo (*Red clover necrotic mosaic virus*, RCNMV) cuya replicación en *A. thaliana* requiere de algunas DCLs para formar complejos con el RNA viral y sus proteínas p88 y p27 (Takeda *et al.*, 2005). Es de destacar que el RCNMV carece de supresores

proteicos del silenciamiento y que, por lo tanto, su efecto supresor está íntimamente ligado a su replicación. Una situación similar podría ocurrir en los viroides.

4. Control de enfermedades de plantas causadas por viroides

El control de las enfermedades viroidales se ha centrado tradicionalmente en métodos de diagnóstico rápidos y fiables, en la eliminación del material infectado, y en la desinfección de los instrumentos de corte y poda con agentes como el hipoclorito sódico (Singh *et al.*, 1989). Los intentos de control por medio de agentes químicos no han tenido demasiado éxito debido a su corta vida útil (Singh, 1977) o a su toxicidad (Bellés *et al.*, 1986). Sin embargo, la aplicación conjunta de termoterapia o crioterapia en combinación con el cultivo de ápices meristemáticos sí ha resultado efectiva en la eliminación de ciertos viroides (Postman y Hadidi, 1995; Lizárraga *et al.*, 1980). El microinjerto de ápices caulinares *per se*, sin tratamiento térmico, ha conducido a la obtención de cítricos y de plántulas de tomate libres de CEVd (Navarro *et al.*, 1981; Durán-Vila y Semancik, 1986).

Debido al éxito limitado de estas estrategias, el interés se ha desplazado hacia el aprovechamiento de las nuevas técnicas de biología molecular, y más concretamente hacia el uso de ácidos nucleicos como 'agentes terapéuticos'. Uno de los primeros ejemplos consistió en hibridar *in vitro* el PSTVd con un oligonucleótido de DNA antisentido, e inocular posteriormente el híbrido a plantas de tomate que mostraron una notable disminución de la infectividad (Matousek *et al.*, 1993). Más tarde se puso de manifiesto que plantas transgénicas de tomate expresando RNAs antisentido contra las cadenas de polaridad (+) o (-) del CEVd acumulaban cantidades inferiores del viroide tras su inoculación. Sin embargo, este resultado sólo se observó con las construcciones dirigidas contra las cadenas de polaridad (-), que se acumulan considerablemente menos que las de polaridad positiva *in vivo*. Además, la incorporación de un dominio catalítico (una ribozima de cabeza de martillo) al RNA antisentido no mejoró el efecto obtenido (Atkins *et al.*, 1995). Por contra, en otros estudios similares con el PSTVd en patata no se observó apenas efecto sobre su infectividad (Matousek *et al.*, 1994), poniendo así de manifiesto la dificultad de aplicar *in vivo* este tipo de estrategias. Sin embargo, en estudios más recientes sí se ha obtenido cierta resistencia al PSTVd en plantas transgénicas de patata expresando una RNasa de

Schizosaccharomyces pombe específica de dsRNAs (Sano *et al.*, 1997). Una metodología similar ha sido también empleada para controlar el CSVd en plantas transgénicas de crisantemo (Ishida *et al.*, 2002). Finalmente, plantas transgénicas de patata expresando una ribozima de cabeza de martillo contra los RNAs de polaridad (-) del PSTVd han mostrado una notable resistencia, pudiendo atribuirse el efecto a la actividad ribozimática ya que las líneas control con el dominio catalítico inactivado no mostraron resistencia (Yang *et al.*, 1997). Sin embargo la resistencia observada en plantas transgénicas de tomate expresando la misma construcción fue muy limitada, probablemente debido a que la mayor tasa de replicación viroidal en tomate que en patata sobrepasaría la resistencia aportada por el RNA antisentido catalítico (Tabla 4).

Tabla 4. Estrategias para el control de enfermedades viroidales en plantas

Transgén	Viroide*	Planta	Observaciones	Referencia
RNA antisentido	PSTVd	<i>Solanum tuberosum</i>	Efecto sobre la acumulación del viroide superado a los pocos días post inoculación	Matousek <i>et al.</i> , 1994
	CEVd	<i>Solanum esculentum</i>	Disminución de la acumulación del viroide por efecto sobre los RNAs de polaridad (-)	Atkins <i>et al.</i> , 1995
RNA antisentido con una ribozima	CEVd	<i>Solanum esculentum</i>	Disminución de la acumulación del viroide por efecto sobre los RNAs de polaridad (-)	Atkins <i>et al.</i> , 1995
Ribozima	PSTVd	<i>Solanum tuberosum</i>	Resistencia por efecto sobre los RNAs de polaridad (-)	Yang <i>et al.</i> , 1997
RNAsa	PSTVd	<i>Solanum tuberosum</i>	Resistencia	Sano <i>et al.</i> , 1997
	CSVd	<i>Dendranthema grandiflora</i>	Resistencia	Ishida <i>et al.</i> , 2002

*CEVd, *Citrus exocortis viroid*; CSVd, *Chrysanthemum stunt viroid*; PSTVd, *Potato spindle tuber viroid*

La resistencia parcial obtenida en alguno de estos trabajos sugiere que el control de ciertas enfermedades viroidales no es sencillo, a la vez que invita a profundizar en el estudio de estas estrategias y en el desarrollo de otras nuevas para mejorar la eficiencia.

Objetivos

Objetivos

En la presente Tesis Doctoral se ha profundizado en el estudio de las ribozimas de cabeza de martillo y de los RNAs interferentes para generar resistencia a viroides en plantas.

Los objetivos específicos planteados han sido:

- i) Estudiar el efecto del trinucleótido que precede al sitio de corte de la ribozima de polaridad (+) del ELVd sobre la actividad autocatalítica de la misma, para adaptar la variante más activa al formato *trans*
- ii) Determinar la actividad catalítica en *trans* de ribozimas de cabeza de martillo con motivos de estabilización terciaria frente al RNA de polaridad (-) del PSTVd *in vitro* a bajas concentraciones de magnesio, y evaluar *in vivo* la ribozima más activa frente a dicho viroide
- iii) Examinar si RNAs bicatenarios o con plegamiento en horquilla interfieren específicamente con infecciones causadas por viroides

Capítulo 1

Effects of the trinucleotide preceding the self-cleavage site on eggplant latent viroid hammerheads: differences in co- and post-transcriptional self-cleavage may explain the lack of trinucleotide AUC in most natural hammerheads¹

Alberto Carbonell, Marcos De la Peña, Ricardo Flores and Selma Gago

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Avenida de los Naranjos, s/n, 46022 Valencia, Spain

ABSTRACT

Eggplant latent viroid (ELVd) can form stable hammerhead structures in its (+) and (-) strands. These ribozymes have the longest helices I reported in natural hammerheads, with that of the ELVd (+) hammerhead being particularly stable (5/7 bp are G-C). Moreover, the trinucleotide preceding the self-cleavage site of this hammerhead is AUA, which together with GUA also found in some natural hammerheads, deviate from the GUC present in most natural hammerheads including the ELVd (-) hammerhead. When the AUA trinucleotide preceding the self-cleavage site of the ELVd (+) hammerhead was substituted by GUA and GUC, as well as by AUC (essentially absent in natural hammerheads), the values of the self-cleavage rate constants at low magnesium of the purified hammerheads were: ELVd-(+)-AUC \approx ELVd-(+)-GUC>ELVd-(+)-GUA>ELVd-(+)-AUA. However, the ELVd-(+)-AUC hammerhead was the catalytically less efficient during *in vitro* transcription, most likely because of the transient adoption of catalytically-inactive metastable structures. These results suggest that natural hammerheads have been evolutionary selected to function co-transcriptionally, and provide a model explaining the lack of trinucleotide AUC preceding the self-cleavage site of most natural hammerheads. Comparisons with other natural hammerheads showed that the ELVd-(+)-GUC and ELVd-(+)-AUC hammerheads are the catalytically most active in a post-transcriptional context with low magnesium.

¹Published in *Nucleic Acids Res.* **34**, 5613-5622 (2006)

INTRODUCTION

Hammerhead ribozymes were initially described in viroid and viroid-like satellite RNAs wherein they mediate self-cleavage of the multimeric RNA intermediates of one or both polarities resulting from replication through a rolling-circle mechanism (1,2, see for a review 3). More specifically, hammerhead viroids follow a symmetric pathway of this mechanism in which the multimeric RNAs of both polarities self-cleave and subsequently are ligated into the corresponding monomeric circular RNAs (4). Early structural dissection showed that minimized catalytically-active hammerheads have as few as 52 nt (5,6), igniting much interest in deciphering the catalytic mechanism (7-9) and developing its potential as a biotechnological tool (10). Most natural hammerheads are formed by a central conserved core flanked by three double-stranded regions with relaxed sequence requirements (helices I, II and III), two of which (I and II) are capped by short loops (1 and 2, respectively). X-ray crystallography uncovered an intricate assortment of non-canonical interactions between the nucleotides of the central core, explaining their conservation in natural hammerheads and illustrating that the actual contour does not resemble a hammerhead but rather a distorted Y in which the basal helix III is almost co-linear with helix II, whilst helix I forms an angle (7-9).

However, these structural studies, which were performed with artificial hammerheads, are partially at odds with some biochemical data (11), and the use of artificial ribozymes designed to act in *trans* against specific RNA targets have met with limited success *in vivo*. More recent data have provided an explanation for these discrepancies by showing that modifications of loops 1 and 2 of natural hammerheads provoke a drastic reduction in their catalytic activity, indicating that these peripheral regions play a crucial role in catalysis through tertiary interactions between some of their nucleotides that may favor the active site at the low magnesium concentration existing *in vivo* (12-15). These interactions, direct evidence for which has been recently derived from the crystallographic structure of a natural hammerhead (16), are currently being incorporated into a new generation of more efficient *trans*-acting artificial hammerheads (17-19).

Eggplant latent viroid (ELVd) (20) is the last reported member of the family *Awsunviroidae* of hammerhead viroids (4, 21). Both (+) and (-) ELVd hammerheads display some peculiarities, the influence of which in the catalytic behavior of these ribozymes has not yet been determined. Here we report the effects of changes in the trinucleotide preceding the self-cleavage site on the self-cleavage kinetics of the ELVd hammerheads, together with a model explaining the lack of trinucleotide AUC in most natural hammerheads, based on differences in co- and post-transcriptional self-cleavage. We also present a comparative analysis of the ELVd hammerheads with other natural hammerheads in a post-transcriptional context at low magnesium concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Construction of hammerhead cDNAs

The cDNA of the ELVd (+) hammerhead was PCR-amplified with *Pwo* DNA polymerase and the buffer recommended by the supplier (Roche Diagnostics) using as template the plasmid containing the complete cDNA of the ELVd reference variant (ELVd-2) (Fadda *et al.*, 2003) and the sense RF-689 (5'-TAATACGACTCACTATAGG CCCCATAGGGTGGTGTG-3') and antisense RF-690 (5'-TCTAGACCCCATTTCGACC-3') primers. Mutants of the trinucleotide preceding the self-cleavage site were obtained by PCR amplification using the same template and the sense RF-691 (5'-TAATACGACTCACTATAGGCCCCgTcGGGTGGTGTG-3') and antisense RF-692 (5'-TCTAGACCCCgTTTCGACC-3') primers for the hammerhead with the trinucleotide GUC, the sense RF-693 (5'-TAATACGACTCACTATAGGCCCCATcGGGTGGTGTG-3') and antisense RF-690 primers for the hammerhead with the trinucleotide AUC, and the sense RF-694 (5'-TAATACGACTCACTATAGGCCCCgTAGGGTGGTGTG-3') and antisense RF-692 primers for the hammerhead with the trinucleotide GUA. After an initial denaturation at 94°C for 2 min, the PCR profile (30 cycles) was: 94°C for 20 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s, with a final extension at 72°C for 10 min. The cDNA of the (+) hammerhead of the *Satellite RNA of tobacco ring spot virus* (sTRSV) was prepared by extension of the partially overlapping sense RF-875 (5'-GGTAAATACGACTCAC TATAGGCTGTCACCGGATGTGCTTTCCGGTC-3') and antisense RF-876 (5'-GGGTC

TAGACTGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGACCGGAAAGC-3') primers (five cycles at 94°C for 30 s, 30°C for 30 s and 72°C for 30 s, with a final extension at 72°C for 2 min). Sense primers included the T7 promoter (underlined) and antisense primers the Xba I site (in italics). Point mutations are indicated with lower case letters. PCR products were separated by PAGE in 10% gels and those with the expected length were eluted, digested with Xba I and cloned into pUC18 opened with Xba I and Sma I. Sequencing of the recombinant plasmids confirmed that they contained only the expected mutations. Construction of (+) hammerheads of *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) and *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) has been reported previously (12).

Synthesis and purification of hammerhead RNAs

Hammerhead RNAs were generated by *in vitro* transcription of the corresponding recombinant plasmids linearized with Xba I. Transcription reactions (25 µl) contained: 40 mM TrisHCl, pH 8, 6 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 10 mM DTT, 10 mM NaCl, 0.4 mM each of ATP, CTP and GTP, 0.08 mM UTP plus 0.25 µCi/µl [α -³²P]UTP, 0.8 U/µl of rRNasin ribonuclease inhibitor (Promega), 20 ng/µl of plasmid, 1.2 U/µl of T7 RNA polymerase and, when indicated, 0.1-1 mM of the self-cleavage blocking oligodeoxyribonucleotide(s). Blocking oligodeoxyribonucleotides were: RF-122 (12) and RF-88 (5'-CAAGAGTTTCGTCCTCATTTTC-3') for PLMVd, RF-142 for CChMVd (12), RF-872 (5'-TCTCATCAGGGGTGGCACACAC-3') and RF-873 (5'-CCCCATTTTCGACCTTTTCG-3') for ELVd, and RF-890 (5'-ACTCATCAGACCGGAAAGCACATC-3') and RF-891 (5'-CTGTTTCGTCCTCACG-3') for sTRSV. After incubation at 37°C for 45 min, transcription products were mixed with an excess of stop solution (50% formamide, 8 M urea, 50 mM EDTA and 0.25% of bromophenol blue and xylene cyanol), heated at 95°C for 1.5 min, and fractionated by PAGE in 15% gels containing 8 M urea. The uncleaved primary transcripts were extracted from the crushed gel pieces with phenol saturated with buffer (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM, SDS 0.7%) containing formamide (40%) to prevent self-cleavage, recovered by ethanol precipitation and resuspended in sterile deionized water.

Self-cleavage kinetics of purified hammerhead RNAs

To determine the self-cleavage rate constants, the purified primary transcripts from the different hammerheads were incubated in 20 μl of 50 mM TrisHCl, pH 7.5 for 2 min at 95°C followed by a slow ramp down to 25°C at -6°C/min. Samples were incubated for 5 min at 25°C and, after taking a zero-time aliquot, the reactions were initiated by addition of MgCl_2 to the indicated concentrations (10 and 50 μM). Aliquots were removed at appropriate time intervals and quenched with 10 volumes of stop solution at 0°C. After heating at 95°C for 1.5 min, primary transcripts and their cleavage products were resolved by PAGE in 15% gels containing 8 M urea and quantified with a bioimage analyzer. The product fraction at different times (F_t) was determined and fitted to the equation $F_t = F_\infty(1 - e^{-kt})$, where F_∞ is the product fraction at the endpoint, and k is the first-order rate constant of self-cleavage (k_{cat}). Values are the means of three independent experiments.

Self-cleavage kinetics of hammerhead RNAs during transcription

Reactions, in absence of blocking oligodeoxyribonucleotides, were performed as described above with the exception of the MgCl_2 concentration, which was adjusted as indicated in Results, and the T7 RNA polymerase, which was added to trigger the reactions (zero-time). Reaction mixtures were pre-incubated at 37°C for 1 min before adding the polymerase and then aliquots were removed at different time intervals and quenched with 10 volumes of stop solution at 0°C. Quantitation of primary transcripts and their cleavage products was as detailed above, and the self-cleavage rate constants (at 2 mM MgCl_2) were determined using the equation derived previously (22). Values are the means of at least two independent experiments.

RESULTS

Some peculiarities of the hammerhead structures from ELVd

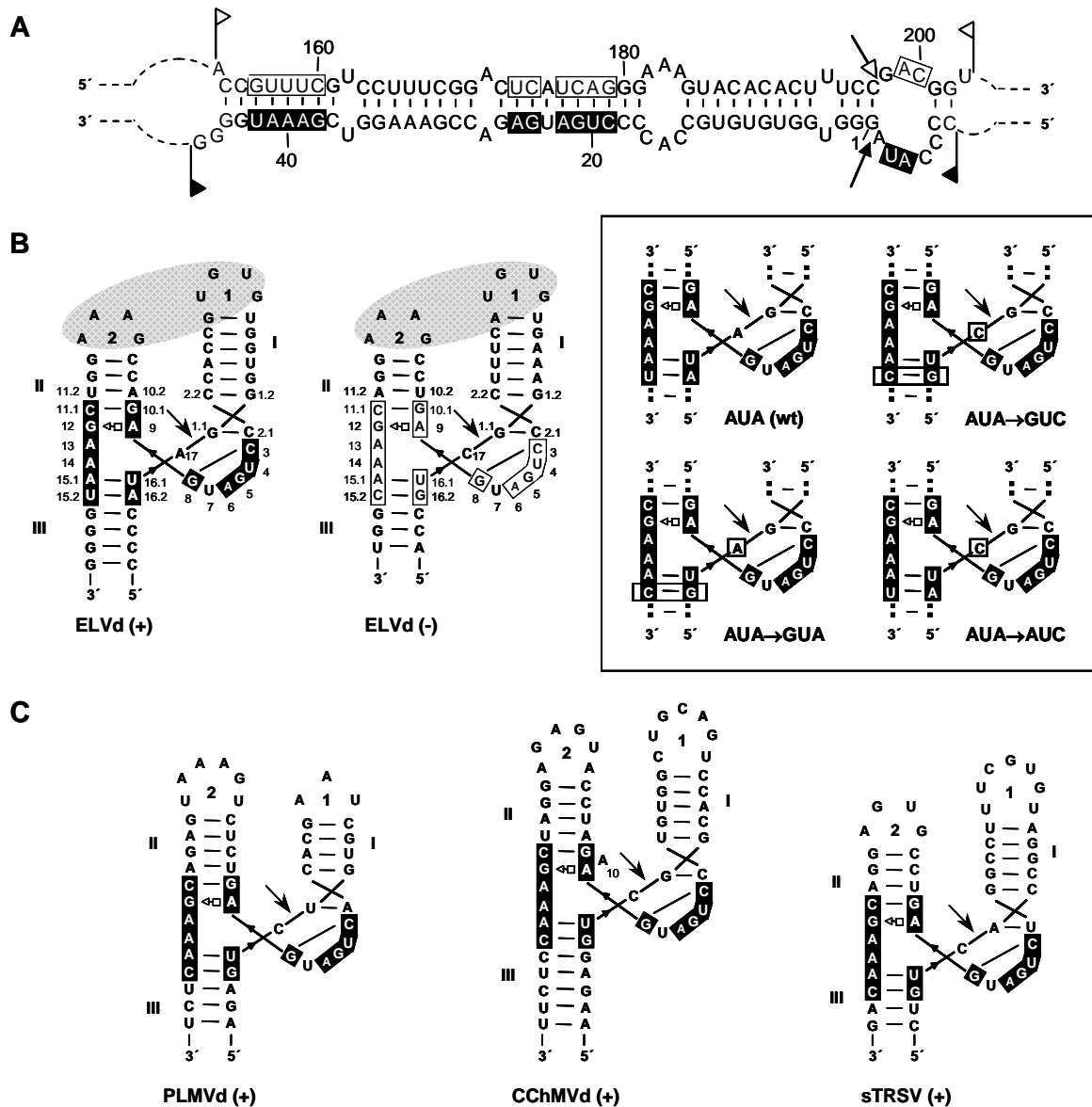


Fig. 1. (A) Rod-like secondary structure that the nucleotides involved in both hammerheads adopt in the predicted most stable conformation of the reference variant of ELVd (+) RNA (accession number AJ536613). Sequences forming the hammerheads are delimited by flags, motifs conserved in most natural hammerheads are within boxes, and self-cleavage sites are marked by arrows. Black and white backgrounds refer to (+) and (-) polarities, respectively. (B) Structure of the ELVd (+) and (-) hammerheads according to crystallographic data obtained for the *Schistosoma mansoni* hammerhead (16). Open square next to open triangle denotes Hoogsteen/sugar edge. Numbering of nucleotides and nomenclature of helices and loops is consistent with the standard criterion. Motifs conserved in most natural hammerheads are within boxes, and self-cleavage sites are marked by arrows. Black and white backgrounds refer to (+) and (-) polarities, respectively. The ovals represent the proposed tertiary interactions between loops 1 and 2 that increase the self-cleavage rates. The inset at the right displays the mutants derived from the ELVd (+) hammerhead used in the present work, with the changes introduced within boxes. (C). Structure of the (+) hammerheads of PLMVd, CChMVd and sTRSV.

The detailed morphology of both ELVd hammerheads has been reported previously (20) and, therefore, we will only summarize here their most salient features when compared with other natural hammerheads that have been used in this work. Both (+) and (-) ELVd strands contain the 11 residues that form the central conserved core of natural hammerheads (3), flanked by helix I/loop 1 (7 bp and 4 nt), helix II/loop 2 (4 bp and 4 nt forming a stable loop of the GNRA family) (23, 24), and helix III (6 and 5 bp for plus and minus hammerhead, respectively) (Fig. 1) (Table 1).

Table 1. Structural characteristics of some hammerhead ribozymes

Hammerhead	Helix I/ loop 1 ¹	Helix II/ loop 2	Helix III	Trinucleotide preceding the self-cleavage site (5'→3')
ELVd (+)	7/4	4/4	6	AUA
ELVd (-)	7/4	4/4	5	GUC
ELVd-(+)-GUC	7/4	4/4	6	GUC
ELVd-(+)-AUC	7/4	4/4	6	AUC
ELVd-(+)-GUA	7/4	4/4	6	GUA
PLMVd (+)	5/3	5/6	5	GUC
CChMVd (+)	6/7	5/6	7	GUC
sTRSV (+)	6/7	4/4	4	GUC
cscRNA (+)	6/6	4/4	7	GUA
cscRNA (-)	6/6	4/4	5	AUA
sLTSV (-)	6/13	4/6	5	GUA
sCYDV-RPV (+)	4/8	Atypical ²	6	AUA

¹Length of helices (in base pairs) and loops (in bases)

²Long helix II composed by segments of 5, 4 and 4 base pairs separated by internal loops and closed by a terminal loop of 4 bases

This morphology is similar to that of both hammerheads of PLMVd (25), and to the (+) hammerheads of CChMVd (26) and sTRSV (2) (Fig. 1), although helices I of ELVd hammerheads are the longest reported in natural hammerheads (3), with that of the (+) hammerhead being particularly stable (5/7 bp are G-C). The sequence heterogeneity observed in natural ELVd variants is consistent with the existence in helix I of both ELVd hammerheads of a base pair between positions 1.7 and 2.7, because a U-G pair is substituted by a U-A pair or viceversa (20). In the (+) ELVd hammerhead, positions 15.2 and 16.2 form a U-A pair instead of the predominant C-G pair, a situation also found in the (+) hammerhead of *Satellite RNA of cereal yellow dwarf virus RPV* (sCYDV-RPV) (27) and in the (-) hammerhead of two cherry small circular RNAs (csc RNAs)

(28,29). In these three hammerheads the residue preceding the self-cleavage site is A and not C (Table 1) as in most natural hammerheads, suggesting some relationship between the three positions (20,28,29). The two ELVd hammerheads are more related to each other than to other hammerheads, as also occurs between the hammerheads of other viroid and viroid-like RNAs (5,25,26,28,29).

Antisense oligodeoxyribonucleotides against loops 1 and 2 efficiently prevent self-cleavage during in vitro transcription of minimal natural hammerheads

Although the self-cleavage rates of artificial hammerheads can be estimated based on measurements from *in vitro* transcription reactions (12,22,30-31), most natural hammerheads self-cleave efficiently under standard *in vitro* transcriptions. This forces the adoption of non-standard conditions, particularly low pH and magnesium concentration (12,31), which complicate further kinetic comparisons between different hammerheads. The alternative approach for estimating hammerhead self-cleavage rates, isolation of the uncleaved RNA from *in vitro* transcriptions and its subsequent incubation in a protein-free buffer (1,32-34), suffers the limitation that the uncleaved primary transcript usually represents a minor fraction of the transcription products. Extensive self-cleavage of the hammerhead RNA during *in vitro* transcription can be avoided by incorporating an oligodeoxyribonucleotide complementary to part of the ribozyme. This approach has been previously used with one ribozyme of hepatitis delta virus RNA (35), with *in vitro* selection of self-cleaving RNAs (36), with the CChMVd (+) and PLMVd (+) hammerheads (12) and with certain hammerheads encoded in the genome of *Arabidopsis thaliana* (37). In the CChMVd case, high levels of uncleaved primary transcripts (75% of the total RNA) were obtained in the presence of oligodeoxyribonucleotides complementary to the sequences forming part of helix I/loop 1 and helix II/loop 2 and the connecting CUGAUGA of the conserved central core (12).

Preliminary experiments with the ELVd (+) hammerhead showed that self-cleavage proceeded extensively during *in vitro* transcription under standard conditions (data not shown). In an attempt to attenuate this problem, an antisense oligodeoxyribonucleotide analogous to those used previously with the CChMVd (+) hammerhead (12) was

incorporated to the *in vitro* transcription mixture. However, the protecting effects were limited, as also were the effects of two other oligodeoxyribonucleotides complementary to sequences forming part of helix I/loop 1 and helix III connected by the A preceding the self-cleavage site, and to sequences forming part of helix II/loop 2 and helix III (data not shown). Considering that the fast self-cleavage rates of most natural hammerheads are very much influenced by tertiary interactions between loops 1 and 2 (12-15), we designed two oligodeoxyribonucleotides, one complementary to the complete loop 1 and its adjacent sequences of helices I and II, and the other complementary to the complete loop 2 and its adjacent sequences of helices II and III (Fig. 2A).

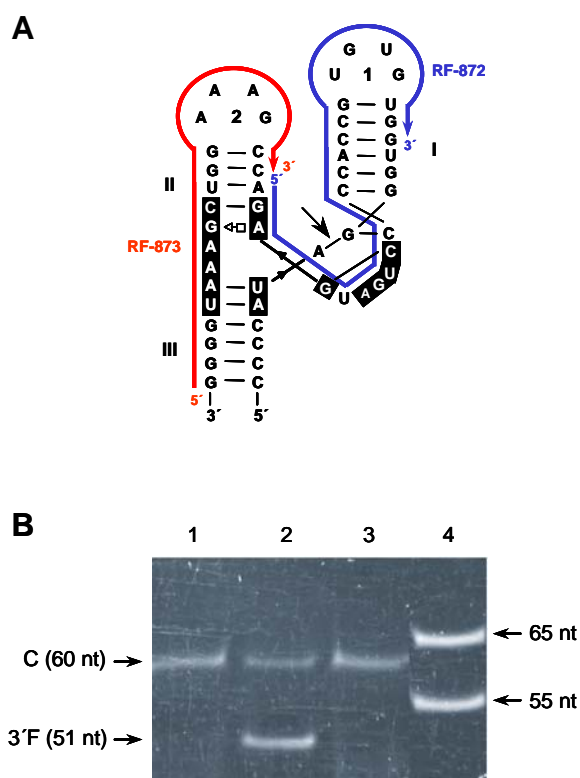


Fig. 2. (A) Positions of the ELVd (+) hammerhead covered by two antisense oligodeoxyribonucleotides (in color). Other details as in the legend to Fig. 1. **(B)** Self-cleavage during transcription of the ELVd (+) hammerhead in the presence and absence of the antisense oligodeoxyribonucleotides (lanes 1 and 2, respectively), and of the mutant ELVd(+)-GUC hammerhead (in which the wild-type AUA trinucleotide preceding the self-cleavage site has been substituted by GUC) in the presence of the antisense oligodeoxyribonucleotides (lane 3). Lane 4, RNA markers of 65 and 55 nt. Aliquots of the reaction mixtures were analyzed by PAGE in 15% gels containing 8 M urea that were stained with ethidium bromide. Positions of the complete (C) primary transcript (60 nt) and of the resulting self-cleavage 3' fragment (3'F) (51 nt) are indicated with arrows. The self-cleavage 5' fragment (9 nt) migrated out of the gel.

Co-incorporation of the two oligodeoxyribonucleotides to the *in vitro* transcription mixture abolished essentially self-cleavage (Fig. 2B, compare lanes 1 and 3 with 2), providing further support for the proposed tertiary interactions between loops 1 and 2. Moreover, the same approach also worked for the PLMVd (+) and sTRSV (+) hammerheads (data not shown), thus indicating that it may be of general application. A possible explanation for these results is that loops 1 and 2 may be more easily

accessible to antisense oligodeoxyribonucleotide than regions more structured like the central conserved core or its flanking helices.

Self-cleavage kinetics of the ELVd (+) hammerhead and of three mutants affecting the trinucleotide preceding the self-cleavage site

The trinucleotide preceding the self-cleavage site of most natural hammerheads, including the ELVd (-) hammerhead, is GUC (3,20). However, there are exceptions to this rule. As already indicated, the trinucleotide preceding the self-cleavage site of the ELVd (+), sCYDV-RPV (+) and csc RNAs (-) hammerheads is AUA (20,27-29). Furthermore, the trinucleotide preceding the self-cleavage site of the (+) hammerhead of csc RNAs and the (-) hammerhead of the *Satellite RNA of lucerne transient streak virus* (sLTSV) is GUA (5,28,29) (Table 1). Because the effects on self-cleavage kinetics of interchanging these trinucleotides preceding the self-cleavage site have not been determined in a *cis* context and at low magnesium concentration, we examined this question in the ELVd (+) hammerhead. As a control, we also studied the effect of the trinucleotide AUC, which with one exception (see below), has never been found preceding the self-cleavage site of natural hammerheads.

At very low magnesium concentration (10 μM), the ELVd-(+)-GUC mutant (where the GUC refers to the trinucleotide preceding the self-cleavage site) presented a self-cleavage rate constant significantly higher than the wild-type ELVd-(+)-AUA hammerhead (Fig. 3A). The ELVd-(+)-GUA mutant had a self-cleavage rate constant intermediate between those of the ELVd-(+)-GUC mutant and the ELVd-(+)-AUA wild-type but, surprisingly, the ELVd-(+)-AUC mutant displayed the highest rate constant (Fig. 3A). Moreover, at the end-point of the reaction, 95% of molecules from the three mutants with the highest rate constants self-cleaved, whereas this fraction was only 60% for the wild-type ELVd-(+)-AUA hammerhead (Fig. 3A). A similar trend in the rate constants was observed when the magnesium concentration was increased moderately (50 μM): ELVd-(+)-AUC \approx ELVd-(+)-GUC>ELVd-(+)-GUA>ELVd-(+)-AUA, with the fraction of self-cleaved molecules at the end-point of the reaction being higher than 95% in all cases (Fig. 3B). At higher magnesium concentration (500 μM), the self-cleavage rates were too fast to be analyzed manually (self-cleavage was essentially

complete after 30 s, data not shown). Altogether these results indicate that the effects of changes in the trinucleotide preceding the self-cleavage site follow the same tendency observed previously in artificial *trans*-acting hammerheads under high magnesium concentration (38-41). However, they neither provide hints on why some catalytically sub-optimal trinucleotides like AUA have been selected in natural hammerheads, nor on why the catalytically most favorable trinucleotide AUC has been essentially excluded in natural hammerheads.

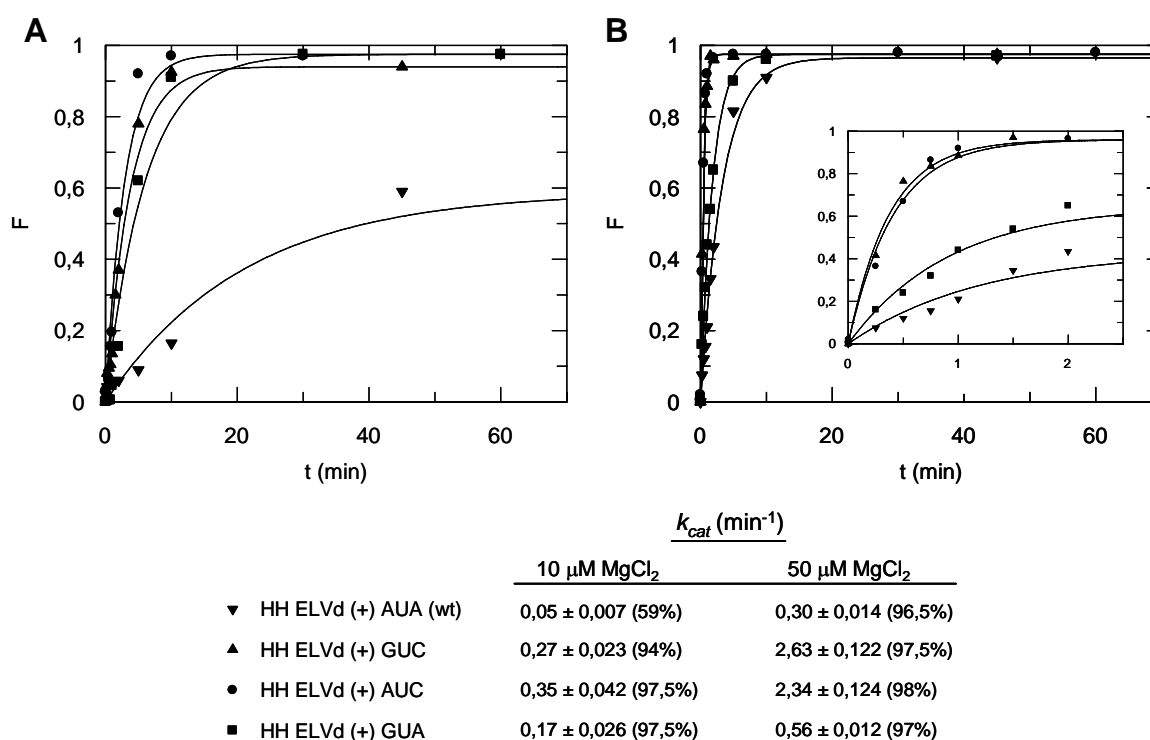


Fig. 3. Representative self-cleavage kinetics at 10 μM (A) and 50 μM (B) magnesium of the purified wild-type ELVd (+) hammerhead and of three mutants affecting the trinucleotide preceding the self-cleavage site. The fraction of product at different times (F_t) was determined by radioactivity quantitation of the corresponding gel bands with a bioimage analyzer and fitted to the equation $F_t = F_\infty (1 - e^{-kt})$, where F_∞ is the fraction of product at the endpoint of the reaction and k the first order rate constant of cleavage (k_{cat}). The *inset* displays the first 2 min for each experiment. The mean values obtained for the rate constants of the four hammerheads and for F_∞ (between parenthesis) are shown below. The concentration of Mg was approximately 1000-fold higher than that of hammerheads.

Co-transcriptional and post-transcriptional self-cleavage may be different: a model for the lack of the trinucleotide AUC in most natural hammerheads

Because RNA folding occurs during transcription (42), we considered the possibility that certain trinucleotides preceding the self-cleavage site, particularly AUC, might

promote the transient adoption of kinetically-inactive metastable structures. If these metastable structures are indeed formed (see Discussion and supplementary Fig. 1S), we reasoned that they could be indirectly revealed by their differential effect on self-cleavage very early during transcription, whereas the differences would be attenuated late in transcription when the most stable catalytically-active hammerhead outcompetes the metastable structures.

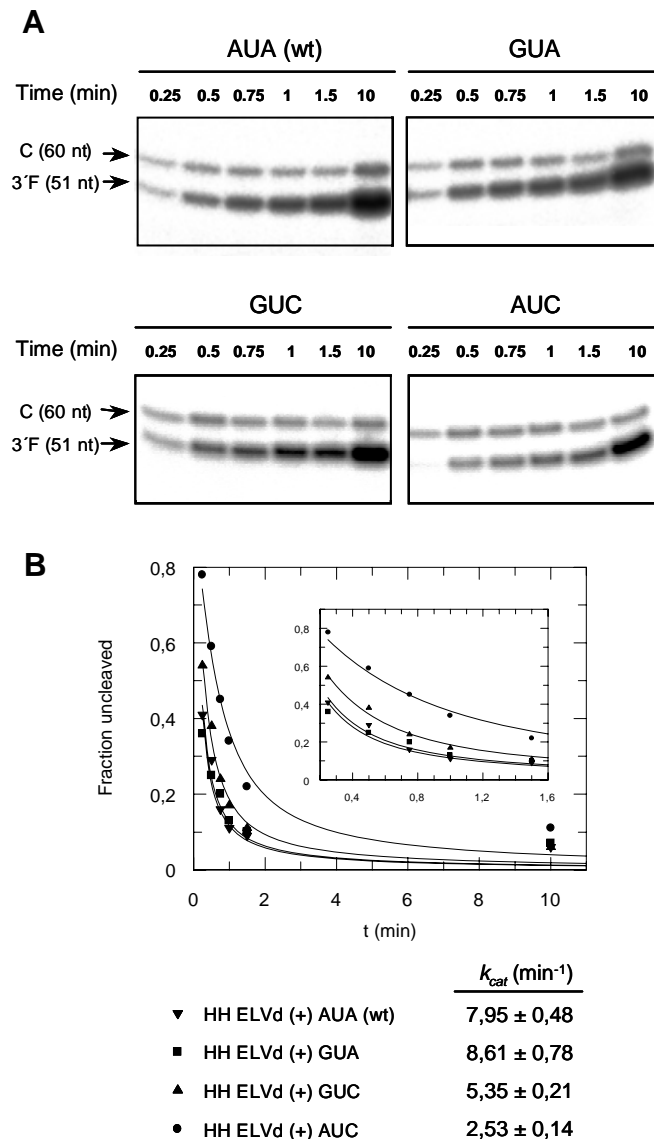


Fig. 4. (A) Representative self-cleavage kinetics during transcription of the wild-type ELVd (+) hammerhead and of three mutants affecting the trinucleotide preceding the self-cleavage site. Transcriptions (at pH 8 and 2 mM MgCl₂) were made in the absence of the antisense oligodeoxyribonucleotides. Reaction aliquots were removed at different time intervals, quenched with an excess of stop solution, separated by PAGE in 15% gels containing 8 M urea, and revealed and quantitated by a bioimage analyzer. Positions of the complete (C) primary transcript and of the resulting self-cleavage 3' fragment (3'F), with their sizes in nt are indicated on the left. The smaller self-cleavage 5' fragment (9 nt) has migrated out of the gel. **(B)** Quantitative data were fitted to the equation derived previously (22) by a least square method. The *inset* displays the first 1.5 min for each experiment.

The experimental data (Fig. 4) are consistent with this model. Self-cleavage of the ELVd-(+)-AUC hammerhead during the initial transcription instants (15 s) was significantly lower than that of the other three ELVd hammerheads (22% vs. 46-67%), whereas later in transcription (1.5 min) the differences were less conspicuous (78% vs.

89-91%), with self-cleavage being very similar for the four ELVd hammerheads (89-94%) 10 min after initiating transcription (Fig. 4A). Analogous results were obtained in independent experiments in which the magnesium concentration of the *in vitro* transcription mixture was, instead of 2 mM, 1 or 4 mM (data not shown). Following the approach for estimation of the self-cleavage rate constants during *in vitro* transcription (22), the values obtained for the four ELVd (+) hammerheads (at 2 mM magnesium and pH 8) were: ELVd-(+)-GUA>ELVd-(+)-AUA>ELVd-(+)-GUC>ELVd-(+)-AUC (Fig. 4B). During *in vivo* transcription the differences could be even higher because interactions with host proteins forming part of the replication complex might stabilize the metastable structures, thus explaining why the trinucleotide AUC, the catalytically most favorable in a post-transcriptional context, is essentially absent in natural hammerheads.

Comparative analysis with other natural hammerheads reveals two ELVd (+) hammerhead derivatives as the catalytically most active at low magnesium concentration

To have a reliable estimate of the catalytic properties of the ELVd (+) hammerheads in relation to other known natural hammerheads, a self-cleavage kinetics analysis of the PLMVd (+), CChMVd (+) and sTRSV (+) hammerheads was performed at the same low magnesium concentrations. The morphology of these three hammerheads presents differences in the helices and loops but the trinucleotide preceding their self-cleavage sites is GUC (Fig. 1C). At 10 μ M magnesium, the self-cleavage rate constants of the PLMVd (+) and CChMVd (+) hammerheads were 5-6 fold lower than the comparable ELVd-(+)-GUC hammerhead (the ELVd variant with the same triplet preceding the self-cleavage site), whereas the self-cleavage rate constant of the sTRSV (+) hammerhead was negligible (Fig. 5A). When compared with the fraction of self-cleaved molecules for the ELVd-(+)-GUC hammerhead at the end-point of the reaction (94%), the corresponding values for CChMVd (+) and, particularly, for the PLMVd (+) hammerheads were significantly lower (80 and 52%, respectively). At 50 μ M magnesium the differences became somewhat diminished but the rate constant and the extent of self-cleavage of the ELVd-(+)-GUC hammerhead were still the highest (Fig.

5B). Therefore, the latter hammerhead, and the ELVd-(+)-AUC mutant (Fig. 3), appear as the catalytically most active in this particular post-transcriptional context.

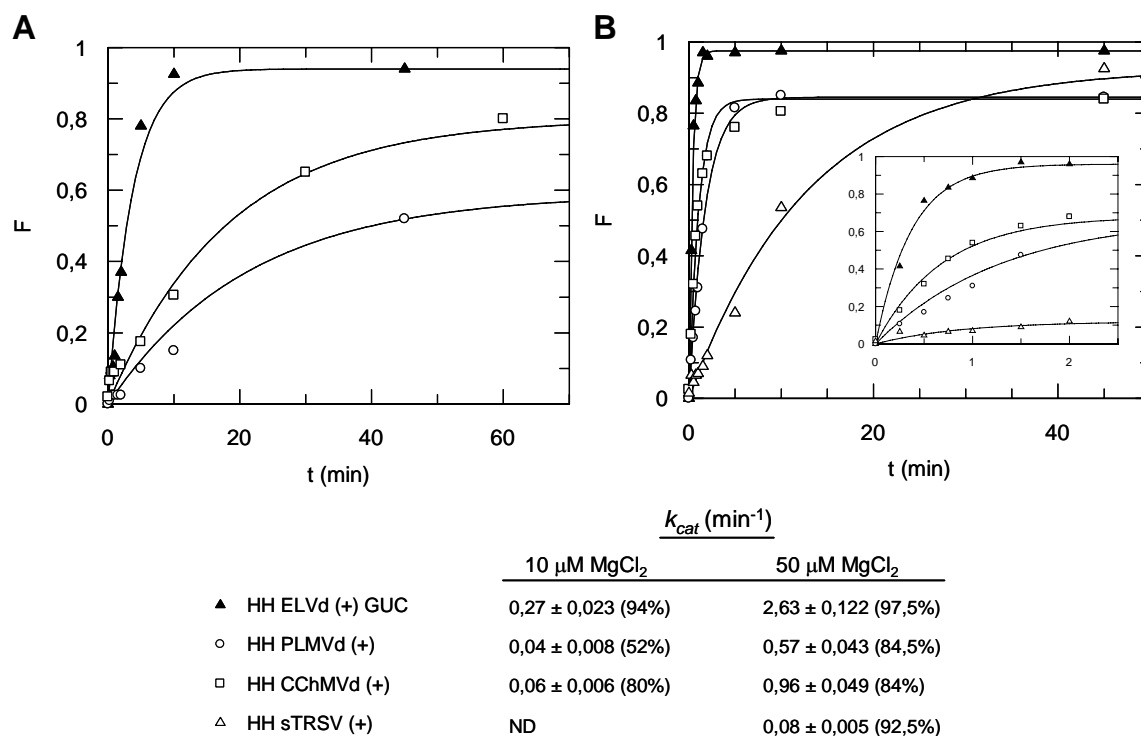


Fig. 5. Representative self-cleavage kinetics at 10 μM (A) and 50 μM (B) magnesium of the purified ELVd-(+)-GUC mutant hammerhead and of three other natural hammerheads with the trinucleotide GUC preceding the self-cleavage site. The fraction of product at different times (F_t) was determined by radioactivity quantitation of the corresponding gel bands with a bioimage analyzer and fitted to the equation $F_t = F_\infty (1 - e^{-kt})$, where F_∞ is the fraction of product at the endpoint of the reaction and k the first order rate constant of cleavage (k_{cat}). The *inset* displays the first 2 min for each experiment. The mean values obtained for the rate constants of the four hammerheads and for F_∞ (between parenthesis) are shown below. ND, not detectable self-cleavage. The concentration of Mg was approximately 1000-fold higher than that of hammerheads.

DISCUSSION

The study of hammerheads in their *cis* context and at the low magnesium concentration existing *in vivo* has still received limited interest, despite its implications for a better understanding of the catalytic mechanism and biological diversity of natural hammerheads, as well as for the development of artificial *trans*-acting hammerheads with increased activity in physiological conditions. Here we have examined the self-cleavage kinetics at low magnesium concentration of the hammerheads described recently in ELVd (20) and, from the effects of changes in the

trinucleotide preceding the self-cleavage site, we have tried to derive some clues about the rules governing the limited variability of this trinucleotide in natural hammerheads.

Starting from the ELVd (+) hammerhead, with an AUA trinucleotide preceding the self-cleavage site, we changed this trinucleotide into GUC. Due to the very similar morphology of both ELVd hammerheads (Fig. 1B), this substitution transformed the ELVd (+) hammerhead in a derivative analogous to the ELVd (-) hammerhead. Kinetic analysis at two low magnesium concentrations (10 and 50 μM) showed that the self-cleavage rate constant of the ELVd-(+)-GUC mutant was considerably higher than that of ELVd-(+)-AUA wild-type (Fig. 3), raising the question of why two trinucleotides have been differentially selected in the two ELVd hammerheads. Moreover, under the same magnesium concentrations, the self-cleavage rate constants of the ELVd-(+)-AUC and ELVd-(+)-GUA mutants were similar to and somewhat lower than those of the ELVd-(+)-GUC mutant, respectively. Whereas the GUA trinucleotide precedes the self-cleavage site of two natural hammerheads (Table 1), why the catalytically very favorable trinucleotide AUC has been excluded in most natural hammerheads?

The effect of the trinucleotide preceding the self-cleavage site on the rate constant has been previously studied in several artificial *trans*-acting hammerheads at high magnesium concentration. Although there are some discrepancies that probably reflect the distinct characteristics of specific hammerheads, the highest self-cleavage rate constants were observed for the trinucleotides GUC and AUC, whereas those for the trinucleotides GUA and AUA were significantly smaller (38-41). These results parallel those reported here at low magnesium concentration with the *cis*-acting ELVd (+) hammerhead and its mutants, indicating that they are to a good extent independent of the *cis* or *trans* context.

In the framework of ELVd replication, the two trinucleotides preceding the self-cleavage site may have been differentially selected in the two hammerheads because of the need of differential self-cleavage rates during transcription of (+) and (-) strands. Replication additionally entails subsequent ligation of the self-cleaved RNAs. It is not yet clear whether in hammerhead viroids of the family *Avsunviroidae* this is an enzyme-catalyzed reaction or it occurs non-enzymatically (self-ligation) giving rise to a 2',5'-

phosphodiester bond (see 4 for a discussion), but the RNA structures promoting self-cleavage and ligation may well be not be the same and, consequently, the trinucleotides preceding the self-cleavage site may have an additional role in ligation. It is even possible that the higher rate and extent of ligation observed in a natural hammerhead with the interactions between loops 1 and 2 preserved could be relevant in physiological conditions (43), and that the trinucleotide preceding the self-cleavage/ligation site may have some influence. Moreover, in natural contexts this trinucleotide might play functional roles other than in cleavage and ligation. This is illustrated by the case of CChMVd, in which the (+) hammerhead has an extra A (A10) between the conserved A9 and the quasi-conserved G10.1. A10 causes a moderate decrease of the *trans*-cleaving rate constant with respect to the CChMVd (+) hammerhead without this residue, but because A10 also occupies a singular and indispensable position in the global CChMVd conformation as revealed by bioassays (44), these results show that some hammerheads deviate from the consensus due to the involvement of certain residues in critical function(s) other than self-cleavage.

However, whereas the above arguments can explain why some catalytically sub-optimal trinucleotides have been selected in natural hammerheads, the reasons excluding the catalytically most favorable trinucleotide AUC in almost all natural hammerheads are probably different. We believe that this exclusion can be accounted by considering that self-cleavage during transcription and in a protein-free medium may be different. Following transcription of the first hammerhead nucleotides, they can be kinetically trapped in a catalytically-inactive structure. These structures, predicted for the ELVd-(+)-AUC, ELVd-(+)-GUC, ELVd-(+)-GUA, and ELVd-(+)-AUA hammerheads with the Kinefold program (45) (supplementary Fig. 1S), show that some trinucleotides preceding the self-cleavage site can potentially base-pair with the CUGAU motif (hammerhead positions 3-7) (Fig. 6). Moreover, the resulting interactions have different stability, with that formed by the trinucleotide AUC displaying the highest and, as a consequence, delaying self-cleavage. This model also explains why when in natural hammerheads the first nucleotide of the trinucleotide is A, the third must be also A (G is excluded because it would base pair with C3 and impede its role in the catalytic pocket, and U is also excluded because it can not form

the complex array of non-canonical interactions) (11,16). Once transcription of the hammerhead is completed, the kinetic trap can be released as a result of the alternative interactions that can be formed (Fig. 6), and the hammerhead can adopt its catalytically-active folding. Formation of the kinetic trap may be particularly facilitated in certain natural hammerheads, like the ELVd (+) hammerhead, with a long and stable helix I. It is also interesting to note that, in nature, an AUC trinucleotide preceding the self-cleavage site has been only found in the *Schistosoma douthitti* hammerhead, whereas this trinucleotide is GUC in the other *Schistosoma* spp. hammerheads deposited in databases. Due to the particular morphology of this hammerhead, adoption of a catalytically-inactive metastable structure cannot be facilitated by helix I because one of its strands is transcribed subsequently to all the other sequences forming the hammerhead. In summary, co-transcriptional and post-transcriptional self-cleavage, particularly *in vivo*, may be different, with natural hammerheads having been probably selected through evolution to function under conditions for co-transcriptional self-cleavage. Hence, a deeper understanding of hammerheads (and probably other ribozymes) in their natural RNA context requires kinetic analysis not only in the *cis*-cleaving format but also during transcription. Pertinent to this point is the finding that transcription initiation of viroid strands occurs at specific sites, the location of which in the nascent strands is consistent with avoiding structures that disfavor the adoption of the catalytically-active hammerheads (46,47).

Finally, the kinetics analysis here reported also shows that the ELVd-(+)-GUC hammerhead presents the highest rate constant and extent of self-cleavage (in low magnesium and in a post-transcriptional context) when compared with three other natural hammerheads from two viroids and one satellite RNA in which the trinucleotide preceding the self-cleavage site is also GUC. This may be the result of the high thermodynamic stability of the helices of the ELVd-(+)-GUC hammerhead that would facilitate the tertiary interactions between the peripheral regions important for catalysis. Therefore, this hammerhead, and the ELVd-(+)-AUC mutant, can serve as a base for designing new and efficient *trans*-acting hammerheads in which the tertiary interactions are preserved.

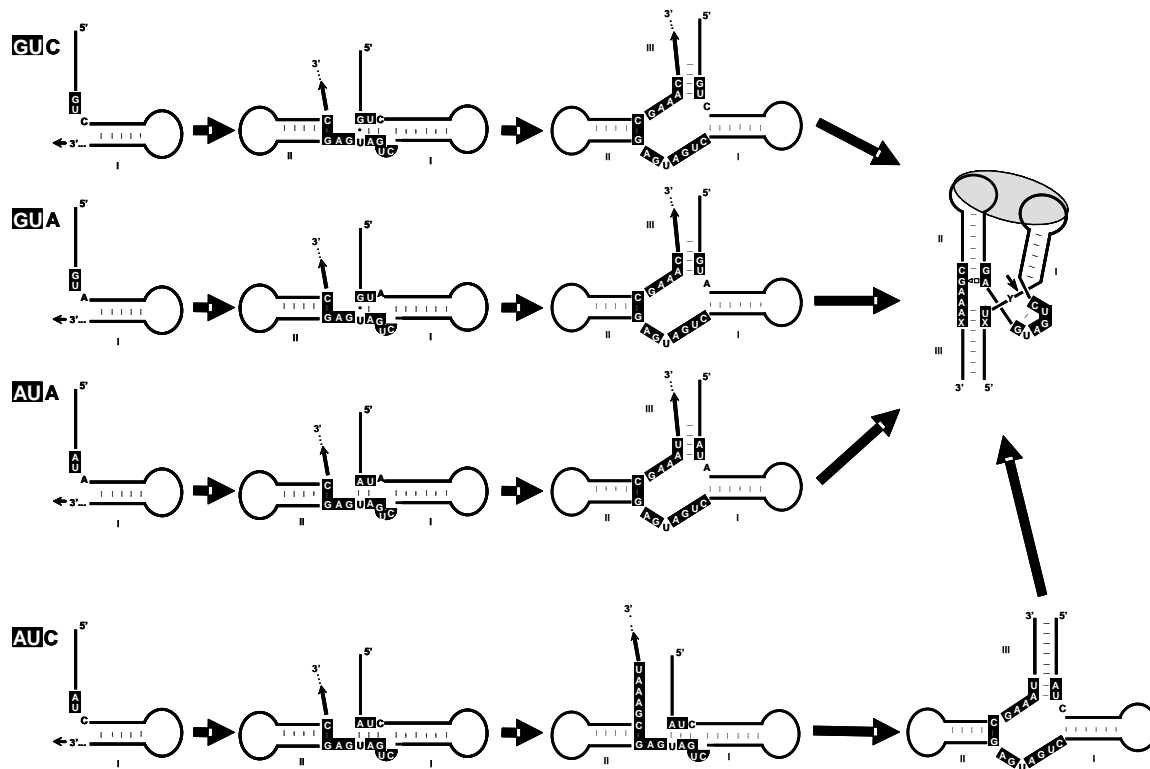


Fig. 6. Model for the transient folding of four hammerheads with different trinucleotides preceding the self-cleavage site. During transcription, nucleotides forming part of the hammerhead catalytic core (in dark background) can be transiently involved in catalytically-inactive metastable structures. The higher stability of the structure with the trinucleotide AUC preceding the self-cleavage site can specifically delay the adoption of the catalytically-active hammerhead. In the scheme of the catalytically-active hammerhead (right) the pair X-X represents C-G or U-A, and the Y represents C or A.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been partially supported by grants BFU2005-06808/BMC from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) and ACOMP06/141 from the Generalitat Valenciana (Spain). A.C. has been supported by a pre-doctoral fellowship from the MEC, M.D.P. by a long-term postdoctoral fellowship of the International Human Frontier Science Program Organization and by a "Ramón y Cajal" contract from the MEC, and S.G. by a postdoctoral fellowship from the Fundación "José y Ana Royo" and by an I3P contract from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

REFERENCES

1. Hutchins,C.J., Rathjen,P.D., Forster,A.C. and Symons,R.H. (1986) Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 3627-3640.
2. Prody,G.A., Bakos,J.T., Buzayan,J.M., Schneider,I.R. and Bruening,G. (1986) Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science*, **231**, 1577-1580.
3. Flores,R., Hernández,C., De la Peña,M., Vera,A. and Daròs,J.A. (2001) Hammerhead ribozyme structure and function in plant RNA replication. *Methods Enzymol.*, **341**, 540-552.
4. Flores,R., Hernández,C., Martínez de Alba,E., Daròs,J.A. and Di Serio,F. (2005) Viroids and viroid-host interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **43**, 117-139.
5. Forster,A.C. and Symons,R.H. (1987a) Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell*, **49**, 211-220.
6. Forster,A.C. and Symons,R.H. (1987b) Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell*, **50**, 9-16.
7. Pley,H.W., Flaherty,K.M. and McKay,D.B. (1994) Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature*, **372**, 68-74.
8. Scott,W.G., Finch,J.T. and Klug,A. (1995) The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell*, **81**, 991-1002.
9. Scott,W.G., Murray,J.B., Arnold,J.R., Stoddard,B.L. and Klug,A. (1996) Capturing the structure of a catalytic RNA intermediate: the hammerhead ribozyme. *Science*, **274**, 2065-2069.
10. Rossi,J.J. and Couture,L.A. (1999) Intracellular Ribozyme Applications: Principles and Protocols. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
11. Blount,K.F. and Uhlenbeck,O.C. (2005) The structure-function dilemma of the hammerhead ribozyme. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **34**, 415-440.
12. De la Peña,M., Gago,S. and Flores,R. (2003) Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *EMBO J.*, **22**, 5561-5570.
13. Khvorova,A., Lescoute,A., Westhof,E. and Jayasena,S.D. (2003) Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nature Struct. Biol.*, **10**, 708-712.
14. Canny,M.D., Jucker,F.M., Kellogg,E., Khvorova,A., Jayasena,S.D. Pardi,A. (2004) Fast cleavage kinetics of a natural hammerhead ribozyme. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10848-10849.
15. Penedo,J.C., Wilson,T.J., Jayasena,S.D., Khvorova,A. and Lilley,D.M. (2004) Folding of the natural hammerhead ribozyme is enhanced by interaction of auxiliary elements. *RNA* **10**, 880-888.
16. Martick,M. Scott,W.G. (2006) Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell*, **126**, 1-12.
17. Saksmerprome,V., Roychowdhury-Saha,M., Jayasena,S., Khvorova,A. and Burke,D.H. (2004) Artificial tertiary motifs stabilize trans-cleaving hammerhead ribozymes under conditions of submillimolar divalent ions and high temperatures. *RNA*, **12**, 1916-1924.

18. Weinberg, M.S. and Rossi, J.J. (2005) Comparative single-turnover kinetic analyses of trans-cleaving hammerhead ribozymes with naturally derived non-conserved sequence motifs. *FEBS Lett.*, **579**, 1619-1624.
19. Burke, D.H. and Greathouse, S.T. (2005) Low-magnesium, trans-cleavage activity by type III, tertiary stabilized hammerhead ribozymes with stem 1 discontinuities. *BMC Biochem.*, **6**, 14.
20. Fadda, Z., Daròs, J.A., Fagoaga, C., Flores, R. and Duran-Vila, N. (2003) Eggplant latent viroid (ELVd): candidate type species for a new genus within family *Avsunviroidae* (hammerhead viroids). *J. Virol.*, **77**, 6528-6532.
21. Flores, R., Daròs, J.A. and Hernández, C. (2000) The *Avsunviroidae* family: viroids with hammerhead ribozymes. *Adv. Virus Res.*, **55**, 271-323.
22. Long, D.M. and Uhlenbeck, O.C. (1994) Kinetic characterization of intramolecular and intermolecular hammerhead RNAs with stem II deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6977-6981.
23. Woese, C.R., Winker, S. and Gutell, R.R. (1990) Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra-loops". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8467-8471.
24. Heus, H.A. and Pardi, A. (1991) Structural features that give rise to the unusual stability of RNA hairpins containing GNRA loops. *Science*, **253**, 191-194.
25. Hernández, C. and Flores, R. (1992) Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3711-3715.
26. Navarro, B. and Flores, R. (1997) Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11262-11267.
27. Miller, W.A., Hercus, T., Waterhouse, P.M. and Gerlach, W.L. (1991) A satellite RNA of barley yellow dwarf virus contains a novel hammerhead structure in the self-cleavage domain. *Virology*, **183**, 711-720.
28. Di Serio, F., Daròs, J.A., Ragozzino, A. and Flores, R. (1997) A 451-nt circular RNA from cherry with hammerhead ribozymes in its strands of both polarities. *J. Virol.*, **71**, 6603-6610.
29. Di Serio, F., Daròs, J.A., Ragozzino, A. and Flores, R. (2006) Close structural relationship between two hammerhead viroid-like RNAs associated with cherry chlorotic rusty spot disease. *Arch. Virol.*, **151**, 1539-1549.
30. Vaish, N.K., Heaton, P.A. and Eckstein, F. (1997) Isolation of hammerhead ribozymes with altered core sequences by *in vitro* selection. *Biochemistry*, **36**, 6495-6501.
31. Ambrós, S. and Flores, R. (1998) *In vitro* and *in vivo* self-cleavage of a viroid RNA with a mutation in the hammerhead catalytic pocket. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1877-1883.
32. Forster, A.C., Davies, C., Sheldon, C.C., Jeffries, A.C. and Symons, R.H. (1988) Self-cleaving viroid and newt RNAs may only be active as dimers. *Nature*, **334**, 265-267.
33. Miller, W.A. and Silver, S.L. (1991) Alternative tertiary structure attenuates self-cleavage of the ribozyme in the satellite RNA of barley yellow dwarf virus. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5313-5320.

34. Pabón-Peña, L.M., Zhang, Y. and Epstein, L.M. (1991) Newt satellite 2 transcripts self-cleave by using an extended hammerhead structure. *Mol. Cell Biol.*, **11**, 6109-6115.
35. Been, M.D. and Perrotta, A.T. (1995) Optimal self-cleavage activity of the hepatitis delta virus RNA is dependent on a homopurine base pair in the ribozyme core. *RNA*, **1**, 1061-1070.
36. Salehi-Ashtiani, K. and Szostak, J.W. (2001). *In vitro* evolution suggests multiple origins for the hammerhead ribozyme. *Nature*, **414**, 82-84.
37. Przybilski, R., Graf, S., Lescoute, A., Nellen, W., Westhof, E., Steger, G. and Hammann, C. (2005) Functional hammerhead ribozymes naturally encoded in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **17**, 1877-1885.
38. Ruffner, D.E., Stormo, G.D. and Uhlenbeck, O.C. (1990) Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry*, **29**, 10695-10702
39. Nakamaye, K.L. and Eckstein, F. (1994) AUA-cleaving hammerhead ribozymes: attempted selection for improved cleavage. *Biochemistry*, **33**, 1271-1277.
40. Zoumadakis, M. and Tabler, M. (1995) Comparative analysis of cleavage rates after systematic permutation of the NUX consensus target motif for hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 1192-1196.
41. Shimayama, T., Nishikawa, S. and Taira, K. (1995) Generality of the NUX rule: kinetic analysis of the results of systematic mutations in the trinucleotide at the cleavage site of hammerhead ribozymes. *Biochemistry*, **34**, 3649-3654.
42. Mahen, E.M., Harger, J.W., Calderon, E.M. and Fedor, M.J. (2005) Kinetics and thermodynamics make different contributions to RNA folding in vitro and in yeast. *Mol Cell*, **19**, 27-37.
43. Nelson, J.A., Shepotinovskaya, I. and Uhlenbeck, O.C. (2005) Hammerheads derived from sTRSV show enhanced cleavage and ligation rate constants. *Biochemistry*, **44**, 14577-14585.
44. De la Pena, M. and Flores, R. (2001) An extra nucleotide in the consensus catalytic core of a viroid hammerhead ribozyme: implications for the design of more efficient ribozymes. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34586-34593.
45. Xayaphoummine, A., Bucher, T. and Isambert, H. (2005) Kinefold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots. *Nucleic Acid Res.*, **33**, 605-610.
46. Navarro, J.A. and Flores, R. (2000) Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. *EMBO J.* **19**, 2662-2670.
47. Delgado, S., Martínez de Alba, E., Hernández, C. and Flores, R. (2005) A short double-stranded RNA motif of peach latent mosaic viroid contains the initiation and the self-cleavage sites of both polarity strands. *J. Virol.* **79**, 12934-12943.

SUPPLEMENTARY MATERIAL:

Supplementary Fig. 1S. Co-transcriptional folding paths for ELVd-(+) hammerhead, and three mutants affecting the trinucleotide preceding the self-cleavage site, predicted with the Kinefold web server at <http://kinefold.curie.fr/> (45). The appearance of catalytically-inactive metastable intermediates can be only observed for the ELVd-(+)-AUC and, to a less extent, ELVd-(+)-GUC hammerheads.

Files of the data supplement are available at NAR online: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/34/19/5613/DC1>

Capítulo 2

***In vitro* and *in vivo* activity against a structured viroid RNA of *trans*-cleaving hammerhead ribozymes with tertiary stabilizing motifs¹**

Alberto Carbonell, Ricardo Flores and Selma Gago

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Campus Universidad Politécnica, Avenida de los Naranjos, s/n, 46022 Valencia, Spain

ABSTRACT

Trans-cleaving hammerheads with discontinuous or extended stem I and with tertiary stabilizing motifs (TSMs) have been tested previously against short RNA substrates *in vitro* at low Mg²⁺ concentration. However, the potential of these ribozymes for targeting longer and structured RNAs *in vitro* and *in vivo* has not been examined. Here we report the *in vitro* cleavage of a 464-nt highly-structured RNA from *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) by hammerheads with discontinuous and extended formats at submillimolar Mg²⁺. Under these conditions, hammerheads derived from *Eggplant latent viroid* and *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) with discontinuous and extended formats, respectively, were the most active. A PLMVd-derived hammerhead with natural TSMs that cleaved *in vitro* the structured RNA even at 0.05 mM Mg²⁺, presented activity *in vivo* against the same substrate and interfered with systemic PSTVd infection.

¹To be submitted

INTRODUCTION

The hammerhead ribozyme is a catalytic RNA motif that in viroids and viroid-like satellite RNAs, wherein it was initially discovered, mediates *cis*-cleavage of the multimeric strands resulting from a rolling circle replication (Hutchins et al., 1986; Prody et al., 1986). Most of the natural hammerheads are formed by a central conserved core flanked by three double-stranded regions with relaxed sequence requirements (helices I, II and III), two of which (I and II) are capped by short loops (1 and 2, respectively) (for a review see Flores et al., 2001). Minimal *trans*-cleaving hammerheads including the central conserved core and two hybridizing arms were generated by removing the peripheral loop 1, which initially was thought non essential for catalytic activity, and extending helix I to specifically target and cleave an RNA after a GUH sequence (where H is any nucleotide except G) (Uhlenbeck, 1987; Haseloff and Gerlach, 1988). These and other ribozymes have received considerable attention because of their potential for the specific inactivation of cellular or viral RNAs. However, the target accessibility, the subcellular co-localization of ribozyme and substrate, and the catalytic activity at the low physiological concentration of Mg^{2+} , are still barriers that limit the use of hammerheads *in vivo* (Castanotto et al., 2002).

Recently, a re-examination of natural hammerheads in which the helix-loop motifs flanking the central conserved core were preserved showed that these ribozymes have significantly higher self-cleavage rates, suggesting the existence of tertiary interactions between loops 1 and 2 critical for catalysis (De la Peña et al., 2003; Khvorova et al., 2003). The tertiary interactions between loops indeed exist and stabilize the catalytically active structures at the submillimolar concentrations of Mg^{2+} present *in vivo* (Martick and Scott, 2006), thus explaining why minimal hammerheads require higher concentrations of this cation for adopting the active folding (Penedo et al., 2004; Canny et al., 2004; Rueda et al., 2004). Tertiary stabilizing motifs (TSMs) that include these interactions have been incorporated into a new generation of more efficient *trans*-cleaving hammerheads in two different manners: i) by extending stem I and including loop 1 as a bulge in the hybridizing arm of this stem (extended format) (Saksmerprome et al., 2004; Weinberg and Rossi, 2005), and ii) by embedding within stem I the 5' and 3' termini of the ribozyme and substrate, respectively (discontinuous format) (Burke and

Greathouse, 2005). Some of these hammerheads are active *in vitro* at low Mg^{2+} concentration against short RNA substrates. In particular, discontinuous and extended hammerheads derived from the *Tobacco ring spot virus satellite RNA* (sTRSV) (Prody et al., 1986) and *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) (Hernández and Flores, 1992), respectively, are the most efficient when compared to other *trans*-cleaving hammerheads.

However, the recently characterized hammerheads of *Eggplant latent viroid* (ELVd) (Fadda et al., 2003) have not been yet adapted into a *trans* design, despite displaying higher self-cleavage rates than other natural hammerheads at very low Mg^{2+} concentrations (Carbonell et al., 2006). Moreover, these hammerheads seem particularly appropriate for the discontinuous format because their long stem I (of seven base pairs) should facilitate substrate binding and folding of loop 1.

Here we report a comparative *trans*-cleavage analysis *in vitro* of some discontinuous and extended hammerheads derived from ELVd, PLMVd and sTRSV, against a long and highly-structured RNA from the plant pathogen *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (Diener, 1971; Gross et al., 1978). Our results, particularly at submillimolar Mg^{2+} , show that the ELVd-derived hammerheads are functional, with the discontinuous variants being more efficient than their sTRSV counterparts, and that an extended PLMVd-derived hammerhead with natural TSMs has the highest cleavage rate. Further analysis with transient expression bioassays in *N. benthamiana* plants have revealed that this latter hammerhead maintains activity *in vivo* and interferes with systemic PSTVd infection.

RESULTS

In vitro trans-cleavage of a highly-structured RNA by discontinuous hammerheads (HHd)

Trans-cleaving hammerheads were designed against a 464-nt highly structured PSTVd (-) RNA generated by *in vitro* transcription of a monomeric PSTVd-cDNA clone. The resulting transcript included a GUC target site within the PSTVd (-) full-length RNA (359 nt) flanked by vector sequences at both 5' and 3' ends (17 nt and 88 nt respectively). Preliminary studies on the self-cleavage kinetics of variants of the

ELVd(+) hammerhead showed that those with a GUC or AUC trinucleotide preceding the self-cleavage site were the most active at very low Mg^{2+} concentration (Carbonell et al., 2006). We therefore reasoned that the ELVd(+)-GUC hammerhead (Figure 1) could serve for designing discontinuous *trans*-cleaving hammerheads with preserved TSMs (Figure 2A), which were named according to the base-pair of stem I adjacent to loop 1 (Figure 2A, boxed) and to the sequence of this loop. Firstly, HHd-ELVd-UA/GUGU was designed with its loop 1 closed by part of stem I (Ia, of three base-pairs), and the U-G base-pair adjacent to loop 1 substituted by the stronger U-A base-pair present in some ELVd variants (Fadda et al., 2003) for increasing the stability of stem Ia. The other part of stem I (Ib, of four base-pairs) served for hybridizing with the substrate. Therefore, stem I is separated into two discrete domains in HHd-ELVd-UA/GUGU.

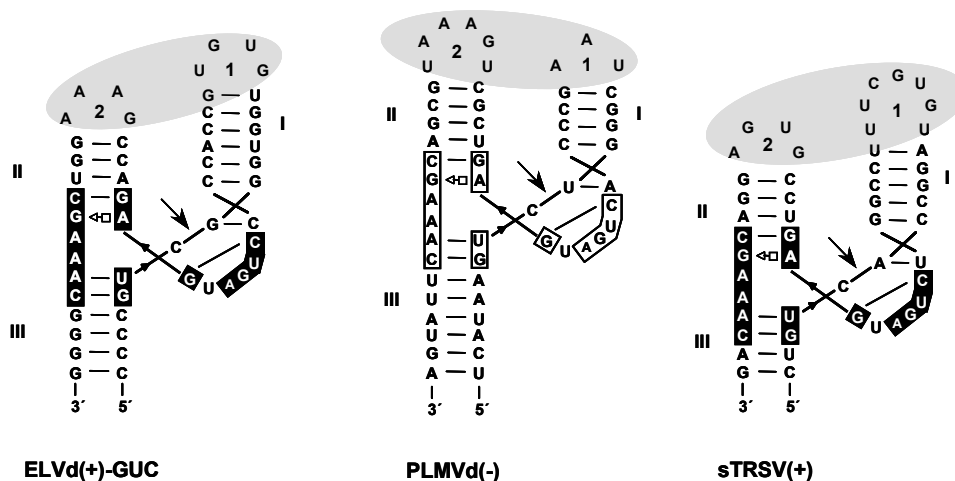


Figure 1. Secondary structures of ELVd(+)-GUC, PLMVd(-) and sTRSV(+) self-cleaving hammerheads according to crystallographic data obtained for the *Schistosoma mansoni* hammerhead (Martick and Scott, 2006). Motifs conserved in most natural hammerheads are within boxes and self-cleavage sites are marked by arrows. Black and white backgrounds refer to (+) and (-) polarities, respectively. Dashes denote Watson-Crick (and wobble) interactions and the open square-triangle a Hoogsteen/sugar edge interaction. Nomenclature of helices and loops follows the standard criterion (Hertel et al., 1992). Ovals represent the proposed tertiary interactions between loops 1 and 2.

Unexpectedly, the catalytic activity of this hammerhead against the PSTVd (-) RNA was very low even at 10 mM Mg^{2+} (Table 1) (Figure 2C). In an attempt to understand this behavior, we examined the secondary structure of the corresponding self-cleaving hammerhead with the Mfold program (Zuker, 2003), which predicted a most stable

conformation different from the catalytically active as a result of alternative rearrangements of the nucleotides forming helix I and loop 1. Further Mfold analysis of an RNA comprising the nucleotides of the hammerhead followed by 27 nt of the substrate (Figure 2A), predicted just a single base-pair between the ribozyme and the substrate in the stem Ia, and a pentaloop (UGUAC) replacing the natural tetraloop 1 (GUGU) (Supplementary Figure 1A). These features could disfavor substrate binding and formation of the TSMs, thus explaining the low catalytic rate observed.

Table 1. Kinetic parameters for discontinuous hammerheads

Hammerhead	[MgCl ₂]	F _∞	k _{cat}
HHd-ELVd-UA/GUGU	10	0.32	0.08
	1	0.21	0.03
	0.1	0.08	n.m.
HHd-ELVd-UA/ <u>UACG</u>	10	0.64 (0.55)	0.75 (0.0023)
	1	0.58 (0.23)	0.18 (0.0131)
	0.1	0.24 (0.17)	0.09 (0.0047)
HHd-ELVd- <u>CG</u> /GUGU	10	0.62 (0.45)	0.22 (0.0054)
	1	0.58 (0.34)	0.25 (0.0086)
	0.1	0.14	0.06
HHd-ELVd- <u>CG</u> / <u>AAAA</u>	10	0.74 (0.52)	0.33 (0.0055)
	1	0.76 (0.48)	0.26 (0.0073)
	0.1	0.29 (0.15)	0.16 (0.0088)
HHd-ELVd- <u>CG</u> / <u>CCCC</u>	10	0.52	0.18
	1	0.50 (0.35)	0.11 (0.0046)
	0.1	0.13	n.m.
HHd-sTRSV	10	0.54	0.08
	1	0.43	0.06
	0.1	0.09	n.m.

n.m. refer to no measurable; values for k_{cat} and F_∞ represent the mean of two independent experiments.

For the double exponential fit, values of F_∞ for the first process and k_{obs} for the second process are indicated in parenthesis.

HHd-ELVd-CG/GUGU (nucleotides differing from the wild-type ribozyme are underlined) was constructed to circumvent this problem: the U-A base-pair adjacent to loop 1 was replaced by a stronger C-G base-pair that should facilitate formation of this loop. As expected, HHd-ELVd-CG/GUGU was more efficient than HHd-ELVd-UA/GUGU (Table 1) (Figure 2C), supporting that stem Ia stability may be critical for loop 1 formation and, by extension, for active discontinuous hammerheads as proposed previously (Burke and Greathouse, 2005). However, Mfold analysis

predicted in the most stable ribozyme-substrate folding three consecutive base-pairs between nucleotides of loop 1 and the substrate (Supplementary Figure 1B), thus disrupting the TSMs required for enhanced catalysis and explaining the moderate cleavage rates obtained with this variant (Table 1).

Three additional hammerheads were designed with artificial loop 1 sequences that should not interact with the substrate according to Mfold predictions: HHd-ELVd-UA/UACG, HHd-ELVd-CG/AAAA and HHd-ELVd-CG/CCCC, in which the wild-type loop 1 (GUGU) was replaced by UACG, AAAA or CCCC, respectively. Formation of loop 1 should be facilitated by the high stability of the UACG tetraloop belonging to the UNCG family (Molinari and Tinoco, 1995) in HHd-ELVd-UA/UACG, and by the stronger C-G base-pair of stem Ia in HHd-ELVd-CG/AAAA and HHd-ELVd-CG/CCCC. HHd-ELVd-UA/UACG and HHd-ELVd-CG-AAAA displayed high cleavage rates and, in particular, the latter hammerhead cleaved 74, 76 and 29% of the substrate at 10, 1 and 0.1 mM Mg²⁺, respectively (Table 1) (Figure 2C). These data suggest that alternative tertiary interactions between artificial loop 1 sequences and the wild-type loop 2 might promote cleavage at submillimolar Mg²⁺.

Because previous studies have shown that discontinuous ribozymes derived from sTRSV (+) hammerhead (Figure 1), with a stem Ib of only three base-pairs, can cleave short RNA substrates at low Mg²⁺ concentration (Burke and Greathouse, 2005), a variant thereof was designed against the highly-structured PSTVd (-) RNA (HHd-sTRSV) (Figure 2B). This hammerhead was less efficient than its ELVd counterparts, specially at 0.1 mM Mg²⁺ where only 9% of the substrate was cleaved (Table 1) (Figure 2C), probably as a consequence of poor substrate binding by the one-nucleotide-shorter stem Ib of the HHd-sTRSV. Moreover, its longer loop 1 (six nucleotides) may favor additional base-pair interactions with nucleotides of the substrate (Supplementary Figure 1B). No experiments were attempted with discontinuous PLMVd-derived hammerheads, because a stem I of only five base-pairs (Figure 1) lacks sufficient stability to support the discontinuous format (Burke and Greathouse, 2005).

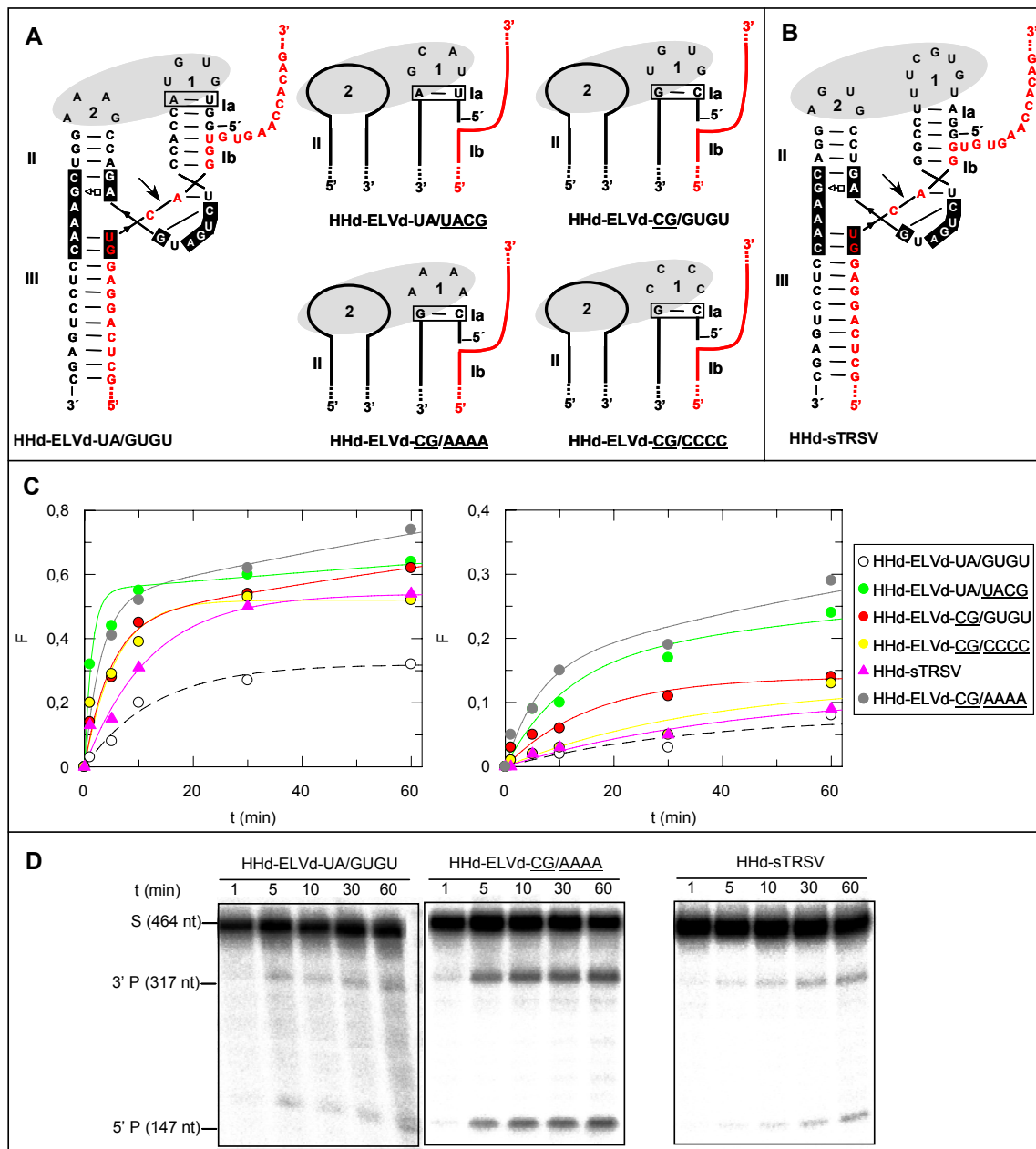


Figure 2. Discontinuous hammerheads (HHd) against PSTVd (-) RNA. (A) Predicted secondary structure for the complex between HHd-ELVd-UA/GUGU and the substrate (left), and schemes for complexes involving other discontinuous ELVd-derived hammerheads (right). Hammerhead and substrate nucleotides are shown with black and red fonts, respectively, and unchanged ribozyme and substrate nucleotides are represented with continuous black and red lines, respectively. Ia and Ib refer to the distal and proximal halves of stem I, respectively, with the base-pair of stem Ia adjacent to loop 1 being boxed. (B) Predicted secondary structure for the complex between HHd-sTRSV and the substrate. Details as in panel A. (C) Diagrams representing the product fraction (F) as a function of time at 10 and 0.1 mM Mg^{+2} (left and right, respectively) generated by five different hammerheads: HHd-ELVd-UA/GUGU, HHd-ELVd-UA/UACG, HHd-ELVd-CG/AAAA, HHd-ELVd-CG/CCCC and HHd-sTRSV. F values represented the mean of two independent experiments. (D) Analysis by denaturing PAGE (5%) and autoradiography of reactions catalyzed by three discontinuous hammerheads at 0.1 mM Mg^{+2} . The positions and size of the PSTVd (-) primary transcript serving as substrate (S) and of the resulting 3' and 5' cleavage products (P) are indicated.

In vitro trans-cleavage of a highly-structured RNA by extended hammerheads (HHe)

TSMs have also been incorporated into extended hammerheads by including loop 1 as a bulge in the hybridizing arm of stem I. Because extended PLMVd-derived ribozymes against short RNAs are more efficient than those derived from other natural hammerheads (Saksmerprome et al., 2004; Weinberg and Rossi, 2005), we designed the following variants against the highly-structured PSTVd (-) RNA: i) HHe-PLMVd with the wild-type loop 2 (UAAAGU) (Figure 1) (Hernández and Flores, 1992), and ii) HHe-PLMVd-L2GG, in which this loop was replaced by UAGGGU (changes with respect to the wild-type sequence are underlined) according to previous *in vitro* selection studies (Saksmerprome et al., 2004) (Figure 3A). The wild-type loop 1 (UAA) was maintained in both variants to preserve loop-loop interactions. Both hammerheads displayed high cleavage rates at 10, 1 and 0.1 mM Mg²⁺ (Table 2), with HHe-PLMVd and HHe-PLMVd-L2GG cleaving 73% and 59% of substrate, respectively, at 0.1 mM Mg²⁺ (Figure 3B).

Table 2. Kinetic parameters for extended hammerheads

Hammerhead	[MgCl ₂]	F _∞	k _{cat}
HHe-sTRSV-ΔL1	10	0.76 (0.55)	0.61 (0.0050)
	1	0.73 (0.53)	0.24 (0.0092)
	0.1	0.05	n.m.
HHe-PLMVd	10	0.67 (0.64)	0.83 (0.0002)
	1	0.60 (0.58)	0.75 (<0.0001)
	0.1	0.73 (0.57)	0.09 (0.0036)
	0.05	0.69	n.m.
HHe-PLMVd-L2 <u>GG</u>	10	0.80 (0.72)	0.99 (0.0011)
	1	0.62 (0.43)	0.41 (0.0070)
	0.1	0.59 (0.46)	0.08 (0.0039)
	0.05	0.34	n.m.
HHe-ELVd	10	0.64 (0.45)	0.27 (0.0064)
	1	0.56	0.08
	0.1	0.17	0.05
	0.05	0.02)	n.m.
HHe-ELVd-ΔL1	10	0.63 (0.35)	0.17 (0.0101)
	1	0.61 (0.35)	0.02 (0.0166)
	0.1	0.00	n.m.

Details as in Table 1.

Two extended ELVd-derived hammerheads were also generated against the same previous substrate: i) HHe-ELVd, in which the wild type loop 1 was included in the hybridizing arm of stem I as a bulging loop seven nucleotides apart from the catalytic core as in the natural ribozyme, and ii) HHe-ELVd- Δ L1, in which loop 1 was deleted (Figure 3A). At 10 mM Mg^{2+} , HHe-ELVd displayed a two-fold increase of the catalytic constant when compared with HHe-ELVd- Δ L1, although the fraction of the substrate cleaved at the end of the reaction was approximately the same (Table 2) (Figure 3B left). In contrast, HHe-ELVd- Δ L1 was essentially inactive at 0.1 mM Mg^{2+} , while HHe-ELVd was able to cleave 17% of the substrate (Figure 3B). These results indicate that extended ELVd-derived hammerheads with TSMs present activity at submillimolar Mg^{2+} , although they are less efficient than their discontinuous counterparts. A plausible explanation for these results was obtained by Mfold analysis, which predicted for the ribozyme-substrate complex alternative secondary structures more stable than the catalytically-active folding (Supplementary Figure 1B). Particularly, the four nucleotides of loop 1 and the adjacent six nucleotides of the distal part of stem I can base-pair with nucleotides of the substrate, thus disrupting the TSMs and disfavoring an efficient cleavage by HHe-ELVd at low Mg^{2+} concentration.

In addition, an extended sTRSV-derived hammerhead lacking loop 1 (HHe-sTRSV- Δ L1), a modified version of a ribozyme without TSMs but with *in vivo* activity when stably expressed in transgenic potato plants (Yang et al., 1997), was included for comparative purposes (Figure 3A). HHe-sTRSV- Δ L1 was designed with 5' and 3' hybridizing arms of 11 and 6 nucleotides, respectively, instead of the 11 and 10 nucleotides of the original ribozyme (Yang et al., 1997), because shorter hybridizing arms generally result in specific substrate binding and faster product release, thus maximizing turnover rate (Hershlag and Cech, 1990; Edwards et al., 1991). The hammerhead was active at 10 and 1 mM Mg^{2+} , although the catalytic constants were moderate (Figure 3B) (Table 2). As expected, the catalytic constant and the fraction of cleaved substrate dropped dramatically when the Mg^{2+} concentration was reduced to 0.1 mM (Table 2) (Figure 3B), most likely as a result of the absence of TSMs in this hammerhead.

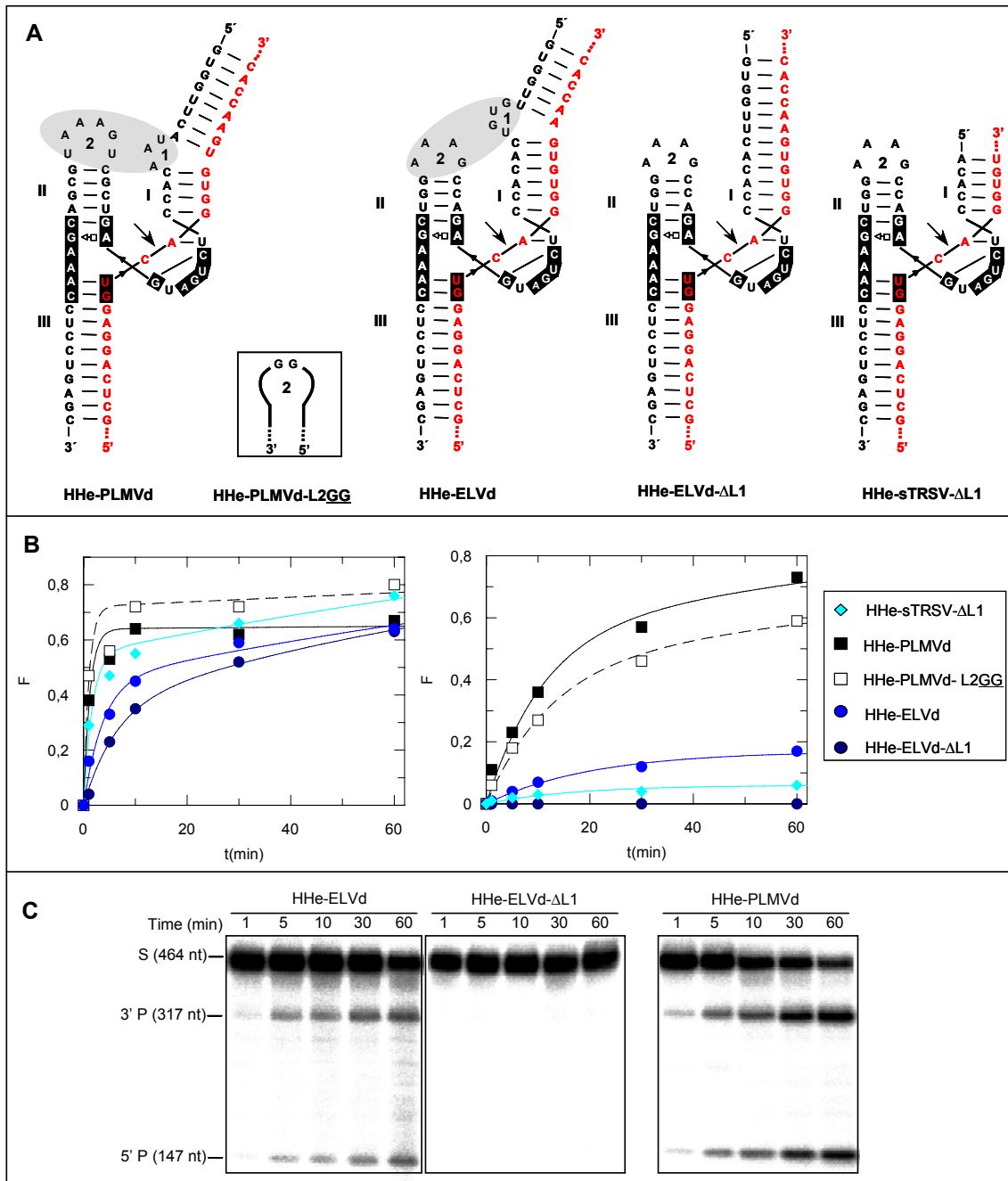


Figure 3. Extended hammerheads (HHe) against PSTVd (-) RNA. (A) Predicted secondary structures for the different ribozyme-substrate complexes. HHe-PLMVd, HHe-PLMVd-L2GG and HHe-ELVd contain TSMs, while HHe-sTRSV-ΔL1 and HHe-ELVd-ΔL1 lack these motifs. The inset highlights the two nucleotides of the HHe-PLMVd-L2GG hammerhead that deviate from the natural loop 2 sequence (Hernández and Flores, 1992). (B) Diagrams representing the product fraction as a function of time at 10 and 0.1 mM Mg²⁺ (left and right, respectively) generated by five different hammerheads: HHe-sTRSV-ΔL1, HHe-PLMVd, HHe-PLMVd-L2GG, HHe-ELVd and HHe-ELVd-ΔL1. (C) Analysis by denaturing PAGE (5%) and autoradiography of reactions catalyzed by three extended hammerheads at 0.1 mM Mg²⁺. Other details as in Figure 2.

To further examine the catalytic activity of these extended hammerheads, Mg^{2+} concentration was reduced to 0.05 mM. Under these conditions HHe-PLMVd still maintained its activity and cleaved 69% of the substrate, while HHe-PLMVd-L2GG and HHe-ELVd cleaved only 34 and 2% of the substrate, respectively (Table 2) (Figure 4A and 4B). In these cases, data could not be adequately fitted to a single or double exponential model.

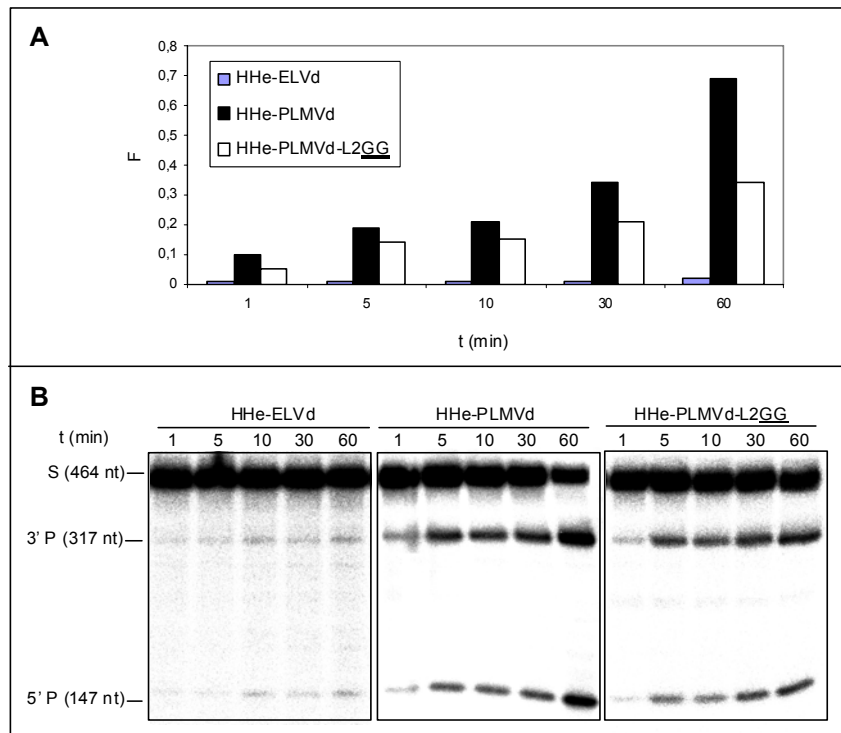


Figure 4. *Trans*-cleavage kinetics at 0,05 mM Mg^{+2} of three extended hammerheads with TSMs. (A) Histograms representing the product fraction as a function of time for HHe-ELVd, HHe-PLMVd and HHe-PLMVd-L2GG. (B) Analysis by denaturing PAGE (5%) and autoradiography of reactions catalyzed by the three hammerheads. Other details as in Figure 2.

In vivo cleavage of a viroid RNA by an extended PLMVd-derived hammerhead with natural TSMs

Because of its high *in vitro* activity at low Mg^{2+} concentration, HHe-PLMVd was selected for further *in vivo* testing. To this aim, we used an *in planta* approach in which two cultures of *Agrobacterium tumefaciens* transformed with the ribozyme and the substrate constructs were co-infiltrated in *N. benthamiana* leaves (Figure 5A).

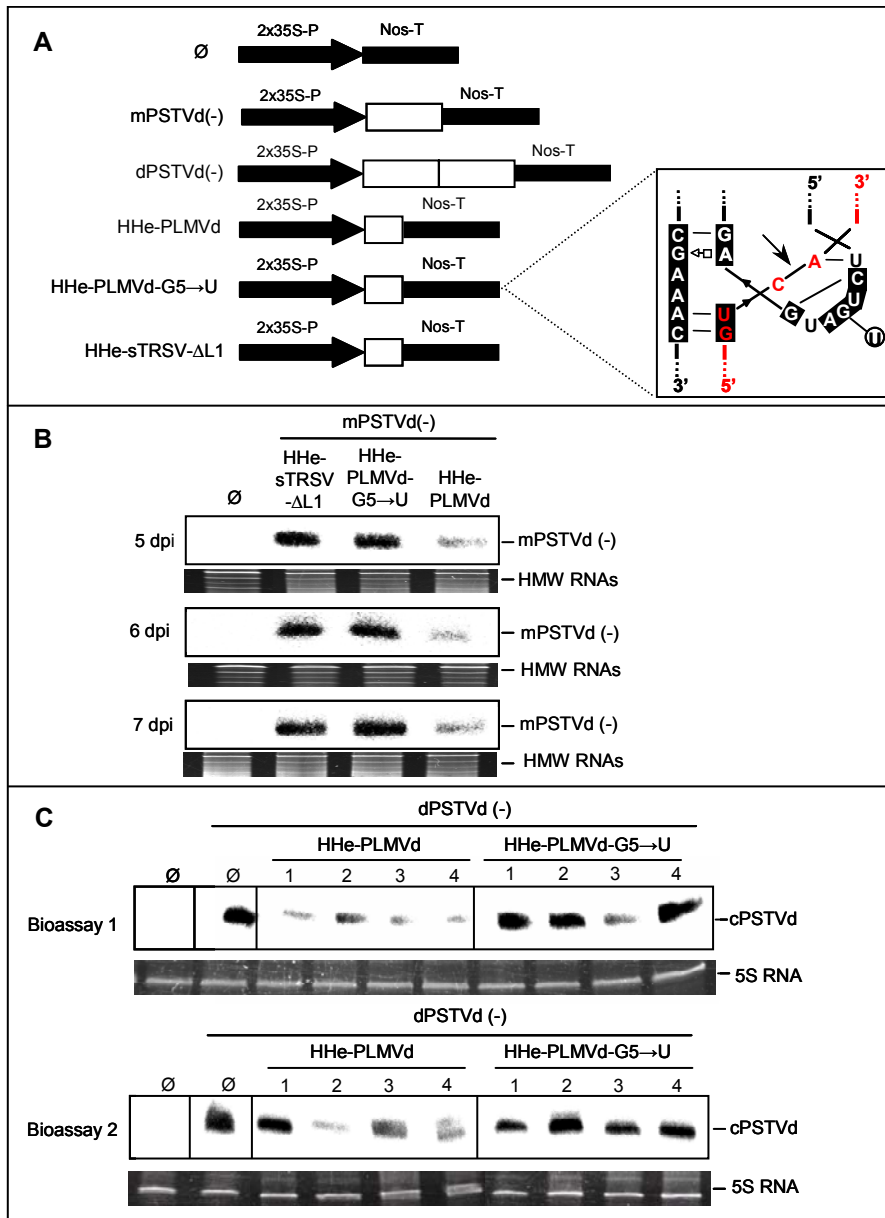


Figure 5. *In vivo* effects on PSTVd RNAs of three extended hammerheads co-agroinfiltrated in *N. benthamiana*. (A) Schematic diagrams of the constructs with the expression cassettes (boxed and with white background) between a double copy of the 35S promoter and the Nos-terminator: empty vector (Ø), monomeric PSTVd (-) RNA [mPSTVd(-)], dimeric PSTVd (-) RNA [dPSTVd(-)], HHe-sTRSV-ΔL1, HHe-PLMVd and HHe-PLMVd-G5→U (with the mutation affecting the catalytic center indicated within the inset). (B) Analysis by denaturing PAGE (5%) and Northern-blot hybridization with a riboprobe for detecting PSTVd (-) strands of RNAs extracted from pools of co-infiltrated leaves from independent plants collected at 5, 6 and 7 days post-infiltration (dpi). Leaves were co-infiltrated with the mPSTVd(-) construct and with either the constructs Ø, HHe-sTRSV-ΔL1, HHe-PLMVd or HHe-PLMVd-G5→U. The position of the PSTVd primary transcript mPSTVd(-) is indicated on the right. High-molecular-weight RNAs (HMW RNAs) stained with ethidium bromide were used as loading controls. (C) Analysis by denaturing PAGE and Northern-blot hybridizations with a riboprobe for detecting PSTVd(+) strands of RNAs extracted from the upper-non-infiltrated leaves of four individual plants collected at 20 and 15 dpi in bioassays 1 and 2, respectively. 5S RNA stained with ethidium bromide was used as loading control.

Controls for the experiment included the empty vector, and the constructs for HHe-sTRSV- Δ L1 and HHe-PLMVd-G5 \rightarrow U, in which the CUGA box of the central core was mutated to CUUA (Figure 5A, inset) leading to a ribozyme catalytically inactive *in vitro* (data not shown).

Each of the three ribozyme constructs was co-agroinfiltrated with the construct expressing the full-length monomeric PSTVd (-) RNA. Northern-blot hybridization of RNAs extracted 5 days-post-inoculation (dpi) from six independent plants revealed that the monomeric PSTVd transcript was significantly reduced in leaves co-agroinfiltrated with the HHe-PLMVd construct with respect to those co-agroinfiltrated with the HHe-sTRSV- Δ L1 or HHe-PLMVd-G5 \rightarrow U variants (Figure 5B). The differential effects of HHe-PLMVd were also observed in RNAs extracted 6 and 7 dpi (Figure 5B), thus confirming that only this hammerhead with TSMs was able to cleave efficiently the highly-structured RNA substrate *in vivo*. However, the resulting cleavage products could not be detected by Northern-blot hybridization, most likely because of their rapid degradation by cellular RNases (Sullenger and Cech, 1993).

The observations were extended to RNA preparations from the upper non-inoculated leaves. Northern-blot hybridizations revealed that co-agroinfiltration of constructs expressing an infectious dimeric PSTVd (-) RNA and the HHe-PLMVd ribozyme induced a decreased accumulation of the monomeric circular PSTVd RNAs (resulting from replication and systemic invasion) with respect to parallel co-agroinfiltrations with the constructs expressing the HHe-PLMVd-G5 \rightarrow U or the empty vector (Figure 5C). The effects on PSTVd infection, which were reproduced in two independent bioassays, could result from HHe-PLMVd mediating cleavage not only of the PSTVd (-) primary transcript but also of the PSTVd (-) oligomeric RNAs generated during viroid replication in the infiltrated leaves.

DISCUSSION

Developing ribozymes for intracellular applications requires their efficient functioning against long and structured RNAs at the low Mg⁺² concentrations existing *in vivo*. Efforts aimed at designing hammerheads against long substrates have met with limited success, with *in vitro trans*-cleavage constants being approximately 100-fold

slower than those observed with short RNA substrates most likely due to alternative interactions with nucleotides of the ribozyme (Hormes and Sczakiel, 2002) or to higher-order structures of the substrate that restricts base-pairing of nucleotides near the cleavage site (Campbell et al., 1997). More recently, the study of *trans*-acting hammerheads at low Mg^{+2} concentration has received increasing attention after the discovery of the TSMs in natural hammerheads (De la Peña et al., 2003; Khvorova et al., 2003) which, when incorporated into ribozymes with discontinuous or extended formats, provide enhanced activity. However, these studies were performed only *in vitro* and against short substrates that entirely base-pair with the ribozyme or that leave few unpaired nucleotides (Burke and Greathouse, 2004; Saksmerprome et al., 2004; Weinberg and Rossi, 2005). Only a PLMVd-derived extended hammerhead has been tested *in vitro* against a long RNA (a 258-nt fragment of the *Human immunodeficiency virus 1*, HIV-1) (Saksmerprome et al., 2004). Here we have examined the *in vitro trans*-cleavage of a 464-nt highly-structured RNA by *trans*-acting hammerheads with both formats, and then tested *in vivo* the most efficient variant.

Most of the ELVd-derived discontinuous hammerheads cleaved the substrate *in vitro* more efficiently than their sTRSV-derived counterpart, probably because their longer stem Ib improves substrate binding and their TSMs are not disrupted with alternative interactions with nucleotides of the long substrate. Moreover, stem Ib stability appears critical for preserving the TSMs, as revealed by the higher cleavage rates of a variant in which the U-A base-pair closing loop 1 was substituted by a stronger C-G base-pair. In a previous work, the lack of activity of a discontinuous PLMVd-derived hammerhead at low Mg^{+2} concentrations was explained by the insufficient stability of stem Ib (Burke and Greathouse, 2004). Interestingly, two hammerheads with artificial loop 1 sequences (UACG and AAAA) were active at 0.1 mM Mg^{+2} , thus indicating that alternative TSMs between artificial sequences of loop 1 and the wild-type loop 2 might promote cleavage at submillimolar Mg^{2+} , as reported for a discontinuous sTRSV-derived hammerhead with an artificial UUCG tetraloop (Burke and Greathouse, 2004). Pertinent to this context, hammerhead sequences other than the natural and included in the TSMs (Khvorova et al., 2003; Saksmerprome et al., 2004) or in the trinucleotide preceding the self-cleaving site (Carbonell et al., 2006) can

even enhance activity at low Mg^{+2} concentrations, probably because sequences forming part of natural hammerheads have been selected not only for high cleavage rates but also for mediating other functions (discussed in De la Peña and Flores, 2001 and Carbonell et al., 2006).

HHe-PLMVd was the most efficient ribozyme *in vitro*, especially at submillimolar Mg^{+2} . This differential behavior most likely results from the tertiary interactions between loops being close to optimal in PLMVd-derived extended hammerheads (Weinberg and Rossi, 2005), and idea supported by *in vitro* selection studies at low Mg^{2+} concentration in which a PLMVd-derived hammerhead with two nucleotide changes in loop 2 with respect to the wild-type (UAGGGU) was selected for the fastest self-cleavage (Saksmerprome et al., 2004). In these previous studies, *trans*-cleaving PLMVd-derived hammerheads with extended format and carrying the selected loop 2 were efficient on cleaving different substrates at 0.5 mM Mg^{+2} . However, we have observed that at 0.1 and 0.05 mM Mg^{+2} HHe-PLMVd with the natural TSMs was more efficient than the variant with the *in vitro* selected loop 2. The nucleotides of the asymmetric bulge of HHe-PLMVd most likely generate TSMs similar to those existing in the natural hammerhead, because a bulging loop of only three nucleotides permits less alternative interactions than in HHe-ELVd (with a bulging loop of four nucleotides). Supporting this view, extended hammerheads derived from sTRSV and CChMVd, with bulging loops of seven nucleotides, also display low catalytic efficiency (Weinberg and Rossi, 2005).

Bioassays in which constructs expressing three hammerheads and a monomeric PSTVd (-) RNA substrate were co-agroinfiltrated in *N. benthamiana* revealed that only HHe-PLMVd was active *in vivo*, whereas HHe-sTRSV- Δ L1 and the catalytically deficient HHe-PLMVd-G5 \rightarrow U were not. These results strongly suggest that the lower accumulation of the PSTVd transcript in plants expressing HHe-PLMVd most likely results from ribozyme-mediated cleavage, and that TSMs are critical in this respect. Moreover, this hammerhead interfered with viroid infection when co-expressed with an infectious PSTVd (-) dimeric RNA, indicating that it may be active against the primary dimeric transcript and perhaps also against the oligomeric (-) replicative intermediates. Because a hammerhead similar to HHe-sTRSV- Δ L1 only conferred

resistance against PSTVd in some potato transgenic lines but not in transgenic tomato (Yang et al., 1997), we believe that HHe-PLMVd constitutively expressed in transgenic plants could serve to control PSTVd more efficiently. We also propose that agroinfiltration assays in *N. benthamiana*, which provide an easy and rapid test of the catalytic performance *in vivo* of *trans*-cleaving hammerheads, should be carried out before attempting stable plant genetic transformation that demands considerable more time.

MATERIALS AND METHODS

Design and construction of trans-cleaving hammerheads and PSTVd (-) RNA

Ribozymes were designed to target the GUC trinucleotide located at positions 322-324 in the PSTVd (-) RNA. This site was previously shown to be a suitable target for hammerhead-mediated cleavage *in vitro* and *in vivo* (Yang et al., 1997). The hammerhead cDNAs constructs were prepared by extension and amplification of partially overlapping sense and antisense primers (five cycles at 94°C for 30 s, 50°C for 30 s and 72°C for 10 s, with a final extension at 72°C for 2 min), with sense primers including the T7 promoter. PCR products were separated by PAGE in 5% gels and those with the expected length were eluted and cloned into pUC18 digested with *Sma*I. Monomeric and dimeric head-to-tail PSTVd cDNAs (intermediate strain, M16826) were cloned into Bluescript II KS (+) digested with *Eco*RI/*Hind*III.

Synthesis and purification of ribozymes and substrate

Hammerheads were generated by *in vitro* transcription of the corresponding recombinant plasmids digested with *Bam*HI. Transcription reactions (100 µl) contained 40 mM Tris-HCl, pH 8, 6 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 10 mM DTT, 10 mM NaCl, 0.4 mM each of ATP, CTP, GTP and UTP, 0.8 U/µl of ribonuclease inhibitor (rRNasin, Promega), 100 ng/µl of plasmid and 1.2 U/µl of T7 RNA polymerase. Radiolabeled PSTVd (-) RNA (464 nt) was obtained by *in vitro* transcription as describe above, but the UTP concentration was 0.08 mM and 0.25 µCi/µl [α -³²P]UTP were added to the transcription mixture. After incubation at 37°C for 1 h, the transcription products were fractionated by PAGE in 5% gels with 8 M urea. The primary transcripts, eluted by

extracting the crushed gel pieces with phenol saturated with buffer (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM and SDS 0.1%), were recovered by ethanol precipitation and resuspended in deionized sterile water. The integrity and concentration of the purified ribozyme and substrate were confirmed by denaturing gel electrophoresis with appropriate size markers.

Kinetic analysis

Trans-cleaving rate constants were determined under single-turnover conditions using an excess of the ribozyme (200 nM) and traces of the ³²P-labeled substrate (2 nM). Ribozyme and substrate were first annealed in Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, by heating at 95°C for 1 min and slowly cooling to 25°C (ramping decrease 1°C/s), and then incubated at this temperature for 5 min. After taking a zero-time aliquot, cleavage reactions were triggered by adding MgCl₂ to the desired final concentration (10, 1, 0.1 or 0.05 mM). Aliquots were removed at different time intervals and quenched with a five-fold excess of stop solution (8 M urea, 50% formamide, 50 mM EDTA, 0.1% xylene cyanol and bromophenol blue) at 0°C. Substrate and cleavage products were separated by PAGE in 5% denaturing gels. The product fraction at different times, F_t , was determined by quantitative scanning of the corresponding gel bands and first fitted to a single-exponential equation $F_t = F_0 + F_\infty(1 - e^{-kt})$, where F_0 and F_∞ are the product fractions at zero time and at the reaction endpoint, respectively, and k is the first-order rate constant of cleavage (k_{cat}). Those data sets that could not be adequately fitted as a single exponential were adjusted to a double-exponential using the equation $F = F_a(1 - e^{-k_a t}) + F_b(1 - e^{-k_b t})$, where F_a and k_a correspond to the product fraction and the rate constant for a rapid process 'a', and F_b and k_b to the product fraction and the rate constant for a slow process 'b'.

Agroinfiltration

The monomeric and dimeric PSTVd-cDNAs and the hammerhead-cDNAs were subcloned into a modified version of the pMOG180 vector between a double copy of the 35S CaMV promoter and the Nos-terminator. The expression cassettes were then subcloned into the plant binary expression vector pBIN19sGFP by replacing the sGFP

cassette to obtain the recombinant plasmids pBINmPSTVd(-), pBINdPSTVd(-), pBINHHePLMVd, pBINHHePLMVdG5→U, pBINHHeTRSVAL1, and pBINØ (the empty vector). Protocols for agroinfiltrate *N. benthamiana* plants were described previously (Tenllado and Díaz-Ruíz, 2001; Carbonell et al., 2008). Bioassays were performed in a growth chamber at 23°C for 16 h with fluorescent light and at 19°C for 8 h in darkness. RNAs from the infiltrated and non-infiltrated upper leaves were extracted with a phenol-based protocol (Navarro et al., 2004). PSTVd (-) primary transcripts and the monomeric circular and linear RNAs resulting from viroid replication were detected by denaturing PAGE in 5% gels containing 8 M urea, followed by Northern-blot hybridization at 70°C in 50% formamide with strand-specific ³²P-labeled riboprobes transcribed *in vitro* (Daròs et al., 1994).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been partially supported by grants BFU2005-06808/BMC from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) and ACOMP07/268 from the Generalidad Valenciana (Spain) to R.F. During this work, A.C. received a pre-doctoral fellowship from the MEC and S.G. a postdoctoral fellowship from the Fundación “José y Ana Royo” and an I3P contract from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas. We thank A. Ahuir for excellent technical assistance.

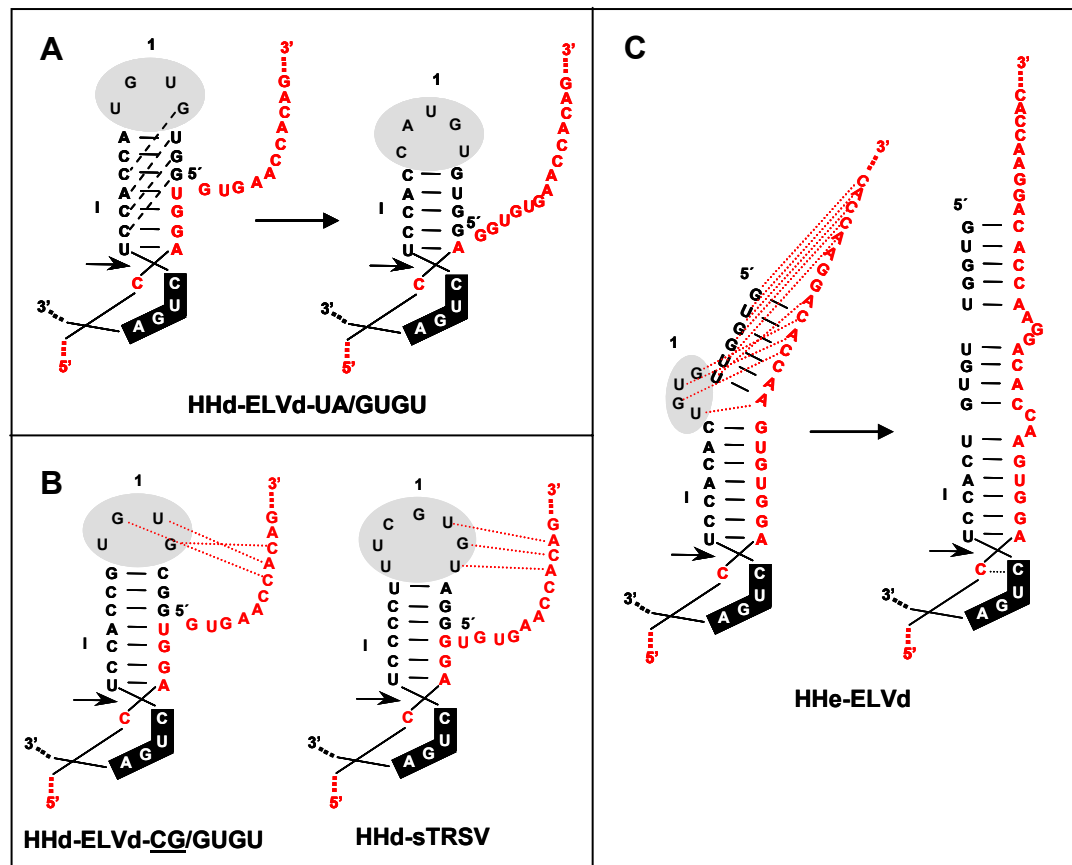
REFERENCES

- Burke,D.H. and Greathouse,S.T. (2005). Low-magnesium, *trans*-cleavage activity by type III, tertiary stabilized hammerhead ribozymes with stem 1 discontinuities. *BMC Biochem.* **6**, 14.
- Campbell,T.B., McDonald,C.K. and Hagen,M. (1997). The effect of structure in a long target RNA on ribozyme cleavage efficiency. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4985-4993.
- Canny,M., Jucker,F., Kellogg,E., Khvorova,A., Jayasena,S., and Pardi,A. (2004). Fast cleavage kinetics of a natural hammerhead ribozyme. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10848-10849.
- Carbonell,A., De la Peña,M., Flores,R. and Gago,S. (2006). Effects of the trinucleotide preceding the self-cleavage site on eggplant latent viroid hammerheads: differences in co- and post-transcriptional self cleavage may explain the lack of AUC in most natural hammerheads. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5613-5622.
- Carbonell,A., Martínez de Alba,A.E., Flores,R. and Gago,S. (2008). Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with infection of representative members of the two viroid families. *Virology* **371**, 44-53.
- Castanotto,D., Li,J.R., Michienzi,A., Langlois,M.A., Lee,N.S., Puymirat,J.Y. and Rossi,J.J. (2002). Intracellular ribozyme applications. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1140-1145.
- Daròs,J.A., Marcos,J.F., Hernández,C., Flores,R. (1994). Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12813-12817.
- De la Peña,M., and Flores,R. (2001). An extra nucleotide in the consensus catalytic core of a viroid hammerhead ribozyme: implications for the design of more efficient ribozymes. *J. Biol. Chem.* **276**, 34586-34593.
- De la Peña,M., Gago,S. and Flores,R. (2003). Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *EMBO J.* **22**, 5561-5570.
- Diener,T.O. (1971). Potato spindle tuber virus. IV. Replicating, low molecular weight RNA. *Virology* **45**, 411-428.
- Edwards,G.A., Hopher,A., Clerk,S.P. and Boulter,D. (1991). Pea lectin is correctly processed, stable and active in leaves of transgenic potato plants. *Plant Mol. Biol.* **17**, 89-100.
- Fadda,Z., Daròs,J.A., Fagoaga,C., Flores,R. and Durán-Vila,N. (2003). Eggplant latent viroid, the candidate type species for a new genus within the family *Avsunviroidae*. *J. Virol.* **77**, 6528-6532.
- Flores,R., Hernández,C., De la Peña,M., Vera,A. and Daròs,J.A. (2001). Hammerhead ribozyme structure and function in plant RNA replication. *Methods Enzymol.* **341**, 540-552.
- Gross,H.J., Domdey,H., Lossow,C., Jank,P., Raba,M., Alberty,H., and Sängner,H.L. (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* **273**, 203-208.
- Haseloff,J. and Gerlach,W.L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* **334**, 585-591.
- Hernández,C. and Flores,R. (1992). Plus and minus RNAs of peach latent mosaic self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3711-3715.

- Hershlag,D. and Cech,T.R. (1990). Catalysis of RNA cleavage by the Tetrahymena thermophila ribozyme.
1. Kinetic description of the reaction on an RNA substrate complementary to the active site. *Biochemistry* **29**, 10159-10171.
- Hertel,K.J., Pardi,A., Uhlenbeck,O.K., Koizumi,M., Ohtsuka,E., Uesugi,S., Cedergren,R., Eckstein,F., Gerlach,W.L., Hodgson,R. and Symons,R.H. (1992). Numbering system for the hammerhead. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3252.
- Hormes,R. and Sczakiel,G. (2002). The size of hammerhead ribozymes is related to cleavage kinetics: the role of substrate length. *Biochimie* **84**, 897-903.
- Hutchins,C.J., Rathjen,P.D., Forster,A.C. and Symons,R.H. (1986). Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res.* **14**, 3627-3640.
- Khvorova,A., Lescoute,A., Westhof,E. and Jayasena,S.D. (2003). Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nature Struct. Biol.* **10**, 708-712.
- Martick,M. and Scott,W.G. (2006). Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell* **126**, 1-12.
- Molinaro,M. and Tinoco Jr.,I. (1995). Use of ultrastable UNCG loop hairpins to fold RNA structures: thermodynamic and spectroscopic applications. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3056-3063.
- Navarro,J.A., Botella,F., Marhuenda,A., Sastre,P., Sánchez-Pina,M.A. and Pallás,V.(2004). Comparative infection progress analysis of lettuce big-vein virus and mirafiori lettuce virus in lettuce crops by developed molecular diagnosis techniques. *Phytopathology* **94**, 470-477.
- Penedo,J., Wilson,T., Jayasena,S., Khvorova,A. and Lilley,D. (2004). Folding of the natural hammerhead ribozyme is enhanced by interaction of auxiliary elements. *RNA* **10**, 880-888.
- Prody,G.A., Bakos,J.T., Buzayan,J.M., Schneider,I.R. and Bruening,G. (1986). Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* **231**, 1577-1580.
- Rueda,D., Wick,K., McDowell,S.E. and Walter,N.G. (2003). Diffusely bound Mg²⁺ ions slightly reorient stems I and II of the hammerhead ribozyme to increase the probability of formation of the catalytic core. *Biochemistry* **42**, 9924-9936.
- Saksmerprome,V., Roychowdhury-Saha,M., Jayasena,S., Khvorova,A., and Burke,D.H. (2004). Artificial tertiary motifs stabilize *trans*-cleaving hammerhead ribozymes under conditions of submillimolar divalent ions and high temperatures. *RNA* **10**, 1916-1924.
- Sullenger,B.A. and Cech,T.R. (1993). Tethering ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science* **262**, 1566-1569.
- Tenllado,F. and Díaz-Ruiz,J.R. (2001). Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *J. Virol.* **75**, 12288-12297.
- Uhlenbeck,O.C. (1987). A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* **328**, 596-600.
- Weinberg,M.S. and Rossi,J.J. (2005). Comparative single-turnover kinetic analyses of *trans*-cleaving hammerhead ribozymes with naturally derived non-conserved sequence motifs. *FEBS Lett.* **579**, 1619-1624.

- Yang,X., Yie,Y., Zhu,F., Liu,Y., Kang,L., Wang,X. and Tien,P. (1997). Ribozyme-mediated high resistance against potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4861-4865.
- Zuker,M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406-3415.

SUPPLEMENTARY MATERIAL:



Supplementary Figure 1. Schematic representation of the secondary structure predicted for the helix I-loop 1 domain of the complexes formed by some hammerheads and the PSTVd (-) RNA. (A) Disruption of the catalytically active conformation of the complex between HHD-ELVd-UA/GUGU and the substrate due to intramolecular interactions represented with dashed lines (left), and adoption of the most stable conformation (right). (B) Catalytically active conformation predicted for the complexes between HHD-ELVd CG/GUGU (left) or HHD-sTRSV (right) and the substrate, with intermolecular interactions that may disrupt adoption of TSMs being represented with red points. (C) Disruption of the catalytically active conformation for the complex between HHe-ELVd and the substrate due to intermolecular interactions (left), and adoption of the catalytically active folding (right). Other details as in panel A and Figures 1 and 2.

Capítulo 3

Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families¹

Alberto Carbonell, Ángel-Emilio Martínez de Alba, Ricardo Flores and Selma Gago
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Campus Universidad Politécnica, Avenida de los Naranjos, s/n, 46022 Valencia, Spain

ABSTRACT

Infection by viroids, non-protein-coding circular RNAs, occurs with the accumulation of 21-24 nt viroid-derived small RNAs (vd-sRNAs) with characteristic properties of small interfering RNAs (siRNAs) associated to RNA silencing. The vd-sRNAs most likely derive from dicer-like (DCL) enzymes acting on viroid-specific dsRNA, the key elicitor of RNA silencing, or on the highly-structured genomic RNA. Previously, viral dsRNAs delivered mechanically or agroinoculated have been shown to interfere with virus infection in a sequence-specific manner. Here, we report similar results with members of the two families of nuclear- and chloroplast-replicating viroids. Moreover, homologous vd-sRNAs co-delivered mechanically also interfered with one of the viroids examined. The interference was sequence-specific, temperature-dependent and, in some cases, also dependent on the dose of the co-inoculated dsRNA or vd-sRNAs. The sequence-specific nature of these effects suggests the involvement of the RNA induced silencing complex (RISC), which provides sequence-specificity to RNA silencing machinery. Therefore, viroid titer in natural infections might be regulated by the concerted action of DCL and RISC. Viroids could have evolved their secondary structure as a compromise between resistance to DCL and RISC, which act preferentially against RNAs with compact and relaxed secondary structures, respectively. In addition, compartmentation, association with proteins or active replication, might also help viroids to elude their host RNA silencing machinery.

¹Published in *Virology* 371, 44-53 (2008).

INTRODUCTION

RNA silencing, in addition to mediating a broad range of developmental events, also operates as a defense mechanism against invading plant, insect and mammalian viruses (Baulcombe, 2004; Ding et al., 2004; Dunoyer and Voinnet, 2005; Schutz and Sarnow, 2006). In the defense pathway, RNA silencing is triggered by: i) double-stranded RNA (dsRNA) generated during viral replication, ii) single-stranded RNA (ssRNA) that, due to their anomalous accumulation or peculiar structural features, is recognized by a host RNA-dependent RNA polymerase (RDRP) and converted into dsRNA, or iii) genomic or defective viral ssRNAs with extensive fold-back structure (Dalmay et al., 2000; Molnar et al., 2005; Mourrain et al., 2000; Szittyá et al., 2002; Moissiard and Voinnet, 2006). The dsRNA or highly-structured ssRNA is processed by a bidentate RNase III-like enzyme—Dicer (Berstein et al., 2001), or Dicer-like (DCL) in plants—into 21-24 nt fragments (Hamilton and Baulcombe, 1999) called small interfering RNAs (siRNAs). These siRNAs are transferred to the RNA induced silencing complex (RISC) and guide its Argonaute component, an RNase H-like enzyme, for degrading the cognate ssRNA (Hammond et al., 2000; Omarov et al., 2007; Pantaleo et al., 2007). The presence of siRNAs homologous and complementary to the targeted ssRNA in all systems exhibiting antiviral RNA silencing, make them reliable markers for this phenomenon also known as post-transcriptional gene silencing (PTGS) in plants.

Viroids are a singular class of plant pathogens composed exclusively by a small (246-401 nt) circular ssRNA, with a compact secondary structure and without protein-coding capacity (Diener, 2003; Ding and Itaya 2007; Flores et al., 2000; Flores et al., 2005; Tabler and Tsagris 2004). They are able to replicate independently (without the assistance of a helper virus) in plants and, as an indirect effect of altering their gene expression, to incite in most cases specific diseases. Viroids, which replicate through an RNA-based rolling circle mechanism with the likely involvement of dsRNA intermediates (Branch et al., 1984; Daròs et al., 1994; Feldstein et al., 1998; Navarro et al., 1999), are grouped into two families: *Pospiviroidae*, type species *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (Diener, 1972; Gross et al., 1978), and *Avsunviroidae*, type species *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) (Hutchins et al., 1986). PSTVd and ASBVd replicate (and

accumulate) in the nucleus and the chloroplast, respectively, as most likely also do the other members of both families. This classification scheme is supported by additional criteria that include the presence of conserved motifs in the family *Pospiviroidae*, and of hammerhead ribozymes in the family *Avsunviroidae* that catalyze self-cleavage of the oligomeric strands of both polarities resulting from their rolling-circle replication (Flores et al., 2005).

Recently, viroid-derived small RNAs (vd-sRNAs) with characteristic properties of the PTGS-associated siRNAs, have been detected in tissues infected by different viroids (Itaya et al., 2001; Markarian et al., 2004; Martínez de Alba et al., 2002; Papaefthimiou et al., 2001), strongly suggesting that these unconventional RNAs are also targeted by PTGS. The vd-sRNAs could result from the action of one or more DCL isoenzymes not only on the dsRNA replicative intermediates, but also on the genomic viroid RNA, which being unencapsidated and highly structured appears particularly vulnerable to enzymes of this class. Indeed, two recent reports on the vd-sRNAs from tomato infected by PSTVd, there referred to as small RNAs of PSTVd (srPSTVds) (Itaya et al., 2007), or by the closely related *Citrus exocortis viroid* (CEVd) (Martín et al., 2007), show that they are mostly of plus polarity, phosphorylated and methylated at their 5' and 3' termini respectively, and mapping predominantly to certain domains of the viroid rod-like secondary structure.

Because direct delivery of dsRNA by mechanical inoculation or by *Agrobacterium*-mediated transient-expression has been shown to interfere in a sequence-specific manner with infection by three different plant RNA viruses (Tenllado and Díaz-Ruiz, 2001), we examined whether these results could be extended to viroids, particularly considering that the PSTVd rod-like secondary structure has been proposed to play a key role in resistance to RISC-mediated cleavage (Itaya et al., 2007). Here, we report our results with PSTVd and CEVd (Semancik and Weathers, 1972) of the family *Pospiviroidae*, and with *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) (Navarro and Flores, 1997) of the family *Avsunviroidae*. These results support the notion that: i) the highly-structured genomic viroid ssRNA or some dsRNA derivative thereof, operate as the primary elicitors of PTGS in natural viroid infections, paralleling the situation observed previously in natural virus infections (Ratcliff et al., 1997; Ratcliff et al., 1999),

and ii) despite their compact secondary structure, viroid RNAs are sensitive to RISC-mediated degradation under certain conditions.

RESULTS

Titration of inocula

Given that, in contrast to viruses, local lesion hosts have not been reported for most viroids and, when reported, they have very narrow growth conditions, viroid bioassays had to be performed with systemic hosts: tomato (PSTVd and CEVd), gynura (CEVd), and chrysanthemum (CChMVd). To study the effects on viroid infectivity of different co-delivered RNAs, it was first necessary to determine the minimal amount of each viroid that elicited symptoms in all the plants inoculated mechanically. Dilution assays showed that these minimal amounts were: 25-50 ng of circular CEVd RNA per gynura or tomato plant, and 5 ng of circular PSTVd RNA per tomato plant (obtained from infected gynura and tomato, respectively), and 10 ng of monomeric linear CChMVd RNA (resulting from *in vitro* self-cleavage of a dimeric head-to-tail transcript) per chrysanthemum plant. Results from bioassays were quantitatively expressed by the infectivity index (Semancik et al., 1976). This index, the total number of infected-plant-days over a certain period of time (20-50 days post-inoculation, depending on the experiment), combines in a single figure the number of infected plants and the time course of the onset of symptoms.

Co-inoculated homologous dsRNA interferes with representative viroids of both families

Because previous results have shown that direct delivery by mechanical inoculation of certain RNA viruses, together with a 5000 molar excess of their homologous dsRNAs, interferes with infection in a sequence-specific manner (Tenllado and Díaz-Ruiz, 2001), we explored whether a similar effect could be observed with representative viroids of both families. With the CEVd-gynura system, co-inoculation of the viroid RNA with a 1250 molar excess of CEVd-dsRNA (inoculating a 5000 molar excess was technically difficult) significantly reduced the infectivity index with respect to inoculations with the viroid RNA alone. This reduction was very much influenced

by the inability of the viroid, in the presence of its homologous dsRNA, to infect half of the plants in two independent experiments, as revealed by the lack of symptoms and hybridization signals in Northern-blot analysis after denaturing PAGE (with the signals generated by the infected plants being considerably weaker) (Fig. 1A, C and E). Moreover, the effect was sequence-specific because co-inoculation of CEVd with the same molar excess of dsRNA of similar size derived from the non-related CChMVd neither decreased the infectivity index, nor the hybridization signals (Fig. 1C and E), and parallel results were obtained with dsRNA from a bacteriophage (data not shown).

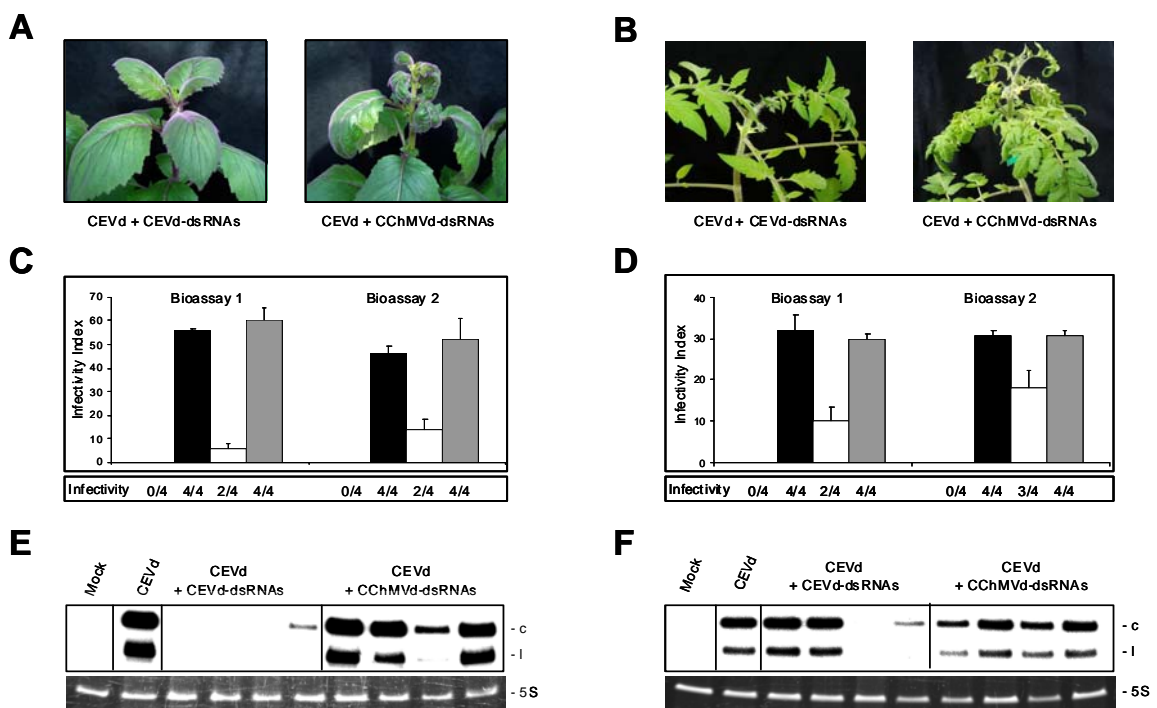


Fig. 1. Effects on CEVd infection of dsRNAs co-inoculated mechanically. **(A)** and **(B)** Gynura and tomato plants, respectively, co-inoculated with CEVd plus CEVd-dsRNA (symptomless, left), or CEVd plus CChMVd-dsRNA (symptomatic, right). The CEVd/dsRNA molar ratio was 1/1500. **(C)** and **(D)** Histograms representing the infectivity index of two independent bioassays in which blocks of four gynura and tomato plants respectively, were mock-inoculated, or inoculated with CEVd (black), CEVd plus CEVd-dsRNA (white), and CEVd plus CChMVd-dsRNA (gray). Infectivity index is expressed as the total number of infected-plant days over the bioassay length (with error bars indicating the standard deviation), and infectivity as the fraction of symptomatic plants at the end of the bioassay (40 days). **(E)** and **(F)** Analysis by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with a riboprobe for detecting (+) strands of the genomic circular (c) and linear (l) CEVd RNAs extracted from upper non-inoculated leaves (collected at the end of the bioassays) of blocks of four gynura (bioassay 1) and tomato (bioassay 2) plants, inoculated with CEVd plus CEVd-dsRNA, and CEVd plus CChMVd-dsRNA. RNAs from mock- and CEVd-inoculated control plants were also included. 5S RNA stained with ethidium bromide was used as loading control.

A similar outcome was observed when gynura was replaced by tomato: only the co-inoculated homologous CEVd-dsRNA afforded a protective effect against CEVd (Fig. 1B, D and F).

With the PSTVd-tomato system, the effect of co-inoculating the viroid RNA with a 5000 molar excess of PSTVd-dsRNA was not so pronounced because all plants eventually became infected, although the onset of symptoms was retarded and, as a consequence, they were less severe (Fig. 2A). This effect was again sequence-specific because substitution of the PSTVd-dsRNA by CChMVd-dsRNA did not essentially affect infectivity (Fig. 2B). Moreover, analysis by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization showed a reduction in the accumulation of the circular and linear forms of PSTVd in plants co-inoculated with PSTVd plus PSTVd-dsRNA, with respect to those inoculated with PSTVd alone, or with PSTVd plus the non-related CChMVd-dsRNA (Fig. 2C). Therefore, a direct correlation could be established between PSTVd accumulation and the precocity and severity of symptoms.

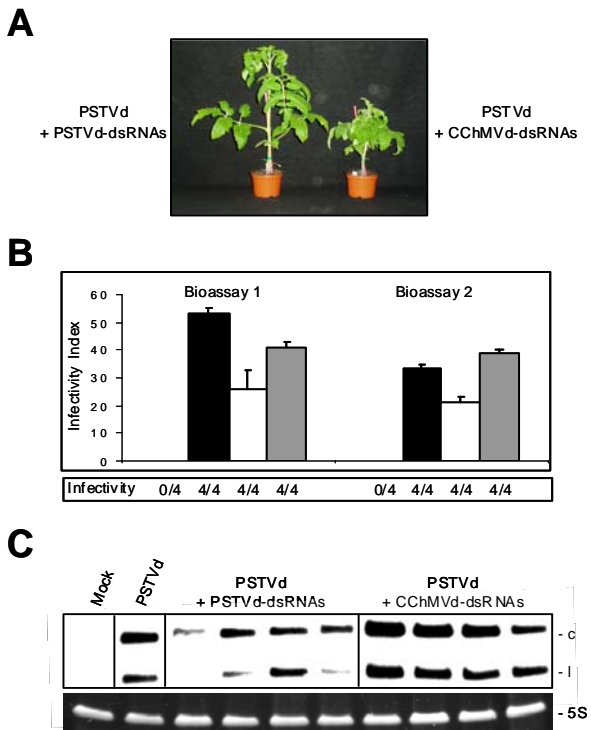


Fig. 2. Effects on PSTVd infection of dsRNAs co-inoculated mechanically. **(A)** Tomato plants co-inoculated with PSTVd plus PSTVd-dsRNA (symptomless, left), or PSTVd plus CChMVd-dsRNA (symptomatic, right). The PSTVd/dsRNA molar ratio was 1/5000. **(B)** Histograms representing the infectivity index of two independent bioassays in which blocks of four tomato plants were mock-inoculated, or inoculated with PSTVd (black), PSTVd plus PSTVd-dsRNA (white), and PSTVd plus CChMVd-dsRNA (gray), and examined for symptom expression along 30 days. **(C)** Analysis by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with a riboprobe for detecting (+) strands of the genomic circular (c) and linear (l) PSTVd RNAs extracted from upper non-inoculated leaves of blocks of four tomato plants, inoculated with PSTVd plus PSTVd-dsRNA, and PSTVd plus CChMVd-dsRNA (bioassay 2). Other details as in the legend to Fig. 1.

Finally, with the CChMVd-chrysanthemum system, a 1250 molar excess of the homologous dsRNA also had a marked negative effect on infectivity when co-inoculated with the viroid: half of the plants did not express symptoms and Northern-blot analysis failed to detect the viroid in these plants (Fig. 3A and C).

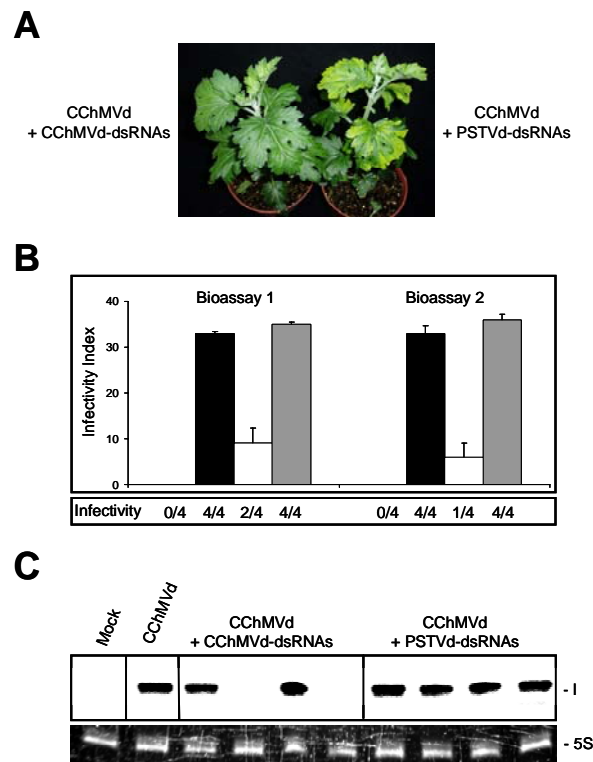


Fig. 3. Effects on CChMVd infection of dsRNAs co-inoculated mechanically. **(A)** Chrysanthemum plants co-inoculated with CChMVd plus CChMVd-dsRNA (symptomless, left), or CChMVd plus PSTVd-dsRNA (symptomatic, right). The CChMVd/dsRNA molar ratio was 1/1250. **(B)** Histograms representing the infectivity index of two independent bioassays in which blocks of four chrysanthemum plants were mock-inoculated, or inoculated with CChMVd (black), CChMVd plus CChMVd-dsRNA (white), and CChMVd plus PSTVd-dsRNA (gray), and examined for symptom expression along 20 days. **(C)** Analysis by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with a riboprobe for detecting (+) strands of the genomic linear (l) CChMVd RNAs (the circular forms were only visible after prolonged exposure, data not shown) extracted from upper non-inoculated leaves of blocks of four chrysanthemum plants, inoculated with CChMVd plus CChMVd-dsRNA, and CChMVd plus PSTVd-dsRNA (bioassay 2). Other details as in the legend to Fig. 1.

The observed effect did not increase at a CChMVd-dsRNA molar excess of 5000 and disappeared when the molar excess was 250 or 50, indicating that it was dose-dependent within a certain interval. The sequence-specificity of the protection observed was confirmed in co-inoculations of CChMVd with the non-related PSTVd-dsRNA: the infectivity index remained basically unchanged when compared with that

of the block of plants inoculated with the viroid only (Fig. 3B), and similar results were obtained in co-inoculations with the bacteriophage dsRNA (data not shown). Altogether, these results with four different viroid-host combinations, which included representative members of the two viroid families, extend the interfering effects of co-delivering homologous dsRNAs observed previously in virus infections to these subviral pathogens, and indicate that these effects most likely result from RNA silencing. More specifically, their sequence-specific nature suggests the involvement of RISC, which also acts in a sequence-specific manner.

Co-inoculated homologous vd-sRNAs also interfere with some viroids

Considering the interference afforded by dsRNAs when co-inoculated with their homologous viroids, we tested whether similar effects could be also provided by the primary products of DCL on dsRNAs (or highly-structured ssRNAs) and direct effectors of RNA silencing. The vd-sRNAs were obtained by *in vitro* digestion with the cloned RNase III from *E. coli*, which, acting on dsRNA, catalyzes the production of small RNAs with the same 3' di-nucleotide overhangs and with 5'-phosphoryl and 3'-hydroxyl termini as those generated by human Dicer (Nicholson, 1999; Yang et al., 2002). Because RNase III produces shorter cleavage products, digestion conditions were controlled to ensure that the resulting vd-sRNAs had a size that included the range of 21-24 nt, typical of DCL products (Fig. 4A). With the CEVd-gynura system, the presence of a 100 molar excess of the CEVd-sRNAs accompanying the infecting viroid decreased the infectivity index with respect to the inoculum containing only the viroid RNA. This effect was the result of delaying the onset of symptoms in one of the experiments (data not shown) and reducing the number of infected plants in the other experiment (Fig. 4B), and was also reflected in the Northern-blot hybridization signals (Fig. 4C). Similar observations were made in one experiment with the CEVd-tomato system, in which co-inoculation of the CEVd-sRNAs resulted in a decrease in the number of infected plants to half (Fig. 4B). As previously found in the co-inoculations with dsRNAs, the effects of the vd-sRNAs were sequence-specific because co-inoculating heterologous vd-sRNAs did not significantly modify the infectivity index (Fig. 4B).

However, parallel attempts with the PSTVd-tomato system (using a 100 molar excess of PSTVd-sRNAs) and the CChMVd-chrysanthemum system (using 500 and 1250 molar excesses of CChMVd-sRNAs) failed to reveal any observable effects of co-inoculating the vd-sRNAs with their homologous viroids. At least with the first system, these negative results could be in part the consequence of PSTVd accumulating in tomato to levels significantly higher than CEVd (see below). In any case, our results show that in certain situations, mechanical co-delivery of homologous vd-sRNAs interferes with viroid infectivity, as predicted for *bona fide* siRNAs, suggesting that vd-sRNAs generated in natural infections may program RISC and exert a regulatory effect on the titer of mature viroid RNAs. Application of a 1000 molar excess of PSTVd-sRNAs induced rapid collapse of tomato plantlets (data not shown). Interestingly, over-saturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways has also been associated with fatality in mice (Grimm et al., 2006).

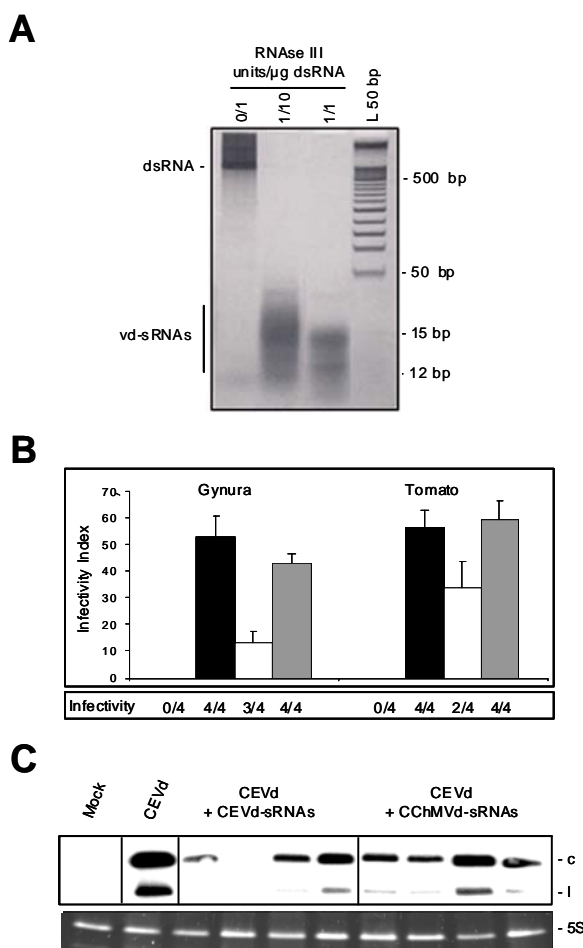


Fig. 4. Effects on CEVd infection of vd-sRNAs co-inoculated mechanically. **(A)** Analysis by non-denaturing PAGE of dsRNA untreated (lane 1), and treated with 0.1 or 1 U of *E. coli* RNase III per μ g of dsRNA (lanes 2 and 3, respectively). Lane 4, molecular size markers. The gel was stained with silver. **(B)** Histograms representing the infectivity index of two bioassays in which blocks of four gynura (left) and tomato (right) plants were mock-inoculated, or inoculated with CEVd (black), CEVd plus CEVd-sRNAs (white), and CEVd plus CChMVd-sRNAs (gray), and examined for symptom expression along 50 days. The CEVd/sRNA molar ratio was 1/100. **(C)** Analysis by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with a riboprobe for detecting (+) strands of the genomic circular (c) and linear (l) CEVd RNAs extracted from upper non-inoculated leaves of blocks of four gynura plants, inoculated with CEVd plus CEVd-sRNAs, and CEVd plus CChMVd-sRNAs. Other details as in the legend to Fig. 1.

Growing temperature influences the interfering effects of homologous dsRNAs

Because it is known that the accumulation of PSTVd and CEVd are unusually temperature-dependent within the interval between 25°C and 35°C (Sänger and Ramm, 1975), we examined whether the protective effects of the homologous dsRNAs observed previously under greenhouse conditions (20-22°C with thermal oscillations between 25°C and 15°C) were also temperature-dependent. In plants kept in a growth chamber (30°C for 16 h with fluorescent light and 25°C for 8 h in darkness), either no significant protective effect (CEVd-gynura and CEVd-tomato systems), or just a minor effect (PSTVd-tomato system), was detected (data not shown).

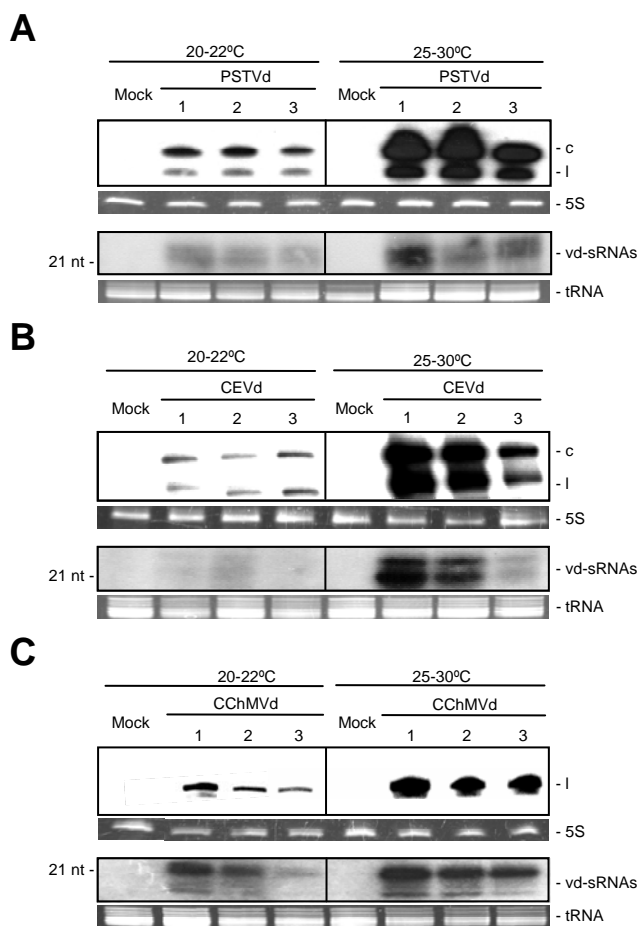


Fig. 5. Effects of the growing temperature on the accumulation of viroid RNAs. Analysis by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with riboprobes for detecting viroid (+) strands in RNA preparations from three tomato, gynura and chrysanthemum plants inoculated with PSTVd (A), CEVd (B), and CChMVd (C), respectively, grown in the greenhouse (20-22°C) or in a growth chamber (25-30°C). Top panels show the signals generated by the monomeric circular (c) and linear (l) viroid RNAs (the CChMVd circular form was only visible after prolonged exposure), and lower panels the signals corresponding to the vd-sRNAs (with the position of an RNA marker of 21 nt indicated at the left). RNAs from mock-inoculated control plants were also included. 5S or tRNAs stained with ethidium bromide were used as loading controls.

To confirm the influence of temperature on viroid titer, blocks of PSTVd- CEVd- and CChMVd-inoculated tomato, gynura and chrysanthemum plants, respectively, were grown in parallel in the greenhouse and the growth chamber. Analysis by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization showed a marked increase in the

accumulation of the circular and linear forms of the three viroids in plants grown under the high temperature regime (Fig. 5). This increase most likely accounts for the reduction or lack of protective effects observed in co-inoculations with homologous dsRNAs using the high temperature regime. Moreover, quantification of viroid RNAs by gel staining with ethidium bromide revealed that with the low temperature regime the accumulation of CEVd in gynura and tomato was considerably lower than that of PSTVd in tomato, whereas the difference was attenuated with the high temperature regime (data not shown). These observations could explain why the protective effects of the homologous dsRNAs in co-inoculations under the low temperature regime were more clearly visible with CEVd. To further discard that other environmental variables, particularly light, could influence the observed differences, we performed a second experiment using two growth chambers set at the same light intensity and photoperiod, but differing in the temperature regime (30°C-25°C and 23°C-19°C). Results from this experiment confirmed those described above (Supplementary Fig. 1).

We also analyzed the influence of temperature on the accumulation of the vd-sRNAs: the titer increased with temperature, following a trend similar to their genomic RNAs. At least two populations were detected in all instances; in the nuclear viroids, the vd-sRNAs of smaller size (comigrating with the RNA marker of 21 nt) were more abundant in CEVd than in PSTVd, whereas in the chloroplastic viroid (CChMVd) the vd-sRNAs of larger size (also comigrating with the RNA marker of 21 nt) were the most abundant (Fig. 5 and Supplementary Fig. 1).

Co-delivery of homologous dsRNA by agroinfiltration also affects PSTVd infection

To provide additional support for the previous results, the dsRNA was co-delivered by agroinfiltration instead of by mechanical inoculation. To this end, we used the experimental host *N. benthamiana* because it can be easily agroinfiltrated and sustains replication of PSTVd, albeit without symptoms. Given that the strong autocomplementarity of PSTVd RNA could pose some problems for proper folding of the dsRNA *in vivo*, we delivered a hairpin construct formed by an inverted repeat designed to comprise only the upper strand of the rod-like structure, separated by an intron, instead of a nearly full-length PSTVd sequence (Smith et al., 2000). Computer-

based predictions indicated that this viroid RNA segment, however, can still adopt a structured folding that includes the so-called hairpin I conserved in all members of the family *Pospiviroidae* (Flores et al., 2005). Controls for the experiment included the corresponding direct repeat construct and the empty vector (Fig. 6A).

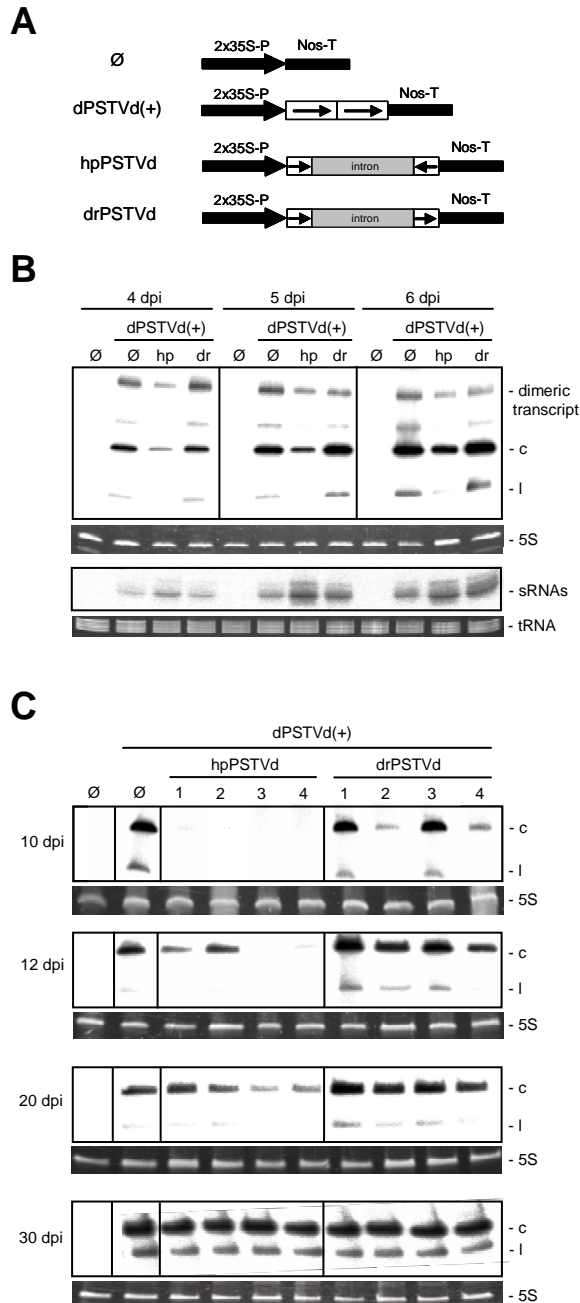


Fig. 6. Local and systemic effects on PSTVd accumulation of different PSTVd constructs co-agroinfiltrated in *Nicotiana benthamiana*. **(A)** Schematic diagrams of the constructs: empty vector (Ø), dimeric PSTVd (+) [dPSTVd(+)], inverted repeat (hairpin) PSTVd (hpPSTVd), and direct repeat PSTVd (drPSTVd). **(B)** Denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with a riboprobe for detecting PSTVd (+) strands of RNAs extracted from pools of three co-infiltrated leaves collected 4, 5 and 6 days post-infiltration. Leaves were co-infiltrated with the dPSTVd(+) construct and either the Ø, hpPSTVd or drPSTVd constructs. Positions of the dimeric primary transcript and unit-length circular (c) and linear (l) viroid RNAs (upper panels) and of the vd-sRNAs (lower panels) are indicated. 5S or tRNAs stained with ethidium bromide were used as loading controls. **(C)** Denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with a riboprobe for detecting PSTVd (+) strands of RNAs extracted from upper non-infiltrated leaves of four individual plants collected 10, 12, 20 and 30 days after infiltrating young basal leaves. Other details as in panel **(B)**.

Northern-blot hybridization of RNAs from leaves agroinfiltrated with the plasmid expressing the hairpin construct showed high levels of PSTVd-sRNAs 3-4 days post

infiltration (dpi), while these levels were significantly lower and undetectable in leaves agroinfiltrated with the plasmid expressing the direct repeat construct and with the empty vector, respectively (data not shown). When each of these three constructs were co-infiltrated with the recombinant plasmid expressing an infectious dimeric head-to-tail PSTVd (+) RNA, Northern-blot hybridization of RNAs extracted 4 dpi showed reduced levels of the dimeric transcript, as well as of the monomeric circular and linear PSTVd RNAs, in leaves co-infiltrated with the hairpin construct with respect to those co-infiltrated with the direct repeat construct and the empty vector (Fig. 6B). The effects of the three different constructs were attenuated, but still visible, in RNAs extracted 5 and 6 dpi (Fig. 6B). As expected, an inverse relationship could be established with the vd-sRNAs, which reached the highest levels in the leaves co-infiltrated with the hairpin construct (Fig. 6B).

These results were extended to RNA preparations from the upper non-inoculated leaves. Northern-blot hybridizations revealed that co-infiltration of the plasmids expressing the dimeric PSTVd (+) RNA and the hairpin construct induced a decrease in the accumulation of the monomeric circular and linear viroid RNAs, with respect to parallel co-infiltrations with the direct repeat construct and the empty vector. The effect was clearly visible in leaves collected 10, 12 and 20 dpi, whereas no differences could be discerned at 30 dpi, presumably because by then the viroid had overcome the protective effect afforded by the transient expression of the hairpin construct (Fig. 6C). Altogether these results, which were reproduced in two independent experiments, support the view that dsRNA interferes in a sequence-specific manner with PSTVd infection through the generation of vd-sRNAs.

DISCUSSION

Detection of vd-sRNAs with the typical properties of siRNAs accumulating *in vivo* in different viroid-host combinations indicates that viroids, like plant viruses, are inducers and targets of the RNA silencing machinery of their hosts. More specifically, these results implicate DCL in the genesis of the vd-sRNAs. At least formally, this enzymatic activity might be the only one responsible for degrading viroid RNAs and regulating viroid titer in natural infections. However, and also paralleling what has

been recently shown for plant RNA viruses (Omarov et al., 2007; Pantaleo et al., 2007), vd-sRNAs might act as authentic siRNAs and program RISC for viroid RNA degradation. Supporting this view, some srPSTVds are active biologically in guiding RISC-mediated cleavage, as revealed with a system in which the green fluorescent protein (GFP) gene was fused to a sensor sequence complementary to a fragment of the PSTVd genomic RNA. When the GFP-sensor was introduced by agroinfiltration in PSTVd-infected tomato, the fluorescence was very much reduced (Itaya et al., 2007), in line with other results showing that expression in tobacco and *N. benthamiana* of non-infectious partial or full-length fragments of PSTVd or *Hop stunt viroid* (HSVd) —also of the family *Pospiviroidae*— fused to the GFP-coding region was suppressed upon viroid infection (Vogt et al., 2004; Gómez and Pallás 2007). However, replication of PSTVd proceeded normally when protoplasts were co-transfected with infectious full-length PSTVd (+) RNA and either srPSTVds or PSTVd-dsRNA, as did replication of transgenically expressed HSVd, suggesting that the viroid secondary structure plays a critical role in resistance to RISC-mediated cleavage (Itaya et al., 2007; Gómez and Pallás, 2007). We have here re-examined this question for several representative species of both viroid families with three different *in planta* approaches, two of which have been used previously with plant viruses (Tenllado and Díaz-Ruiz, 2001).

First, mechanical co-inoculation of the viroid RNA with an excess of homologous dsRNA induced significant reduction of the infectivity in CEVd-infected gynura, CEVd-infected tomato, PSTVd-infected tomato and CChMVd-infected chrysanthemum. At least in the CChMVd-chrysanthemum system, the effects were dose-dependent (lower amounts of the co-inoculated dsRNA induced less pronounced responses) and, most importantly, sequence-specific in the four viroid-host combinations examined (co-inoculations with similar amounts of unrelated dsRNA failed to provide any protection). The most direct interpretation for these results is that the co-delivered homologous dsRNAs are processed into vd-sRNAs that then prime RISC for degrading their cognate viroid genomic RNAs in the cytoplasm during intercellular movement, with the need of an excess of the dsRNA probably resulting from its inefficient delivery into cells, as presumably also occurs for viruses (Tenllado and Díaz-Ruiz, 2001). The alternative interpretation that RISC could target some viroid

replicative intermediate appears less likely because of their dsRNA nature and because the vd-sRNAs should move into the nucleus or the chloroplast where replication occurs.

Second, additional support for this notion was obtained by mechanical co-inoculation of the viroid RNA with an excess of vd-sRNAs generated *in vitro* by bacterial RNase III: only the homologous vd-sRNAs significantly reduced the infectivity in CEVd-infected gynura and CEVd-infected tomato. The effect was less pronounced than that induced by the homologous dsRNA, as revealed by the lack of protection observed in PSTVd-infected tomato and CChMVd-infected chrysanthemum. Although, as already indicated, this difference could result from the higher titer that PSTVd reaches in tomato, it is also possible that only a minor fraction of the vd-sRNAs generated *in vitro* are functional *in vivo*.

And third, co-agroinfiltration of *N. bentamiana* with recombinant plasmids expressing a dimeric head-to-tail PSTVd (+) RNA and a homologous PSTVd dsRNA (resulting from an inverted repeat construct separated by an intron) delayed viroid accumulation in the infiltrated areas and in the upper non-inoculated leaves. This effect was dependent on the formation of the dsRNA *in vivo* because it was not observed in co-infiltrations in which the hairpin construct was replaced by a direct repeat control. The inhibitory effect of the hairpin construct on PSTVd accumulation is presumably due to RISC-mediated cleavage of viroid RNA. However, considering that the hairpin and the dimeric PSTVd (+) RNAs were produced in the nucleus, we cannot exclude that the inhibitory effect could result from transcriptional interference of dimeric PSTVd (+) RNA production (Matzke and Birchler, 2005), although the same mechanism would be then expected to inhibit transcription of the hairpin construct and production of the hairpin-derived sRNAs. Transient co-expression of hairpin constructs may thus provide a rapid evaluation of the RNA silencing potential of viroid-derived sequences before attempting the generation of viroid-resistant transgenic plants. We believe that the inherent differences between the *in planta* systems used here and previously (Vogt et al., 2004; Itaya et al., 2007) and the protoplast system (Itaya et al., 2007), may explain the different results observed on the sensitivity/resistance of viroids to RISC-mediated cleavage. In particular, the molar excess of PSTVd-dsRNA used here was considerably

higher than in the protoplast system and, of the three viroids here examined, PSTVd was the most resistant to inhibition by homologous dsRNA or vd-sRNAs. Moreover, the constructs used in the agroinfiltration experiments were also different.

We noticed that consistent reproduction of the protective effects demanded specific experimental conditions that included titration of the inocula and temperature. The importance of this latter environmental factor was revealed by the attenuation or lack of any effect afforded by mechanical co-delivery of homologous dsRNAs when the growing temperature was increased. In contrast to most plant RNA viruses, viroid levels increase between 25°C and 35°C and the genomic RNAs are more structured than their viral counterparts and, hence, more sensitive to DICER-mediated degradation. It is not thus surprising that raising the temperature not only induced higher accumulation of the genomic viroid RNA, but also of the corresponding vd-sRNAs, given that higher temperatures also increase the accumulation of the small RNAs derived from two plant viral RNAs (Kalantidis et al., 2002; Szittyá et al., 2003). The RISC-mediated degradation that we propose here would be more clearly detectable when viroids are co-inoculated —mechanically or by agroinfiltration— with their homologous dsRNA or hairpin construct respectively, in plants grown under the low temperature regime. Under these conditions, the vd-sRNAs resulting from DICER-mediated degradation of the dsRNA would program RISC against the initial viroid progeny in the co-inoculated leaves, thus impeding or delaying systemic spread; the inverse relationship detected between the genomic viroid RNA and the vd-sRNAs is consistent with this view (Fig. 6B). When this barrier is overcome, the viroid replicates actively and most of the vd-sRNAs result from DICER-mediated degradation of the genomic RNA, thus accounting for the direct correlation between both RNAs observed in the infected non-inoculated leaves. On the other hand, this direct correlation does not allow us to discriminate which of the two RNA species is the primary effector of the more severe symptoms observed at high temperature. Therefore, although it is possible that some viroid-specific vd-sRNAs might act like endogenous microRNAs targeting host mRNAs for degradation (Papaefthimiou et al., 2001; Wang et al., 2004), the alternative implicating the genomic viroid RNA as the primary pathogenic effector remains open (Flores et al., 2005). Pertinent to this context is the recent finding that the

endogenous tomato miRNA pathway does not seem to be affected by CEVd infection (Martín et al., 2007).

The idea regarding RNA silencing as an important selection pressure shaping the evolution of the secondary structure of viroids has been advanced previously (Wang et al., 2004). In view of our present results indicating that viroids are not only targets of DCL but also of RISC, we propose that these RNAs could have evolved their typical secondary structure as a tradeoff to face degradation by DCL and RISC, which act preferentially against RNAs with compact and relaxed secondary structures, respectively. However, compartmentation in organelle (nuclei or chloroplasts), association with proteins (Daròs and Flores, 2002; Martínez de Alba et al., 2003) or a very active replication, might also help viroids to elude the RNA silencing machinery of their hosts. In a different context, viroid sensitivity to RISC-mediated degradation at least under certain conditions, may also explain the sequence-specific cross-protection observed in viroids of both families (Niblett et al., 1978; De la Peña et al., 1999), which due to their lack of protein-coding ability must be necessarily RNA-based. Because RNA-mediated cross-protection in plant viruses is mechanistically equivalent to PTGS (Ratcliff *et al.* 1999), cross-protection between viroids may be interpreted by assuming that the vd-sRNAs resulting from the pre-inoculated mild strain load and guide RISC against the incoming RNA of the challenging severe strain. Confirmation of this hypothesis would provide an example of viroid sensitivity to RISC-mediated degradation under natural conditions.

MATERIALS AND METHODS

Viroids and hosts

PSTVd, CEVd and CChMVd variants were M16826 (intermediate), S67446 (severe) and AJ878085 (severe), respectively. Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cv. 'Rutgers' and *Nicotiana benthamiana* plants were seedlings. Gynura (*Gynura aurantiaca* DC) and chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelez) cv. 'Bonnie Jean', were propagated vegetatively from cuttings.

Preparation of dsRNAs and vd-sRNAs

Viroid-specific dsRNAs were prepared by annealing *in vitro* less-than-full-length or mutated (non-infectious) ssRNAs of both polarities obtained by *in vitro* transcription of recombinant plasmids. PSTVd and CEVd ssRNAs had a deletion of 6 nt affecting positions 354-359 (PSTVd) and 365-370 or 90-95 (CEVd), and CChMVd ssRNAs a mutation (CUGA to CUUA) in the conserved core of the hammerhead ribozymes of both polarities rendering them catalytically inactive. A 400 bp fragment of the phage lambda DNA was cloned in both orientations in an expression plasmid to obtain by *in vitro* transcription and annealing a non-viroid dsRNA control. Equal amounts of plus and minus ssRNAs were annealed by heating at 95°C for 30 min (PSTVd and CEVd) or 10 min (CChMVd and phage lambda) and slow cooling to 25°C, with annealing being confirmed by the change in electrophoretic mobility in non-denaturing 5% polyacrylamide gels. The vd-sRNAs were obtained by digesting *in vitro* the dsRNAs with RNase III from *E. coli* (Silencer siRNA cocktail kit RNase III, Ambion). Digestions were controlled (0.1 or 1 U RNase III/ μ g dsRNA at 37°C for 1 h) to produce small 21-25 bp duplexes as revealed by non-denaturing PAGE in 15% gels.

Bioassays

RNAs were quantified by comparing the intensity of their electrophoretic bands stained with ethidium bromide with those generated by a preparation of 5S RNA quantified spectrophotometrically. Bioassays were performed under two conditions: in the greenhouse at 20-22°C with a thermal oscillation between 25 and 15°C (standard conditions for PSTVd and CEVd), or in a growth chamber at 30°C for 16 h with fluorescent light and at 25°C for 8 h in darkness (standard conditions for CChMVd, which under greenhouse conditions did not incite symptoms). In each bioassay (repeated at least once) blocks of four identical plants were inoculated mechanically by gentle rubbing two carborundum-dusted young leaves with: i) buffer, ii) viroid RNA, iii) viroid RNA and an excess of homologous dsRNA or vd-sRNAs, and iv) viroid RNA and an excess of heterologous dsRNA or vd-sRNAs. Plants were examined for symptom expression (leaf curling in tomato and gynura, and chlorotic mottling in chrysanthemum), with the exact day of symptom appearance being recorded for each

plant to estimate the infectivity index (total number of infected-plant-days over the bioassay length). Bioassays were concluded when all plants of the block co-inoculated with the heterologous dsRNA or vd-sRNAs showed symptoms.

Nucleic acids were extracted from upper non-inoculated leaves collected at the end of the bioassays, either with a protocol without organic solvents (Dellaporta et al., 1983), complemented with a fractionation with 2 M LiCl to enrich preparations in viroid RNAs, or with a phenol-based protocol (De la Peña et al., 1999). Viroid genomic RNAs were detected by denaturing PAGE in 5% gels containing 1X TBE and 8 M urea, and Northern-blot hybridization at 70°C in the presence of 50% formamide (Daròs et al., 1994) with strand-specific ³²P-labeled riboprobes transcribed *in vitro* that were quantified by their acid-precipitable counts. Viroid-specific vd-sRNAs were detected by denaturing PAGE in 17% gels (acrylamide:bis-acrylamide ratio 19:1) containing 1X TBE and 8 M urea, and Northern-blot hybridization at 35°C with the same riboprobes.

Agroinfiltration

A cDNA fragment corresponding to the upper strand of the PSTVd rod-like secondary structure (positions 1-179) was PCR-amplified from a recombinant plasmid. Two copies of this fragment, separated by the intron-2 of the *PDK* gene of *Flaveria* (Smith et al., 2000), were introduced in a modified version of pUC18 to obtain the direct repeat (drPSTVd) and the hairpin (hpPSTVd) constructs. The DNA fragments corresponding to drPSTVd, hpPSTVd and to a head-to-tail infectious dimeric PSTVd (dPSTVd), were subcloned into a modified version of the pMOG180 vector between a double copy of the 35S CaMV promoter and the Nos-terminator. The expression cassettes were again subcloned into the plant binary expression vector pBIN19sGFP by replacing the sGFP cassette to obtain pBINdrPSTVd, pBINhpPSTVd, pBINdPSTVd, and pBINØ (the empty vector). These plasmids were introduced in *Agrobacterium tumefaciens* strain COR 308 by direct transformation, and the recombinant bacterial lines were grown overnight at 28°C in tubes containing LB medium supplemented with 50 and 5 µg/ml of kanamycin and tetracyclin, respectively. Saturated cultures were diluted and used to inoculate fresh induction media (LB supplemented with 10 mM MES pH 5.6, 20 µM acetosyringone and 10 µg/ml tetracycline) that were then

grown overnight at 28°C. Cells were harvested by centrifugation, resuspended to OD₆₀₀=1 in infiltration medium (LB with 10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5.6 and 150 µM acetosyringone) and incubated at room temperature for 5 h before infiltration (Tenllado and Díaz-Ruiz, 2001). Two or three leaves of young plants, grown in the greenhouse, were infiltrated in the lower side of the lamina with a 1-ml syringe without needle. For co-infiltration experiments, equal volumes of the two bacterial cultures were previously mixed. Nucleic acids from infiltrated and upper non-inoculated leaves were extracted as indicated before.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been partially supported by grants BFU2005-06808/BMC from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), and ACOMP06/141 and ACOMP07/268 from the Generalidad Valenciana (Spain) to R.F. During this work, A.C. received a pre-doctoral fellowship from the MEC, A.E.M a postdoctoral contract from the MEC, and S.G. a postdoctoral fellowship from the Fundación “José y Ana Royo” and an I3P contract from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas. We thank A. Ahuir for excellent technical assistance and Dr. Lynne Yenush for reviewing the English text.

REFERENCES

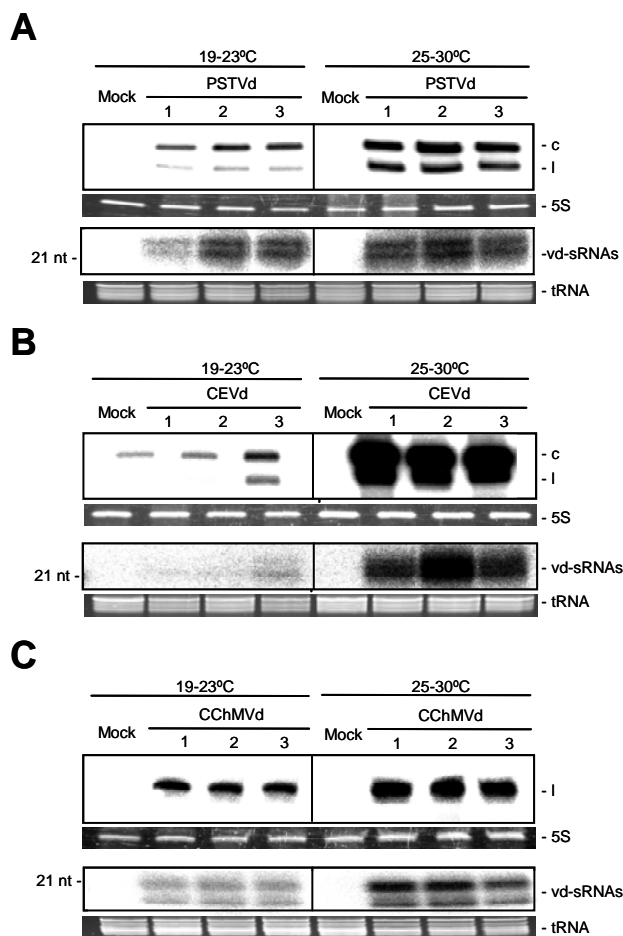
- Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Branch, A.D., Robertson, H.D., 1984. A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* 223, 450-455.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., Baulcombe, D.C., 2000. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101, 543-553.
- Daròs, J.A., Marcos, J.F., Hernández, C., Flores, R., 1994. Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12813-12817.
- Daròs, J.A., Flores, R., 2002. A chloroplast protein binds a viroid RNA *in vivo* and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *EMBO J.* 21, 749-759.
- De la Peña, M., Navarro, B., Flores, R., 1999. Mapping the molecular determinat of pathogenicity in a hammerhead viroid: a tetraloop within the *in vivo* branched RNA conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9960-9965.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1, 19-21.
- Diener, T.O., 1972. Potato spindle tuber viroid VIII. Correlation of infectivity with a UV-absorbing component and thermal denaturation properties of the RNA. *Virology* 50, 606-609.
- Diener, T.O., 2003. Discovering viroids--a personal perspective. *Nature Rev. Microbiol.* 1, 75-80.
- Ding, S.W., Li, H., Lu, R., Li, F., Li, W.X., 2004. RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res.* 102, 109-115.
- Ding, B., Itaya, A., 2007. Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 7-20.
- Dunoyer, P., Voinnet, O., 2005. The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 415-423.
- Feldstein, P.A., Hu, Y., Owens, R.A., 1998. Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6560-6565.
- Flores, R., Daròs, J.A., Hernández, C., 2000. The *Avsunviroidae* family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Adv. Virus. Res.* 55, 271-323.
- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A.E., Daròs, J.A., Di Serio, F., 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 117-139.
- Gómez, G., Pallás, V., 2007. Mature monomeric forms of hop stunt viroid resist RNA silencing in transgenic plants. *Plant J.* 51, 1041-1049.

- Grimm, D., Streetz, K.L., Jopling, C.L., Storm, T.A., Pandey, K., Davis, C.R., Marion, P., Salazar, F., Kay, M.A., 2006. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, 441, 537-541.
- Gross, H.J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H., Sänger, H.L., 1978. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* 273, 203-208.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C., 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Hutchins, C., Rathjen, P.D., Forster, A.C., Symons, R.H., 1986. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res.* 14, 3627-3640.
- Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R.S., Ding, B., 2001. Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 1332-1334.
- Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., Harris, A.R., Molina, C., Nelson, R.S., Ding, B., 2007. A structured viroid RNA is substrate for Dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RISC-mediated degradation. *J. Virol.* 81, 2980-2994.
- Kalantidis, K., Psaradakis, S., Tabler, M., Tsagris, M., 2002. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8, 826-833.
- Markarian, N., Li, H.W., Ding, S.W., Semancik, J.S., 2004. RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Arch. Virol.* 149, 397-406.
- Marín, R., Arenas, C., Daros, J.A., Covarrubias, A., Reyes, J.L., and Chua, N.H., 2007. Characterization of small RNAs derived from citrus exocortis viroid (CEVd) in infected tomato plants. *Virology* 367, 135-146.
- Martínez de Alba, A.E., Flores, R., Hernández, C., 2002. Two chloroplastic viroids induce the accumulation of the small RNAs associated with post-transcriptional gene silencing. *J. Virol.* 76, 3094-3096.
- Martínez de Alba, A.E., Sagesser, R., Tabler, M., Tsagris, M., 2003. A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds potato spindle tuber viroid RNA in vitro and in vivo. *J. Virol.* 77, 9685-9694.
- Matzke, M.A., Birchler, J.A., 2005. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* 6, 24-35.
- 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, 19593-19598.
- Molnar, A., Csorba, T., Lakatos, L., Varallyay, E., Lacomme, C., Burgyan, J., 2005. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol.* 79, 7812-7818.

- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T.A., Vaucheret, H., 2000. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101, 533-542.
- Navarro, B., Flores, R., 1997. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11262-11267.
- Navarro, J.A., Daròs, J.A., Flores, R., 1999. Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: Identification in chloroplasts and characterization. *Virology* 253, 77-85.
- Niblett, C.L., Dickson, E., Fernow, K.H., Horst, R.K., Zaitlin, M., 1978. Cross-protection among four viroids. *Virology* 91, 198-203.
- Nicholson, A.W., 1999. Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev* 23, 371-390.
- Omarov, R.T., Cioperlik, J.J., Sholthof, H.B., (2007). RNAi-associated ssRNA-specific ribonucleases in tombusvirus P19 mutant-infected plants and evidence for a discrete siRNA-containing effector complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1714-1719.
- Pantaleo, V., Szittyá, G., and Burgyán, J., (2007). Molecular bases of viral RNA targeting by viral small interfering RNA-programmed RISC. *J. Virol.* 81, 3797-3806.
- Papaefthimiou, I., Hamilton, A.J., Denti, M.A., Baulcombe, D.C., Tsagris, M., Tabler, M., 2001. Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 29, 2395-2400.
- Ratcliff, F., Harrison, B.D., Baulcombe, D.C., 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276, 1558-1560.
- Ratcliff, F., MacFarlane, S., Baulcombe, D.C., 1999. Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11, 1207-1216.
- Sänger, H.L., Ramm, K., 1975. Radioactive labeling of viroid RNA. In: Markham, R., Davies, D.R., Hopwood, D.A., Horne R.W. (Eds.), *Modifications of the Information Content of Plant Cells*. North Holland, Amsterdam, pp. 229-252.
- Schutz, S., Sarnow, P., 2006. Interaction of viruses with the mammalian RNA interference pathway. *Virology* 344, 151-157.
- Semancik, J.S., Weathers, L.G., 1972. Exocortis disease: evidence for a new species of "infectious" low molecular weight RNA in plants. *Nature New Biol.* 237, 242-244.
- Semancik, J.S., Tsuruda, D., Zaner, L., Geelen, J.L.M.C., Weathers, J.G., 1976. Exocortis disease: subcellular-distribution of pathogenic (viroid) RNA. *Virology* 69, 669-676.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G., Waterhouse P.M., 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407, 319-320.
- Szittyá, G., Molnar, A., Silhavy, D., Hornyik, C., Burgyan, J., 2002. Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell* 14, 359-372.

-
- Szittyá, G., Silhavy, D., Molnar, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Banfalvi, Z., Burgyan, J., 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J.* 22, 633-640.
- Tabler, M., Tsagris, M., 2004. Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci.* 9, 339-348.
- Tenllado, F., Díaz-Ruiz, J.R., 2001. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *J. Virol.* 75, 12288-12297.
- Vogt, U., Pelissier, T., Putz, A., Razvi, F., Fischer, R., Wassenegger, M., 2004. Viroid-induced RNA silencing of GFP-viroid fusion transgenes does not induce extensive spreading of methylation or transitive silencing. *Plant J.* 1, 107-118.
- Wang, M.B., Bian, X.Y., Wu, L.M., Liu, L.X., Smith, N.A., Isenegger, D., Wu, R.M., Masuta, C., Vance, V.B., Watson, J.M., Rezaian, A., Dennis, E.S., Waterhouse, P.M., 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3275-3280.
- Yang, D., Buchholz, F., Huang, Z.D., Goga, A., Chen, C.Y., Brodsky, F.M., Bishop, J.M., 2002. Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 9942-9947.

SUPPLEMENTARY MATERIAL:



Supplementary Fig. 1. Effects of the growing temperature on the accumulation of viroid RNAs. Analysis by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with riboprobes for detecting viroid (+) strands in RNA preparations from two blocks of three tomato plants inoculated with PSTVd (**A**) and CEVd (**B**), and three chrysanthemum plants inoculated with CChMVd (**C**), grown in two growth chambers at the same light intensity and photoperiod but differing in the temperature regime (19°C-23°C and 25°C-30°C). Other details as in the legend to Figure 5.

Discusión

1. Resistencia a viroides: antecedentes

Desde su descubrimiento (Diener, 1971a), los viroides han sido profusamente estudiados por el atractivo que despierta su simplicidad genómica y estructural. Además, su versatilidad funcional y su accesibilidad experimental hacen del sistema viroide-huésped un excelente modelo para el estudio de los principios básicos que rigen en la replicación, transporte y acumulación de un RNA infeccioso mínimo (Ding e Itaya, 2007). Por otro lado, los viroides también han recibido atención por los daños económicos que causan, y algunas investigaciones han ido encaminadas a desarrollar estrategias de control frente a los mismos. Debido al éxito limitado de las metodologías convencionales, el interés se ha centrado en aplicar herramientas de biología molecular que previamente han resultado útiles para el control de enfermedades virales. Los primeros estudios con plantas transgénicas expresando RNAs antisentido (algunos de ellos incluyendo una ribozima de cabeza de martillo) no tuvieron el éxito esperado pues la resistencia obtenida fue superada por el viroide poco tiempo después de su inoculación (Matusek *et al.*, 1994; Atkins *et al.*, 1995). Sin embargo, en una estrategia similar basada en la obtención de plantas de patata expresando una ribozima de cabeza de martillo contra los RNAs de polaridad negativa del PSTVd, se observó una notable resistencia en algunas de las líneas transgénicas. Este efecto no se detectó en plantas de tomate expresando la misma construcción, probablemente debido a que la mayor tasa de replicación viroidal en este huésped sobrepasa la resistencia aportada por la ribozima (Yang *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha obtenido cierta resistencia al PSTVd y CSVd en plantas de patata y crisantemo, respectivamente, expresando una RNAsa de *Schizosaccharomyces pombe* específica de dsRNAs (Sano *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 2002). Por último, y a diferencia de los virus, no se ha determinado si la tecnología basada en dsRNAs interferentes (RNAi) puede conferir resistencia a los viroides.

La resistencia parcial obtenida en algunos de estos trabajos sugiere que el control de los viroides no es sencillo, y que se ve dificultado por algunas de las propiedades de estos patógenos como su alto contenido en estructura secundaria, su elevada tasa de replicación en determinados huéspedes, su asociación con proteínas del huésped que los protegerían o su localización en orgánulos como el nucleolo o el cloroplasto.

2. Las ribozimas de cabeza de martillo de polaridad (+) del ELVd: estudios previos en *cis*.

El estudio de las ribozimas de cabeza de martillo en su contexto natural (*cis* y a baja concentración de Mg^{2+}) no ha recibido mucha atención a pesar de sus implicaciones para entender mejor el mecanismo catalítico y la diversidad biológica de esta clase de ribozimas, así como para diseñar ribozimas artificiales que actúen en *trans* en condiciones fisiológicas. Sin embargo, el reciente descubrimiento de los TSMs claves para la catálisis en las ribozimas de cabeza de martillo naturales (Khvorova *et al.*, 2003; De la Peña *et al.*, 2003) ha impulsado el estudio de las mismas para entender mejor el papel de dichos motivos en el mecanismo catalítico (Martick y Scott, 2006), y para desarrollar nuevas ribozimas más eficientes *in vivo* (Saksmerprome *et al.*, 2004; Burke y Greathouse, 2005; Weinberg y Rossi, 2005).

2.1. Características especiales de las ribozimas de polaridad (+) del ELVd

Las ribozimas descritas recientemente en las cadenas de ambas polaridades del ELVd (Fadda *et al.*, 2003a) son particularmente interesantes para adaptarlas al formato *trans* discontinuo ya que presentan la hélice I más larga de las ribozimas viroidales, propiedad ésta que facilitaría la unión con el sustrato y la formación del bucle periférico 1. En particular, la de polaridad (+) es más estable pues cinco de los siete pares de bases de su hélice I son C-G mientras que sólo existen dos pares de esta clase en la de polaridad (-). Por otro lado, el triplete que precede el sitio de autocorte en la ribozima de polaridad (+) es AUA (sólo presente en otras dos ribozimas naturales) y no GUC (que es el que se encuentra en la mayoría de ellas) y que junto a AUC es el catalíticamente más activo *in vitro* en ribozimas mínimas con formato *trans* (Ruffner *et al.*, 1990; Nakamaye y Eckstein, 1994; Shimayama *et al.*, 1995; Zoumadakis y Tabler, 1995). En el presente trabajo hemos examinado el comportamiento autocatalítico de la ribozima de polaridad (+) del ELVd y los efectos producidos al substituir el trinucleótido AUA que precede el sitio de autocorte por otros distintos (AUC, GUA y GUC) con objeto de conocer por qué ha sido seleccionado el trinucleótido AUA en la ribozima de polaridad (+) del ELVd así como identificar la variante catalíticamente más activa para adaptarla posteriormente al formato *trans*.

2.2. Las ribozimas de polaridad (+) del ELVd con trinucleótidos GUC y AUC precediendo al sitio de autocorte son las catalíticamente más activas en condiciones postranscripcionales

El efecto del trinucleótido que precede el sitio de autocorte sobre la constante catalítica se ha estudiado previamente en varias ribozimas artificiales actuando en *trans* a alta concentración de Mg^{2+} . A pesar de algunas discrepancias que reflejan probablemente características específicas de cada ribozima, las constantes catalíticas más altas se han observado cuando los trinucleótidos que preceden al sitio de autocorte son GUC y AUC, mientras que cuando son GUA y AUA dichas constantes son significativamente más bajas (Ruffner *et al.*, 1990; Nakamaye y Eckstein, 1994; Shimayama *et al.*, 1995; Zoumadakis y Tabler, 1995).

En el presente trabajo hemos comprobado que al substituir el trinucleótido AUA de la ribozima de polaridad (+) del ELVd por GUC, AUC y GUA, los valores de las constantes catalíticas de cada variante determinadas mediante cinéticas de autocorte *in vitro* con las ribozimas purificadas y en ausencia de proteínas siguen el orden: ELVd(+)-AUC \approx ELVd(+)-GUC $>$ ELVd(+)-GUA $>$ ELVd(+)-AUA. Estos resultados confirman que los efectos provocados por el cambio del trinucleótido que precede el sitio de autocorte siguen el mismo patrón que el observado previamente en ribozimas artificiales en *trans* a altas concentraciones de Mg^{2+} (Ruffner *et al.*, 1990; Nakamaye y Eckstein, 1994; Shimayama *et al.*, 1995; Zoumadakis y Tabler, 1995). Además, análisis cinéticos adicionales realizados también en *cis* pero a baja concentración de Mg^{2+} muestran que la variante ELVd(+)-GUC presenta la constante catalítica y la fracción de corte más altas al compararla con otras tres ribozimas naturales en las que el trinucleótido que precede el sitio de autocorte es también GUC: las de dos viroides [CChMVd(+) y PLMVd(+)] y la de un RNA satélite [sTRSV(+)]. Este resultado puede explicarse por la alta estabilidad termodinámica de las hélices de la ribozima ELVd(+)-GUC, que facilitaría las interacciones terciarias entre los bucles periféricos. Por lo tanto, la variante ELVd(+)-GUC, así como la ELVd(+)-AUC, podrían servir como base para diseñar nuevas ribozimas con formato *trans* que mantuvieran las interacciones terciarias aumentando así su eficiencia de corte.

2.3. El autocorte *in vivo* de las ribozimas de polaridad (+) del ELVd debe ocurrir durante la síntesis del RNA viroidal

Los resultados anteriores ponen de manifiesto que, en el contexto de la replicación del ELVd, los dos trinucleótidos que preceden el sitio de autocorte [AUA en la de polaridad (+) y GUC en la de polaridad (-)] deben haber sido seleccionados diferencialmente por la necesidad de distintas tasas de autocorte durante su transcripción. Además, el mecanismo de replicación de los viroides conlleva la consiguiente ligación de los RNAs autocortados. En el ELVd, al igual que en el resto de los miembros de la familia *Awsunviroidae*, todavía no está claro si dicha ligación ocurre mediante una reacción catalizada por una enzima, o por autoligación dando lugar a un enlace 2',5'-fosfodiéster (discutido en Flores *et al.*, 2005). Como las estructuras favorables al autocorte y a la ligación podrían no ser las mismas, el trinucleótido que precede al sitio de autocorte podría tener un papel adicional en la ligación. También es posible que la alta velocidad y extensión de la ligación observadas en la ribozima natural de *S. mansoni* que mantiene la interacción entre sus bucles 1 y 2 sean relevantes en condiciones fisiológicas (Nelson *et al.*, 2005), es decir que las ribozimas de cabeza de martillo naturales también catalicen la ligación, y que el trinucleótido que precede el sitio de corte/ligación pudiera tener cierta influencia en esta reacción. Además, en un contexto natural, dicho trinucleótido podría tener otros papeles funcionales adicionales a los de corte y ligación, como se ha observado para otros nucleótidos del centro catalítico en la ribozima de polaridad (+) del CChMVd (De la Peña y Flores, 2001).

Los argumentos anteriores explicarían por qué algunos trinucleótidos subóptimos para la catálisis han sido seleccionados en condiciones naturales, pero no por qué el trinucleótido AUC, a pesar de ser el catalíticamente óptimo (junto al GUC) en condiciones postranscripcionales, no se encuentra en las ribozimas de cabeza de martillo naturales (salvo en un caso). Como el plegamiento del RNA ocurre durante la transcripción (Mahen *et al.*, 2005), es posible que algunos de los trinucleótidos que preceden el sitio de autocorte pudieran promover la adopción transitoria de estructuras metaestables catalíticamente inactivas. En tal caso, el efecto de dichas estructuras sobre el autocorte debería de observarse en estadios tempranos de la transcripción, y atenuarse durante su transcurso cuando se formaran las estructuras

catalíticamente activas más estables. En efecto, la constante de autocorte de la ribozima ELVd(+)-AUC medida a los 15 segundos de iniciarse su transcripción fue significativamente más baja que la de las otras tres variantes (22% frente a 36-67%), mientras que a los 10 minutos las diferencias se atenuaron (78% frente a 89-91%). Los valores de las constantes catalíticas obtenidos para las cuatro variantes durante su transcripción *in vitro* (2 mM Mg⁺² y pH 8) siguieron el orden ELVd(+)-GUA>ELVd(+)-AUA>ELVd(+)-GUC>ELVd(+)-AUC, indicando que la secuencia del trinucleótido afecta de forma distinta a dichas constantes durante la transcripción o en condiciones postranscripcionales.

El análisis *in silico* mediante el programa Kinefold (Xayaphoummine *et al.*, 2005) permitió visualizar el plegamiento de las estructuras de las ribozimas ELVd(+)-AUC, ELVd(+)-GUC, ELVd(+)-GUA y ELVd(+)-AUA a medida que se sintetizan. Dicho análisis muestra que algunos de los trinucleótidos que preceden el sitio de autocorte pueden aparear con el motivo CUGAU de la ribozima durante su síntesis. Además las interacciones observadas tienen distinta estabilidad, siendo las más estables las formadas por el trinucleótido AUC, lo que provocaría un retraso en el autocorte. Este modelo permite también explicar por qué cuando el primer nucleótido es A en las ribozimas de cabeza de martillo naturales, el tercero también es A (G estaría excluida porque aparea con el nucleótido C3 impidiendo su función en el centro catalítico, y U también estaría excluida porque no puede formar la compleja trama de interacciones no canónicas necesaria para la catálisis) (Blount y Uhlenbeck, 2005; Martick y Scott, 2006). Una vez completada la transcripción de la ribozima, la trampa cinética se desharía al formarse interacciones alternativas y la ribozima podría adoptar el plegamiento catalíticamente activo. La formación de la trampa cinética podría estar facilitada en ciertas ribozimas de cabeza de martillo naturales, como la de polaridad (+) del ELVd, por una hélice I larga y estable. En este contexto es interesante resaltar que en la naturaleza sólo se ha encontrado un trinucleótido AUC precediendo el sitio de autocorte de una variante de la ribozima de cabeza de martillo de *Schistosoma douthitti*, mientras que el trinucleótido GUC está presente en las ribozimas de todas las demás especies del género *Schistosoma*. Dada la particular morfología de esta última ribozima, la hélice I no puede contribuir a la adopción de la estructura metaestable

catalíticamente inactiva porque una de sus cadenas se transcribe después de que lo hagan las otras secuencias que forman la ribozima.

En resumen, nuestros resultados sostienen que el autocorte de una ribozima de cabeza de martillo natural en condiciones co- y postranscripcionales puede ser distinto (particularmente *in vivo*), y que algunas ribozimas de cabeza de martillo naturales podrían haber sido seleccionadas evolutivamente para actuar durante la transcripción de los RNAs viroidales. Por lo tanto, un estudio más profundo de las ribozimas de cabeza de martillo (y por extensión de otras ribozimas) en su contexto natural requiere de análisis cinéticos cotranscripcionales además de los habituales. Este modelo obtenido para las ribozimas de polaridad (+) del ELVd podría ser válido para otros miembros de la familia *Avsunviroidae*, y explicaría la localización de los puntos de inicio de transcripción previamente determinados para las cadenas del ASBVd y del PLMVd (Navarro y Flores, 2000; Delgado *et al.*, 2005), que no favorecen que los RNAs nacientes adopten estructuras metaestables catalíticamente inactivas. Por último, un trabajo publicado recientemente muestra que la ribozima de polaridad (+) del RNA del virus de la hepatitis delta humana (*Hepatitis delta virus*, HDV) es la catalíticamente óptima en condiciones cotranscripcionales (Chadalavada *et al.*, 2007) mientras que otras variantes son más activas postranscripcionalmente. Este resultado sugiere que, además de las ribozimas de cabeza de martillo, otras ribozimas naturales que no pertenecen a esta clase podrían también haber sido seleccionadas evolutivamente para actuar durante la transcripción.

3. Resistencia al PSTVd inducida por ribozimas de cabeza de martillo con motivos de estabilización terciaria

Las ribozimas de cabeza de martillo han sido empleadas previamente con cierto éxito para el control del PSTVd. La estrategia utilizada consistió en obtener plantas transgénicas de patata expresando una ribozima de cabeza de martillo mínima dirigida contra los RNAs de polaridad negativa o positiva del PSTVd (Yang *et al.*, 1997). Tras inocular dichas plantas con el viroide, únicamente algunas de las líneas transgénicas que expresaban la ribozima frente a los RNAs de polaridad negativa fueron resistentes, probablemente a causa de la menor acumulación de dichos RNAs. El efecto pudo

atribuirse al dominio catalítico ya que las líneas control en las que este dominio fue inactivado no mostraron resistencia. Sin embargo, la protección observada en plantas transgénicas de tomate expresando la misma construcción fue muy limitada, probablemente debido a que la alta tasa de replicación viroidal en tomate sobrepasaría la resistencia aportada por la ribozima. Una importante limitación de la estrategia empleada es la utilización de ribozimas de cabeza de martillo mínimas que, si bien son eficientes *in vitro* a concentraciones de 5-10 mM de Mg^{+2} , deben actuar *in vivo* a una concentración de este catión muy inferior (en torno a 0.1-0.5 mM) (Darnell *et al.*, 1986), por lo que su eficiencia en estas últimas condiciones debe reducirse considerablemente.

En el presente trabajo hemos pretendido mejorar la resistencia obtenida previamente frente a los RNAs de polaridad (-) del PSTVd (Yang *et al.*, 1997) mediante el empleo de ribozimas de cabeza de martillo que incorporan los TSMs recientemente descubiertos en las ribozimas naturales (De la Peña *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003). Dichos motivos han sido incluidos en una nueva generación de ribozimas con formato *trans* más activas a bajas concentraciones de Mg^{+2} , siendo las más eficientes las de formato discontinuo y extendido derivadas de las de polaridad (+) del sTRSV y (-) del PLMVd, respectivamente, (Saksmerprome *et al.*, 2004; Burke y Greathouse, 2005; Weinberg y Rossi, 2005).

Con este fin hemos diseñado varias ribozimas con ambos formatos que catalizan específicamente el corte de los RNAs de polaridad (-) del PSTVd. Dichas ribozimas han sido evaluadas primero *in vitro* frente a un transcrito monomérico de polaridad (-) de dicho viroide, para posteriormente ensayar la ribozima más eficiente *in vivo* frente a un sustrato similar y frente a un RNA infeccioso del PSTVd.

3.1. Ribozimas con distinto formato *trans* son activas *in vitro* a baja concentración de Mg^{2+} frente a un RNA del PSTVd de polaridad (-) altamente estructurado

Estudios previos *in vitro* han mostrado que las ribozimas de cabeza de martillo discontinuas y extendidas derivadas de las de polaridad (+) del sTRSV y (-) del PLMVd, respectivamente, son las más eficientes *in vitro* a concentraciones bajas de Mg^{2+} (Saksmerprome *et al.*, 2004; Burke y Greathouse, 2005; Weinberg y Rossi, 2005). Sin embargo, en dichas condiciones, la mayoría de estas ribozimas sólo se han

evaluado frente a RNAs cortos que hibridan en su totalidad con los brazos de las mismas o que se unen parcialmente dejando unos pocos nucleótidos desapareados (Saksmerprome *et al.*, 2004; Burke y Greathouse, 2005; Weinberg y Rossi, 2005), mientras que sólo ribozimas extendidas derivadas del PLMVd han sido también evaluadas frente a un RNA sustrato más largo (un fragmento de 258 nt del HIV) (Saksmerprome *et al.*, 2004).

La actividad de las ribozimas diseñadas en el presente trabajo se evaluó *in vitro* en condiciones de 10, 1 y 0.1 mM Mg²⁺ (pH 7.5, 25°C), siendo el sustrato un RNA de 464 nt altamente estructurado obtenido por transcripción *in vitro* del correspondiente clon de cDNA. En el transcrito resultante la secuencia completa de polaridad (-) del PSTVd (359 nt) se encuentra flanqueada en sus extremos 5' y 3' por 88 y 17 nt del vector, respectivamente.

La mayoría de las ribozimas discontinuas derivadas del ELVd fueron más activas que la del sTRSV, salvo la variante HHd-ELVd UA/GUGU que probablemente no adquiere la conformación catalíticamente activa. En los demás casos, el aumento en la actividad de las ribozimas derivadas del ELVd con respecto a las del sTRSV se debe presumiblemente a que su hélice Ib más larga (un par U-A adicional) mejora la unión con el sustrato. Además, la estabilización de dicha hélice mediante la substitución del par U-A adyacente al bucle 1 por otro C-G más estable induce en la ribozima resultante, HHd-ELVd-CG/GUGU, una mayor actividad. Este resultado sugiere que la estabilidad de la hélice Ib es crítica para preservar las interacciones terciarias originales, como se ha propuesto previamente para explicar la falta de actividad de las ribozimas discontinuas derivadas del PLMVd (con un hélice Ib de tan sólo dos pares de bases) a bajas concentraciones de Mg²⁺ (Burke y Greathouse, 2005). Por otra parte, las interacciones terciarias naturales de las ribozimas discontinuas derivadas del ELVd y del sTRSV podrían verse afectadas debido a la interacción de los nucleótidos del bucle 1 con otros desapareados del sustrato. Esta alteración de los TSMs explicaría la poca actividad de dichas ribozimas a baja concentración de Mg²⁺. Sin embargo, las variantes HHd ELVd UA-UACG y HHd ELVd CG-AAAA, con secuencias del bucle 1 no naturales (y que no interactúan con el sustrato según predicciones bioinformáticas) muestran cierta actividad a 0.1 mM Mg²⁺. Este resultado sugiere que interacciones

terciarias alternativas entre los nucleótidos de un bucle 1 artificial y de un bucle 2 natural de una ribozima de cabeza de martillo con formato *trans* permiten su actividad catalítica a bajas concentraciones de Mg^{2+} . Una situación similar se ha observado con una ribozima discontinua derivada de la del sTRSV con un bucle 1 artificial UUCG (Burke y Greathouse, 2005). En este contexto, estudios previos han mostrado que secuencias ligeramente distintas de las naturales en los TSMs (Khvorova *et al.*, 2003; Saksmerprome *et al.*, 2004) o en el triplete que precede el sitio de autocorte (ver capítulo 1) aumentan la actividad de ribozimas de cabeza de martillo naturales o de sus derivadas con formato *trans* a bajas concentraciones de Mg^{2+} . Una posible explicación es que las secuencias de las ribozimas de cabeza de martillo naturales pueden haber sido seleccionadas no sólo para ser más eficientes en el corte sino también en otros procesos (De la Peña y Flores, 2001).

Respecto a las ribozimas de cabeza de martillo extendidas, las variantes derivadas del PLMVd fueron las más eficientes, especialmente a bajas concentraciones de Mg^{2+} , probablemente porque las interacciones terciarias entre los bucle 1 y 2 de dichas variantes extendidas están cerca del óptimo para la catálisis (Weinberg y Rossi, 2005). Esta idea está sustentada por otros estudios de selección *in vitro* a bajas concentraciones de Mg^{2+} , en los que la variante del PLMVd seleccionada por su mayor actividad catalítica presenta dos cambios en su bucle 2 (dos Gs en vez de dos As) con respecto a la secuencia natural (Saksmerprome *et al.*, 2004). Sin embargo, en nuestro estudio la variante HHe-PLMVd que incluye los TSMs naturales fue más eficiente en el corte de los RNAs de polaridad (-) del PSTVd a concentraciones bajas de Mg^{2+} (0.1 y 0.05 mM) que la variante HHe-PLMVd-L2 GG. La alta actividad de las variantes extendidas del PLMVd podría deberse a que el posicionamiento del bucle 1 como un bucle interno en la hélice I no afectaría significativamente las interacciones terciarias entre dicho bucle y el bucle 2, muy probablemente a causa de que un bucle 1 de tres nucleótidos permite menos interacciones alternativas que otro mayor (como el tetrabucle de la ribozima HHe-ELVd). Un argumento similar explicaría la baja actividad catalítica de ciertas ribozimas extendidas derivadas del sTRSV y del CChMVd con un bucle 1 de siete nucleótidos (Weinberg y Rossi, 2005).

3.2. La ribozima extendida derivada del PLMVd es activa *in vivo* y retrasa la infección del PSTVd

Debido a su alta actividad *in vitro* a concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} , quisimos examinar si la variante HHe-PLMVd también actuaba *in vivo* sobre los RNAs de polaridad (-) del PSTVd. La metodología consistió en coagroinfiltrar *N. benthamiana* con las construcciones expresando dicha ribozima y el monómero de polaridad (-) del PSTVd. Como controles se incluyeron la variante inactivada HHe-PLMVd-(G5→U) (en la que la secuencia CUGA del centro catalítico se mutó a CUUA) y la ribozima mínima HHe-sTRSV- Δ L1 (en la que se eliminó el bucle 1). Experimentos de hibridación Northern revelaron una disminución notable de la acumulación del sustrato únicamente en las plantas que expresaban la variante HHe-PLMVd. Estos resultados sugieren que dicha disminución es debida al corte mediado por la ribozima, y que los TSMs desempeñan un papel crucial al respecto.

Posteriormente se determinó si la variante HHe-PLMVd interfería con la infección causada por el PSTVd. La construcción correspondiente a dicha ribozima se coagroinfiltró con otra expresando un RNA infeccioso dimérico de polaridad (-) del PSTVd. Los controles del experimento fueron la variante inactivada HHe-PLMVd-(G5→U) y la construcción vacía (\emptyset). En dos bioensayos independientes, hibridaciones Northern con preparaciones de RNA de hojas apicales no infiltradas mostraron que la acumulación de las formas genómicas del PSTVd fue notablemente inferior en las plantas que expresaban la variante HHe-PLMVd que en las que expresaban la variante inactivada o la construcción \emptyset . Estos resultados sugieren que la ribozima HHe-PLMVd podría actuar tanto frente al transcrito dimérico del PSTVd como frente a los intermediarios oligoméricos de polaridad (-) resultantes de la replicación de dicho viroide, y que la resistencia parcial previamente obtenida con una ribozima mínima similar a la variante HHe-sTRSV- Δ L1 (Yang *et al.*, 1997), podría ser mejorada mediante la expresión estable de la ribozima HHe-PLMVd en plantas transgénicas de patata.

En resumen, hemos comprobado que una ribozima de cabeza de martillo con TSMs naturales es activa *in vivo* frente a un RNA largo y estructurado, siendo incluso capaz de interferir con la infección causada por el PSTVd. Por lo tanto, esta nueva generación de ribozimas de cabeza de martillo con TSMs constituye una potencial herramienta

biotecnológica para el control de enfermedades virales o viroidales y para la regulación intracelular de RNAs en estudios genómicos o de terapia génica. Conviene resaltar por último que la coexpresión transitoria por agroinfiltración en *N. benthamiana* de construcciones expresando una ribozima y su sustrato es una metodología rápida para evaluar el potencial *in vivo* de dicha ribozima.

4. Resistencia a viroides mediante RNAs interferentes

La segunda metodología empleada en el presente trabajo para interferir con las infecciones viroidales ha sido la del RNAi, previamente utilizada con éxito en el control de ciertos virus vegetales pero todavía sin evaluar en los viroides. La esencia de esta técnica radica en aportar a la planta dsRNAs viroidales que induzcan la respuesta de la misma conocida como silenciamiento génico mediado por RNA, que actúa como barrera defensiva específica frente a ulteriores infecciones por estos patógenos.

4.1. ds- e ihpRNAs específicos retrasan o bloquean las infecciones causadas por ciertos viroides

Nuestros resultados indican que, al igual que ocurre con ciertos virus de plantas (Tenllado y Díaz-Ruiz, 2001), dsRNAs viroidales coinoculados mecánicamente o expresados transitoriamente como ihpRNAs (RNAs con plegamiento en horquilla derivados de una construcción con secuencias viroidales invertidas separadas por un intrón) interfieren específicamente con la infección de viroides.

En primer lugar, la coinoculación mecánica de RNAs viroidales genómicos con un exceso de dsRNAs homólogos sintetizados *in vitro* induce una reducción significativa de la infectividad en plantas de gynura, tomate y crisantemo inoculadas con el CEVd, con el CEVd y el PSTVd, y con el CChMVd, respectivamente. Los efectos son específicos de secuencia (la coinoculación con dosis similares de dsRNAs heterólogos no induce protección), y dependientes de la estructura secundaria del RNA (no se observa protección cuando se coinoculan las plantas con ssRNAs homólogos) y, al menos en el sistema CChMVd-crisantemo, de la dosis de dsRNAs (porque al disminuir la cantidad de dsRNAs coinoculados la respuesta inducida es más débil). La interpretación más directa de estos resultados es que los dsRNAs coinoculados son

procesados por una o más DCLs a vd-sRNAs, que son luego incorporados al complejo RISC y lo dirigen contra las formas genómicas viroidales durante su movimiento en el citoplasma para infectar células adyacentes. La hipótesis alternativa, que RISC dirige la degradación de los intermediarios de replicación viroidales, parece menos probable por su naturaleza de dsRNA y a que los vd-sRNAs deberían dirigirse al núcleo o al cloroplasto en donde ocurre la replicación. Por último, la necesidad de aplicar grandes dosis de dsRNAs sugiere que su entrada en las células es ineficiente, al igual que parece ocurrir con los dsRNAs virales (Tenllado y Díaz-Ruiz, 2001).

En segundo lugar, un efecto similar se observa en los sistemas CEVd-gynura y CEVd-tomate al coinocular el viroide con un exceso de vd-sRNAs homólogos generados *in vitro* mediante digestión de los dsRNAs por una RNAsa III bacteriana. Sin embargo, este efecto no se observa con los sistemas PSTVd-tomate y CChMVd-crisantemo. Al menos en el caso del PSTVd este resultado podría explicarse por su alta acumulación en tomate, que sobrepasaría el efecto protector aportado por los vd-sRNAs homólogos, aunque no puede descartarse que sólo una pequeña fracción de los vd-sRNAs generados *in vitro* sea funcional *in vivo*.

Y en tercer lugar, ihpRNAs viroidales producidos en plantas de *N. benthamiana* al expresar transitoriamente una construcción con secuencias del PSTVd invertidas (hpPSTVd) separadas por un intrón también interfieren la infección viroidal. En particular, la coagroinfiltración de plásmidos recombinantes correspondientes a las construcciones hpPSTVd y dPSTVd(+), que expresa un RNA dimérico infeccioso de polaridad (+) del PSTVd) retrasa la acumulación de dicho viroide en las hojas infiltradas y en las superiores no infiltradas. Este efecto, que es dependiente de la formación *in vivo* del ihpRNA puesto que no se observa al coagroinfiltrar con una construcción similar pero con repeticiones directas (drPSTVd) o con otra que no contiene inserto (\emptyset), es transitorio y progresivamente superado por el viroide. La interferencia obtenida, al igual que en el caso de las coinoculaciones mecánicas, se debe probablemente a la degradación específica del RNA viroidal por el complejo RISC. Alternativamente, como los RNAs derivados de las construcciones hpPSTVd y dPSTVd(+) son producidos en el núcleo, el efecto inhibitorio podría ser causado por el silenciamiento transcripcional de la construcción dPSTVd(+) (Matzke y Birchler, 2005).

Sin embargo, este mismo mecanismo debería de operar inhibiendo la transcripción de la construcción hpPSTVd y la producción de los vd-sRNAs, lo que no ocurre. En las hojas coagroinoculadas con la construcción hpPSTVd se observa una relación inversa entre la acumulación de los RNAs viroidales genómicos y la de los vd-sRNAs. Esta situación difiere de la que se presenta en las hojas coinfiltradas con el plásmido vacío o la construcción drPSTVd en las que, al igual que en una infección natural por el PSTVd, existe una correlación directa entre la acumulación de ambos RNAs. Por lo tanto, en las hojas coinfiltradas con la construcción hpPSTVd la mayor cantidad de vd-sRNAs debe provenir mayoritariamente de la construcción hpPSTVd, y la disminución de las formas genómicas viroidales de su degradación por RISC. Además, los vd-sRNAs generados en las hojas infiltradas inmunizarían temporalmente a la planta hasta que la infección viroidal logra superar este efecto protector.

En resumen, una construcción hpPSTVd coexpresada transitoriamente interfiere la infección por el PSTVd, y es posible que bloquee dicha infección si se expresa de forma estable en plantas transgénicas. Así pues, la coexpresión en *N. benthamiana* de construcciones que expresean ihpRNAs y de RNAs con secuencias viroidales es una metodología rápida y directa para evaluar el potencial efecto de silenciamiento de construcciones de esta clase antes de abordar la obtención de plantas transgénicas que requiere un considerable periodo de tiempo. Además del PSTVd, otros viroides de interés económico como el CEVd y el HSVd infectan *N. benthamiana* por lo que esta metodología puede ser aplicada para evaluar la eficiencia de construcciones de tipo horquilla frente a dichos viroides.

4.2. Los RNAs viroidales son sustratos de RISC en ciertas condiciones

La detección *in vivo* de vd-sRNAs con las características típicas de los siRNAs en distintas combinaciones viroide-huésped (Itaya *et al.*, 2001; Papaefthimiou *et al.*, 2001; Martínez de Alba *et al.*, 2002; Markarian *et al.*, 2004; Itaya *et al.*, 2007; Machida *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2007) sugiere que los viroides, al igual que los virus, son inductores y dianas de la maquinaria de silenciamiento génico de sus huéspedes. Estos resultados implican una o más DCLs en la biogénesis de los vd-sRNAs. Dicha actividad enzimática bastaría en principio para controlar el título viroidal si bien, como ocurre

con algunos virus de plantas (Omarov *et al.*, 2007; Pantaleo *et al.*, 2007), los vd-sRNAs generados podrían actuar como auténticos siRNAs guiando a RISC para degradar los correspondientes RNAs genómicos. En dicho caso la regulación del título dependería de la acción conjunta de las DCLs y de RISC. Los siguientes resultados sostienen esta hipótesis: i) la infección con el PSTVd de plantas transgénicas que expresan un gen delator fusionado en 3' a una secuencia parcial de dicho viroide, activa la degradación del transcrito recombinante y la metilación de las secuencias del transgén (Vogt *et al.*, 2004), ii) la fluorescencia generada por una construcción que incluye una secuencia complementaria al RNA del PSTVd fusionada al gen de la proteína verde fluorescente (GFP) se reduce al expresar transitoriamente dicha construcción en plantas de tomate infectadas por este viroide (Itaya *et al.*, 2007), y iii) la expresión en *N. benthamiana* de fragmentos no infecciosos parciales o completos del HSVd fusionados a la región codificante de la GFP también es suprimida en plantas transgénicas que expresan dímeros del HSVd (Gómez y Pallás, 2007). Sin embargo, otros datos experimentales no sustentan esta hipótesis: i) secuencias no replicativas del PSTVd fusionadas a un gen delator y expresadas transgénicamente son resistentes a siRNAs derivados de una construcción con secuencias invertidas de dicho viroide expresada sobre el fondo de las plantas anteriores (Wang *et al.*, 2004), ii) la replicación del PSTVd en protoplastos no se ve afectada cuando el RNA viroidal se cotransfecta con dsRNAs o sRNAs homólogos (Itaya *et al.*, 2007), si bien las dosis empleadas de estos últimos fueron bajas, y iii), las formas genómicas del HSVd resultantes del procesamiento de transcritos diméricos de dicho viroide generados transgénicamente en *N. benthamiana* son resistentes al silenciamiento génico inducido al expresar transitoriamente en dichas plantas fragmentos no infecciosos del HSVd fusionados a un gen delator (Gómez y Pallás, 2007), aunque no se ha examinado si el viroide se replica en esta planta.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que los viroides son sustratos de RISC, al menos en ciertas condiciones. En primer lugar, los experimentos de titulación de los inóculos determinaron para cada combinación viroide-huésped la cantidad mínima de RNA viroidal que induce la aparición consistente de síntomas en todas las plantas. En segundo lugar, el efecto protector es dependiente de la dosis de dsRNAs interferentes, siendo necesario un exceso de éstos para obtener una respuesta

efectiva. Y en tercer lugar, la interferencia inducida depende de la temperatura de crecimiento de las plantas, al menos con el PSTVd y el CEVd, pues ésta se observó únicamente en los bioensayos realizados a menor temperatura (20-22°C) y se perdió cuando este factor se incrementó (25-30°C). El aumento en la acumulación de ambos viroides en los experimentos a mayor temperatura en los que se inoculó únicamente el viroide explicaría la ineficacia de los dsRNAs en contener la infección.

En resumen, a pesar de que el papel de RISC en la regulación del título viroidal ha sido cuestionado (Itaya *et al.*, 2007; Gómez y Pallás, 2007), nuestros datos sugieren que, al menos en ciertas condiciones, los viroides son sustratos de RISC. Las diferencias entre los diversos sistemas *in planta* empleados en el presente trabajo y en otros anteriores (Vogt *et al.*, 2004; Gómez y Pallás, 2007; Itaya *et al.*, 2007) y entre éstos y el sistema de protoplastos (Itaya *et al.*, 2007), podrían explicar los distintos resultados respecto a la resistencia/sensibilidad de los viroides a su degradación por RISC. En particular, el exceso de dsRNAs empleado en nuestro estudio es considerablemente mayor que el del estudio con protoplastos, y las construcciones empleadas en los experimentos de agroinfiltración son también diferentes. Nuestros resultados además indican que el PSTVd es el más resistente a la interferencia mediada por dsRNAs y vd-sRNAs homólogos.

Por otro lado, la correlación directa entre los niveles de acumulación de los vd-sRNAs y de las formas genómicas viroidales en plantas inoculadas únicamente con el viroide no permite discriminar cuál de las dos clases de RNAs es el efector primario de los síntomas más intensos observados en las condiciones de mayor temperatura. A pesar de que se ha sugerido que los vd-sRNAs pueden actuar como auténticos microRNAs dirigiendo la degradación de ciertos mRNAs del huésped (Papaefthimiou *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004), la alternativa de que las formas genómicas sean los efectores patogénicos queda abierta (Flores *et al.*, 2005). En este contexto resultados recientes indican que el CEVd no interfiere con las rutas de síntesis de los miRNAs en tomate (Martín *et al.*, 2007).

La idea de que el silenciamiento mediado por RNA es una importante presión de selección que determina la estructura secundaria de los viroides ha sido propuesta previamente (Wang *et al.*, 2004). En vista de nuestros resultados que indican que los

viroides no sólo son sustratos de las DCLs sino también de RISC, la estructura de dichos RNAs podría haber evolucionado a una situación de compromiso frente a la degradación por las DCLs y por RISC, que actúan preferentemente contra RNAs con estructuras secundarias compactas y relajadas, respectivamente. Además, la alta tasa de replicación de los viroides, su asociación con proteínas (Daròs y Flores, 2002; Martínez de Alba *et al.*, 2003) y su compartimentalización en orgánulos exentos de actividad RISC (como el nucleolo y el cloroplasto), son otros factores que ayudarían a estos RNAs a eludir la respuesta de silenciamiento génico del huésped.

Por último, la sensibilidad de los viroides a la degradación por RISC podría explicar los fenómenos de protección cruzada observados en miembros de las dos familias (Niblett *et al.*, 1978; De la Peña *et al.*, 1999), ya que dichos fenómenos son específicos de secuencia y deben estar mediados por RNA al no codificar los viroides ninguna proteína. En los virus la protección cruzada mediada por RNA es mecánicamente equivalente al PTGS (Ratcliff *et al.*, 1999). La protección cruzada podría explicarse en los viroides asumiendo que los vd-sRNAs de la cepa suave preinoculada se incorporan a RISC y lo guían contra los RNAs de otras cepas más agresivas de infecciones ulteriores.

5. Ribozimas de cabeza de martillo *versus* RNAs interferentes

Las ribozimas de cabeza de martillo y los RNAs interferentes son dos clases de RNAs con capacidad de unirse específicamente a otros RNAs de secuencia complementaria e inducir su corte o inactivación traduccional. Ambos han sido utilizados para estudiar la función de ciertos genes (Fritz *et al.*, 2002; Waterhouse y Heliwell, 2003), en terapia génica (Sioud e Iversen, 2005; Aagard y Rossi, 2007; Kim y Rossi, 2007) y en la obtención de resistencia frente a virus (Haasnoot *et al.*, 2007; Scherer *et al.*, 2007).

Las principales ventajas e inconvenientes de estas dos metodologías se resumen en la Tabla 5. Las ribozimas de cabeza de martillo presentan una alta especificidad, pues se diseñan para que sus brazos hibriden con el RNA diana que debe contener un trinucleótido NHH (siendo N cualquier nucleótido y H cualquier nucleótido excepto G), haciendo improbable su acción sobre otros RNAs. Otra ventaja de las ribozimas es

que en principio pueden dirigirse a los distintos compartimentos celulares en los que se encuentre el RNA diana (Sullenger y Cech, 1993; Samarski *et al.*, 1999; Michienzi *et al.*, 2000; Castanotto *et al.*, 2002). Además, las ribozimas tienen capacidad de recambio múltiple, pues una misma molécula de ribozima puede catalizar la degradación de varias moléculas de sustrato. Sin embargo, la presencia de RNAsas celulares limita la estabilidad de las ribozimas *in vivo* y en la práctica son necesarias elevadas dosis de las mismas para obtener una respuesta eficaz (Castanotto *et al.*, 2002). Estas elevadas dosis se consiguen en plantas con la utilización de promotores fuertes para sobreexpresar las ribozimas. Otro inconveniente de su uso es que el trinucleótido que precede el sitio de corte puede residir en una región inaccesible por estructura secundaria o asociación con proteínas. Por último, la necesidad de altas concentraciones de Mg^{2+} para la actividad intracelular de las ribozimas de cabeza de martillo mínimas explica su baja actividad *in vivo*, en donde la concentración de este catión es sensiblemente menor. La nueva generación de ribozimas de cabeza de martillo con TSMs y mayor eficiencia a concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} ha impulsado de nuevo el interés en la utilización de estos RNAs catalíticos (Flores *et al.*, 2007a).

Tabla 5. Ventajas e inconvenientes de las ribozimas de cabeza de martillo y de los RNAs interferentes

	Ventajas	Inconvenientes
Ribozimas de cabeza de martillo	<ul style="list-style-type: none"> -Alta especificidad -Catalizan la degradación de RNAs en el núcleo y en el citoplasma -Recambio múltiple 	<ul style="list-style-type: none"> -Baja estabilidad frente a RNAsas -Necesidad de dosis altas -Necesidad de un trinucleótido NHH en el RNA diana
RNAs interferentes	<ul style="list-style-type: none"> -Amplificación de la señal -Cualquier región del RNA puede ser diana 	<ul style="list-style-type: none"> -Mayor inespecificidad: <ul style="list-style-type: none"> -degradación de mRNAs de secuencia similar -saturación de componentes endógenos -Sólo catalizan la degradación de RNAs en el citoplasma

La tecnología del RNAi basa su éxito en adaptar el PTGS, uno de los mecanismos de defensa con que cuentan la mayoría de los eucariotas y en particular las plantas. La acción de las RDRs celulares (en particular la RDR6) permite la amplificación de la respuesta al catalizar estas enzimas la producción de nuevos dsRNAs interferentes

(Wassenegger y Krczal, 2006). El RNA de interés no impone en principio restricciones de secuencia (al contrario de lo que ocurre con las ribozimas) por lo que cualquier región del mismo puede ser diana. Los dsRNAs interferentes pueden ser de gran tamaño (excepto en mamíferos donde desencadenan la respuesta del interferón) dando así lugar a un gran número de siRNAs diferentes capaces de reconocer distintas regiones del RNA diana. Sin embargo, uno de los inconvenientes del uso de los RNAs interferentes reside precisamente en que algunos de los siRNAs pueden actuar también como miRNAs dirigiendo la degradación o bloqueando la traducción de otros RNAs celulares con similitud de secuencia con el RNA de interés (Kim y Rossi, 2007). Otro efecto inespecífico deriva de que altas dosis de dsRNAs (resultantes de la sobreexpresión y procesamiento de construcciones que expresan pequeños hpRNAs) pueden provocar daños celulares colaterales debido a la saturación de componentes de las rutas de silenciamiento génico (Grimm *et al.*, 2006). Por último, la degradación o inactivación del RNA diana por el complejo RISC parece ocurrir únicamente en el citoplasma, por lo que aquellos RNAs que se localicen en otros compartimentos celulares no serían susceptibles.

En el presente trabajo hemos comprobado que las dos metodologías pueden ser empleadas para obtener resistencia frente a viroides, si bien la utilización práctica de ambas debe aún superar algunas dificultades derivadas de las propiedades biológicas de estos patógenos como su elevado contenido en estructura secundaria, su alta tasa de replicación, su asociación con proteínas del huésped o su localización en orgánulos como el nucleolo o el cloroplasto.

Conclusiones

Conclusiones

1. La secuencia del trinucleótido que precede al sitio de autocorte de la ribozima de polaridad (+) del ELVd afecta a su actividad autocatalítica. Las constantes catalíticas de las distintas variantes de secuencia (AUA, AUC, GUA, GUC) determinadas *in vitro* a baja concentración de magnesio son diferentes en condiciones co- y postranscripcionales. Las variantes con un trinucleótido AUC o GUC son las más activas postranscripcionalmente, mientras que las variantes con GUA o AUA son las más activas cotranscripcionalmente.
2. Los resultados obtenidos en condiciones cotranscripcionales sugieren que la ribozima de polaridad (+) del ELVd ha sido seleccionada para actuar durante la transcripción de los RNAs viroidales, y que el trinucleótido AUC no se encuentra en la mayoría de las ribozimas de cabeza de martillo naturales por favorecer la adopción de estructuras metaestables catalíticamente inactivas durante la transcripción.
3. Los resultados obtenidos en condiciones postranscripcionales a baja concentración de magnesio indican que la variante de la ribozima de polaridad (+) del ELVd con el trinucleótido GUC presenta mayor actividad que otras ribozimas naturales con este mismo trinucleótido precediendo el sitio de autocorte.
4. Las ribozimas de cabeza de martillo derivadas de la de polaridad (+) del ELVd y (-) del PLMVd, con formato *trans* discontinuo o extendido y motivos de estabilización terciaria, degradan específicamente *in vitro* a bajas concentraciones de magnesio un RNA muy estructurado como la cadena de polaridad (-) del PSTVd.
5. La ribozima de cabeza de martillo derivada de la de polaridad (-) del PLMVd, con formato *trans* extendido y motivos de estabilización terciaria naturales, es la más eficiente *in vitro* a bajas concentraciones de magnesio, mantiene su actividad *in vivo* frente a los RNAs de polaridad (-) del PSTVd, y retrasa la infección sistémica causada por este viroide.

6. La coinoculación mecánica de RNAs genómicos viroidales con un exceso de dsRNAs homólogos induce una reducción significativa de la infectividad. Los efectos, observados con los sistemas CEVd-gynura, CEVd-tomate, PSTVd-tomate y CChMVd-crisantemo, son específicos de secuencia y dependientes de la dosis de dsRNAs y de la temperatura de crecimiento de las plantas. La coinoculación de vd-sRNAs sintetizados *in vitro* produce un efecto protector similar en los sistemas CEVd-gynura y CEVd-tomate.

7. La coagroinfiltración de plásmidos recombinantes que expresan un RNA infeccioso del PSTVd y un RNA homólogo con plegamiento en horquilla (generado a partir de una construcción con secuencias del PSTVd invertidas separadas por un intrón) retrasa la acumulación de las formas genómicas viroidales en las hojas infiltradas y en las hojas superiores no infiltradas.

8. El efecto sobre la infección de algunos viroides inducido por los RNAs interferentes generados *in vitro* o *in vivo* es específico de secuencia, lo que indica que, al menos en ciertas condiciones, los viroides además de ser sustratos de DICER lo son también de RISC. En consecuencia, su estructura secundaria podría haber evolucionado hacia una situación de compromiso que les permitiera establecer la infección aún siendo sustrato de ambas enzimas.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- AAGAARD, L., ROSSI, J. J. (2007). RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 75-86.
- ANDERSSON, M. G., HAASNOOT, P. C., XU, N., BERENJIAN, S., BERKHOUT, B., AKUSJARVI, G. (2005). Suppression of RNA interference by adenovirus virus associated RNA. *J. Virol.* **79**, 9556-9565.
- ASHULIN, L., LACHMAN, O., HADAS, R., BAR-JOSEPH, M. (1991). Nucleotide sequence of a new viroid species, Citrus bent leaf viroid (CBLVd), isolated from grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4767.
- ATKINS, D., YOUNG, M., UZZELL, S., KELLY, L., FILLATTI, J., GERLACH, W. L. (1995). The expression of antisense and ribozyme genes targeting Citrus exocortis viroid in transgenic plants. *J. Gen. Virol.* **76**, 1781-1790.
- ÁVILA, A. C., SINGH, R. P., DUSI, A., FONSECA, M. E. N., DE CASTRO, L. A. S. (1990). Lack of evidence of the presence of Potato spindle tuber viroid in the main potato crop of Brazil. *Fitopatol. Brasil.* **15**, 186-189.
- BADILLA, R., HAMMOND, R., RIVERA, C. (1999). First report of Potato spindle tuber viroid in Costa Rica. *Plant Dis.* **83**, 1072.
- BARTEL, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297.
- BATUMAN, O., MAWASSI, M., BAR-JOSEPH, M. (2006). Transgenes consisting of a dsRNA of an RNAi suppressor plus the 3' UTR provide resistance to Citrus tristeza virus sequences in *Nicotiana benthamiana* but not in citrus. *Virus Genes* **33**, 319-327.
- BAULCOMBE, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.
- BAUMBERGER, N., BAULCOMBE, D. C. (2005). *Arabidopsis* ARGONATUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 11928-11933.
- BAUMSTARK, T., RIESNER, D. (1995). Only one of four possible secondary structures of the central conserved region of Potato spindle tuber viroid is a substrate for processing in a potato nuclear extract. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4246-4254.
- BAUMSTARK, R., SCHRÖDER, A. R. W., RIESNER, D. (1997). Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.* **16**, 599-610.
- BÉCLIN, C., BOUTET, S., WATERHOUSE, P., VAUCHERET, H. (2002). A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Curr. Biol.* **12**, 684-688.
- BEIGELMAN, L., MCSWIGGEN, J. A., DRAPER, K. G., GONZALEZ, C., JENSEN, K., KARPEISKY, A. M., MODAK, A. S., MATULIC-ADAMIC, J., DIRENZO, A. B., HAEBERLI, P., SWEEDLER, D., TRACZ, D., GRIMM, S., WINCOTT, F. E., THACKRAY, V. G., USMAN, N. (1995). Chemical modification of hammerhead ribozymes. *J. Biol. Chem.* **270**, 25702-25708.
- BELLÉS, J. M., HANSEN, A. J., GRANELL, A., CONEJERO, V. (1986). Antiviroid effects of ribavirin on Citrus exocortis viroid infection in '*Gynura aurantiaca*'. *DC. Physiol. Mol. Plant Pathol.* **28**, 61-65.
- BELLÉS, J. M., CARBONELL, J., CONEJERO, V. (1991). Polyamines in plants infected by citrus exocortis viroid or treated with silver ions and ethephon. *Plant Physiol.* **96**, 1053-1059.
- BELLÉS, J. M., PÉREZ-AMADOR, M. A., CARBONELL, J., CONEJERO, V. (1993). Correlation between ornithine decarboxylase and putrescine in tomato plants infected by Citrus exocortis viroid or treated with ethephon. *Plant Physiol.* **102**, 933-937.
- BELLÉS, J. M., GARRO, R., PALLÁS, V., FAYOS, J., RODRIGO, I., CONEJERO, V. (2006). Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant-pathogen interactions. *Planta* **223**, 500-511.
- BERNSTEIN, E., CAUDY, A. A., HAMMOND, S. M., HANNON, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.
- BLOUNT, K. F., UHLENBECK, O. C. (2005). The structure-function dilemma of the hammerhead ribozyme. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 415-440.

- BONFIGLIOLI, R. G., McFADDEN, G. I., SYMONS, R. H. (1994). *In situ* hybridization localizes Avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and Coconut cadang-cadang viroid in the nucleus. *Plant J.* **6**, 99-103.
- BONFIM, K., FARIA, J. C., NOGUEIRA, E. O., MENDES, E. A., ARAGÃO, F. J. (2007). RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**, 717-726.
- BRANCH, A. D., ROBERTSON, H. D., DICKSON, E. (1981). Longer-than-unit-length viroid minus strands are present in RNA from infected plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6381-6385.
- BRANCH, A. D., ROBERTSON, H. D., GREER, C., GEGENHEIMER, P., PEEBLES, C., ABELSON, J. (1982). Cell-free circulation of viroid progeny RNA by an RNA ligase from wheat germ. *Science* **217**, 1147-1149.
- BRANCH, A. D., ROBERTSON, H. D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* **223**, 450-455.
- BRANCH, A. D., BENENFELD, B. J., ROBERTSON, H. D. (1985). Ultraviolet light-induced crosslinking reveals a unique region of tertiary structure in Potato spindle tuber viroid and HeLa 5S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6590-6594.
- BRANCH, A. D., BENENFELD, B. J., ROBERTSON, H. D. (1988). Evidence for a single rolling circle in the replication of Potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9128-9132.
- BROADBENT, P., DEPHOFF, C. M. (1992). Virus indexing in the New South Wales citrus improvement scheme. *Aust. J. Exp. Agric.* **32**, 494-502.
- BRUENING, G., GOULD, A. R., MURPHY, P. J., SYMONS, R. H. (1982). Oligomers of Avocado sunblotch viroid are found in infected avocado leaves. *FEBS Lett.* **148**, 71-78.
- BRUENING, G. (1989). Compilation of self-cleaving sequences from plant virus satellite RNAs and other sources. *Methods Enzymol.* **180**, 546-558.
- BUCHER, E., LOHUIS, D., VAN POPPEL, P. M., GEERTS-DIMITRIADOU, C., GOLDBACH, R., PRINS, M. (2006). Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. *J. Gen. Virol.* **87**, 3697-3701.
- BURKE, D. H., GREATHOUSE, S. T. (2005). Low-magnesium, *trans*-cleavage activity by type III, tertiary stabilized hammerhead ribozymes with stem 1 discontinuities. *BMC Biochem.* **6**, 14.
- BUSSIÈRE, F., LEHOUX, J., THOMPSON, D. A., SKRZECZKOWSKI, L. J., PERREAULT, J. P. (1999). Subcellular localization and rolling circle replication of Peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. *J. Virol.* **73**, 6353-6360.
- BUSSIÈRE, F., QUELLET, J., CÔTÉ, F., LEVESQUE, D., PERREAULT, J. P. (2000). Mapping in solution shows the Peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J. Virol.* **74**, 2647-2654.
- CARRINGTON, J. C., AMBROS, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **301**, 336-338.
- CARTHEW, R. W. (2006). Gene regulation by microRNAs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 203-208.
- CASTANOTTO, D., SCHERR, M., ROSSI, J. J. (2000). Intracellular expression and function of antisense catalytic RNAs. *Methods Enzymol.* **313**, 401-420.
- CASTANOTTO, D., LI, J. R., MICHIENZI, A., LANGLOIS, M. A., LEE, N. S., PUYMIRAT, J., ROSSI, J. J. (2002). Intracellular ribozyme applications. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1140-1145.
- CECH, T. R., ZAUG, A. J., GRABOWSKI, P. J. (1981). *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* **27**, 487-493.
- CHADALAVADA, D. M., CERRONE-SZAKAL, A. L., BEVILACQUA, P. C. (2007). Wild-type is the optimal sequence of the HDV ribozyme under cotranscriptional conditions. *RNA* **13**, 2189-2201.

- CHAFFAI, M., SERRA, P., GANDÍA, M., HERNÁNDEZ, C., DURÁN-VILA, N. (2007). Molecular characterization of CEVd strains that induce different phenotypes in *Gynura aurantiaca*: structure-pathogenicity relationships. *Arch. Virol.* **152**, 1283-1294.
- CHAN, S. W., ZILBERMAN, Z., XIE, L., JOHANSEN, L. K., CARRINGTON, J. C., JACOBSEN, S. E. (2004). RNA silencing genes control *de novo* DNA methylation. *Science* **303**, 1336.
- CHANG, J., PROVOST, P., TAYLOR, J. M. (2003). Resistance of human hepatitis delta virus RNAs to dicer activity. *J. Virol.* **77**, 11910-11917.
- CHAPMAN, E., CARRINGTON, J. C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat. Rev. Gen.* **8**, 884-896.
- CHEN, X. (2005). MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett.* **579**, 5923-5931.
- CHILAKAMARTHI, U., MUKHERJEE, S. K., DEB, J. K. (2007). Intervention of geminiviral replication in yeast by ribozyme mediated downregulation of its Rep protein. *FEBS Lett.* **581**, 2675-2683.
- COLLINS, R. F., GELLATLY, D. L., SEHGAL, O. P., ABOUHAIIDAR, M. G. (1998). Self-cleaving circular RNA associated with Rice yellow mottle virus is the smallest viroid-like RNA. *Virology* **241**, 269-275.
- CONEJERO, V., SEMANCIK, J. S. (1977). Exocortis viroid: alterations in the proteins of *Gynura aurantiaca* accompanying viroid infection. *Virology* **77**, 221-223.
- CONEJERO, V., PICAZO, I., SEGADO, P. (1979). Citrus exocortis viroid (CEV): protein alterations in different hosts following viroid infection. *Virology* **97**, 454-456.
- CÔTÉ, F., PERREAULT, J. P. (1997). Peach latent mosaic viroid is locked by a 2',5'-phosphodiester bond produced by *in vitro* self-ligation. *J. Mol. Biol.* **273**, 533-543.
- CÔTÉ, F., LEVESQUE, D., PERREAULT, J. P. (2001). Natural 2', 5'-phosphodiester bonds found at the ligation sites of Peach latent mosaic viroid. *J. Virol.* **75**, 19-25.
- COX, K. H., GOLBERG, R. B. (1988). Analysis of plant gene expression. En 'Plant Molecular Biology: A Practical Approach' (C. H. Shaw, Ed.), pp 1-35. IRL Press. Oxford.
- CULLEN, B. R. (2006). Viruses and microRNAs. *Nat. Genet.* **38**, S25-S30.
- DALMAY, T., HORSEFIELD, R., HARTIG BRAUNSTEIN, T., BAULCOMBE, D. (2001). SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **20**, 2069-2077.
- DARNELL, J., LODISH, H., BALTIMORE, D. (1986). *Molecular cell biology*. W. H. Freeman, New York.
- DARÒS, J. A., MARCOS, J. F., HERNÁNDEZ, C., FLORES, R. (1994). Replication of Avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12813-12817.
- DARÒS, J. A., FLORES, R. (1995). Identification of a retroviroid-like element from plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6856-6860.
- DARÒS, J. A., FLORES, R. (2002). A chloroplast protein binds a viroid RNA *in vivo* and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *EMBO J.* **21**, 749-759.
- DARÒS, J. A., FLORES, R. (2004). *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family *Pospiviroidae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6792-6797.
- DARÒS, J. A., ELENA, S. F., FLORES, R. (2006). Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. *EMBO Rep.* **7**, 593-598.
- DE BOKX, J. A., PIRON, P. G. M. (1981). Transmission of Potato spindle tuber viroid by aphids. *Eur. J. Plant Pathol.* **87**, 31-34.
- DE FEYTER, R., YOUNG, M., SCHROEDER, K., DENNIS, E. S., GERLACH, W. (1996). A ribozyme gene and an antisense gene are equally effective in conferring resistance to Tobacco mosaic virus on transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **250**, 329-338.

- DE LA PEÑA, M., NAVARRO, B., FLORES, R. (1999). Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: a tetraloop within the *in vivo* branched RNA conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9960-9965.
- DE LA PEÑA, M., FLORES, R. (2001). An extra nucleotide in the consensus catalytic core of a viroid hammerhead ribozyme: implications for the design of more efficient ribozymes. *J. Biol. Chem.* **276**, 34586-34593.
- DE LA PEÑA, M., FLORES, R. (2002). Chrysanthemum chlorotic mottle viroid RNA: dissection of the pathogenicity determinant and comparative fitness of symptomatic and non-symptomatic variants. *J. Mol. Biol.* **321**, 411-421.
- DE LA PEÑA, M., GAGO, S., FLORES, R. (2003). Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *EMBO J.* **22**, 5561-5570.
- DELERIS, A., GALLEGU-BARTOLOME, J., BAO, J., KASSCHAU, K. D., CARRINGTON, J. C., VOINNET, O. (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* **313**, 68-71.
- DELGADO, S., MARTÍNEZ DE ALBA, A. E., HERNÁNDEZ, C., FLORES, R. (2005). A short double-stranded RNA motif of Peach latent mosaic viroid contains the initiation and the self-cleavage sites of both polarity strands. *J. Virol.* **79**, 12934-12943.
- DENTI, M. A., BOUTLA, A., TSAGRIS, M., TABLER, M. (2004). Short interfering RNAs specific for Potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *Plant J.* **37**, 762-769.
- DESJARDINS, P. R., DRAKE, R. J., ATKINS, E. L., BERG, O. (1979). Pollen transmission of Avocado sunblotch virus experimentally demonstrated. *California Agriculture* **33**, 14-15.
- DESJARDINS, P. R. (1987). Avocado sunblotch. En 'The Viroids' (T. O. Diener, Ed.), pp. 299-313. Plenum Press, New York.
- DIENER, T. O. (1971a). Potato spindle tuber virus. IV. Replicating, low molecular weight RNA. *Virology* **45**, 411-428.
- DIENER, T. O. (1971b). Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. III. Subcellular location of PSTV-RNA and the question of whether virions exists in extracts or *in situ*. *Virology* **43**, 75-98.
- DIENER, T. O., RAYMER, W. B. (1971). Potato spindle tuber 'virus', CMI/AAB. *Descriptions of Plant Viruses*, **66**.
- DIENER, T. O. (1987). Biological properties. En 'The Viroids' (T. O. Diener, Ed.), pp. 9-35. Plenum Press, New York.
- DIENER, T. O. (2003). Discovering viroids, a personal perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 75-80.
- DIMOCK, A. W., GEISSINGER, C. M. (1969). A newly recognized disease of chrysanthemum caused by a graft-transmissible agent. *Phytopathology* **59**, 1024.
- DIMOCK, A. W., GEISSINGER, C. M., HORST, R. K. (1971). Chlorotic mottle: a newly recognized disease of chrysanthemum. *Phytopathology* **61**, 415-419.
- DING, B., KWON, M. O., HAMMOND, R., OWENS, R. (1997). Cell-to-cell movement of Potato spindle tuber viroid. *Plant J.* **12**, 931-936.
- DING, B., ITAYA, A. (2007). Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**, 7-20.
- DING, S. W., LI, H., LU, R., LI, F., LI, W. X. (2004). RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res.* **102**, 109-115.
- DING, S. W., VOINNET, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**, 413-426.
- DI NICOLA-NEGRI, E., BRUNETTI, A., TAVAZZA, M., ILARDI, V. (2005). Hairpin RNA-mediated silencing of Plum pox virus P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus. *Transgenic Res.* **14**, 989-994.

- DI SERIO, F., APARICIO, F., ALIOTO, D., RAGOZZINO, A., FLORES, R. (1996). Identification and molecular properties of a 306 nucleotide viroid associated with apple dimple fruit disease. *J. Gen. Virol.* **77**, 2833-2837.
- DI SERIO, F., DARÒS, J. A., RAGOZZINO, A., FLORES, R. (1997). A 451-nucleotide circular RNA from cherry with hammerhead ribozymes in its strands of both polarities. *J. Virol.* **71**, 6603-6610.
- DORSSERS, L., VAN DER KROL, S., VAN DER MEER, J., VAN KAMMEN, A., ZABEL, P. (1984). Purification of Cowpea mosaic virus RNA replication complex: identification of a virus-encoded 110,000 dalton polypeptide responsible for RNA chain elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1951-1955.
- DUGAS, D. V., BARTEL, B. (2004). MicroRNA regulation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 512-520.
- DUNOYER, P., HIMBERT, C., 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., VOINNET, O. (2005). The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 415-423.
- DURÁN-VILA, N., FLORES, R., SEMANCIK, J. S. (1986). Characterization of viroid-like RNAs associated with the citrus exocortis syndrome. *Virology* **150**, 75-84.
- DURÁN-VILA, N., SEMANCIK, J. S. (1986). Shoot tip culture and the eradication of viroid-RNA. *Scientia Hort.* **29**, 199-203.
- DURÁN-VILA, N., SEMANCIK, J. S. (2003). Citrus viroids. En 'Viroids' (A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, J. S. Semancik, Eds.) pp 178-194. CSIRO Publ.: Collingwood, Aust.
- ECONOMIDES, C. V. (1976). Exocortis in marsh seedless grapefruit in Cyprus. *Plant Dis. Rep.* **60**, 532-534.
- EIRAS, M., KITAJIMA, E. W., FLORES, R., DARÒS, J. A. (2007). Existente *in vivo* of the loop E motif in Potato spindle tuber viroid RNA. *Arch. Virol.* **152**, 1389-1393.
- EKWALL, K. (2004). The RITS complex-A direct link between small RNA and heterochromatin. *Mol. Cell* **13**, 304-305.
- EPSTEIN, L. M., GALL, J. (1987). Self-cleaving transcripts of satellite DNA from the newt. *Cell* **48**, 535-543.
- FADDA, Z., DARÒS, J. A., FAGOAGA, C., FLORES, R., DURÁN-VILA, N. (2003a). Eggplant latent viroid, the candidate type species for a new genus within the family *Avsunviroidae*. *J. Virol.* **77**, 6528-6532.
- FADDA, Z., DARÒS, J. A., FLORES, R., DURÁN-VILA, N. (2003b). Identification in eggplant of a variant of Citrus exocortis viroid (CEVd) with a 96 nucleotide duplication in the right terminal region of the rod-like secondary structure. *Virus Res.* **97**, 145-149.
- FAGOAGA, C., PINA, J. A., DURÁN-VILA, N. (1994). Occurrence of small RNAs in severely diseased vegetable crops. *Plant. Dis.* **78**, 749-753.
- FAWCET, H. S., KLOTZ, L. J. (1948). Exocortis on trifoliolate orange. *Citrus Leaves* **28**, 8.
- FEDOR, M. J., WILLIAMSON, J. R. (2005). The catalytic diversity of RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 399-412.
- FERBEYRE, G., SMITH, J. M., CEDERGREN, R. (1998). Schistosome satellite DNA encodes active hammerhead ribozymes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3880-3888.
- FERNOW, K. H., PETERSON, L. C., PLAISTED, R. L. (1970). Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected potato plants. *Amer. Pot. J.* **47**, 75-80.
- FIRE, A., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E., MELLO, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- FLORES, R., SEMANCIK, J. S. (1982). Properties of a cell-free system for synthesis of Citrus exocortis viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6285-6288.

- FLORES, R. (1989). Synthesis of RNAs specific to Citrus exocortis viroid by a fraction rich in nuclei from infected *Gynura aurantiaca*: examination of the nature of the products and solubilisation of the polymerase-template complex. *J. Gen. Virol.* **70**, 2695-2706.
- FLORES, R., DI SERIO, F., HERNÁNDEZ, C. (1997). Viroids: the noncoding genomes. *Sem. Virol.* **8**, 65-73.
- FLORES, R., DARÒS, J. A., HERNÁNDEZ, C. (2000). *Avsunviroidae* family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Adv. Virus Res.* **55**, 271-323.
- FLORES, R., HERNÁNDEZ, C., DE LA PEÑA, M., VERA, A., DARÒS, J. A. (2001). Hammerhead ribozyme structure and function in plant replication. *Methods Enzymol.* **341**, 540-552.
- FLORES, R., DE LA PEÑA, M., NAVARRO, B. (2003). Chrysanthemum chlorotic mottle viroid. En 'Viroids' (A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, J. S. Semancik, Eds.) pp 224-227. CSIRO Publ.: Collingwood, Aust.
- FLORES, R., DELGADO, S., GAS, M. E., CARBONELL, A., MOLINA, D., GAGO, S., DE LA PEÑA, M. (2004). Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Letters* **567**, 42-48.
- FLORES, R., HERNÁNDEZ, C., MARTÍNEZ DE ALBA, A. E., DARÒS, J. A., DI SERIO, F. (2005). Viroids and viroid-hosts interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 117-139.
- FLORES, R., CARBONELL, A., DE LA PEÑA, M., GAGO, S. (2007a). RNAs autocatalíticos: ribozimas de cabeza de martillo. En 'Herramientas biotecnológicas en fitopatología' (V. Pallás, P. Rodríguez-Palenzuela, C. Escobar, J.F. Marcos, Eds) pp 409-420. Mundi-Prensa-SEF, Madrid, España.
- FLORES, R., NAVARRO, B., GAGO, S., DE LA PEÑA, M. (2007b). Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: a system for reverse genetics in the family *Avsunviroidae* (hammerhead viroids). *Plant viruses* **1**, 27-32.
- FORSTER, A. C., SYMONS, R. H. (1987a). Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* **49**, 211-220.
- FORSTER, A. C., SYMONS, R. H. (1987b). Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell* **50**, 9-16.
- FORSTER, A. C., DAVIES, C., SHELDON, C., JEFFRIES, A. C., SYMONS, R. H. (1988). Self-cleaving viroid and newt RNAs may only be active as dimmers. *Nature* **334**, 265-267.
- FRITZ, J. J., LEWIN, A., HAUSWIRTH, W., AGARWAL, A., GRANT, M., SHAW, L. (2002). Development of hammerhead ribozymes to modulate endogenous gene expression for functional studies. *Methods* **28**, 276-285.
- GALINDO, J. A., LÓPEZ, M., AGUILAR, T. (1986). Significance of *Myzus persicae* in the spreads of Tomato planta macho viroid. *Fitopatol. Bras.* **11**, 400-410.
- GANDÍA, M., RUBIO, L., PALACIO, A., DURÁN-VILA, N. (2005). Genetic variation and population structure of an isolate of Citrus exocortis viroid (CEVd) and of the progenies of two infectious sequence variants. *Arch. Virol.* **150**, 1945-1957.
- GAGO, S., DE LA PEÑA, M., FLORES, R. (2005). A kissing-loop interaction in a hammerhead viroid RNA critical for its *in vitro* folding and *in vivo* viability. *RNA* **11**, 1073-1083.
- GAS, M. E., HERNÁNDEZ, C., FLORES, R., DARÒS, J. A. (2007). Processing of nuclear viroids *in vivo*: an interplay between RNA conformations. *PLoS Path.* **3**, 1813-1826.
- GASCIOLLI, V., MALLORY, A. C., BARTEL, D. P., VAUCHERET, H. (2005). Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing *trans*-acting siRNAs. *Curr. Biol.* **15**, 1494-1500.
- GAST, F. U., KEMPE, D., SPIEKER, R. L., SÄNGER, H. L. (1996). Secondary structure probing of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) and sequence comparison with other small pathogenic RNA replicons provides evidence for central non canonical base-pairs, large A-rich loops, and a terminal branch. *J. Mol. Biol.* **262**, 652-670.
- GILLINGS, M. R., BROADBENT, P., GOLLNOW, B. I. (1991). Viroids in australian citrus: relationship to exocortis, cachexia and citrus dwarfing. *Aust. J. Plant Physiol.* **18**, 559-570.

- GÓMEZ, G., PALLÁS, V. (2001). Identification of an *in vitro* ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 910-913.
- GÓMEZ, G., PALLÁS, V. (2004). A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex *in vivo* with Hop stunt viroid RNA. *J. Virol.* **78**, 10104-10110.
- GÓMEZ, G., PALLÁS, V. (2007). Mature monomeric forms of Hop stunt viroid resist RNA silencing in transgenic plants. *Plant J.* **51**, 1041-1049.
- GRIMM, D., STREETZ, K. L., JOPLING, C. L., STORM, T. A., PANDEY, K., DAVIS, C. R., MARION, P., SALAZAR, F., KAY, M. A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* **441**, 537-541.
- GROSS, H. J., DOMDEY, H., LOSSOW, C. H., JANK, P., RABA, M., ALBERTY, H., SÄNGER, H. L. (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of Potato spindle tuber viroid. *Nature* **273**, 203-208.
- GROSS, H. J., KRUPP, G., DOMDEY, H., RABA, M., JANK, P., LOSSOW, C., ALBERTY, H., RAMM, K., SÄNGER, H. L. (1982). Nucleotide sequence and secondary structure of Citrus exocortis and Chrysanthemum stunt viroid. *Europ. J. Biochem.* **121**, 249-257.
- GRUNER, R., FELLS, A., QU, F., ZIMMAT, R., STEGER, G., RIESNER, D. (1995). Interdependence of pathogenicity and replicability with Potato spindle tuber viroid. *Virology* **209**, 60-69.
- GUERRIER-TAKADA, C., GARDINER, K., MARSH, T., PACE, N., ALTMAN, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**, 849-857.
- HAASNOOT, J., WESTERHOUT, E. M., BERKHOUT, B. (2007). RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1435-1443.
- HAJDUKIEWICZ, P. T., ALLISON, L. A., MALIGA, P. (1997). The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J.* **16**, 4041-4048.
- HAMMOND, R. W., OWENS, R. A. (1987). Mutational analysis of Potato spindle tuber viroid reveals complex relationships between structure and infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3967-3971.
- HAMMOND, R. W., SMITH, D. R., DIENER, T. O. (1989). Nucleotide sequence and proposed secondary structure of Columnea latent viroid: a natural mosaic of viroid sequences. *Nucleic Acids Res.* **17**, 10083-10094.
- HAMMOND, S. M., BERNSTEIN, E., BEACH, D., HANNON, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-296.
- HAN, S., WU, Z., YANG, H., WANG, R., YIE, Y., XIE, L., TIEN, P. (2000). Ribozyme-mediated resistance to Rice dwarf virus and the transgene silencing in the progeny of transgenic rice plants. *Transgenic Res.* **9**, 195-203.
- HARDERS, J., LUKÁCS, N., ROBERT-NICOUD, M., JOVIN, T. M., RIESNER, D. (1989). Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by *in situ* hybridisation and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.* **8**, 3941-3949.
- HARI, V. (1980). Ultrastructure of Potato spindle tuber viroid-infected tomato leaf tissue. *Phytopathology* **70**, 385-387.
- HARRIS, P. S., MILLER-JONES, D. N., HOWELL, P. J. (1979). Control of Potato spindle tuber viroid: the special problems of a disease in plant breeders' material. En 'Plant health: the scientific basis for administrative control of plant parasites.' (D. L. Ebbels, J. E. King, Eds.) pp 232-237. Blackwell: Oxford, England.
- HARRIS, P. S., BROWNING, I. A. (1980). The effects of temperature and light on the symptom expression and viroid concentration in tomato of a severe strain of Potato spindle tuber viroid. *Pot. Res.* **23**, 85-94.
- HASELOFF, J., SYMONS, R. H. (1981). Chrysanthemum stunt viroid: primary sequence and secondary structure. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2741-2752.
- HASELOFF, J., MOHAMED, N. A., SYMONS, R. H. (1982). Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconuts. *Nature* **299**, 316-321.

- HASELOFF, J., GERLACH, W. L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* **334**, 585-591.
- HASHIMOTO, J., KOGANEZAWA, H. (1987). Nucleotide sequence and secondary structure of Apple scar skin viroid. *Nucleic Acids Res.* **15**, 7045-7052.
- HENDERSON, I. R., ZHANG, X., LU, C., JOHNSON, L., MEYERS, B. C., GREEN, P., JACOBSEN, S. E. (2006). Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat. Genet.* **38**, 721-725.
- HERNÁNDEZ, C., ELENA, S. F., MOYA, A., FLORES, R. (1992). Pear blister canker viroid is a member of the apple scar skin subgroup (apscaviroids) and has also sequence homologies with viroids from other subgroups. *J. Gen. Virol.* **73**, 2503-2507.
- HERNÁNDEZ, C., FLORES, R. (1992). Plus and minus RNAs of Peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3711-3715.
- HERNÁNDEZ, C., DI SERIO, F., AMBRÓS, S., DARÒS, J. A., FLORES, R. (2006). An element of the tertiary structure of Peach latent mosaic viroid RNA revealed by UV irradiation. *J. Virol.* **80**, 9336-9340.
- HORMES, R., SCZAKIEL, G. (2002). The size of hammerhead ribozymes is related to cleavage kinetics: the role of substrate length. *Biochimie* **84**, 897-903.
- HORST, R. K., LANGHANS, R. W., SMITH, S. H. (1977). Effects of chrysanthemum stunt, chlorotic mottle, aspermy and mosaic on flowering and rooting of chrysanthemums. *Phytopathology* **67**, 9-14.
- HORST, R. K. (1987). Chrysanthemum chlorotic mottle. En 'The Viroids' (T. O. Diener, Ed.), pp 291-295. Plenum: New York.
- HUTCHINS, C. J., KEESE, P., VISVADER, J. E., RATHJEN, P. D., McINNES, J. L., SYMONS, R. H. (1985). Comparison of plus and minus forms of viroids and virusoids. *Plant Mol. Biol.* **4**, 293-304.
- HUTCHINS, C. J., RATHJEN, P. D., FORSTER, A. C., SYMONS, R. H. (1986). Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of Avocado sunblotch. *Nucleic Acid Res.* **14**, 3627-3640.
- HUTTINGA, H., MOSCH, W. H. M., TREUR, A. (1987). Comparison of bidirectional electrophoresis and molecular hybridization methods to detect Potato spindle tuber viroid and Chrysanthemum stunt viroid. *EPPO Bull.* **17**, 37-43.
- HUTTNER, E., TUCKER, W., VERMEULEN, A., IGNART, F., SAWYER, B., BIRCH, R. (2001). Ribozyme genes protecting transgenic melon plants against potyviruses. *Curr. Issues Mol. Biol.* **3**, 27-34.
- ISHIDA, I., TUKAHARA, M., YOSHIOKA, M., OGAWA, T., KAKITANI, M., TOGURI, T. (2002). Production of anti-virus, viroid plants by genetic manipulations. *Pest Manag. Sci.* **58**, 1132-1136.
- ISHIKAWA, M., MESHI, T., OHNO, T., OKADA, Y., SANO, T., UEDA, I., SHIKATA, E. (1984). A revised replication cycle for viroids: the role of longer than unit viroid RNA in viroid replication. *Mol. Gen. Gen.* **196**, 421-428.
- ITAYA, A., FOLIMONOV, A., MATSUDA, Y., NELSON, R. S., DING, B. (2001). Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 1332-1334.
- ITAYA, A., ZHONG, X., BUNDSCHUH, R., QI, Y., WANG, Y., TAKEDA, R., HARRIS, A. R., MOLINA, C., NELSON, R. S., DING, B. (2007). A structured viroid RNA is substrate for Dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RISC-mediated degradation. *J. Virol.* **81**, 2980-2994.
- ITO, T., IEKI, H., OZAKI, K. (2000). A population of variants of a viroid closely related to Citrus viroid-I in citrus plants. *Arch. Virol.* **145**, 2105-2114.
- ITO, T., IEKI, H., OZAKI, K., ITO, T. (2001). Characterization of a new citrus viroid species tentatively termed Citrus viroid OS. *Arch. Virol.* **146**, 975-982.
- JAGIELLO, C., MOONEY, P., DAWSON, T., AFTAB, M., PEARSON, M. (1995). Virus and virus-like diseases in New Zealand. *Orchardist* **68**, 40.

- JONES-RHOADES, M. W., BARTEL, D. P., BARTEL, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 19-53.
- KALANTIDIS, K., PSARADAKIS, S., TABLER, M., TSAGRIS, M. (2002). The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**, 826-833.
- KALANTIDIS, K., SCHUMACHER, H. T., ALEXIADIS, T., HELM, J. M. (2008). RNA silencing movement in plants. *Biol. Cell* **100**, 13-26.
- KASSCHAU, K. D., XIE, Z., ALLEN, E., LLAVE, C., CHAPMAN, E. J., KRIZAN, K. A., CARRINGTON, J. C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev. Cell* **4**, 205-217.
- KAWASAKI, H., TAIRA, K. (2004). Helicase-attached novel hybrid ribozymes. *Methods Mol. Biol.* **252**, 237-243.
- KEESE, P., SYMONS, R. H. (1985). Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4582-4586.
- KEESE, P., OSORIO-KEESE, M. E., SYMONS, R. H. (1988). Coconut tinangaja viroid: sequence homology with Coconut cadang-cadang viroid and other Potato spindle tuber viroid related RNAs. *Virology* **162**, 508-510.
- KENNERDELL, J. R., CARTHEW, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-1026.
- KHAN, Z. A., HIRIYANNA, F., CHAVEZ, F., FRAENKEL-CONRAT, H. (1986). RNA-directed RNA polymerases from healthy and from virus-infected cucumber. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2382-2386.
- KHVOROVA, A., LESCOUTE, A., WESTHOF, E., JAYASENA, S. D. (2003). Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 708-712.
- KHOURY, I., SINGH, R. P., BOUCHER, A., COOMBS, D. H. (1988). Concentration and distribution of mild and severe strains of Potato spindle tuber viroid in cross-protected tomato plants. *Phytopathology* **78**, 1331-1336.
- KIEFER, M. C., OWENS, R. A., DIENER, T. O. (1983). Structural similarities between viroids and transposable genetic elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6234-6238.
- KIKUCHI, Y., TYC, K., FILIPOWICZ, W., SÄNGER, H. L., GROSS, H. J. (1982). Circularization of linear viroid RNA via 2'-phosphomonoester, 3', 5'-phosphodiester bonds by a novel type of RNA ligase from wheat germ and *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res.* **10**, 7521-7529.
- KIM, D. H., ROSSI, J. J. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 173-184.
- KOLTUNOW, A. M., REZAIAN, M. A. (1988). Grapevine yellow speckle viroid: structural features of a new viroid group. *Nucleic Acids Res.* **16**, 849-864.
- KOLTUNOW, A. M., KRAKE, L. R., JOHNSON, S. D., REZAIAN, M. A. (1989). Two related viroids cause grapevine yellow speckle disease independently. *J. Gen. Virol.* **70**, 3411-3419.
- KONARSKA, M., FILIPOWICZ, W., GROSS, H. J. (1982). RNA ligation via 2'-phosphomonoester, 3',5'-phosphodiester linkage: requirement of 2',3'-cyclic phosphate termini and involvement of a 5'-hydroxyl polynucleotide kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1474-1478.
- KORE, A. R., VAISH, N. K., KUTZKE, U., ECKSTEIN, F. (1998). Sequence specificity of the hammerhead ribozyme revisited: the NHH rule. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4116-4120.
- KRUGER, K., GRABOWSKI, P. J., ZAUG, A. J., SANDS, J., GOTTSCHLING, D. E., CECH, T. R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* **31**, 147-157.
- KRYCZYNSKI, S., PADUCH-CICHAL, E., SKRZECZKOWSKI, L. J. (1988). Transmission of three viroids through seed and pollen of tomato plants. *J. Phytopathol.* **121**, 51-57.

- KWON, C. S., CHUNG, W. I., PAEK, K. H. (1997). Ribozyme mediated targeting of Cucumber mosaic virus RNA 1 and 2 in transgenic tobacco plants. *Mol. Cells* **7**, 326-334.
- KYRIAKOU, A. (1992). Incidence in Cyprus of Citrus ecocortis viroid and its mechanical transmission. *Plant Pathol.* **41**, 20-24.
- LAFONTAINE, D., BEAUDRY, D., MARQUIS, P., PERREAULT, J. P. (1995). Intra- and intermolecular non-enzymatic ligations occur within transcripts derived from the Peach latent mosaic viroid. *Virology* **212**, 705-709.
- LAKSHMAN, D. K., TAVANTZIS, S. M. (1993). Primary and secondary structure of a 360-nucleotide isolate of Potato spindle tuber viroid. *Arch. Virol.* **128**, 319-331.
- LANDRY, P., PERREAULT, J. P. (2005). Identification of a Peach latent mosaic viroid hairpin able to act as a dicer-like substrate. *J. Virol.* **79**, 6540-6543.
- LAWSON, R. H., HEARON, S. S. (1971). Ultrastructure of Chrysanthemum stunt virus-infected and stunt free Mistletoe chrysanthemums. *Phytopathology* **61**, 653-656.
- LECELLIER, C. H., VOINNET, O. (2004). RNA silencing: no mercy for viruses? *Immunol. Rev.* **198**, 285-303.
- LEHMANN, E., BRUECKNER, F., CRAMER, P. (2007). Molecular basis of RNA-dependent RNA polymerase II activity. *Nature* **450**, 445-449.
- LI, H. W., DING, S. W. (2005). Antiviral silencing in animals. *FEBS Lett.* **579**, 5965-5973.
- LI, H. W., DING, S. W. (2006). Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 503-531.
- LIEBER, A., STRAUSS, M. (1995). Selection of efficient cleavage sites in target RNAs by using a ribozyme expression library. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 540-551.
- LIMA, M. I., FONSECA, M. E. N., FLORES, R., KITAJIMA, E. W. (1994). Detection of Avocado sunblotch viroid in chloroplast of avocado leaves by *in situ* hybridization. *Arch. Virol.* **138**, 285-390.
- LIU, B., TABLER, M., TSAGRIS, M. (2000). Episomal expression of a hammerhead ribozyme directed against Plum pox virus. *Virus Res.* **68**, 15-23.
- LIU, Y. H., SYMONS, R. H. (1998). Specific RNA self-cleavage in coconut cadang cadang viroid: potential for a role in rolling circle replication. *RNA* **4**, 418-429.
- LIZÁRRAGA, R. E., SALAZAR, S. F., ROCA, W. M., SCHILDE-RENTSCHLER, L. (1980). Elimination of potato spindle tuber viroid by low temperature and meristem culture. *Phytopathology* **70**, 754-755.
- LU, S., CULLEN, B. R. (2004). Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and microRNA biogenesis. *J. Virol.* **78**, 12868-12876.
- LU, S., SHI, R., TSAO, C. C., YI, X., LI, L., CHIANG, V. L. (2004). RNA silencing in plants by the expression of siRNA duplexes. *Nucleic Acids Res.* **32**, e171.
- MACHIDA, S., YAMAHATA, N., WATANUKI, H., OWENS, R. A., SANO, T. (2007). Successive accumulation of two size classes of viroid-specific small RNA in potato spindle tuber viroid-infected tomato plants. *J. Gen. Virol.* **88**, 3452-3457.
- MAHEN, E. M., HARGER, J. W., CALDERON, E. M., FEDOR, M. J. (2005). Kinetics and thermodynamics make different contributions to RNA folding *in vitro* and in yeast. *Mol. Cell* **19**, 27-37.
- MALFITANO, M., DI SERIO, F., COVELLI, L., RAGOZZINO, A., HERNÁNDEZ, C., FLORES, R. (2003). Peach latent mosaic viroid variants inducing peach calico contain a characteristic insertion that is responsible for this symptomatology. *Virology* **313**, 492-501.
- MARCOS, J. F., FLORES, R. (1992). Characterization of RNAs specific to Avocado sunblotch viroid synthesized *in vitro* by a cell-free system from infected avocado leaves. *Virology* **186**, 481-488.
- MARKARIAN, N., LI, H. W., DING, S. W., SEMANCIK, J. S. (2004). RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Arch. Virol.* **149**, 397-406.

- MARTICK, M., SCOTT, W. G. (2006). Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell* **126**, 1-12.
- MARTÍN, R., ARENAS, C., DARÒS, J. A., COVARRUBIAS, A., REYES, J. L., CHUA, N. H. (2007). Characterization of small RNAs derived from Citrus exocortis viroid (CEVd) in infected tomato plants. *Virology* **367**, 135-146.
- MARTIN, W. H. (1922). Spindle tuber, a new potato trouble. *Hints to potato growers, N.J. State Potato Assoc.* **3**.
- MARTÍNEZ DE ALBA, A. E., FLORES, R., HERNÁNDEZ, C. (2002). Two chloroplastic viroids induce the accumulation of the small RNAs associated with post-transcriptional gene silencing. *J. Virol.* **76**, 3094-3096.
- MARTÍNEZ DE ALBA, A. E., SÄGESSER, R., TABLER, M., TSAGRIS, M. (2003). A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds potato spindle tuber viroid RNA *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* **77**, 9685-9694.
- MARTÍNEZ-SORIANO, J. P., GALINDO-ALONSO, J., MAROON, C. J. M., YUCEL, I., SMITH, D., DIENER, T. O. (1996). Mexican papita viroid: putative ancestor of crop viroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9397-9401.
- MARZLUFF, W. F., HUANG, R. C. (1984). Transcription of RNA in isolated nuclei. En 'Transcription and translation: a practical approach (B. D. Hames, S. J. Higgings, Eds.) pp 89-129. IRL Press. Oxford y Washington DC.
- MATOUSEK, J., TRNENA, L., ARNOLD, L., DEDIC, P., RAKOUSKY, S., STEGER, G., RIESNER, D. (1993). Inhibition of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) infection with DNA oligonucleotides. *Biochimie* **75**, 63-69.
- MATOUSEK, J., SCHRÖDER, A. R., TRNĚNÁ, L., REIMERS, M., BAUMSTARK, T., DĚDIC, P., VLASÁK, J., BECKER, I., KREUZALER, F., FLADUNG, M. (1994). Inhibition of viroid infection by antisense RNA expression in transgenic plants. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **375**, 765-777.
- MATZKE, M. A., BIRCHLER, J. A. (2005). RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 24-35.
- McCALL, M. J., HENDRY, P., JENNINGS, P. A. (1992). Minimal sequence requirements for ribozyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5710-5714.
- MERCATANTI, A., RAINALDI, G., MARIANI, L., MARANGONI, R., CITTI, L. (2002). A method for prediction of accessible sites on an mRNA sequence for target selection of hammerhead ribozymes. *J. Comp. Biol.* **9**, 641-653.
- MICHIEZZI, A., CAGNON, L., BAHNER, I., ROSSI, J. J. (2000). Ribozyme-mediated inhibition of HIV 1 suggests nucleolar trafficking of HIV-1 RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8955-8960.
- MILLER, W. A., HERCUS, T., WATERHOUSE, P. M., GERLACH, W. (1991). A satellite RNA of Barley yellow dwarf virus contains a novel hammerhead structure in the self-cleavage domain. *Virology* **183**, 711-20.
- MOISSARD, G., 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. USA* **103**, 19593-19598.
- MOLINA-SERRANO, D., SUAY, L., SALVADOR, M. L., FLORES, R., DARÒS, J. A. (2007). Processing of RNAs of the family *Ausunviroidae* in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *J. Virol.* **81**, 4363-4366.
- MOLNAR, A., CSORBA, T., LAKATOS, L., VÁRALLYAY, E., LACOMME, C., BURGAYÁN, J. (2005). Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol.* **79**, 7812-7818.
- MORESHT, S., COHEN, S., ASSOR, Z., BAR-JOSEPH, M. (1998). Water relations of Citrus exocortis viroid-infected grapefruit trees in the field. *J. Exp. Bot.* **49**, 1421-1430.

- MOURRAIN, P., BÉCLIN, C., ELMAYAN, T., FEUERBACH, F., GODON, C., MOREL, J. B., JOUETTE, D., LACOMBE, A. M., NIKIC, S., PICAULT, N., RÉMOUÉ, K., SANIAL, M., VO, T. A., VAUCHERET, H. (2000). *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for post-transcriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**, 533-542.
- MÜLBACH, H. P., SÄNGER, H. L. (1979). Viroid replication is inhibited by alpha-amanitin. *Nature* **278**, 185-188.
- NAKAMAYE, K. L., ECKSTEIN, F. (1994). AUA-cleaving hammerhead ribozymes: attempted selection for improved cleavage. *Biochemistry* **33**, 1271-1277.
- NAPOLI, C., LEMIEUX, C., JORGENSEN, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in *trans*. *Plant Cell* **2**, 279-289.
- NAVARRO, B., FLORES, R. (1997). Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11262-11267.
- NAVARRO, J. A., DARÒS, J. A., FLORES, R. (1999). Complexes containing both polarity strands of Avocado sunblotch viroid: identification in chloroplasts and characterization. *Virology* **253**, 77-85.
- NAVARRO, J. A., FLORES, R. (2000). Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. *EMBO J.* **19**, 2662-2670.
- NAVARRO, J. A., VERA, A., FLORES, R. (2000). A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. *Virology* **268**, 218-225.
- NAVARRO, L., BALLESTER, J. F., JUAREZ, J., PINA, J. A., ARREGUI, J. M., BONO, R. (1981). Development of a program for disease-free citrus budwood in Spain. *Proc. Intl. Soc. Citriculture*, 70-73.
- NELSON, J. A., SHEPOTINOVSKAYA, I., UHLENBECK, O. C. (2005). Hammerheads derived from sTRSV show enhanced cleavage and ligation rate constants. *Biochemistry* **44**, 14577-14585.
- NIBLETT, C. L., DICKSON, E., FERNOW, K. H., HORST, R. K., ZAITLIN, M. (1978). Cross-protection among four viroids. *Virology* **91**, 198-203.
- NIU, Q. W., LIN, S. S., REYES, J. L., CHEN, K. C., WU, H. W., YEH, S. D., CHUA, N. H. (2006). Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1420-1428.
- OERKE, E. C. (1994). Estimated crop losses due to pathogens, animal pests and weeds. En 'Crop production and crop protection' (E. C. Oerke, H. W. Dehne, F. Schonbeck, A. Weber, Eds.), pp 72-741. Elsevier: Amsterdam.
- OHNO, T., TAKAMATSU, N., MESHI, T., OKADA, Y. (1983). Hop stunt viroid: molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA. *Nucleic Acids Res.* **11**, 6185-6187.
- OMAROV, R. T., CIOERLIK, J. J., SHOLTHOF, H. B. (2007). RNAi-associated ssRNA-specific ribonucleases in tombusvirus P19 mutant-infected plants and evidence for a discrete siRNA-containing effector complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 1714-1719.
- OWENS, R. A., DIENER, T. O. (1982). RNA intermediates in Potato spindle tuber viroid replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 113-117.
- OWENS, R. A., KHURANA, S. M. P., SMITH, D. R., SINGH, M. N., GARG, I. D. (1992). A new mild strain of Potato spindle tuber viroid isolated from wild *Solanum* spp. in India. *Plant Dis.* **76**, 527-529.
- OWENS, R. A., STEGER, G., HU, Y., FELS, A., HAMMOND, R. W., RIESNER, D. (2001). RNA structural features responsible for Potato spindle tuber viroid pathogenicity. *Virology* **222**, 144-158.
- OWENS, R. A. (2007). Potato spindle tuber viroid: the simplicity paradox resolved? *Mol. Plant Pathol.* **8**, 549-560.
- PALLÁS, V., FLORES, R. (1989). Interactions between citrus exocortis and potato spindle tuber viroids in plants of *Gynura aurantiaca* and *Lycopersicon esculentum*. *Intervirology* **30**, 10-17.

- PALUKAITIS, P. (1987). Potato spindle tuber viroid: investigation of the long-distance, intra-plant transport route. *Virology* **158**, 239-241.
- PAK, J., FIRE, A. (2007). Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science* **315**, 241-244.
- PAN, W. H., CLAWSON, G. A. (2004). Identification of efficient cleavage sites in long-target RNAs. *Methods Mol. Biol.* **252**, 125-144.
- PANDOLFINI, T., MOLESINI, B., AVESANI, L., SPENA, A., POLVERARI, A. (2003). Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the rolC promoter confers systemic disease resistance to *Plum pox virus* without preventing local infection. *BMC Biotechnol.* **3**, 7.
- PANTALEO, V., SZITTYA, G., BURGYÁN, J. (2007). Molecular bases of viral RNA targeting by viral small interfering RNA-programmed RISC. *J. Virol.* **81**, 3797-3806.
- PAPAEFTHIMIOU, I., HAMILTON, A. J., DENTI, M. A., BAULCOMBE, D. C., TSAGRIS, M., TABLER, M. (2001). Replicating Potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2395-2400.
- PELCHAT, M., CÔTÉ, F., PERREAULT, J. P. (2001). Study of the polymerization step of the rolling circle replication of Peach latent mosaic viroid. *Arch. Virol.* **146**, 1753-1763.
- PELCHAT, M., GRENIER, C., PERREAULT, J. P. (2002). Characterization of a viroid-derived RNA promoter for the DNA-dependent RNA polymerase form *Escherichia coli*. *Biochemistry* **41**, 6561-6571.
- PELISSIER, T., WASSENEGGER, M. (2000). A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed DNA methylation. *RNA* **6**, 55-65.
- PERRIMAN, R., BRUENING, G., DENNIS, E. S., PEACOCK, W. J. (1995). Effective ribozyme delivery in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6175-6179.
- PFANNENSTIEL, M. A., SLACK, S. A. (1980). Response of potato cultivars to infection by the Potato spindle tuber viroid. *Phytopathology* **70**, 922-926.
- PFEFFER, S., ZAVOLAN, M., GRASSER, F. A., CHIEN, M., RUSSO, J. J., JU, J., JOHN, B., ENRIGHT, A. J., MARKS, D., SANDER, C., TUSCHL, T. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* **304**, 734-736.
- PFEFFER, S., SEWER, A., LAGOS-QUINTANA, M., SHERIDAN, R., SANDER, C., GRASSER, F. A., VAN DYK, L. F., HO, C. K., SHUMAN, S., CHIEN, M., RUSSO, J. J., JU, J., RANDALL, G., LINDENBACH, B. D., RICE, C. M., SIMON, V., HO, D. D., ZAVOLAN, M., TUSCHL, T. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* **2**, 269-276.
- PLEY, H. W., FLAHERTY, K. M., MCKAY, D. B. (1994). Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature* **372**, 68-74.
- POSTMAN, J. D., HADIDI, A. (1995). Elimination of Apple scar skin viroid from pears by *in vitro* thermotherapy and apical meristem culture. *Acta Hort.* **386**, 536-543.
- PRODY, G. A., BAKOS, J. T., BUZAYAN, J. M., SCHENEIDER, I. R., BRUENING, G. (1986). Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* **231**, 1577-1580.
- PRZYBILSKI, R., GRAF, S., LESCOUTE, A., NELLEN, W., WESTHOF, E., STEGER, G., HAMMANN, C. (2005). Functional hammerhead ribozymes naturally encoded in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **17**, 1877-1885.
- PUCHTA, H., RAMM, K., SÄNGER, H. L. (1988). The molecular structure of Hop latent viroid (HLV) a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucleic Acids Res.* **16**, 4197-4216.
- PUCHTA, H., HEROLD, T., VERHOEVEN, K., ROENHORST, A., RAMM, K., SCHMIDT-PUCHTA, W., SÄNGER, H. L. (1990). A new strain of Potato spindle tuber viroid (PSTVd-N) exhibits major sequence differences as compared to all other PSTVd strains sequence so far. *Plant Mol. Biol.* **15**, 509-511.
- PUCHTA, H., RAMM, K., LUCKINGER, R., HADAS, R., BAR-JOSEPH, M., SÄNGER, H. L. (1991). Primary and secondary structure of Citrus viroid IV (CVd IV), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6640.

- QI, Y., DING, B. (2003a). Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity from an autonomously replicating viroid. *Plant Cell* **15**, 2566-2577.
- QI, Y., DING, B. (2003b). Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *Plant Cell* **15**, 1360-1374.
- QU, F., YE, X., HOU, G., SATO, S., CLEMENTE, T. E., MORRIS, J. (2005). RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *J. Virol.* **79**, 15209-15217.
- QU, J., YE, J., FANG, R. (2007). Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *J. Virol.* **81**, 6690-6699.
- QUERCI, M., OWENS, R. A., BARTOLINI, I., LAZARTE, V., SALAZAR, L. F. (1997). Evidence for heterologous encapsidation of *Potato spindle tuber viroid* in particles of potato leafroll virus. *J. Gen. Virol.* **78**, 1207-1211.
- RACKWITZ, H. R., ROHDE, W., SÄNGER, H. L. (1981). DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature* **291**, 297-301.
- RAKOWSKI, A. G., SZYCHOWSKY, J. A., AVENA, Z. S., SEMANCIK, J. S. (1994). Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroids. *J. Gen. Virol.* **75**, 3581-3584.
- RANDLES, J. W. (2003). Economic impact of viroid diseases. En 'Viroids' (A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, J. S. Semancik, Eds.) pp 3-11. CSIRO Publ.: Collingwood, Aust.
- RATCLIFF, F., MACFARLANE, S., BAULCOMBE, D. C. (1999). Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* **11**, 1207-1216.
- REANWARAKORN, K., SEMANCIK, J. S. (1998). Regulation of pathogenicity of Hop stunt viroid-related group II citrus viroids. *J. Gen. Virol.* **79**, 3163-3171.
- REZAIAN, M. A. (1990). Australian grapevine viroid: evidence for extensive recombination between viroids. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1813-1818.
- RIBEIRO, S. G., LOHUIS, H., GOLDBACH, R., PRINS, M. (2007). Tomato chlorotic mottle virus is a target of RNA silencing but the presence of specific short interfering RNAs does not guarantee resistance in transgenic plants. *J. Virol.* **81**, 1563-1573.
- RIVERA-BUSTAMANTE, R. F., SEMANCIK, J. S. (1989). Properties of a viroid-replicating complex solubilized from nuclei. *J. Gen. Virol.* **70**, 2707-2716.
- ROCHELEAU, L., PELCHAT, M. (2006). The Subviral RNA Database: a toolbox for viroids, the hepatitis delta virus and satellite RNAs research. *BMC Microbiol.* **6**, 24.
- RODIO, M. E., DELGADO, S., FLORES, R., DI SERIO, F. (2006). Variants of Peach latent mosaic viroid inducing peach calico: uneven distribution in infected plants and requirements of the insertion containing the pathogenicity determinant. *J. Gen. Virol.* **87**, 231-240.
- RODIO, M. E., DELGADO, S., DE STRADIS, A., GÓMEZ, M. D., FLORES, R., DI SERIO, F. (2007). A viroid RNA with a specific structural motif inhibits chloroplast development. *Plant Cell* **19**, 3610-3626.
- RODRIGO, I., VERA, P., FRANK, R., CONEJERO, V. (1991). Identification of the viroid-induced tomato pathogenesis-related (PR) protein P23 as the thaumatin-like tomato protein NP24 associated with osmotic stress. *Plant Mol. Biol.* **16**, 931-934.
- ROEDER, R. G. (1976). Eukaryotic nuclear RNA polymerases. En 'RNA Polymerases' (R. Losick, M. Chamberlin, Eds.), pp. 285-329. Cold Spring Harbor. New York.
- ROHDER, W., SÄNGER, H. L. (1981). Detection of complementary RNA intermediates of viroid replication by Northern-blot hybridization. *Biosci. Rep.* **1**, 327-336.
- ROJAS, A., VÁZQUEZ-TELLO, A., FERBEYRE, G., VENANZETTI, F., BACHMANN, L., PAQUIN, B., SBORDONI, V., CEDERGREN, R. (2000). Hammerhead-mediated processing of satellite pDo500 family transcripts from *Dolichopoda* cave crickets. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4037-4043.
- ROMAINE, C. P., HORST, R. K. (1975). Suggested viroid etiology for chrysanthemum chlorotic mottle disease. *Virology* **64**, 86-95.

- RUFFNER, D. E., STORMO, G. D., UHLENBECK, O. C. (1990). Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry* **29**, 10695-10702.
- SAKSMEPRROME, V., ROYCHOWDHURY-SAHA, M., JAYASENA, S., KHVOROVA, A., BURKE, D. H. (2004). Artificial tertiary motifs stabilize *trans*-cleaving hammerhead ribozymes under conditions of submillimolar divalent ions and high temperatures. *RNA* **10**, 1916-1924.
- SAMARSKY, D., FERBEYRES, G., BERTRAND, E., SINGER, R., CEDERGREN, R., FOURNIER, M. (1999). A small nucleolar RNA: ribozyme hybrid cleaves a nucleolar RNA target *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6609-6614.
- SÄNGER, H. L. (1972). An infectious and replicating RNA of low molecular weight: the agent of the exocortis disease of citrus. *Adv. Biosci.* **8**, 103-106.
- SÄNGER, H. L., RAMM, K. (1975). Radioactive labelling of viroid RNA. En 'Modification of the information content of plant cells' (R. Markham, D. R. Davies, D. A. Hopwood, R. W. Horne, Eds.), pp. 229-252, North Holland, Amsterdam.
- SÄNGER, H. L., KLOTZ, G., RIESNER, D., GROSS, H. J., KLEINSCHMIDT, A. K. (1976). Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3852-3856.
- SANO, M., KATO, Y., TAIRA, K. (2006). Sequence-specific interference by small RNAs derived from adenovirus VAI RNA. *FEBS Lett.* **580**, 1553-1564.
- SANO, T., CANDRESSE, T., HAMMOND, R. W., DIENER, T. O., OWENS, R. A. (1992). Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10104-10108.
- SANO, T., NAGAYAMA, A., OGAWA, T., ISHIDA, I., OKADA, Y. (1997). Transgenic potato expressing a double stranded RNA specific ribonuclease is resistant to Potato spindle tuber viroid. *Nature Biotech.* **15**, 1290-1294.
- SANO, T., ISHIGURO, A. (1998). Viability and pathogenicity of intersubgroup viroid chimeras suggest possible involvement of the terminal right region in replication. *Virology* **240**, 238-244.
- SANO, T., MATSUURA, Y. (2004). Accumulation of short interfering RNAs characteristics of RNA silencing precedes recovery of tomato plants from severe symptoms of Potato spindle tuber viroid infection. *J. Gen. Plant. Pathol.* **70**, 50-53.
- SASAKI, M., SHIKATA, E. (1977a). On some properties of hop stunt disease agent, a viroid. *Jap. Acad.* **53**, 109-112.
- SASAKI, M., SHIKATA, E. (1977b). Studies on the host range of hop stunt disease in Japan. *Jap. Acad.* **53**, 103-108.
- SCHERER, L., ROSSI, J. J., WEINBERG, M. S. (2007). Progress and prospects: RNA-based therapies for treatment of HIV infection. *Gene Ther.* **14**, 1057-1064.
- SCHERR, M., ROSSI, J. J. (1998). Rapid determination and quantitation of the accessibility to native RNAs by antisense oligodeoxynucleotides in murine cell extracts. *Nucleic Acids Res.* **26**, 5079-5085.
- SCHERR, M., ROSSI, J. J., SCZAKIEL, G., PATZEL, V. (2000). RNA accessibility prediction: a theoretical approach is consistent with experimental studies in cell extracts. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2455-2461.
- SCHIEBEL, W., PÉLISSIER, T., RIEDEL, L., THALMEIR, S., SCHIEBEL, R., KEMPE, D., LOTTSPEICH, F., SÄNGER, H. L., WASSENEGGER, M. (1988). Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* **10**, 2087-2101.
- SCHINDLER, I. M., MÜHLBACH, H. P. (1992). Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in Potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci.* **84**, 221-229.
- SCHNOELZER, M., HAAS, B., RAMM, K., HOFFMAN, H., SAENGER, H. L. (1985). Correlation between structure and pathogenicity of Potato spindle tuber viroid (PSTV). *EMBO J.* **4**, 2181-2190.
- SCHUMACHER, J., SÄNGER, H. L., RIESNER, D. (1983). Subcellular localization of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue. *EMBO J.* **2**, 1549-1555.

- SCHWACH, F., VAISTIJ, F. E., JONES, L., BAULCOMBE, D. (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**, 1842-1852.
- SCOTT, W. G., FINCH, J. T., KLUG, A. (1995). The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell* **81**, 991-1002.
- SEMANCIK, J. S., WEATHERS, L. G. (1972a). Exocortis disease: evidence for new species of 'infectious' low molecular weight RNA in plants. *Nature New Biology* **237**, 242-244.
- SEMANCIK, J. S., WEATHERS, L. G. (1972b). Exocortis virus: an infectious free-nucleic acid plant virus with unusual properties. *Virology* **46**, 456-466.
- SEMANCIK, J. S., TSURUDA, D., ZANER, L., GEELEN, J. L., WEATHERS, J. G. (1976). Exocortis disease: subcellular distribution of pathogenic (viroid) RNA. *Virology* **80**, 218-221.
- SEMANCIK, J. S., VANDERWOUDE, W. J. (1976). Exocortis viroid: cytopathic effects at the plasma membrane in association with pathogenic RNA. *Virology* **69**, 719-726.
- SEMANCIK, J. S., HARPER, K. L. (1984). Optimal conditions for cell-free synthesis of Citrus exocortis viroid and the question of specificity of RNA polymerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4429-4433.
- SEMANCIK, J. S., CONEJERO, V. (1987). Viroid pathogenesis and expression of biological activity. En 'Viroids and Viroid-like Pathogens' (J. S. Semancik, Ed.), pp. 71-126. Boca Raton: CRC Press.
- SEMANCIK, J. S., SZYCHOWSKI, J. A., RAKOWSKI, A. G., SYMONS, R. H. (1993). Isolates of Citrus exocortis viroid recovered by host and tissue selection. *J. Gen. Virol.* **74**, 2427-2436.
- SERRA, P., BARBOSA, C. J., DARÒS, J. A., FLORES, R., DURÁN-VILA, N. (2008). Citrus viroid V: molecular characterization and synergistic interactions with other members of the genus *Apscaviroid*. *Virology* **370**, 102-112.
- SHAMLOUL, A. M., HADIDI, A., ZHU, S. F., SINGH, R. P., SAGREDO, B. (1997). Sensitive detection of Potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Can. J. Plant Pathol.* **19**, 89-96.
- SHIMAYAMA, T., NISHIKAWA, S., TAIRA, K. (1995). Generality of the NUX rule: kinetic analysis of the results of systematic mutations in the trinucleotide at the cleavage site of hammerhead ribozymes. *Biochemistry* **34**, 3649-3654.
- SHULTZ, E. S., FOLSOM, D. (1923). Transmission, variation, and control of certain degeneration disease of Irish potatoes. *J. Agric. Res.* **25**, 43.
- SIJEN, T., FLEENOR, J., SIMMER, F., THIJSEN, K. L., PARRISH, S., TIMMONS, L., PLASTERK, R. H., FIRE, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**, 465-476.
- SIJEN, T., STEINER, F. A., THIJSEN, K. L., PLASTERK, R. H. (2007). Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science* **315**, 244-247.
- SINGH, R. P., CLARK, M. C. (1971). Infectious low-molecular weight ribonucleic acid from tomato. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **44**, 1077-1083.
- SINGH, R. P., FINNIE, R. E., BAGNALL, R. H. (1971). Losses due to the potato spindle tuber virus. *Am. Potato J.* **48**, 262-267.
- SINGH, R. P. (1977). Piperonyl butoxide as a protectant against Potato spindle tuber viroid infection. *Phytopathology* **67**, 933-935.
- SINGH, R. P., CROWLEY, C. F. (1985). Evaluation of polyacrylamide gel electrophoresis, bioassay and dot-blot methods for the survey of Potato spindle tuber viroid. *Can. Plant Dis. Surv.* **65**, 61-63.
- SINGH, R. P., DEHAAN, T. L., JASWAL, A. S. (1988). A survey of the incidence of Potato spindle tuber viroid in Prince Edward Island using two testing methods. *Can. J. Plant Sci.* **68**, 1229-1236.
- SINGH, R. P., BOUCHER, A., SOMERVILLE, T. H. (1989). Evaluation of chemicals for disinfection of laboratory equipment exposed to potato spindle tuber viroid. *Am. Potato J.* **66**, 239-246.

- SINGH, R. P., BOUCHER, A., WANG, R. G. (1991). Detection, distribution and long-term persistence of Potato spindle tuber viroid in true potato seed from Heilongjiang, China. *Am. Potato J.* **68**, 65-74.
- SINGH, R. P., NIE, X., SINGH, M. (1999). Tomato chlorotic dwarf viroid: an evolutionary link in the origin of pospiviroids. *J. Gen. Virol.* **80**, 2823-2828.
- SINGH, R. P., READY, K. F. M., HADIDI, A. (2003a). Viroids in North America and global distribution of viroid diseases. En: 'Viroids' (A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, J. S. Semancik, Eds.) pp 255-264. CSIRO Publ.: Collingwood, Aust.
- SINGH, R. P., READY, K. F. M., NIE, X. (2003b). Biology. En: 'Viroids' (A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, J. S. Semancik, Eds.) pp 30-48. CSIRO Publ.: Collingwood, Aust.
- SIOUD, M., IVERSEN, P. O. (2005). Ribozymes, DNazymes and small interfering RNAs as therapeutics. *Curr. Drug Targets* **6**, 647-653.
- SIRRI, V., URCUQUI-INCHIMA, S., ROUSSEL, P., HERNÁNDEZ-VERDUN, D. (2008). Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem. Cell Biol.* **129**:13-31.
- SMITH, N. A., SINGH, S. P., WANG, M. B., STOUTJESDIJK, P. A., GREEN, A. G., WATERHOUSE, P. M. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin. *Nature* **407**, 319-320.
- SOGO, J. M., KOLLER, T., DIENER, T. O. (1973). Potato spindle tuber viroid. X. Visualization and size determination by electron microscopy. *Virology* **55**, 70-80.
- SPIEKER, R. L., HAAS, B., CHARNG, Y. C., FREIMÜLLER, K., SÄNGER, H. L. (1990). Primary and secondary structure of a new viroid 'species' (CbVd1) present in the *Coleus blumei* cultivar 'Bienvenue'. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3998.
- SPIEKER, R. L. (1996a). The molecular structure of *Iresine* viroid, a new viroid species from *Iresine herbstii* (beefsteak plant). *J. Gen. Virol.* **77**, 2631-2635.
- SPIEKER, R. L. (1996b). A new sequence variant of *Coleus blumei* viroid-1 from the *Coleus blumei* cultivar "Rainbow Gold". *Arch. Virol.* **141**, 2153-2161.
- SPIEKER, R. L., MARINKOVIC, S., SÄNGER, H. L. (1996). A new sequence variant of *Coleus blumei* viroid 3 from *Coleus blumei* cultivar "Fairway Ruby". *Arch. Virol.* **141**, 1377-1386.
- SPIESMACHER, E., MÜHLBACH, H. P., SCHONOELZER, M., HAAS, B., SÄNGER, H. L. (1983). Oligomeric forms of Potato spindle tuber viroid (PSTV) and of its complementary RNA are present in nuclei isolated from viroid-infected potato cells. *Biosci. Rep.* **3**, 767-774.
- STEGER, G., BAUMSTARK, T., MORCHEN, M., TABLER, M., TSAGRIS, M., SÄNGER, H. L., RIESNER, D. (1992). Structural requirements for viroid processing by RNase T1. *J. Mol. Biol.* **227**, 719-737.
- STERN, D. S., HIGGS, D. C., YANG, J. (1997). Transcription and translation in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* **2**, 308-315.
- SULLIVAN, C. S., GANEM, D. (2005). MicroRNAs and viral infection. *Mol. Cell* **20**, 3-7.
- SULLIVAN, C. S., GRUNDHOFF, A. T., TEVETHIA, S., PIPAS, J. M., GANEM, D. (2005). SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* **435**, 682-686.
- SULLENGER, B. A., CECH, T. R. (1993). Tethering ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science* **262**, 1566-1569.
- SYLLER, J., MARCZEWSKI, W., PAWLOWICZ, J. (1997). Transmission by aphids of Potato spindle tuber viroid encapsidated by Potato leafroll luteovirus particles. *Eur. J. Plant Pathol.* **103**, 285-289.
- SYMONS, R. H. (1981). Avocado sunblotch viroid: primary structure and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Res.* **9**, 6527-6537.
- SYMONS, R. H. (1991). Ribozymes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **10**, 189-234.
- SYMONS, R. H. (1992). Small catalytic RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 641-671.
- SYMONS, R. H. (1997). Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Res.* **15**, 2683-2689.

- TABLER, M., OMÁN, M., TZORTZAKAKI, S., SCZAKIEL, G. (1994). A three-nucleotide helix I is sufficient for full activity of a hammerhead ribozyme: advantages of an asymmetric design. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3958-3965.
- TABLER, M., TSAGRIS, M. (2004). Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci.* **9**, 339-348.
- TAKAHASHI, T., DIENER, T. O. (1975). Potato spindle tuber viroid. XIV. Replication in nuclei isolated from infected leaves. *Virology* **64**, 106-114.
- TAKAHASHI, T. (1987). Plant viroid diseases occurring in Japan. *Jap. Agric. Res. Quart.* **21**, 184-191.
- TAKEDA, A., TSUKUDA, M., MIZUMOTO, H., OKAMOTO, K., KAIDO, M., MISE, K., OKUNO, T. (2005). A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO J.* **24**, 3147-3157.
- TENLLADO, F., DÍAZ-RUIZ, J. R. (2001). Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *J. Virol.* **75**, 12288-12297.
- TENLLADO, F., BARAJAS, D., VARGAS, M., ATENCIO, F. A., GONZÁLEZ-JARA, P., DÍAZ-RUIZ, J. R. (2003a). Transient expression of homologous hairpin RNA causes interference with plant virus infection and is overcome by a virus encoded suppressor of gene silencing. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**, 149-158.
- TENLLADO, F., MARTÍNEZ-GARCÍA, B., VARGAS, M., DÍAZ-RUIZ, J. R. (2003b). Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnol.* **3**.
- TIEN, P. (1985). Viroids and viroid diseases in China. En 'Subviral pathogens of plants and animals: viroids and prions.' (K. Maramorosch, J. J. McKelvey, Eds.), pp 124-136. Academic Press: Orlando, FL.
- TOUGOU, M., FURUTANI, N., YAMAGISHI, N., SHIZUKAWA, Y., TAKAHATA, Y., HIDAKA, S. (2006). Development of resistant transgenic soybeans with inverted repeat-coat protein genes of Soybean dwarf virus. *Plant Cell Rep.* **25**, 1213-1218.
- TSAGRIS, M., TABLER, M., MÜHLBACH, H. P., SÄNGER, H. L. (1987a). Linear oligomeric Potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs are accurately processed *in vitro* to the monomeric circular viroid proper when incubated with a nuclear extract from healthy potato cells. *EMBO J.* **6**, 2173-2183.
- TSAGRIS, M., TABLER, M., SÄNGER, H. L. (1987b). Oligomeric Potato spindle tuber viroid (PSTV) RNA does not process autocatalytically under conditions where other RNAs do. *Virology* **157**, 227-231.
- TSAGRIS, M., TABLER, M., SÄNGER, H. L. (1991). Ribonuclease T1 generates circular RNA molecules from viroid-specific RNA transcripts by cleavage and intramolecular ligation. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1605-1612.
- UHLENBECK, O. C. (1987). A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* **328**, 596-600.
- VAISTIJ, F. E., JONES, L., 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**, 857-867.
- VAN DER KROL, A. R., MUR, L. A., BELD, M., MOL, J. N., STUITJE, A. R. (1990). Flavonoid genes in *Petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**, 291-299.
- VAUCHERET, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* **20**, 759-771.
- VÁZQUEZ, F., VAUCHERTET, H., RAJAGOPALAN, R., LEPERS, C., GASCIOLLI, V., MALLORY, A., HILBERT, J. L., BARTEL, D., CRÉTÉ, P. (2004). Endogenous *trans*-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Mol. Cell* **16**, 69-79.
- VERDEL, A., JIA, S., GERBER, S., SUGIYAMA, T., GYGY, S., GREWAL, S. I., MOAZED, D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* **303**, 672-676.
- VIDAL, A. M., BEN-CHEIKH, W., TALÓN, M., GARCÍA-MARTÍNEZ, J. L. (2003). Regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression and gibberellin content in citrus by temperature and Citrus exocortis viroid. *Planta* **217**, 442-448.

- VOGT, U., PELISSIER, T., PUTZ, A., RAZVI, F., FISHER, R., WASSENEGGER, M. (2004). Viroid-induced RNA silencing of GFP-viroid fusion transgenes does not induce extensive spreading of methylation or transitive silencing. *Plant J.* **38**, 107-118.
- VOINNET, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* **17**, 449-459.
- VOINNET, O. (2005a). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 206-220.
- VOINNET, O. (2005b). Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Lett.* **579**, 5858-5871.
- WALTER, J., McLEOD, R. (1982). New records of plant diseases in New South Wales 1981-82. *Dept. Agric. Plant Dis. Survey* 1981-82.
- WAHN, D., ROSENBERG DE GÓMEZ, R., SÄNGER, H. L. (1980). Cytopathic effects at the plasma membrane in association with pathogenic RNA. *J. Gen. Virol.* **49**, 355-365.
- WANG, M. B., ABBOTT, D. C., WATERHOUSE, P. M. (2000). A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to Barley yellow dwarf virus. *Mol. Plant Pathol.* **1**, 347-356.
- WANG, M. B., BIAN, X. Y., WU, L. M., LIU, L. X., SMITH, N. A., ISENEGGER, D., WU, R. M., MASUTA, C., VANCE, V. B., WATSON, J. M., REZAIAN, A., DENNIS, E. S., WATERHOUSE, P. M. (2004). On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 3275-3280.
- WANG, Y., ZHONG, X., ITAYA, A., DING, B. (2007). Evidence for the existence of the loop E motif of Potato spindle tuber viroid *in vivo*. *J. Virol.* **81**, 2074-2077.
- WARASHINA, M., KUWABARA, T., KATO, Y., SANO, M., TAIRA, K. (2001). RNA-protein hybrid ribozymes that efficiently cleave any mRNA independently of the structure of the target RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5572-5577.
- WARRILOW, D., SYMONS, R. H. (1999). Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato *in vivo*. *Arch. Virol.* **144**, 2367-2375.
- WASSENEGGER, M., HEIMES, S., RIEDEL, L., SANGER, H. L. (1994). RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**, 567-576.
- WASSENEGGER, M. (2005). The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell* **122**, 13-16.
- WASSENEGGER, M., KRCZAL, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.* **11**, 142-151.
- WATERHOUSE, P. M., GRAHAM, M. W., WANG, M. B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13959-13964.
- WATERHOUSE, P. M., WANG, M. B., LOUGH, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-842.
- WATERHOUSE, P. M., HELLIWELL, C. A. (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 29-38.
- WEINBERG, M. S., ROSSI, J. J. (2005). Comparative single-turnover kinetic analyses of *trans*-cleaving hammerhead ribozymes with naturally derived non-conserved sequence motifs. *FEBS Lett.* **579**, 1619-1624.
- WOO, Y. M., ITAYA, A., OWENS, R. A., TANG, L., HAMMOND, R. W., CHOU, H. C., LAI, M. M. C., DING, B. (1999). Characterization of nuclear import of Potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *Plant J.* **17**, 627-635.
- XAYAPHOUMMINE, A., BUCHER, T., ISAMBERT, H. (2005). Kinofold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots. *Nucleic Acid Res.* **33**, 605-610.
- XIE, Z., FAN, B., CHAN, C., CHAN, Z. (2001). An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6516-6521.

- XIE, Z., JOHANSEN, L. K., GUSTAFSON, A. M., KASSCHAU, K. D., LELLIS, A. D., ZILBERMAN, D., JACOBSEN, S. E., CARRINGTON, J. C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* **2**, 1-11.
- XIE, Z., ALLEN, E., WILKEN, A., CARRINGTON, J. C. (2005). DICER-LIKE 4 functions in *trans*-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12984-12999.
- YANG, X., YIE, Y., ZHU, F., LIU, Y., KANG, L., WANG, X., TIEN, P. (1997). Ribozyme-mediated high resistance against Potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4861-4865.
- YOSHIKAWA, N., TAKAHASHI, T. (1986). Inhibition of Hop stunt viroid replication by α -amanitin. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* **93**, 62-71.
- YU, D., FAN, B., MACFARLANE, S., 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.
- YUKAWA, Y., MATOUSEK, J., GRIMM, M., VRBA, L., STEGER, G., SUGIURA, M., BEIER, H. (2002). Plant 7SL RNA and tRNA (Tyr) genes with inserted antisense sequences are efficiently expressed in an *in vitro* transcription system from *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Mol. Biol.* **50**, 713-723.
- ZABEL, P., WEENEN-SWAANS, H., VAN KAMMEN, A. (1974). *In vitro* replication of Cowpea mosaic virus RNA. I. Isolation and properties of the membrane-bound replicase. *J. Virol.* **14**, 1049-1055.
- ZAMORE, P. D., HALEY, B. (2005). Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* **309**, 1519-1524.
- ZELAZNY, B., RANDLES, J. W., BOCCARDO, G., IMPERIAL, J. S. (1982). The viroid nature of the cadang-cadang disease of coconut palm. *Sci. Filip.* **2**, 45-63.
- ZHANG, Y., EPSTEIN, L. M. (1996). Cloning and characterization of extended hammerheads from a diverse set of caudate amphibians. *Gene* **172**, 183-190.
- ZHAO, Y., OWENS, R. A., HAMMOND, R. W. (2001). Use of a vector based on Potato virus X in a whole plant assay to demonstrate nuclear targeting of Potato spindle tuber viroid. *J. Gen. Virol.* **82**, 1491-1497.
- ZHONG, X., LEONTIS, N., QIAN, S., ITAYA, A., QI, Y., BORIS-LAWRIE, K., DING, B. (2006). Tertiary structural and functional analyses of a viroid RNA motif by isostericity matrix and mutagenesis reveal its essential role in replication. *J. Virol.* **80**, 8566-8581.
- ZHONG, X., TAO, X., STOMBAUGH, J., LEONTIS, N., DING, B. (2007). Tertiary structure and function of an RNA motif required for plant vascular entry to initiate systemic trafficking. *EMBO J.* **26**, 3836-3846.
- ZHU, Y., GREEN, L., WOO, Y. M., OWENS, R., DING, B. (2001). Cellular basis of Potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology* **279**, 69-77.
- ZOUMADAKIS, M., TABLER, M. (1995). Comparative analysis of cleavage rates after systematic permutation of the NUX consensus target motif for hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1192-1196.
- ZUKER, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406-3415.

Agradecimientos

A Ricardo, por abrirme amablemente la puerta de su laboratorio hace ya bastante tiempo, por inculcarme el gusto por tratar de hacer bien las cosas, y por todos los buenos consejos que me ha ido dando durante tantas y tantas charlas en su despacho.

A todos mis compañeros del antiguo Lab. 4 y del nuevo Lab. 2.04: Marcos, Emilio, M^a Eugenia, Sonia, Selma, Amine, Douglas, Laura, José Antonio, Diego, y a todos aquellos que nos visitaron durante algún tiempo... Naturalmente, mención especial para Amparo por su calidad humana y su profesionalidad, y para José Antonio por su generosa ayuda durante la Tesis.

A todos aquellos que he ido conociendo en el IBMCP. A Aurora, por estar siempre ahí, en los buenos y en los malos momentos, por tu fiel compañía, tu paciencia conmigo, cariño y alegría. A Brande, por tu amistad, tu sentido del humor, y por compartir conmigo la ilusión por hacer 'medias'. A Diego y Jorge, por ser tan auténticos y divertidos. Y a los del equipo de fútbol del IBMCP: siempre me acordaré de aquel año increíble en que ganábamos todo y disfrutamos como locos...

A todos mis amigos del Lycée, porque es una suerte seguir siéndolo después de tantos años... Y por supuesto a todo el grupete de Náquera, que mira que sois todos buena gente! Verdad, Jose? Sí, también va para ti faltaría más, que mira que te he contado cosas raras de este particular mundo de la Ciencia...Amigo, tu amistad es un auténtico lujo. Y también a mis compañeros de Agrónomos.

A mis padres, por su eterno amor y su apoyo total desde siempre: gracias por transmitirme vuestra fuerza, el valor del esfuerzo y del trabajo, pero sobre todo por contagiarme vuestra alegría e ilusión por la vida. A mis hermanos Jorge y María, por muchas cosas...pero sobre todo por hacerme recientemente tío y padrino! Esta Tesis también va para los peques (Cuchi, Bolonchete y Coquito)..., para sus otros papis Esther y Ramón, para mi abuela, mis tíos de Alcoy y de Alicante, Ximo y Lolín. Y para el resto de la familia que no pudo acompañarme en esta etapa...

A Águeda, por iluminar cada uno de los días de mi vida desde hace ya más de un año, y por haberme elegido como compañero de viaje en esta aventura incierta que es la vida. Por tu amor, tu confianza, tu incondicional paciencia y tu apoyo durante el final de la Tesis.

Y a Selma, por TODO. Porque en realidad ésta Tesis es de los dos. Gracias por creer en mí, por transmitirme tu ilusión por este trabajo, por tu infinita generosidad, por apoyarme y aconsejarme en todo momento, y por portarte conmigo como una auténtica hermana. Xiqueta, gracias para siempre.



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



IBMCP
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas

