

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA



INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS (IBMCP)



MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

**Una proteína de *Arabidopsis thaliana* perteneciente a la familia  
AlkB de dioxigenasas dependientes de hierro (II) y 2-  
oxoglutarato interfiere en el ciclo infeccioso del virus del  
mosaico de la alfalfa**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

*Realizado por:*  
Mireya Martínez Pérez

*Dirigido por:*  
Frederic Aparicio Herrero  
Vicente Pallás Benet

Valencia, Enero de 2016



# ÍNDICE

Introducción .....	1
<b>1.1. El virus del mosaico de la alfalfa (AMV) .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Origen, distribución, impacto económico y principales huéspedes .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2. Transmisión y sintomatología asociada.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3. Estrategias de control.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.4. Organización genómica .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.5. Interacción con factores del huésped.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. La superfamilia de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3. Familia AlkB .....</b>	<b>8</b>
Justificación y objetivos .....	12
Materiales y métodos .....	13
<b>3.1. Materiales .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1.1. Material vegetal .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1.2. Aislado del AMV .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1.3. Cepas bacterianas.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1.4. Plásmidos.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Métodos.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.1. Clonación del fragmento NYFP en el plásmido pET28a y del fragmento atALKBH9B         en el plásmido pGEX-KG .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.2. Purificación de viriones a partir de plantas infectadas.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.3. Expresión de proteínas en sistemas de expresión bacterianos.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.4. Purificación de proteínas en condiciones nativas mediante cromatografía de         afinidad .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.5. Co-inmunoprecipitación de His-atALKBH9B con viriones de AMV .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.6. Detección de proteínas mediante Western Blot .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.7. Estudio filogenético de la proteína atALKBH9B .....</b>	<b>22</b>

3.2.8. Detección de ARN mediante Northern Blot .....	23
3.2.9. Unión de atALKBH9B a ARN viral mediante North-Western .....	25
3.2.10. Reacción de RT-PCR.....	26
3.2.11. Caracterización fenotípica del mutante <i>alkbh9b</i> .....	27
3.2.16. <i>Tissue printing</i> de inflorescencias de plantas de <i>A.thaliana</i> .....	27
Resultados y discusión .....	28
4.1. Interacción entre las proteínas atALKBH9B y CP del AMV .....	28
4.2. Estudio filogenético de la proteína atALKBH9B .....	30
4.3. Interacción entre la proteína atALKBH9B y el ARN 4 del AMV.....	35
4.4. Caracterización del mutante <i>alkbh9b</i> .....	36
4.5. Comparación de los niveles de infección entre plantas de <i>Arabidopsis silvestres</i> y <i>alkbh9b</i> .....	38
Conclusiones .....	45
Referencias bibliográficas.....	46
Anexos.....	52
<b>Anexo I</b> .....	52
<b>Anexo II</b> .....	53

# Introducción



Los virus son parásitos obligados que sobreviven gracias a la manipulación de la maquinaria celular del huésped al que infectan. En concreto, los virus de plantas codifican en su genoma de 4 a 20 proteínas que deben interactuar con factores del huésped para completar el ciclo viral. Estas interacciones provocan cambios bioquímicos, metabólicos y de expresión génica que, en cultivos de interés agronómico, desencadenan una disminución de la productividad (Culver y Padmanabhan, 2007; Pallás y García, 2011). El ciclo completo de un virus consta de varias etapas: replicación, traducción, movimiento célula a célula, movimiento sistémico y transmisión entre plantas. Para conocer el proceso de infección de un virus en una planta es necesario identificar y caracterizar los factores del huésped que el virus requiere para completar su ciclo vital. Uno de los enfoques más comunes para estudiar estas interacciones es el uso de proteínas virales como “cebo” para identificar proteínas del huésped que establezcan interacciones directas con dicha proteína del virus. En trabajos previos realizados en el laboratorio del Prof. Vicente Pallás se han buscado, mediante ensayos de doble híbrido (Y2H), proteínas de la planta que interactúan con la proteína de cubierta (CP) del virus del mosaico de la alfalfa (AMV). La CP está implicada en importantes procesos del ciclo viral, como son la formación de viriones, el mantenimiento de la estabilidad y la regulación de la síntesis y traducción de los ARNs genómicos y subgenómicos, y el movimiento célula a célula (Bol, 2005; Herranz *et al.*, 2012). Además, el AMV, junto con los virus del género *Ilarvirus*, presenta un fenómeno denominado “activación genómica”, que consiste en la necesidad de unión de moléculas de CP a las regiones 3' no codificantes de los ARNs genómicos para que el virus sea infeccioso (Pallás *et al.*, 2013).

Una de las proteínas identificadas en la búsqueda mencionada anteriormente pertenece a la superfamilia de dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y hierro (II) y, más concretamente, a la familia AlkB. Recientemente, se ha observado que dicha proteína se acumula en gránulos citoplasmáticos asociados en algunos casos al citoesqueleto celular (van Beest, 2013). Por tanto, continuando con ese último estudio, en el presente Trabajo Final de Máster se han realizado una serie de estudios para determinar la posible implicación de esta AlkB en el ciclo de infección del AMV.

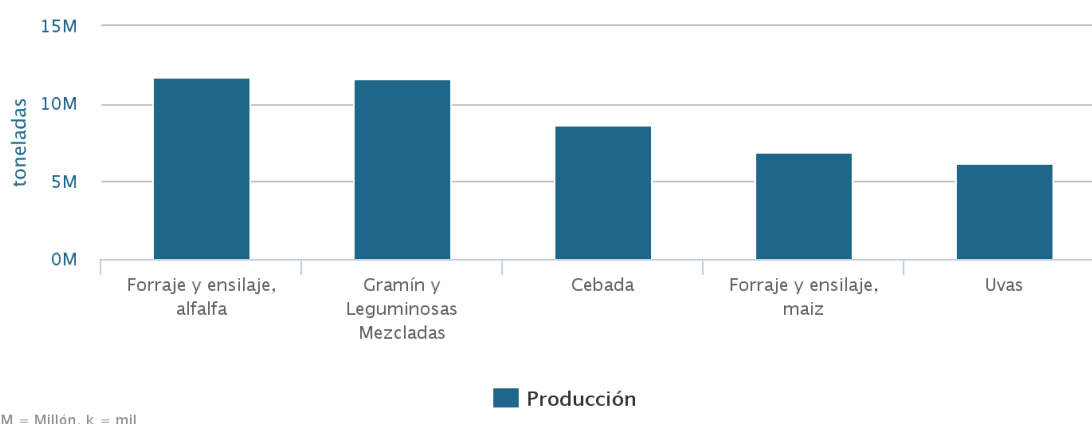
### 1.1. El virus del mosaico de la alfalfa (AMV)

El AMV es el único miembro del género *Alfavirus* dentro de la familia *Bromoviridae*, compuesta por 6 géneros y 33 especies (Comité Internacional de Taxonomía de Virus, ICTV,

<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). Los otros 5 géneros pertenecientes a esta familia son *Anulavirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Ilavirus* y *Oleavirus* (van Regenmortel *et al.*, 2000).

### 1.1.1. Origen, distribución, impacto económico y principales huéspedes

El AMV fue descrito por primera vez por Weimer en 1931 en Estados Unidos como el agente causal de una enfermedad económicamente importante en alfalfa (*Medicago sativa*). Actualmente, este virus afecta a prácticamente todas las zonas de producción de alfalfa a nivel mundial. En España, Díaz-Ruiz y Moreno (1972) purificaron el primer aislado del virus de plantas de alfalfa de los alrededores de Madrid. En países productores como España, Gran Bretaña, Estados Unidos, Canadá, Australia y Nueva Zelanda, se han observado niveles de infección que, en general, no descienden del 50% del cultivo como media, aunque estos niveles dependen de la edad de los alfalfares (Escriu *et al.*, 2011). La gama de huéspedes de este virus es muy amplia. Entre los huéspedes naturales y experimentales se incluyen más de 600 especies de plantas pertenecientes a 70 familias, la mayoría de las cuales son especies herbáceas, y entre las que se incluyen cultivos para alimentación y forraje. Algunos de los mencionados huéspedes son: patata (*Solanum tuberosum*), guisante (*Pisum sativum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Solanum lycopersicon*), soja (*Glycine max*), haba (*Vicia faba*), garbanzo (*Cicer arietinum*), lenteja (*Lens culinaris*) y trébol blanco (*Trifolium repens*), entre otros. Aunque, sin duda, el más estudiado es la alfalfa, el cual se considera el reservorio principal del AMV (Bol, 2008). En España el cultivo de la alfalfa adquiere una importancia especial, ya que, como se observa en la Figura 1, es el cultivo más producido, con casi 12 millones de toneladas en 2013 (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO).



**Figura 1. Producción de cultivos en España.** Fuente: FAOSTAT, 2013.



### 1.1.2. Transmisión y sintomatología asociada

La fácil transmisión del AMV a través de semillas y polen, permite que el virus se perpetúe en los cultivares de alfalfa. Además, se puede transmitir mediante la inoculación mecánica de savia de la planta y por la planta parásita *Cuscuta*. El hecho de que la alfalfa sea un cultivo perenne da la oportunidad a los insectos vectores de aumentar los niveles de infección y colabora a su persistencia en campo debido a la coincidencia en el tiempo entre parcelas de distinta edad. Se conocen diversas especies de pulgones que, al alimentarse de una planta infectada y posteriormente de una sana, pueden actuar como vectores de AMV, permitiendo su dispersión de unas plantas a otras. Estos vectores son insectos del orden *Hemiptera*, y la familia *Aphididae*, entre los que destacan especies que a menudo colonizan los cultivos de alfalfa, como el pulgón negro de la alfalfa (*Aphis craccivora*), el pulgón verde del guisante (*Acyrtosiphon pisum*) y el pulgón del trébol (*Therioaphis trifolii*); y especies más comunes en cultivos hortícolas, como el pulgón negro del haba (*Aphis fabae*) y el pulgón del melocotonero (*Myzus persicae*). Estos insectos son, en gran parte, los responsables de la rápida difusión del virus en el mismo y en otros cultivos cercanos también susceptibles (Escriu *et al.*, 2011). El síntoma más generalizado y el cual da nombre al AMV es la presencia de moteados o mosaicos amarillos (Figura 2A, 2B), acompañados, en ocasiones, de arrugamiento de las hojas, enanismo, malformaciones y, en los casos más extremos, necrosis de frutos en los cultivos hortícolas (Figura 2C) (Smith *et al.*, 1988). En alfalfa se ha descrito que la disminución de raíces y de la parte aérea de las plantas infectadas, provocada por la reducción del grado de nodulación y, por tanto, de su capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico, da lugar a un menor rendimiento de forraje. Además, la pérdida parcial de fijación de nitrógeno produce una menor cantidad de proteína bruta que disminuye la calidad nutricional y aumenta la susceptibilidad a heladas y climas extremos. Por último, la infección por AMV facilita la infección por otros patógenos (revisado en Escriu *et al.*, 2011).



**Figura 2. Sintomatología asociada al AMV.** Mosaicos amarillos en alfalfa (A) y soja (B), y necrosis en fruto de tomate (C).

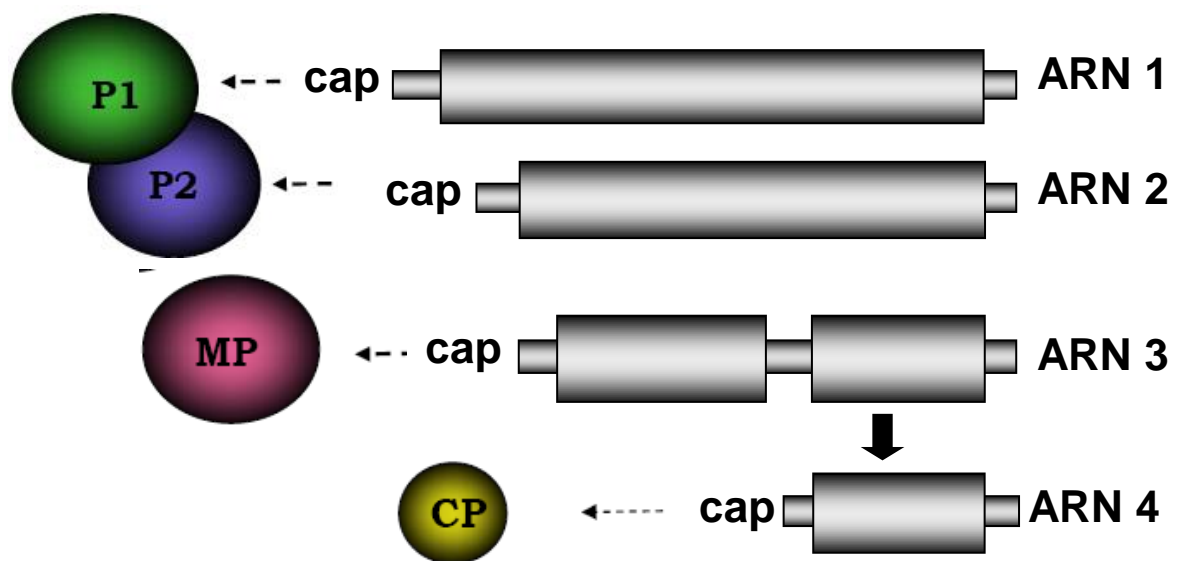
### 1.1.3. Estrategias de control

En la actualidad, las estrategias de control utilizadas se basan en medidas preventivas y buenas prácticas de cultivo. Se pretende evitar la siembra de semilla infectada y la propagación del virus por el movimiento de los áfidos. Sin embargo, el control químico de estos no ha resultado un método eficaz para controlar el AMV. Por ello, se recomienda la siembra de semilla sana, la gestión de las malas hierbas y otras prácticas culturales para minimizar la propagación del virus. Se debe evitar cultivar cerca de cultivos de alfalfa o pasto infectado y mantener el rastrojo, puesto que parece disuadir la presencia de vectores.

Una opción es comprar semillas comerciales en las que se haya comprobado la ausencia de virus, pero si los agricultores conservan su propia semilla deben seleccionarlas de cultivos que no muestren síntomas de infección.

### 1.1.4. Organización genómica

El genoma del AMV, como el resto de miembros de la familia *Bromoviridae*, consiste en 3 moléculas de ARN monocatenario de polaridad positiva, los cuales presentan en el extremo 5' una estructura con función protectora de tipo Cap (m7G5ppp). Por otro lado, el extremo 3' de estos ARNs carece de cola poliA y, en su lugar, muestran una estructura secundaria en forma de tallos y bucles. Los ARNs 1 y 2, ambos monocistrónicos, codifican las dos subunidades que conforman la replicasa viral (P1 y P2, respectivamente). El ARN 3 es bicistrónico y codifica la proteína de movimiento (MP) y la CP, aunque esta última se traduce a partir de un ARN subgenómico (sgARN 4) (Figura 3) (Bol, 2005; Pallás *et al.*, 2013).



**Figura 3. Organización genómica del AMV.** Se muestran los tres ARNs genómicos y el subgenómico 4, así como las proteínas que traducen cada uno, representadas por esferas.

***Proteínas del complejo de la replicasa (P1 y P2)***

La proteína P1 presenta motivos típicos de actividad metiltransferasa, relacionados con el capeado de los ARNs virales, y de unión a nucleótidos trifosfato, implicados en la actividad helicasa (Rozanov *et al.*, 1992). Por otro lado, la proteína P2 consta de un motivo, GDD, que forma parte del centro catalítico de la ARN polimerasa dependiente de ARN (replicasa) de los virus de polaridad positiva (Koonin, 1991).

***Proteína de movimiento (MP)***

Las MPs de los virus están implicadas en el movimiento viral intra e intercelular. Estas proteínas presentan capacidad de unión a ácidos nucleicos, de modificación del tamaño de los plasmodesmos o de interacción con el citoesqueleto celular. En el caso del AMV, la MP pertenece a la superfamilia 30K (Melcher, 2000), cuyos miembros poseen un dominio muy conservado con una región hidrofóbica (Mushegian y Koonin, 1993). Además, la MP del AMV presenta una zona rica en aminoácidos básicos situada antes del mencionado dominio hidrofóbico con capacidad de unión a ARN (Schoumacher *et al.*, 1992). Asimismo, la MP del AMV forma unas estructuras tubulares y se ha propuesto que el virus se mueve célula a célula en forma de complejos ribonucleoproteicos compuestos por CP, MP y ARN viral (Sánchez-Navarro y Bol, 2001).

***Proteína de cubierta (CP)***

La CP del AMV no sólo está implicada en la formación de viriones, sino que también es fundamental en múltiples procesos del ciclo viral, como el mantenimiento de la estabilidad y la regulación de la síntesis y traducción de los ARNs, y el movimiento intercelular (revisado en Bol, 2005). Además, como ya se ha comentado anteriormente, el AMV y los *Ilarvirus* presentan una característica única en la virología vegetal: es necesaria la presencia de unas pocas moléculas de CP o de ARN 4 para ser infecciosos. Este fenómeno se conoce como “activación genómica” y, para que tenga lugar, es imprescindible la unión de la CP a las regiones 3’ no codificantes de los ARNs genómicos (Aparicio *et al.*, 2003; Bol, 2005;). Respecto a la localización subcelular de la CP, se ha identificado una señal de localización nucleolar (NLoS) adyacente al dominio de unión a ARN, y se ha propuesto un modelo en el que la replicación y traducción de este virus estarían regulados por el balance de la acumulación de CP entre el núcleo y el citoplasma (Herranz *et al.*, 2012).

### 1.1.5. Interacciones con factores del huésped

Actualmente el conocimiento sobre las interacciones que establece el AMV con la planta es muy reducido, estando mayoritariamente limitado a la identificación de factores del huésped que directamente interactúan con proteínas virales. Estudios recientes sugieren la formación de complejos entre las subunidades P1, P2 y los ARNs virales asociados a cuerpos vesiculares en la membrana del tonoplasto donde ocurriría la replicación viral (Ibrahim *et al.*, 2012).

Por otra parte, mediante estudios de co-inmunoprecipitación y rastreos de librerías de ADNc (ADN complementario) usando el sistema de los dos híbridos en levadura se ha descrito la interacción entre la MP y la CP con factores del huésped que facilitan u obstaculizan la infección. Peiró y colaboradores (2014) demostraron la interacción entre la MP y dos proteínas de la familia de las Patellinas, la cual dificulta la capacidad de la MP de alcanzar los plasmodesmos, entorpeciendo el transporte intercelular del virus. Asimismo, se ha sugerido que la CP se translocaría al nucleolo mediante su interacción con la importina- $\alpha$  (Herranz *et al.*, 2012). Finalmente, se ha descrito la interacción de la CP con la proteína cloroplástica PsbP, un componente del fotosistema II, y con el factor eIF4G que participarían en los procesos de replicación y traducción del virus, respectivamente (Krab *et al.*, 2005; Balasubramaniam *et al.*, 2014).

### 1.2. La superfamilia de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato

La metilación del ADN y del ARN es una de los procesos químicos más importantes en la regulación funcional de los ácidos nucleicos. En eucariotas, la metilación del ADN (5-metilcitosina, m5C) llevada a cabo por metiltransferasas, dirige a las células a un destino concreto sin modificar su secuencia de ADN (Bird *et al.*, 2007). Recientemente se ha demostrado que esta metilación, producida por agentes alquilantes exógenos y/o endógenos, puede causar lesiones que desencadenan errores en la replicación que pueden dar lugar a tumores o, incluso, provocar la muerte celular debido al bloqueo de la replicación o la transcripción (Yi y He, 2013). Por su parte, la metilación del ARN se produce tanto en regiones codificantes como no codificantes, y también desempeña un papel muy importante en procesos epigenéticos. La metilación reversible sobre el ARN más habitual en mamíferos es la N<sub>6</sub>-metiladenosina (m6A), que determina el destino del ARN mensajero (ARNm) y está ampliamente conservada entre eucariotas superiores (Fu *et al.*, 2014). Por tanto, la metilación m6A parece estar implicada en la estabilidad y traducción de ARNm, pero, al igual que la

metilación del ADN, se ha visto asociada con diversas patologías cuando se presenta en condiciones anómalas.

Las enzimas responsables de la modificación m<sup>6</sup>A sobre el ARN son las denominadas metiltransferasas, las cuales parecen mostrar preferencia por la secuencia [G/A/U][G>A]m<sup>6</sup>AC[U>A>C] (Csepany *et al.*, 1990). En mamíferos se han identificado tres componentes del complejo metiltransferasa encargado de la modificación m<sup>6</sup>A: METTL3, METTL14 y WTAP. METTL3 – cuyo homólogo en *Arabidopsis thaliana* es MTA – forma un heterocomplejo con METTL14, y WTAP – cuyo homólogo en *A. thaliana* es FIP37– (Fu *et al.*, 2014). AtFIP37 es la única diana conocida de la proteína FKBP12, componente de la ruta de rapamicina (TOR), una ruta conservada que regula las respuestas celulares para factores de crecimiento y disponibilidad de nutrientes en Eucariotas (Bodi *et al.*, 2012).

La reacción llevada a cabo por las metiltransferasas puede ser revertida por las proteínas pertenecientes a la superfamilia de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2OGDs). Las 2OGDs conforman la familia enzimática más grande en el genoma de plantas, y, además, están ampliamente extendidas en microorganismos, hongos y mamíferos, participando en funciones relacionadas con la respuesta a estrés, la reparación de ADN, y la biosíntesis antibiótica y de colágeno (Aravind y Koonin, 2001). Se trata de proteínas que requieren de 2-oxoglutarato y oxígeno molecular como co-sustratos, y de hierro no-hemo Fe (II) como un cofactor para catalizar la oxidación de un sustrato a la vez que tiene lugar su propia descarboxilación, formando succinato y dióxido de carbono ( $R + 2OG + O_2 \rightarrow R-OH + \text{succinato} + CO_2$ ). El sitio catalítico de las 2OGDs consiste en una hélice  $\beta$  de doble cadena con el motivo HxD/E...H, el cual se une a Fe (II) formando el set catalítico (Hegg y Que, 1997).

En plantas, las 2OGDs se han clasificado en tres grupos: DOXA, DOXB y DOXC (Kawai *et al.*, 2014). Las de tipo DOXA conforman la familia de homólogos de AlkB de *Escherichia coli*, cuya función es la desmetilación oxidativa de ácidos nucleicos e histonas. Las del grupo DOXB, las prolil-4-hidroxilasas (P4Hs), están involucradas en la síntesis de colágeno y en la señalización hipóxica en mamíferos (Hieta y Myllyharju, 2002). Además, están conservadas en todos los taxones de plantas, donde se encargan de la 4-hidroxilación de la prolina en la síntesis proteica de la pared celular (Keskiaho *et al.*, 2007). Debido a su papel fundamental en el metabolismo primario, ambas, DOXA y DOXB, están conservadas en todos los organismos, desde bacterias a eucariotas. Por último, las 2OGDs de clase DOXC son las encargadas del metabolismo especializado de varios fitoquímicos, incluyendo fitohormonas y flavonoides, y sus clados se han dividido en 5 categorías basándose en su distribución filogenética entre los 6 modelos de plantas: i) clados distribuidos en plantas terrestres, ii) en plantas vasculares, iii) en espermatofitas, iv) en angiospermas, y v) los encontrados únicamente en especies concretas

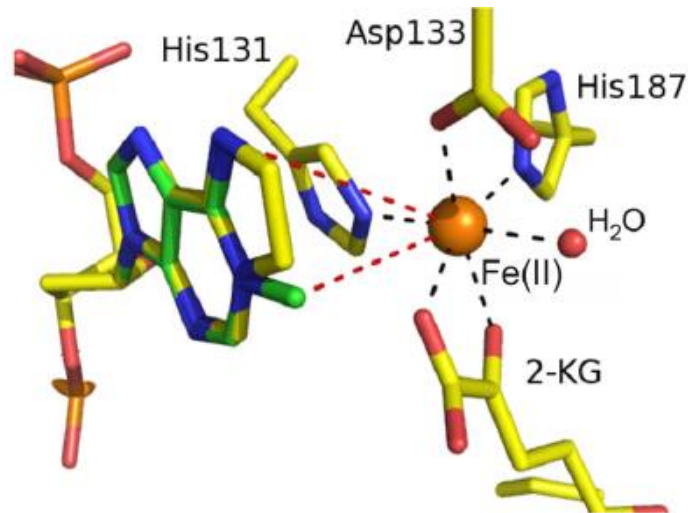
(Kawai *et al.*, 2014). El número de 2OGDs pertenecientes a los tipos DOXA y DOXB parece más o menos constante entre las distintas especies vegetales, mientras que las incluidas en el grupo DOXC presentan grandes variaciones, sugiriendo su implicación en el metabolismo específico de linaje. Su evolución y diversificación es, en parte, responsable de la diversidad y complejidad de los metabolitos especializados en plantas terrestres. Conforme aumenta la complejidad del metabolismo secundario, aumenta el número de dioxigenasas de este tipo (Kawai *et al.*, 2014). En *Arabidopsis*, los genes 2OGD están ampliamente distribuidos a lo largo de su genoma, exceptuando mitocondrias y plastos.

### 1.3. Familia AlkB

Samson y Cairns descubrieron en 1977 un fenómeno en *Escherichia coli* al que se denominó *respuesta adaptativa*. Esta respuesta confiere a la bacteria resistencia a agentes alquilantes y es llevada a cabo, principalmente, por las proteínas Ada, AlkA, AlkB y AldB. Las tres primeras (Ada, AlkA, AlkB) son proteínas de reparación del ADN, siendo AlkB una 2OGDs (Aravind y Koonin, 2001). Por tanto, la proteína AlkB de *E. coli* es una proteína que protege al genoma bacteriano del daño por alquilaciones tales como 1-metiladenina (m1A), 3-metilcitosina (m3C) y 1,N<sup>6</sup>-etenoadenina (εA), utilizando oxígeno molecular para oxidar los grupos alquilo de las bases nitrogenadas (Falnes *et al.*, 2002; Trewick *et al.*, 2002; Delaney *et al.*, 2005). La oxidación de estos grupos repara las bases dañadas y produce la liberación de aldehídos. En los últimos años se han identificado una gran variedad de genes homólogos (ALKBH) en diversos organismos, incluyendo mamíferos y plantas, pero exceptuando levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Los sustratos procesados por estas ALKBH pueden ser ADN o ARN de simple o doble hebra según la especificidad de cada proteína. Asimismo se han encontrado dominios AlkB en las replicasas codificadas por algunos virus de plantas con genomas de ARN de simple cadena que repararían bases alquiladas preferiblemente en el ARN aunque también aceptarían al ADN como sustrato (Bratlie y Dablos, 2005; van den Born *et al.*, 2009).

Respecto a sus características estructurales, la cristalización de algunas ALKBH de humanos (Feng *et al.*, 2014) ha permitido vislumbrar el mecanismo molecular de la desalquilación oxidativa que llevan a cabo. El sitio activo de estas enzimas consiste en un dominio conocido como *jelly roll – remolino*, en castellano –, el cual consta de 8 láminas β organizadas a pares en una conformación helicoidal para formar el corazón que une a los cofactores, Fe (II) y 2-OG, por medio de residuos conservados (Yu *et al.*, 2006). Además, el miembro tipo de *E. coli* interactúa con su sustrato – un oligonucleótido con una base alquilada – por medio de un subdominio de 90 residuos en el fragmento N-terminal, cubriendo el sitio activo con la denominada *tapa de reconocimiento nucleotídico*, cuya flexibilidad permite

acomodar a diversos sustratos. No obstante, existen otros factores que colaboran a esa especificidad de sustrato (Zdzalik *et al.*, 2015). El sitio activo de AlkB contiene, además, un túnel de difusión de oxígeno desde la superficie de la proteína al sitio de unión de oxígeno. El oxígeno molecular (o el agua en condiciones anaeróbicas), el 2-OG y los residuos de AlkB de *E. coli*, His-131, Asp-133 y His-187 forman el octaedro que rodea al Fe (II) (Figura 4). Dos puentes de hidrógeno entre las Asp-204, la Asp-210 y los carboxilatos de 2-OG mantienen al cofactor en su puesto.



**Figura 4. Sitio activo de la proteína AlkB de *E. coli*.** Estructura octaédrica formada alrededor del Fe (II) por agua, 2-OG y los residuos de His-131, Asp-133 y His-187. Fuente: Fedeles *et al.*, 2015.

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la reacción de desalquilación oxidativa catalizada por AlkB es parecido al del resto de dioxigenasas dependientes de hierro no-hemo. En primer lugar se produce la unión del oxígeno molecular a Fe (II) en el sitio activo reemplazando a la molécula de agua. La rotura del oxígeno genera un ligando Fe (IV) que hidroxila el grupo alquilo del sustrato cuando se libera CO<sub>2</sub> a partir de la descarboxilación oxidativa del ligando 2-OG a succinato. El resultado es un producto aldehído y la base reparada (Lu *et al.*, 2014). Cuando se trata de sustratos alquilo simples – como en el caso de m3C y m1A – AlkB oxida el carbono unido a un átomo de nitrógeno de la base nitrogenada. El mecanismo propuesto en el caso de las lesiones por eteno consiste en la oxidación del puente de eteno a un epóxido que es hidrolizado a glicol, liberándose finalmente dialdehído oxálico (revisado en Fedeles *et al.*, 2015).

En mamíferos se conocen 9 homólogos de *AlkB* los cuales se han denominado *ALKBH1-8* en el caso de los 8 primeros y *FTO* (gen de la *proteína asociada a obesidad y masa de grasa*) en el caso del 9 (Liu *et al.*, 2013). Se ha demostrado que en humanos ALKBH5 (hsALKBH5) y FTO presentan actividad de desmetilación del átomo de nitrógeno en la posición 6 de los residuos de adenina del ARN (m6A) (Figura 5) (Zheng *et al.*, 2013). Ambas proteínas han sido

localizadas en el núcleo, aunque no se descarta la posibilidad de translocación al citoplasma bajo ciertas circunstancias. Más concretamente, hsALKBH5 y FTO colocalizan con los llamados motas nucleares (*nuclear speckles*) – dominios nucleares localizados en las regiones intercromatina del nucleoplasma y enriquecidos en factores de procesamiento de pre-ARNm (revisado en Fu *et al.*, 2014).

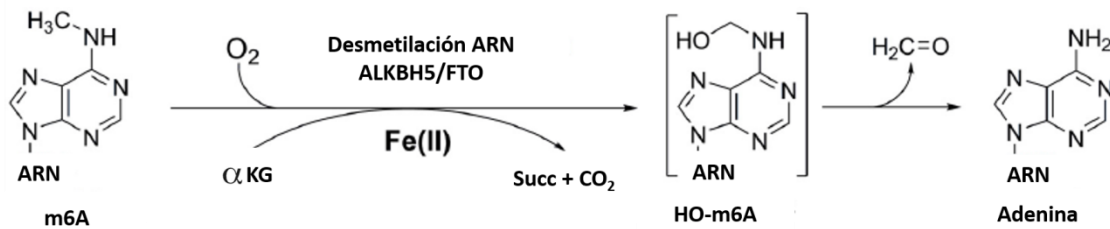


Figura 5. Reacción de desmetilación del Nitrógeno 6 de las adeninas de ARN (m6A), llevada a cabo por las proteínas hsALKB5 y FTO.

En plantas, como ya se ha comentado anteriormente, esta familia conforma la clase DOXA de las 2OGDs, que a su vez se divide en 9 clados. En *A. thaliana* se han descrito 14 genes homólogos de *AlkB* (Kawai *et al.*, 2014). Experimentos realizados para estudiar la localización subcelular 13 de estas proteínas (denominadas *AtALKBH1A*, *1B*, *1C*, *1D*, *AtALKBH2*, *AtALKBH 6*, *AtALKBH 8A*, *8B*, *AtALKBH 9A*, *9B*, *9C*, *AtALKBH 10A*, *10B*) mostraron 6 posibles localizaciones: núcleo-citoplásmica a partes iguales o desiguales – mayoritariamente nuclear o mayoritariamente citoplásmica –, exclusivamente en el núcleo o en el citoplasma y en cloroplastos. En el caso de la proteína *AtALKBH9B* (*at2g17970*) únicamente se observó localización citoplásmica (Mielecki *et al.*, 2012). Más concretamente, en el Trabajo de Fin de Máster realizado por van Beest (2013), se observó que esta proteína formaba gránulos en el citoplasma que parecían estar asociados a microtúbulos (Figura 6).

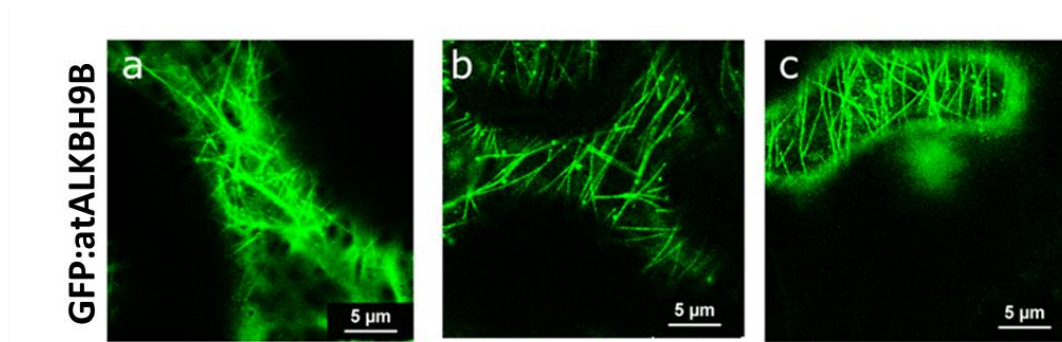


Figura 6. Localización subcelular de la proteína *AtALKBH9B*. Formación de gránulos de la proteína de fusión GFP:AtALKBH9B asociados al citoesqueleto celular (tomado de van Beest, 2013).



Mielecki *et al.* (2012) observaron, en algunos casos, translocación del citoplasma al núcleo o del núcleo al nucléolo de las ALKBH de Arabidopsis después de tratar con el agente alquilante metilmetanosulfonato (MMS), sugiriendo que algunas AtALKBH participarían en la reparación de lesiones alquilantes de ácidos nucleicos localizados en el núcleo y/o nucléolo. La localización de otros homólogos, como AtALKBH9B, exclusivamente en el citoplasma sugiere que participan en la reparación de otros sustratos alquilados distintos al ADN.

Un análisis previo mediante Y2H realizado en el laboratorio del Prof. Vicente Pallás identificó la interacción entre AtALKBH9B y la CP del AMV. En el presente Trabajo de Fin de Máster se pretende dilucidar la implicación de la proteína AtALKBH9B en el ciclo infeccioso del AMV, estudiando sus características estructurales y bioquímicas así como mediante el empleo de un mutante de pérdida de función *alkbh9b* de *A. thaliana*.



# Justificación y objetivos



Los virus requieren de la interacción con diversos factores de huésped al que infectan para poder manipular su maquinaria celular y completar su ciclo infeccioso. Mediante el sistema de doble híbrido se identificó la interacción entre la CP del AMV y la proteína de *A. thaliana* atALKBH9B (at2g17970), la cual pertenece a la superfamilia de las 2OGDs y, dentro de esta, a la familia AlkB. En plantas, las 2OGDs se han clasificado en tres grupos: DOXA, DOXB y DOXC (Kawai *et al.*, 2014). Las de tipo DOXA son las que conforman la familia de homólogos de AlkB de *Escherichia coli*, cuya función es la desmetilación oxidativa de ácidos nucleicos e histonas (Mielecki *et al.*, 2012). En *A. thaliana* se han descrito 14 genes homólogos de *AlkB* (*AtALKBH*), y trabajos previos han estudiado la localización subcelular de 13 de las proteínas codificadas por estos genes (Mielecki *et al.*, 2012). La proteína AtALKBH9B únicamente se encontró en el citoplasma, observándose la formación de gránulos que parecían estar asociados a microtúbulos (van Beest, 2013).

El objetivo general del presente Trabajo de Fin de Máster es dilucidar la implicación de la proteína AtALKBH9B en el ciclo infeccioso del AMV, y, para ello, se han abordado los siguientes objetivos parciales:

1. Corroborar la interacción identificada por Y2H entre la CP del AMV y la proteína atALKBH9B mediante un procedimiento distinto.
2. Realizar un estudio filogenético de la proteína atALKBH9B.
3. Comprobar la capacidad de unión de la proteína atALKBH9B con el ARN del AMV.
4. Estudiar la implicación de la proteína atALKBH9B en la infección por AMV en plantas de *A. thaliana* silvestres y mutantes de pérdida de función (*alkbh9b*).



# Materiales y métodos





### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Material vegetal

##### ***Plantas de Nicotiana benthamiana***

Para realizar la purificación de viriones de AMV se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* en estadio de desarrollo de 4 a 6 hojas, cultivadas en una mezcla de turba y vermiculita. Se mantuvieron en fitotrón con las siguientes condiciones:

- Régimen térmico de 25°C/18°C (día/noche).
- Humedad relativa de 60-65%/95-100% (día/noche).
- Fotoperiodo de 16 h de luz y 8h de oscuridad con una irradiancia de 65-85  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  suministrada por tubos fluorescentes con un intervalo de longitud de onda de entre 400-700 nm.

##### ***Plantas de Arabidopsis thaliana silvestres y mutantes para el gen atALKBH9B***

Para llevar a cabo el estudio de la implicación de la proteína atALKBH9B en la infección por AMV, se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 silvestres y de mutantes de pérdida de función para el gen *ALKBH9B* (*alkbh9b*). Este mutante (at2g17970; SALK\_015591) fue obtenido del centro Europeo de reposición NASC y es una planta homocigota que contiene una inserción de T-DNA. Las semillas se mantuvieron a 4°C y las plantas se crecieron en un fitotrón bajo las condiciones ya descritas anteriormente.

#### 3.1.2. Aislado del AMV

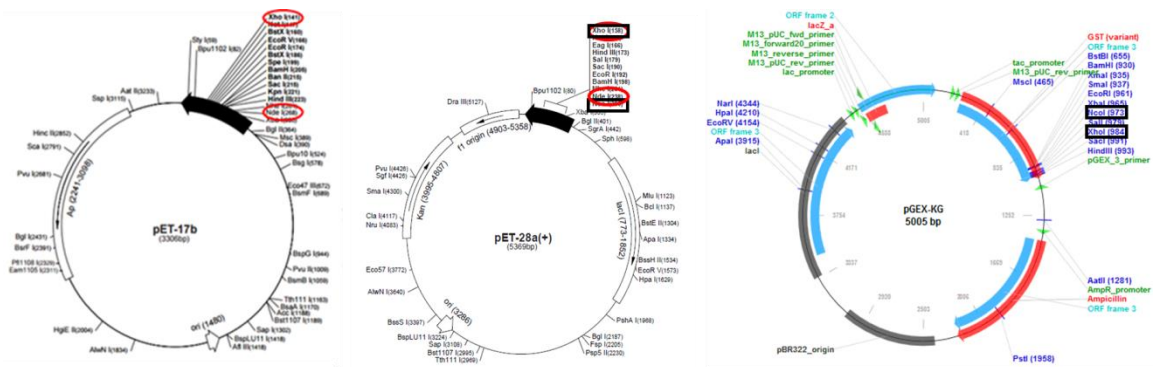
El aislado del AMV empleado en el presente trabajo es la cepa PV0196 obtenida de la colección de virus de plantas de Alemania (DSMZ GmbH). Para la inoculación de las plantas se utilizó virión purificado. Se realizaron pequeñas heridas en las hojas utilizando el compuesto abrasivo carborundum, y se frotaron con el virión disuelto en tampón fosfato 30mM en una relación 1:1.

#### 3.1.3. Cepas bacterianas

Las bacterias empleadas para la amplificación de los plásmidos y para la expresión y purificación de las proteínas de interés fueron las cepa DH5 $\alpha$  y BL21 de *E. coli*, respectivamente. Se utilizaron bacterias BL21 comunes y las derivadas de estas, Rosetta(DE3)pLysS, las cuales contienen tARNs para codones raramente usados en *E. coli*.

### 3.1.4. Plásmidos

Los plásmidos que se usaron en el desarrollo del trabajo fueron pET-17b (Novagen), pET28a (Novagen) y pGEX-KG (GE Healthcare Life Sciences). Desde el plásmido pET-17b (Figura 7, izquierda) se obtuvo el fragmento N-terminal del gen de la proteína amarilla fluorescente (YFP) (NYFP), utilizando los puntos de corte de las enzimas de restricción *Nde* I y *Xho* I. Por otro lado, puesto que se disponía del plásmido pET28a (Figura 7, centro) que contenía la ORF (*open reading frame*) del inserto de interés (*atALKBH9B*), este se subclonó en pGEX-KG (Figura 7, derecha), utilizando los puntos de corte de las enzimas de restricción *Nco* I y *Xho* I.



**Figura 7. Representación esquemática de los plásmidos comerciales pET-17b (izquierda), pET28a (centro) y pGEX-KG (derecha). Recuadrados en negro, los sitios de restricción empleados en el presente trabajo.**

El plásmido pET28a fue utilizado para expresar las proteínas de interés, His-NYFP-His y His-*atALKBH9B*, empleadas para analizar la interacción *atALKBH9B*-CP. Este plásmido contiene las colas de histidinas entre las que se clonaron las proteínas, resistencia a kanamicina (*kan*) y, entre otros, los sitios de restricción de las enzimas *Nde* I y *Xho* I. Por otro lado, el plásmido pGEX-KG, confiere resistencia a ampicilina (*amp*) y contiene, entre otros, los sitios de restricción de las enzimas *Nco* I y *Xho* I, fue el utilizado para expresar las proteínas utilizadas para comprobar la unión con el ARN4 del AMV (la glutatión S-transferasa (GST) como control negativo y la proteína de fusión GST-*atALKBH9B*).

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Clonación del fragmento NYFP en el plásmido pET28a y del fragmento *atALKBH9B* en el plásmido pGEX-KG

#### **Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Las digestiones para clonar el gen *NYFP* se realizaron con las enzimas de restricción *Nde* I y *Xho* I (Thermo Fisher Scientific). En el caso de la digestión doble hay que tener en

cuenta si las dos enzimas se pueden utilizar a la vez o no. Para resolver esta cuestión se recurrió a la página web de la casa comercial. Se emplearon las dos enzimas simultáneamente y la reacción de restricción se llevó a cabo durante 2 horas a 37°C en un volumen final de 20 µL en 1X tampón O, 0,5 U/µL de *Nde* I, 1 U/µL de *Xho* I y 2 µg de los correspondientes plásmidos. Por otra parte, para las digestiones para clonar el gen *atALKBH9B* en pGEX-KG se emplearon las enzimas de restricción *Nco* I y *Xho* I (Thermo Fisher Scientific). En este caso la reacción se incubó durante 3 horas a 37°C en un volumen final de 20 µL en 2X tampón TANGO, 0,5 U/µL de *Nde* I, 1 U/ µL de *Xho* I y 2 µg de los correspondientes plásmidos.

#### ***Electroforesis en geles de agarosa***

Para analizar los fragmentos de ADN se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1 o 1,2%. La agarosa se preparó añadiendo 1 o 1,2 g de agarosa a 100 mL 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA pH 8) y calentando la mezcla hasta su disolución. Antes de que la mezcla gelificara, se les añadió 0,1 µg/mL de bromuro de etidio para la tinción de los ácidos nucleicos. Una vez preparado el gel, a las muestras se les añadió la cantidad correspondiente de tampón de carga 6X LB (10 mM Tris-HCl Ph 7,6, 60% glicerol, 60 mM EDTA pH 8.0, 0,03% azul de bromofenol y 0,03% xilencianol) y se cargaron en los pocillos. Para determinar el tamaño de los fragmentos se utilizó el marcador *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). Finalmente, el ADN se visualizó mediante un transiluminador *Vilber Lourmat, ECX-20-M* bajo luz ultravioleta.

#### ***Purificación de ADN a partir de geles de agarosa***

Para la purificación de los fragmentos de ADN separados en geles de agarosa se utilizó el kit comercial *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific). El kit permite obtener altas concentraciones de ADN puro para su utilización en reacciones posteriores. Los fragmentos de gel con los ADNs deseados se cortaron con una espátula bajo luz ultravioleta y se colocaron en tubos Eppendorf. Se pesaron y se añadieron 2 V (volúmenes) de tampón de disolución de agarosa (*Buffer QG*) por gramo de gel. Se incubó a 50°C durante 5-10 min hasta que el fragmento de gel quedó totalmente disuelto y se traspasó la mezcla a una columna de gel de sílice colocada sobre un tubo Eppendorf de 2 mL. Se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm y se descartó el filtrado. Después se procedió al lavado de la columna añadiendo 0,75 mL de tampón de lavado (*Buffer PE*), centrifugando 1 min a 13.000 rpm y retirando el filtrado. Se volvió a centrifugar 1 min a 13.000 rpm para dejar completamente seca la columna y se traspasó la columna a un nuevo tubo Eppendorf. Por último, el ADN retenido en la columna se

eluyó en un volumen adecuado de agua (30-50  $\mu\text{L}$ ), incubando durante 1 min a temperatura ambiente y centrifugando 1 min a 13.000 rpm.

#### **Reacción de ligación de ADN**

Esta reacción permite insertar un fragmento de ADN en un vector de clonación o circularizar un plásmido previamente linealizado. La reacción de ligación se realizó a 25°C durante 3 horas en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  en 1X tampón T4 ADN ligasa (Thermo Fisher Scientific), 0,1 U/  $\mu\text{L}$  de la T4 ADN ligasa y una relación molar inserto:vector de 4:1.

#### **Electroporación de plásmidos en *E.coli***

El producto de la ligación se introdujo en células competentes de *E. coli* mediante electroporación. Para ello se añadió 1/3 del volumen de la reacción de ligación en un vial de células competentes (50  $\mu\text{L}$ ) descongeladas previamente en hielo. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación, con una separación entre electrodos de 2 mm, que fue sometida a un pulso de 2300 V en un electroporador “Gene Pulser Xcell Electroporation System” (BIO-RAD). Las células transformadas se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de medio LB (Luria-Bertani) estéril (10 g triptona, 5 g extracto de levadura y 10 g NaCl por cada litro de medio) y se incubaron a 37°C durante 30-40 min. Posteriormente se sembraron en placas Petri conteniendo medio LB-Agar (solución LB conteniendo 15 g/L de agar) suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37°C durante 24 h. Este procedimiento se empleó tanto para la transformación de las cepas DH5 $\alpha$  como BL21, incluyendo la derivada de esta última, Rosetta.

#### **Selección de bacterias recombinantes mediante PCR de colonias**

La identificación de las colonias recombinantes se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR), utilizando los cebadores pT7 y VP626 para el plásmido pET28a/NYFP, y la pareja VP1885/VP1886 en el caso de pGEX-KG/atALKBH9B (Tabla 1). Esta reacción se llevó a cabo en un termociclador *Mastercycler® pro* de Eppendorf, utilizando la polimerasa *GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase* (Promega). La mezcla de los reactivos se describe a continuación:

5X Tampón GoTaq® Flexi	1X
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dNTPs	0,2 mM
Oligonucleótidos sentido y antisentido	0,2 $\mu\text{M}$
Polimerasa GoTaq 5U/ $\mu\text{L}$	0,025 U/ $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	Hasta 10 $\mu\text{L}$
Colonia de bacteria	---

Las condiciones de amplificación incluyeron un paso previo de desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 15 segundos (s) de desnaturalización a 94°C, 15 s de hibridación a 55°C y 1 min/kb de elongación a 72 °C, continuados de 2 min de incubación a 72°C.

**Tabla 1. Cebadores usados para identificación de las colonias recombinantes y secuenciación de plásmidos.** Las parejas de cebadores pT7/VP626 y VP1885/VP1886 se emplearon para amplificar los insertos de los plásmidos pET28a/NYFP, y pGEX-KG/atALKBH9B, respectivamente. Para la secuenciación de los insertos en los plásmidos pET28a/NYFP y pGEX-KG/atALKBH9B se utilizaron los cebadores pT7 y VP2854, respectivamente.

Nombre del cebador	Secuencia
<b>pT7 (directo)</b>	5'-CTAATACGACTCACTATAG-3'
<b>VP626 (reverso)</b>	5'-AAAAGAATTCGGCCATGATATAGACGTTG-3'
<b>VP1885 (directo)</b>	5'-AACCATGGAAAACGATCCATTTTC-3'
<b>VP1886 (reverso)</b>	5'-AAACGATGCTTAACCGTAGTTTCTTCTAC-3'
<b>VP2854</b>	5'-TCTCTTCACATTAATCAG-3'

#### **Purificación de los plásmidos recombinantes (minipreps)**

La purificación de los plásmidos presentes en la bacteria se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit *GeneJET Plasmid Miniprep* de Thermo Scientific. Previamente, las bacterias se crecieron a 37°C durante alrededor de 18 horas en medio líquido de LB con el antibiótico correspondiente (50 µg/mL kan o amp). Se partió de 3 mL de cultivo y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min y el sedimento (células bacterianas) se resuspendió en 250 µL de solución de resuspensión conteniendo ARNasa A (0,1 mg/mL). Se agitó con el vórtex hasta resuspenderlo totalmente y seguidamente se añadieron 250 µL de solución de lisis celular. Se mezcló por inversión (más de 10 veces) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Después se añadieron 350 µL de solución de neutralización y se mezcló por inversión. Se centrifugó durante 5 min a 13.000 rpm y se transfirió el sobrenadante a la columna de cromatografía. Se colocó la columna en un tubo (proporcionado en el kit) y se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm. Se descartó el filtrado y se añadieron a 500 µL de solución de lavado. Se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm y se descartó el filtrado. Se repitió el lavado y se transfirió la columna a un tubo Eppendorf. Para eluir el plásmido de la columna se añadieron 50 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, se incubó durante 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 2 min a 13.000 rpm. El ADN eluido se guardó a -20°C hasta su uso.

### **Cuantificación de ácidos nucleicos**

Para cuantificar tanto el ADN plasmídico como las extracciones de ARN, se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. La medición de la concentración se hizo con 1  $\mu$ L de muestra, obteniéndose la concentración en ng/ $\mu$ L.

### **Secuenciación de ácidos nucleicos**

Para corroborar su correcta clonación, los plásmidos pET28a/NYFP y pGEX-KG/atALKBH9B fueron secuenciados por el servicio del IBMCP (CSIC-Universidad Politécnica de Valencia) con el cebador del promotor T7 y el cebador VP2854 (Tabla 1) (3,2  $\mu$ M), respectivamente. Se entregaron 5  $\mu$ L del plásmido, siendo la cantidad óptima para secuenciar de 400 ng. (Anexos I y II).

Una vez comprobado, bacterias competentes de la cepa BL21 fueron transformadas con pET28a/NYFP y, bacterias competentes de la cepa Rosetta fueron transformadas con el plásmido pGEX-KG/atALKBH9B, según el protocolo de electroporación descrito anteriormente en este mismo apartado.

### **3.2.2. Purificación de viriones a partir de plantas infectadas**

Para la purificación de partículas virales a partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas se recogieron las hojas sintomáticas a 5 días post-inoculación (dpi), se pesaron y se trituraron en 2 V de tampón de extracción TE (100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM ácido ascórbico, 20 mM EDTA, pH 7,1). Tras transferirlo a tubos Eppendorf, se añadió ½ V de una mezcla de cloroformo:butanol (1:1) y se mezcló con vórtex durante un minuto. Después se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min y se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo y se añadió polietilenglicol 20000 a una concentración final del 5%. Se invirtieron los tubos varias veces y se mantuvo incubando en hielo 15 min. Se precipitó de nuevo a 6500 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en tampón 1X PE (10 mM tampón fosfato, 1mM EDTA), manteniéndolo 20 min a temperatura ambiente. Por último, tras una centrifugación a 6500 rpm durante 5 min se recogió el sobrenadante.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo para comparar la acumulación de virión de AMV en plantas de *A. thaliana*, silvestres y *alkbh9b*. Las muestras analizadas provenían de hojas inoculadas (5 dpi) y planta entera sin hojas inoculadas (9 dpi) de pools de tres plantas.

### **3.2.3. Expresión de proteínas en sistemas de expresión bacterianos**

En 50 mL de LB con kan (50  $\mu$ g/mL) se crecieron, paralelamente, bacterias portadoras de los plásmidos pET28a/NYFP y pET28a/atALKBH9B a 37°C en agitación durante,

aproximadamente, 18 h. A continuación, se refrescó el cultivo añadiendo la cantidad necesaria de este para obtener una densidad óptica ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) final de 0,2 en 200 mL de LB con kan (50  $\mu\text{g/mL}$ ), el cual se puso a crecer de nuevo a a 37°C en agitación hasta alcanzar una  $OD_{600\text{ nm}}$  de 0,7. Una vez se obtuvo la concentración necesaria de cultivo y, puesto que el plásmido pET28a consta del operón lactosa, se añadió el inductor Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 1mM, y se incubó a 25°C durante unas 5 h, también en agitación. Transcurrido este tiempo, las bacterias se precipitaron mediante 15 min de centrifugación a 8.000-10.000 rpm. Por último, se hizo un lavado, resuspendiendo los precipitados en 30 mL de H<sub>2</sub>O y centrifugando de nuevo a 8.000-10.000 rpm durante 10 min.

Para la expresión de las proteínas GST y GST-atALKBH9B en bacterias de la cepa Rosetta se empleó el mismo procedimiento pero se partió de 1 L de cultivo y el medio LB se suplementó con los antibióticos amp (50  $\mu\text{g/mL}$ ) y cloranfenicol (34  $\mu\text{g/mL}$ ). Además, la inducción con IPTG se realizó durante 3 h a 37°C.

### 3.2.4. Purificación de proteínas en condiciones nativas mediante cromatografía de afinidad

Los precipitados de bacterias expresando las proteínas GST y GST-atALKBH9B obtenidos en el apartado 3.2.3. se resuspendieron en 20 mL de tampón fosfato salino (1X PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,3), y se sometieron a 4 ciclos de congelación/descongelación.

A continuación, se añadieron a cada muestra 20U/mL de ADNasa y  $\text{MgCl}_2$  a una concentración final de 4 mM, incubándolas durante unos 45 min a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron durante 30 min a 23500 rpm y se descartaron los precipitados. A los sobrenadantes, recogidos en tubos limpios, se les añadió 1 mL de resina Glutación Sefarosa 4B (GE Healthcare Life Sciences) previamente sometida a 3 lavados con 5 mL 1X PBS. Esta resina consiste en una matriz de 4% de agarosa que contiene unido covalentemente el ligando glutatión, el cual presenta la capacidad de unir selectivamente la proteína GST permitiendo la purificación de proteínas fusionadas a esta. Tras 45 min de incubación a 4°C con dicha resina se realizaron 3 lavados con 1X PBS en columna con el fin de eliminar uniones inespecíficas. Por último, se eluyeron las proteínas GST-atALKBH9B y GST purificadas empleando el tampón de elución compuesto por 50 mM Tris-HCl y 10 mM glutatión reducido (pH 8) (protocolo GE Healthcare Life Sciences). Las proteínas purificadas fueron cuantificadas por el método Bradford.

### 3.2.5. Co-inmunoprecipitación de His-atALKBH9B con virión de AMV

Los precipitados de bacterias expresando las proteínas His-NYFP-His y His-atALKBH9B obtenidos en el paso 3.2.3. se resuspendieron en 10 ml de tampón de resuspensión: 1X TL (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 70% 2-Mercaptoetanol, 20 mM imidazol pH 8), 0,5 % TRITON X-100, un comprimido del coctel inhibidor de proteasas *Complete Mini, EDTA-free* (Roche) y se añadieron 250 µg/mL lisozima y se incubaron a 4°C durante una hora. Posteriormente, los extractos fueron sometidos a 6 series de 10 pulsos de sonicación (*Branson sonifier 250*). Cabe mencionar que los tubos que contenían dichas soluciones fueron depositados en un vaso con hielo durante el proceso para evitar el calentamiento excesivo. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 15-20 min a 9000 rpm y se descartaron los precipitados. A los sobrenadantes, recogidos en tubos limpios, se les añadió 0.5 ml de la resina anti-His (Ni-NTA, Quiagen) en 1X TL2 (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 70% 2-Mercaptoetanol, 20 mM imidazol pH 8, 1 % TRITON X-100), la cual había sido previamente sometida a 3 lavados con 2V de TL2. La resina Ni-NTA consiste en una matriz de Sefarosa CL-6B que contiene níquel-ácido nitiriloacético (Ni-NTA) covalentemente unido. Esta resina exhibe una elevada y selectiva afinidad por proteínas con colas de 6 histidinas. Tras 1 h y 30 min de incubación a 4°C la mezcla se transfirió a columnas de cromatografía de 10 ml y se permitió la elución del extracto. Posteriormente las columnas se lavaron 3 veces con 2,5 ml de TL2 con el fin de eliminar uniones inespecíficas a la resina y se añadieron a cada columna 40 µL de virión (0,5 µg/µL) disueltos en 7,5 ml de TL. Esta incubación se mantuvo a 4°C durante 2 h y 30 min. Transcurrido este tiempo, las columnas se lavaron 3 veces con 2,5 ml de TL1 y, finalmente, se recogieron 6 eluidos de 0,25 ml con tampón de elución TEL (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,25 M NaCl, 35% 2-Mercaptoetanol, 0,5 M imidazol pH 8, 0,5 % TRITON X-100).

### 3.2.6. Detección de proteínas mediante Western Blot

#### ***Preparación del gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)***

La separación de proteínas se realizó en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia del detergente sodiododecilsulfato (SDS), utilizando el sistema MiniProtean 3 (BIO-RAD). Estos geles constan de dos fases: de separación al 10-14% PAGE (10-14% mezcla de acrilamida:bisacrilamida (29:1), 0,375 M Tris pH 8,8, 2% SDS, 0,01% persulfato amónico, 0,001% TEMED) y de concentración al 5% PAGE (5% mezcla de acrilamida:bisacrilamida (29:1), 0,125M Tris pH 6,8, 2% SDS, 0,01% persulfato amónico, 0,001% TEMED). Una vez polimerizada la acrilamida, los geles se montaron en cubetas de



electroforesis y se cubrieron con tampón de electroforesis de proteínas (0,025 M Tris-HCl pH 8,3; 0,2 M glicina; 1% SDS).

#### ***Extracción de proteínas totales de plantas infectadas y electroforesis***

El material vegetal (0,25 mg) se trituró en presencia de nitrógeno líquido, se resuspendió en 3V de tampón de extracción de proteínas Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 0,1 M dithiothreitol, 10% glicerol y 0.01% azul de bromofenol) (Laemmli, 1970) y se incubó a 95°C durante 10 min para desnaturalizar las proteínas. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 s y se cargaron entre 20-40 µL del sobrenadante en geles de poliacrilamida. La electroforesis se llevó a cabo a 100V durante 2 h. Como marcador de peso molecular de proteínas se empleó el marcador *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* de Thermo Scientific. El patrón de proteínas se visualizó mediante la tinción del gel durante 40 min en solución de azul coomassie (2,4 mg/mL, 45% metanol y 10% ácido acético) y, la posterior eliminación del exceso de colorante durante 1-2 h en solución de lavado (45% metanol y 10% ácido acético). El mismo protocolo de tinción se usó para determinar la correcta transferencia de las proteínas a las membranas de PVDF tras la inmunodetección de las proteínas de interés.

#### ***Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF***

Tras su separación por PAGE-SDS, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (polivinilideno fluoruro, Amersham). Las membranas fueron tratadas previamente, sumergiéndolas en metanol al 100% durante 1 min y realizando 3 lavados de 5 min con agua destilada. La transferencia de proteínas a las membranas se realizó con el equipo de transferencia semi-seca *TE 70* de Hoefer™. Para ello, la membrana y el gel se colocaron entre papeles whatman 3MM humedecidos con tampón de electrotransferencia (25 mM Tris base, 192 mM glicina). La transferencia de las proteínas se realizó mediante la aplicación de un campo eléctrico constante de 1 mA/cm<sup>2</sup> de membrana durante 2 h.

#### ***Inmunodetección de proteínas transferidas membranas de PVDF***

Finalizada la transferencia, las membranas se lavaron durante 5 min con solución 1X TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) y posteriormente se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con leche en polvo desnatada al 5%, disuelta en TBST (1X TBS, 0,3% Tween 20). A continuación las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con TBST a la que se añadió el antisuero específico contra la proteína de interés. Para la CP, se usó un anticuerpo comercial policlonal producido en conejo a una dilución 1:3000 (Loewe), y, en el caso de las histidinas, se empleó un anticuerpo monoclonal producido en ratón a una dilución

1:1000 (Roche). Seguidamente se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno en agitación con TBST para eliminar el exceso del anticuerpo de la membrana. Una vez lavadas, las membranas se incubaron 1 h a temperatura ambiente con TBST a la que se añadió el anticuerpo secundario correspondiente (dilución 1:10000), que reconoce la fracción constante del correspondiente anticuerpo primario, conjugado a la peroxidasa (Amersham). Con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo secundario se realizaron 3 lavados consecutivos de 7 min cada uno con TBST y otro con TBS, todos ellos a temperatura ambiente. Finalmente, el revelado de la membrana se realizó preparando el sustrato quimioluminiscente especial para la fosfatasa alcalina, utilizando el kit *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific). La solución que contenía el sustrato se aplicó sobre la membrana durante 5 min en oscuridad. Para la detección de la señal quimio-luminiscente, la membrana se expuso a películas autorradiográficas (Amersham) durante 10-30 min y se revelaron automáticamente. Todos los pasos del revelado se llevaron a cabo en oscuridad y a temperatura ambiente.

### 3.2.7. Estudio filogenético de la proteína atALKBH9B

Una vez comprobada la interacción entre la proteína atALKBH9B y la proteína de cubierta del AMV, se empleó la herramienta informática BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de la web NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para comparar la secuencia aminoacídica de la proteína contra las secuencias disponibles en las bases de datos. Así se seleccionaron las 34 secuencias proteicas con las que, posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple mediante *Clustal Omega*, disponible en el portal de EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institute*). Finalmente, utilizando dicho alineamiento y gracias al programa MEGA6, se construyó un árbol filogenético sin raíz. Dentro de las opciones que ofrece el programa, se seleccionó el método de mínima evolución como método estadístico, y el análisis Bootstrap, con 10000 repeticiones, como test de filogenia. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson y se encuentran en las unidades de número de sustituciones aminoacídicas por sitio. El árbol de mínima evolución fue registrado utilizando el algoritmo CNI (*Close-Neighbor-Interchange*) a un nivel de búsqueda de 1. El algoritmo *Neighbor-joining* se utilizó para generar el árbol inicial. Todas las posiciones ambiguas fueron retiradas para cada par de secuencias. Se seleccionó el método de Pairwise para el tratamiento de *gaps*.

Según este estudio filogenético, la proteína descrita más similar a atALKBH9B es ALKBH5, por lo que, empleando de nuevo la herramienta BLAST, se llevó a cabo un

alineamiento entre ambas secuencias para identificar el nivel de similitud y los dominios conservados.

### 3.2.8. Detección de ARN mediante Northern Blot

#### ***Preparación de geles de agarosa y electroforesis***

Los geles de agarosa se prepararon disolviendo al 1,5 gr de agarosa en tampón 1X MOPS (20 mM ácido 3-n-morfolino propanosulfónico, 5 mM acetato de sodio. 3H<sub>2</sub>O, 1 mM EDTA), 2% de formaldehído. Por otro lado, antes de cargar las muestras, estas fueron incubadas a 65°C durante 5 min y en hielo 1 min, después de añadirles el tampón de desnaturalización (1X MOPS, 50% formamida, 6,14% formaldehído, 0,05% azul de bromofenol, 0,01 µg/µL bromuro de etidio) en proporción 1:1. La electroforesis se llevó a cabo a 75 V durante 1 h.

#### ***Extracción de ARN total***

Para la extracción de ARN total se utilizaron muestras de material vegetal – 0,1 g, aproximadamente – provenientes de pools de tres plantas. El material vegetal se trituró en presencia de nitrógeno líquido, se resuspendió en 10 V de Ribozol y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Seguidamente, se añadió a las muestras 1/5 parte de cloroformo, se agitaron bien y se incubaron durante 3 min a temperatura ambiente, antes de ser centrifugadas a 14000 rpm durante 10 min (4°C). Se recogió el sobrenadante en tubos Eppendorf nuevos y se repitió el proceso con cloroformo. Esta vez, al sobrenadante rescatado se le añadió 1 V de Isopropanol y las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, obteniendo los pellets de ARN al centrifugar 16 min a 14000 rpm (4°C). A continuación, estos precipitados se resuspendieron en agua y se les añadió un volumen del 10% acetato sódico 3M, mezclándolo con vórtex. Después se añadieron 2,5 V de etanol y se incubaron durante 2 h a -20°C. Transcurrido este tiempo, las muestras se precipitaron mediante una última centrifugación y los precipitados se disolvieron en agua. El ARN obtenido se cuantificó con el NanoDrop tal y como se explica en el apartado 3.2.1.

Para estimar la diferencia en porcentaje de la infección sistémica entre plantas silvestres y mutantes (apartado 4.5.), se realizó una extracción rápida de plantas individuales enteras utilizando tampón de citrato de sodio (50 mM citrato de sodio, 5 mM EDTA).

#### ***Transferencia de ARN a membranas de nylon***

El ARN se transfirió a membranas de nylon cargadas positivamente (Roche) por capilaridad (Sambrook *et al.*, 1989). El gel, enjuagado con agua previamente, fue colocado en

contacto con la membrana entre un par de papeles whatman 3MM y una gran cantidad de papeles absorbentes encima, todo ello humedecido con tampón 10X SSC (0,75M cloruro de sodio, 0,075M citrato de sodio pH 7), y sobre un soporte estable dentro de una bandeja que también contenía tampón 10X SSC. Sobre toda la estructura, un cristal y una botella pesada ejercieron presión.

#### **Hibridación, lavados y revelado**

Tras, aproximadamente, 18 h, se desmontó la estructura y los ácidos nucleicos unidos fueron fijados covalentemente a la membrana mediante exposición a luz ultravioleta ( $700 \times 100 \text{ J/cm}^2$ ). La hibridación, lavados y revelado se realizó siguiendo el procedimiento previamente descrito (Pallas *et al.*, 1988). Para ello, la membrana se introdujo en un tubo de hibridación y se bloqueó con 10 mL de la solución de hibridación (formamida 50%, 5X SSC, N-Lauroyl sarcosine 0,1%, SDS 0,02% y agente bloqueante (Roche) 2x), durante 1-2 horas, a 68°C en un horno de hibridación con rotación suave. Tras ello, se añadió la sonda marcada con digoxigenina y desnaturalizada (5 min a 100°C), al tubo de hibridación, y se dejó incubando toda la noche a la misma temperatura. Las sondas utilizadas fueron una mezcla de 3 fragmentos, de 200 pb cada uno, que reconocían los ARN1, ARN2, ARN3 y ARN4 del AMV, y un fragmento, también de 200 pb, para detectar el gen de la proteína relacionada con patogénesis 1 (PR1) de *A. thaliana* (at2g14610). Posteriormente se realizaron dos lavados de 5 min a temperatura ambiente con 2X SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M citrato sódico) más 0.1% SDS, y tras estos, otros dos lavados de 15 min a 68°C con 0.1X SSC (15 mM NaCl, 1,5 mM citrato sódico) más 0.1% SDS. Después se realizó un lavado con tampón 1 (0,1M ácido maleico, 0,15M NaCl pH 7,5) más 0.3% Tween 20 (SIGMA P-1379) durante 10 min y posteriormente la membrana se bloqueó con tampón 1 más agente bloqueante 1X (ROCHE) durante 30 min, seguidos de otros 30 min con tampón 1 más agente bloqueante 1X y el anticuerpo anti-DIG (fragmentos Fab Anti-Digoxigenina-AP; Roche) a una dilución 1:10000. Tras el bloqueo, se llevaron a cabo 2 lavados empleando tampón 1 más 0.3% Tween 20 durante 15 min, y, seguidamente, otro lavado con tampón 3 (1M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl) durante 5 min. Posteriormente, se sacó la membrana del tubo de hibridación y se metió en una bolsa de plástico con el sustrato quimioluminiscente CSPD (dilución 1:100 en tampón 3, Roche), y se mantuvo en oscuridad durante 5 min, tras los cuales se sacó la membrana de la bolsa y se eliminó el exceso de CSPD sin que la membrana se secase. Una vez hecho esto, se visualizó el resultado mediante exposición fotográfica.

Con el fin de comparar de forma más fiable las diferencias en la infección entre las plantas silvestres y mutantes, las intensidades de las bandas de los ARNs detectados fueron

cuantificadas con el programa ImageJ y las medias obtenidas se compararon estadísticamente mediante el test T de student.

### 3.2.9. Unión de atALKBH9B a ARN viral mediante North-Western

Para obtener transcritos de ARN marcados con digoxigenina se utilizó como molde un ADNc que contenía el ARN 4 del AMV fusionado al promotor T7 en su extremo 5'-terminal. De este modo mediante una reacción de transcripción se obtuvo una ARN correspondiente a la polaridad positiva del ARN 4. La reacción de transcripción se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante (Takara Bio Inc).

Tampón 10X T7 ARN polimerasa	(40 mM Tris-HCl pH 8; 8 mM MgCl <sub>2</sub> ; 2 mM spermidine)
50mM DTT	5 mM
DigNTPs	1 mM
Inhibidor de ARNasa	15U
ADNc molde	250 ng
Polimerasa T7 ARN	20 U
Agua	Hasta 20 µL

Esta mezcla de reacción se incubó durante 2h a 37°C. Posteriormente, se añadió ADNasa (0,5 U/ µL) y se mantuvo a 37°C media hora más para eliminar los restos de ADNc molde que pudieran quedar. El siguiente paso fue la fenolización del ARN, para lo que se añadieron 90 µL de agua y 100 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó en frío durante 5 min a 13000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se precipitó a -20°C añadiendo, en primer lugar, 10% acetato sódico 3M y, posteriormente, 2V de etanol absoluto. Para terminar se realizó una última centrifugación de 15 min a 13000 rpm y se diluyó el pellet en 25 µL de agua. El ARN resultante se cuantificó, y su integridad se confirmó analizando 1 µL de la reacción mediante electroforesis en gel al 1 % ag-TAE.

Por otra parte, las proteínas GST y GST-atALKBH9B purificadas se obtuvieron mediante el método descrito en el apartado 3.2.4. y se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado 3.2.6.). Posteriormente se llevó a cabo la transferencia húmeda a membranas de nitrocelulosa durante 2h a 100 V. Posteriormente las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el tampón de renaturalización (10Mm Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 0,0005% TRITON-X, agente bloqueante 0,1X). A partir de este momento todo el proceso se realizó a temperatura ambiente. El siguiente paso consistió en la incubación con tampón 1 más agente bloqueante 1X (ROCHE) durante 30 min, seguidos de 1 h con tampón 1 más agente bloqueante 1X y el anticuerpo anti-DIG (fragmentos Fab Anti-Digoxigenina-AP; Roche) a una dilución 1:10000. Seguidamente, se realizaron 2 lavados empleando tampón 1 más 0.3%

Tween 20 durante 15 min y otro lavado con tampón 3 (1M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl) durante 5 min. Por último, las membrana se metieron en una bolsa de plástico con el sustrato colorimétrico NBT/BCIP (dilución 1:50 en tampón 3, Roche), y se mantuvieron en oscuridad hasta que aparecieron las bandas, tras lo cual la reacción se paró con agua.

### 3.2.10. Reacción de RT-PCR

Con el fin de comprobar la ausencia del ARN mensajero del gen *ALKBH9B* en las plantas mutantes, se realizó una RT-PCR a partir de ARN total de plantas silvestres y *alkbh9b* – protocolo de extracción descrito en el apartado 3.2.8. – utilizando la pareja de cebadores VP1885/VP1886 (Tabla 1). En algunos casos las muestras se sometieron previamente a un tratamiento con ADNasa. Para ello, se incubó el ARN con 1X tampón ADNasa/ARNasa free y 0,33 U/ $\mu$ L de enzima durante media hora a 37°C. Después, las muestras se fenolizaron, se precipitaron con etanol y se resuspendieron en agua.

Para la reacción de retrotranscripción se incubaron 2  $\mu$ g del ARN total con 20  $\mu$ M del cebador antisentido – añadiendo H<sub>2</sub>O hasta 11  $\mu$ L – a 70 °C durante 5 min. Ya en hielo, se añadió 1X tampón de reacción (5X: 250 mM Tris-HCl pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 1 mM dNTPs y 20 U de inhibidor de ARNasa, completando con H<sub>2</sub>O el volumen hasta 19  $\mu$ L. Tras la incubación de la mezcla a 37°C durante 5 min, esta se completó con 200 U de la transcriptasa reversa *RevertAid<sup>TM</sup> H Minus M-MuLV* (Fermentas). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo a 42°C durante 1h.

El producto de esta reacción se utilizó como molde para la amplificación por PCR, estando compuesta la mezcla por los siguientes reactivos:

Producto de RT	1 $\mu$ L
5X Tampón GoTaq <sup>®</sup> Flexi	1X
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dNTPs	0,2 mM
Oligonucleótidos sentido y antisentido	0,2 $\mu$ M
Polimerasa GoTaq 5U/ $\mu$ L	0,025 U/ $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	Hasta 10 $\mu$ L

Las condiciones de amplificación incluyeron un paso previo de desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de 15 segundos (s) de desnaturalización a 94°C, 15 s de hibridación a 58°C y 1 min/kb de elongación a 72°C, continuados de 2 min de incubación a 72°C.

### 3.2.11. Caracterización fenotípica del mutante *alkbh9b*

Para obtener el peso medio de las plantas silvestres y mutantes de *A. thaliana* estas se sembraron (3 plantas por maceta) y crecieron durante 5 semanas y media en las condiciones descritas en el apartado 3.1.1. Transcurrido este tiempo, se pesó la parte aérea de cada una, eliminando las raíces.

Para realizar los estudios de germinación, las semillas fueron sometidas a un tratamiento de esterilización consistente en la incubación de estas con una solución de lejía comercial al 30% durante 7 min y 3 lavados de 3 minutos con agua estéril. Este tratamiento, además de desinfectar las semillas, facilita la germinación al degradarse la cubierta seminal. Las semillas se sembraron en placas Petri que contenían medio Murashige y Skoog (MS, 0,44 gr/100mL), 1g sacarosa/100 mL y 0,8 g agar/100 mL. En ambos estudios se utilizaron 94 semillas silvestres y 94 *alkbh9b*. Al contrario que en la medida de germinación frente al tiempo, en el análisis de la germinación total no se tuvieron en cuenta las semillas no germinadas.

Los estudios estadísticos de comparación de medias y medianas se realizaron mediante la prueba T de student y U de Mann-Withney, respectivamente.

### 3.2.16. *Tissue printing* de inflorescencias de plantas de *A.thaliana*

Además de analizar la infección por AMV mediante la extracción de ARN y proteínas totales de hojas, se cortaron los tallos de dos inflorescencias de 10 plantas a los 15 dpi y se imprimieron en una membrana de nylon que, posteriormente, fue sometida al proceso de fijación e hibridación (*dot-blot*) descrito en el apartado 3.2.8. del presente trabajo.





# Resultados y discusión



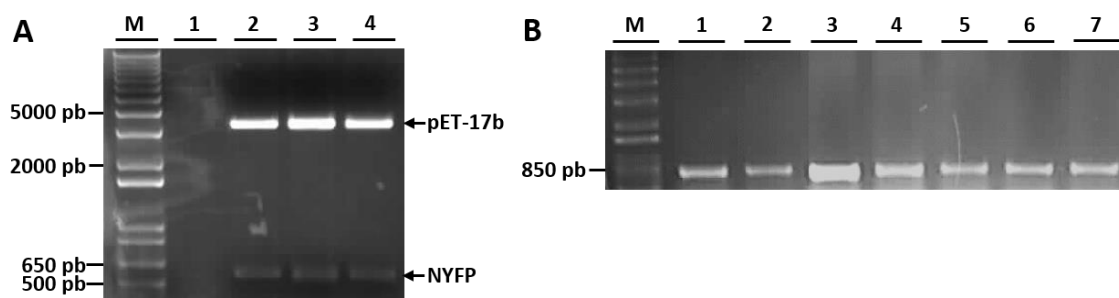
El rastreo de una librería de ADNc de Arabidopsis mediante el sistema de los dos híbridos usando la CP del AMV como cebo realizado en el laboratorio del Prof. Vicente Pallás reveló la interacción de la proteína atALKBH9B con la CP y posteriormente se observó que esta proteína del huésped se acumulaba en unos gránulos citoplasmáticos asociados en algunos casos a los microtúbulos que conforman el citoesqueleto celular (van Beest, 2013). En el presente Trabajo de Fin de Máster se han abordado diversos estudios para profundizar en el conocimiento sobre el papel de la proteína atALKBH9B en el proceso infeccioso del AMV.

#### 4.1. Interacción entre las proteínas atALKBH9B y CP del AMV

Con el fin de corroborar la interacción entre la CP del AMV y la proteína atALKBH9B identificada en el rastreo mediante doble híbrido ya mencionado, se trató de co-inmunoprecipitar *in vivo* complejos formados por ambas proteínas. Sin embargo, no se logró purificar suficiente cantidad de proteína atALKBH9B en condiciones nativas, por lo que se llevó a cabo una co-inmunoprecipitación *in vitro* de complejos atALKBH9B-CP.

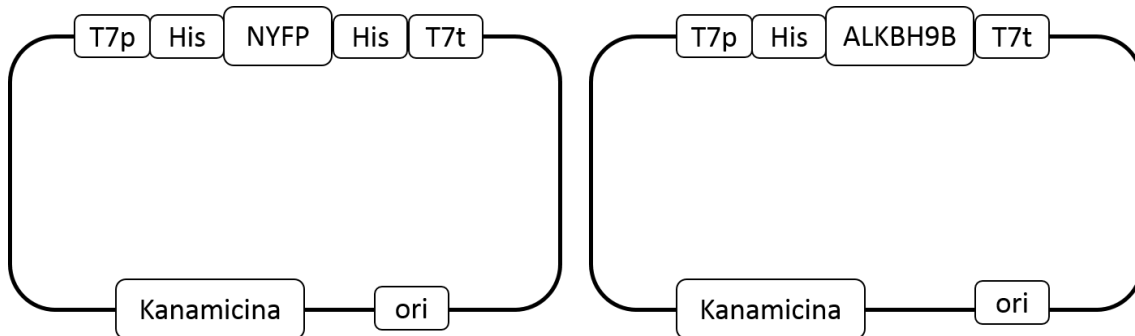
Puesto que ya se disponía del plásmido pET28a/atALKBH9B, el primer paso consistió en la clonación del gen que codifica el extremo N-terminal de la proteína YFP (NYFP) en el plásmido pET28a para utilizarlo como control negativo en los experimentos de co-inmunoprecipitación. Cabe recordar que el plásmido pET28a consta del epítipo His, por medio del cual se purificaron posteriormente las proteínas de interés.

Para obtener el plásmido pET28a/NYFP se partió del plásmido pET-17b/NYFP que fue digerido utilizando las enzimas *Nde* I y *Xho* I. Esta digestión liberó el fragmento correspondiente a la NYFP, (Figura 8A fragmento entre 500 y 650 pb).



**Figura 8. Clonación de NYFP en el vector pET28a/His.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de **A)** la digestión de pET17b-NYFP con las enzimas *Nde* I y *Xho* I (carriles 2,3 y 4), y de **B)** los productos de amplificación a partir de 7 colonias de bacterias transformadas con pET28a/His-NYFP-His. En la parte superior de cada imagen se indica la posición del marcador (M) y la numeración del resto de carriles. A la izquierda se indican los tamaños del marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) en pares de bases.

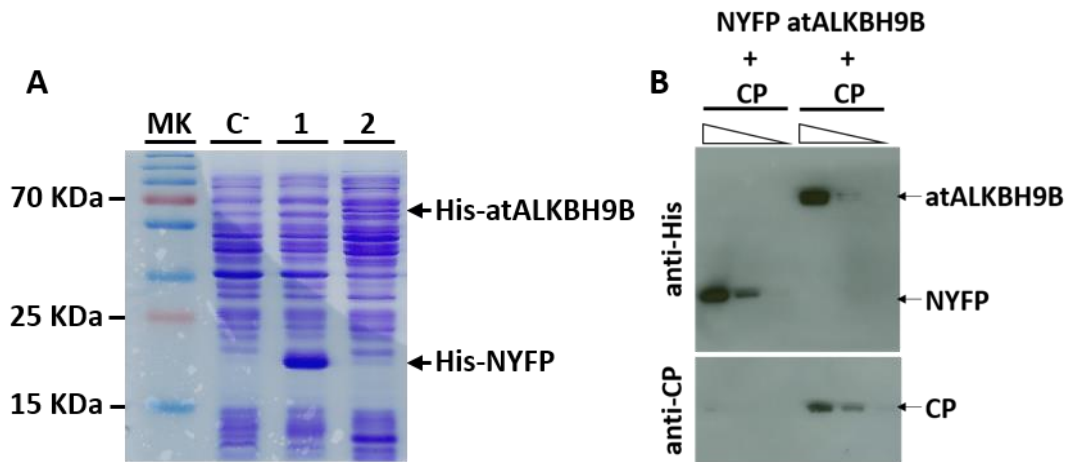
Este fragmento, fue purificado del gel para, posteriormente, llevar a cabo su ligación en el vector pET28a – también digerido previamente con las enzimas *Nde* I y *Xho* I – y, así, obtener la construcción que se esquematiza en la Figura 9. A la izquierda de la imagen se muestra la construcción que contiene el gen *NYFP* y a la derecha el plásmido recombinante con *atALKBH9B*. Como puede observarse mientras que el plásmido pET28a/*NYFP* expresará el fragmento *NYFP* con una cola de histidinas fusionada en sus extremos amino y carboxilo (His-*NYFP*-His), el plásmido pET28a/*atALKBH9B* expresa la proteína *ALKBH9B* con una cola de histidinas fusionada a su extremo amino (His-*ALKBH9B*).



**Figura 9.** Representación esquemática de los vectores pET28a en los que se han clonado los genes que codifican el extremo del N-terminal del YFP (izquierda) y la proteína *atALKBH9B* (derecha). El vector contiene un origen de replicación y un gen de resistencia a kanamicina. Ambos casetes de expresión constan del promotor y del terminador T7, y del gen *NYFP* y *atALKBH9B*, respectivamente, clonados tras una cola de 6 histidinas.

Para identificar las colonias positivas pET28a/*NYFP* tras la transformación de la cepa DH5α de *Escherichia coli* se realizó una PCR de colonias. En la Figura 8B se muestra un ejemplo de amplificación a partir de diferentes colonias de bacterias transformadas con pET28a/*NYFP*. Los plásmidos recombinantes positivos fueron secuenciados para descartar cualquier error durante el proceso de clonación (Anexo I).

Una vez obtenido el plásmido control pET28a/*NYFP*, se indujo, paralelamente, la expresión de proteínas en bacterias de la cepa BL21 transformadas, por un lado, con dicho plásmido control y, por otro, con el plásmido pET28a/*atALKBH9B*. En la Figura 10A se observa la correcta expresión de las proteínas obtenida mediante la adición del inductor IPTG 1mM. En el segundo carril (marcado como C-) se observa un control negativo procedente de bacterias transformadas con el vector vacío, pET28a. Por el contrario, en el tercer carril (marcado como 1; por debajo del marcador de 25 kDa) se observa claramente la expresión de la proteína His-*NYFP*-His y, del mismo modo ocurre con la proteína His-*atALKBH9B* en el cuarto carril (marcado como 2; por debajo del marcador de 70 kDa). Las bandas correspondientes a ambas proteínas se encuentran indicadas en la parte derecha de la imagen.



**Figura 10. Co-inmunoprecipitación atALKBH9B-CP.** A) Extracto de proteínas totales de los cultivos inducidos con IPTG 1mM de *E. Coli* (cepa BL21) transformados con pET28a (C-), pET28a/NYFP (1) y con pET28a/atALKBH9B (2). Los tamaños del marcador de proteínas (MK), PageRuler Plus Prestained Protein Ladder #26619 (Thermo Scientific), se indican a la izquierda de la imagen en kDa. La posición de His-NYFP-His y His-atALKBH9B se indican en la derecha de la imagen. B) Western Blot del eluido procedente de la incubación de virión de AMV con la resina Ni-NTA unida a His-NYFP-His o His-atALKBH9B y sus diluciones seriadas 1:5. Los paneles superior e inferior muestran la detección utilizando el anticuerpo contra el epítipo de histidinas y contra la CP, respectivamente (indicado en la izquierda de la figura).

Las proteínas His-NYFP-His y His-atALKBH9B fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad con la matriz Ni-NTA a través de sus colas de histidinas y posteriormente incubadas con extracto de virión del AMV. Tras una serie de lavados para eliminar la unión inespecífica de las partículas virales, se eluyeron los posibles complejos virión-proteína formados, se separaron en geles SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF por duplicado y se analizaron mediante Western Blot con anticuerpos contra el epítipo de histidinas y contra la CP. El panel superior de la Figura 10B muestra el resultado obtenido al incubar la membrana con el anticuerpo anti-His, en el que, como era de esperar, en cada eluido se detectan ambas proteínas confirmando su correcta expresión. En la parte inferior de la Figura 10B se muestra el resultado de incubar un duplicado de la misma membrana con el anticuerpo anti-CP. La CP fue únicamente detectada en presencia de la proteína atALKBH9B y no en presencia de NYFP corroborando la interacción entre la CP y la proteína atALKBH9B identificada previamente en el sistema de los dos híbridos.

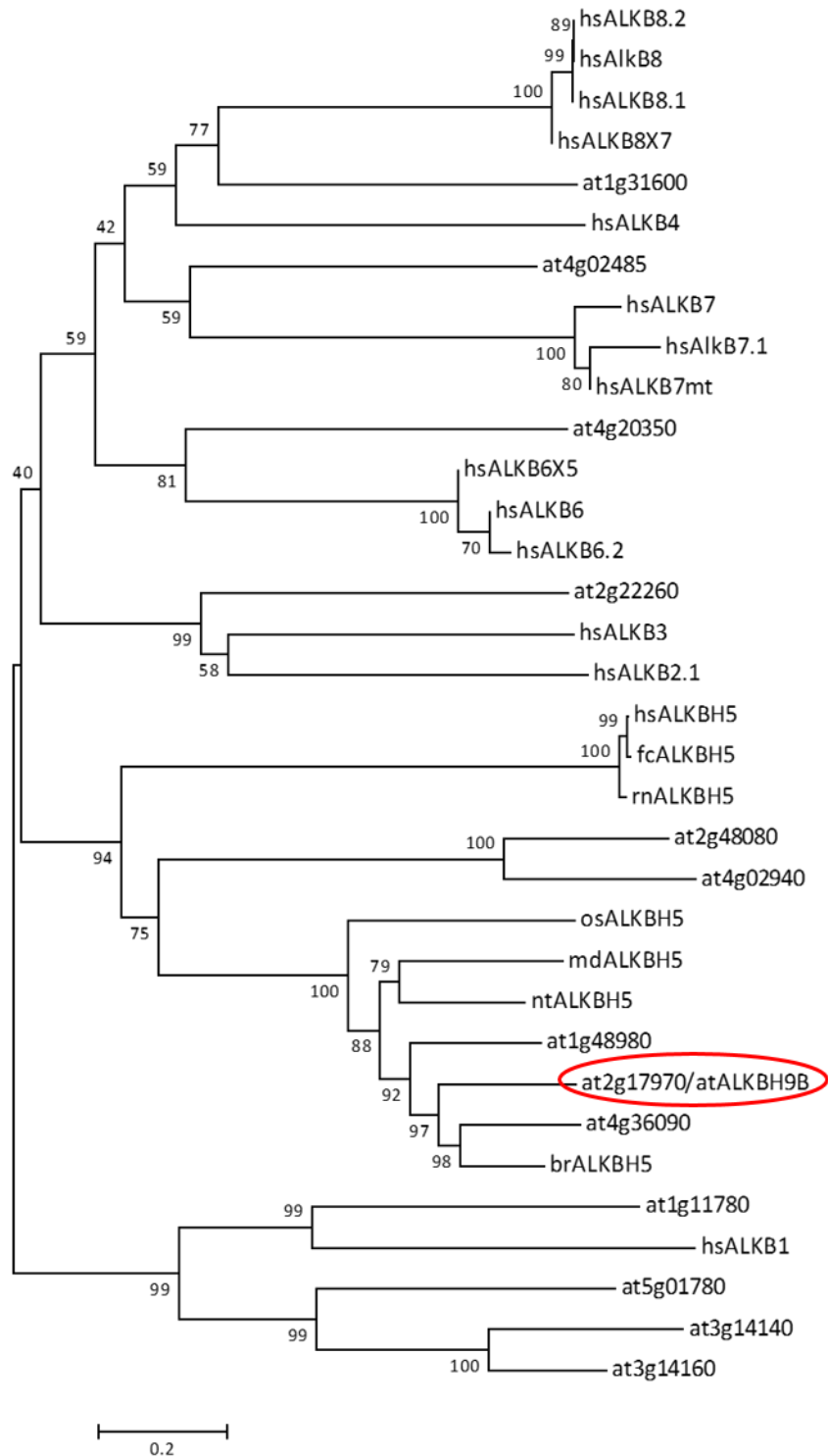
#### 4.2. Estudio filogenético de la proteína atALKBH9B

Una vez confirmada la interacción entre la CP del AMV y la proteína atALKBH9B, se realizó un estudio filogenético comparando esta última con otras proteínas de la misma familia presentes en la misma u otras especies. El resultado de este estudio está reflejado en la Figura

11, en la que aparece un árbol filogenético sin raíz que muestra las distancias evolutivas basándose en la similitud de secuencia.

Las proteínas incluidas en el estudio pertenecen a especies vegetales y de mamíferos. Se excluyeron las AlkB correspondientes a microorganismos, ya que, al diferir más del resto, complicaban el alineamiento y disminuían la fiabilidad de los agrupamientos.

Como se observa en la Figura 11, la proteína atALKBH9B, cuyo *locus name* es at2g17970 – redondeada en rojo – se incluye en un pequeño cluster que contiene a sus homólogas en otras especies vegetales y que, a su vez, pertenece a un grupo mayor en el que se encuentra la proteína ALKBH5 ya descrita y estudiada en mamíferos. Se ha demostrado que, en humanos, esta proteína (hsALKBH5) presenta actividad de desmetilación del átomo de nitrógeno en la posición 6 de los residuos de adenina del ARN (m6A) (Zheng *et al.*, 2013). Esta metilación reversible, m6A, en los ARNm es un mecanismo de regulación génica post-transcripcional. Estudios recientes han descubierto proteínas encargadas de “escribir”, “borrar” y “leer” esta marca química del ARN, indicando papeles reguladores dinámicos similares a las modificaciones epigenéticas reversibles conocidos en ADN e histonas (Fu *et al.*, 2014). Esta metilación reversible en ARN aporta una nueva dimensión al desarrollo de la regulación post-transcripcional de la expresión génica.



**Figura 11. Árbol filogenético sin raíz derivado del análisis Clustal Omega entre proteínas de la familia AlkB pertenecientes a distintas especies.** La proteína atALKBH9B (at2g17970), redondeada en rojo, queda englobada en un pequeño cluster que contiene a sus homólogas en otros vegetales y este, a su vez, en un grupo mayor en el que se encuentra la proteína ALKBH5 ya descrita y estudiada en mamíferos. Hs=homo sapiens, at=arabidopsis thaliana, oz=oryza sativa, rn=rattus norvegicus, fc=felis catus, md=malus domestica, br=brassica rapa, nt=nicotiana tomentosiformis. Los valores bootstrap se indican en cada nodo.

Según nuestros resultados, ALKBH5 es la proteína más cercana evolutivamente a atALKBH9B. La comparación de la secuencia aminoacídica de atALKBH9B y la hsALKBH5, que es la proteína más ampliamente estudiada, (Figura 12) desveló que, a pesar de que la similitud no era muy elevada (30% de posiciones idénticas), sí existían motivos importantes conservados característicos de la superfamilia de dioxigenasas dependientes de 2OG-FeII y de la familia AlkB. El motivo involucrado en la unión a hierro (Fe II), HxD/E...H (Lu *et al.*, 2014) y el motivo RxxxxR se muestran sombreados en amarillo y rojo respectivamente (Figura 12). La primera arginina de este último motivo también formaría parte del octaedro que engloba al Fe (II) y a 2-OG, mientras que la R final parece estar involucrada en la especificidad de sustrato de AlkB (Bratlie y Drablos, 2005). Además, el 2-OG se encontraría estabilizado por dos puentes de hidrógeno formados por los lados de las cadenas de los aminoácidos tirosina (Y) y Asparagina (N) en las posiciones 139 y 193, respectivamente en hsALKBH5, conservados en ambas proteínas y también destacados en rojo.

AlkbH9	222	VFSAVEQKRI--VDQVYQLQEKGRRGELKKRTFTAPHKWMRGKGR	RETIQFGCCYNYAPD	278
		+FS E +I +D+V EKG E H R R FG Y Y		
AlkbH5	94	LFSQDECAKIEARIDEVVSRAEKGLYNE-----HTVDRAPLRNKYFFGEGYTYGAQ		144
			<i>Flip 1</i>	<i>Flip 2</i>
AlkbH9	279	RAGNPPG---ILQREEVDPLPH-LFKVIIRKLIKWHVLPPTCVPDSCIV	IIDEGDCIPP	334
		PG + +VD +P + +++I+KL++ V+P V +S ++	G CI	
AlkbH5	145	LQKRGPQERLYPPGDVDEIPEWVHQLVIQKLVEHRVIEGPFV-NSAVINDIQPGGCIVS		203
			<i>Flip 2</i>	
AlkbH9	335	HIDN-HDFLRPFCTISFLSE	DILFGSNLKEGPGDFSGSYSIPLPVGSVLVLNNGADV	393
		H+D H F RP ++SF S+ + FG + + S+P+ GSV VL+G AD		
AlkbH5	204	HVDPIHIFERPIVSVSFFSDSALCFG	KFQFKPIRVSEPVLSLPVRRGVSVTVLSGYAADE	263
			<i>Flip 3</i>	
AlkbH9	394	AKHCV--PAVPTK	ISITFK	412
		HC+ + +K I RK		
AlkbH5	264	ITHCI	RPDIKERKAVIILRK	284

**Figura 12.** Alineamiento entre las proteínas atALKBH9B (ALKBH9) y hsALKBH5 (ALKBH5), mediante la herramienta BLAST. Subrayados los motivos Flip 1, 2 y 3 en hsALKBH5. En sombreado con distintos colores se indican los residuos necesarios para la correcta actividad de la proteína hsALKBH5.

Feng y colaboradores (2014) proponen una serie de aminoácidos como los responsables de la actividad de la proteína hsALKBH5. Para sus ensayos utilizan una forma truncada, correspondiente a un fragmento comprendido entre los aminoácidos 66 y 292. Este fragmento es el que recoge en su mayoría el alineamiento entre atALKBH9B y hsALKBH5 que se observa en la Figura 12. Las diferencias estructurales más importantes entre la hsALKBH5 y el resto de proteínas AlkB se encuentran fuera del dominio remolino – también conocido como DSBH y característico de la familia –, en lo que se denomina *tapa de reconocimiento nucleotídico*, dividida en dos motivos, *Flip 1* y *Flip 2*. El motivo *Flip 1*, abarca los aminoácidos



117-129 y contiene una hélice  $\alpha$  y una lámina  $\beta$  mientras que *Flip 2*, está constituido por los aminoácidos 136-165, y contiene un gran *loop* que la hace altamente flexible (indicados en la Figura 12). Dentro de esta región se encuentran, tanto en hsALKBH5 como en atALKBH9B, los residuos Y en las posiciones 139 y 141 (Figura 12, sombreados en rosa), las cuales han sido propuestas como residuos de unión directa a m6A. El residuo Y139 está bastante conservado en la familia AlkB en general, pero, parece que Y-141 podría ser específico de ALKBH5. No obstante, en la región *Flip 2* también se observa un motivo importante no conservado a simple vista, QKR, (Figura 12, sombreado en gris), y posiblemente implicado en la unión al sustrato. Sin embargo, podemos encontrar este conjunto de aminoácidos en las posiciones 228-230 de la proteína atALKBH9B (Figura 12, también sombreado en gris). De hecho, esta zona sí se encuentra alineada entre proteínas de plantas a las que se les ha clasificado mediante predicciones informáticas como ortólogos de ALKBH5. Por otra parte, en la zona intermedia entre *Flip 1* y *Flip 2* también se encuentra conservado el residuo R-130 que podría rotar para contactar con m6A, pero no el residuo de lisina (K) en la posición 132 (Figura 12, sombreados en azul claro). Sin embargo, aunque K-132 parece estar involucrado en la interacción, su ausencia, al contrario que en el caso de R-130, no anula la actividad de atALKBH5, sino que simplemente la disminuye (Feng *et al.*, 2014).

Otra característica estructural de hsALKBH5 es la formación de un puente disulfuro entre la cisteína (C) en la posición 267 y C-230, (Figura 12, indicadas en verde) aunque no se observan cambios importantes en la conformación de la proteína cuando la C-230 es sustituida por un residuo neutro (Feng *et al.*, 2014). En atALKBH9B, el residuo C-267 se encuentra conservado mientras que en el caso de C-230 la cisteína más cercana es la situada en la posición 355 de la numeración en atALKBH9B (Figura 12, también sombreada en verde).

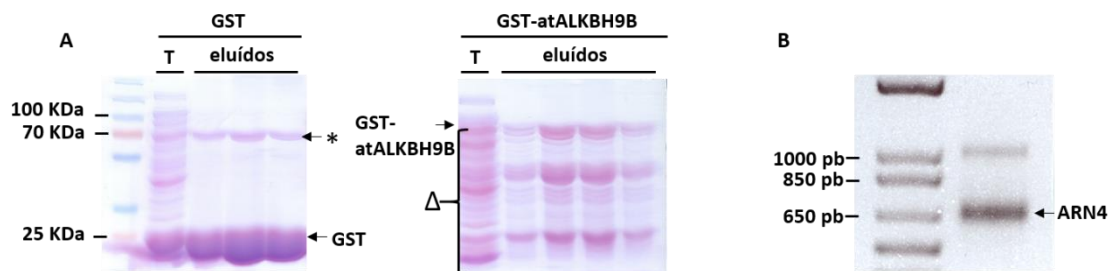
Por otro lado, los residuos 229-242 constituyen el denominado *Flip 3* de hsALKBH5, el cual podría ser el responsable de imposibilitar la unión de esta proteína a ARNs bicatenarios como sustrato (Feng *et al.*, 2014). Curiosamente esta región no está muy conservada en atALKBH9B. Del mismo modo, otros aminoácidos fuera de *Flip 3* que han sido descritos como importantes para mantener el nivel de actividad de hsALKBH5, como R-269 y la glutamina (Q) en la posición 271 (Figura 12, sombreados en gris oscuro), pero que no serían imprescindibles para que exista la desmetilación m6A (Feng *et al.*, 2014) tampoco están conservados en atALKBH9B. Por último, el residuo H-209, el cual es característico de hsALKBH5 pero no del resto de AlkB, también está conservado en atALKBH9B (Figura 12, en morado).

La distinta composición y conformación de *Flip 1* y, especialmente, de *Flip 2* en hsALKBH5 es, probablemente, lo que confiere la selectividad de sustrato característica de esta enzima, (Feng *et al.*, 2014). Es de destacar que, a pesar de su gran distancia filogenética –

puesto que una procede de humanos y otra de plantas – atALKBH9B mantiene conservados todos los residuos que, hasta la fecha, se han demostrado imprescindibles para la actividad de desmetilación m6A que desempeña hsALKBH5. Por tanto, existen indicios para postular que ambas proteínas podrían llevar a cabo la misma función.

### 4.3. Interacción entre la proteína atALKBH9B y el ARN 4 del AMV

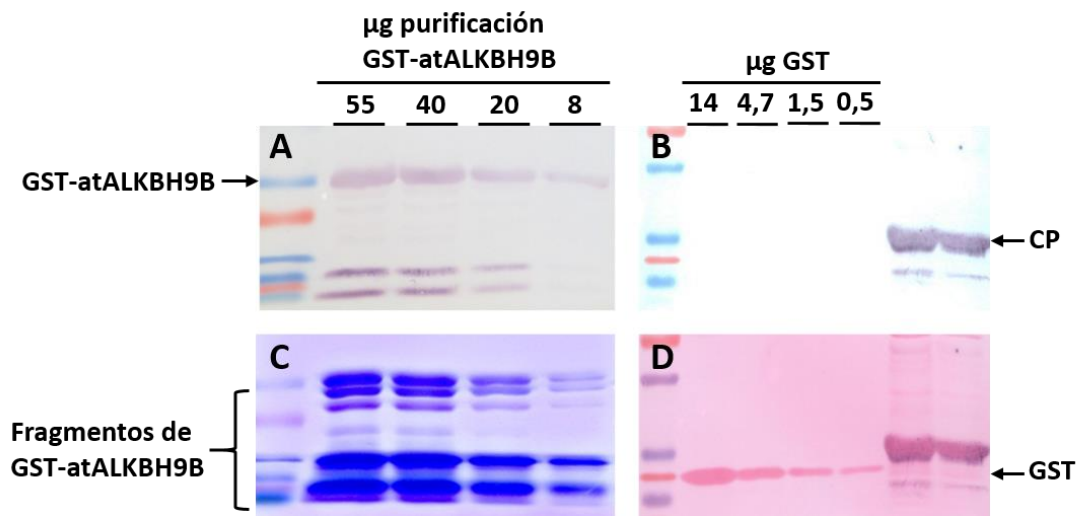
Dadas estas evidencias, se comprobó si atALKBH9B poseía la capacidad de unir ARN. Para ello, se llevó a cabo la purificación de las proteínas GST y GST-atALKBH9B mediante cromatografía de afinidad con la matriz Glutathion Sepharosa (Figura 13A), así como una reacción de transcripción de ARN 4 del AMV marcado con digoxigenina (Figura 13B). Como se observa en la Figura 13A la purificación de la GST da lugar a una banda inespecífica de unos 70 KDa (indicada con un asterisco en la imagen) junto a la propia GST (25 KDa) mientras que la fusión GST-atALKBH9B sufre una fragmentación dando lugar a una escalera de bandas de distintos tamaños que va desde los 80 KDa de la fusión completa (GST-atALKBH9B) hasta un péptido de unos 25-27 KDa (indicado con un triángulo en la figura).



**Figura 13. A)** Eluidos obtenidos en la purificación de las proteínas GST y GST-atALKBH9B. El extracto total previo a la purificación se indica como T. El asterisco (\*) hace referencia a la proteína desconocida de unos 70 KDa purificada junto a la GST, y el triángulo (Δ) a los fragmentos de la proteína GST-atALKBH9B. Los tamaños del marcador de proteínas PageRuler Plus Prestained Protein Ladder #26619 (Thermo Scientific) se indican a la izquierda de la imagen. **B)** Transcrito de ARN 4 del AMV marcado con digoxigenina. A la izquierda se indican los tamaños del marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Concentraciones crecientes de GST y GST-atALKBH9B purificadas se separaron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Asimismo, se incluyó la CP del AMV purificada como un control positivo de la interacción. Tras la incubación de las membranas con ARN 4 de AMV marcado con digoxigenina se observó que el ARN 4 interaccionaba con la GST-atALKBH9B completa y algunos fragmentos de esta y con la CP pero no con la GST (Figura 14A y B). El panel 14C muestra un gel equivalente al empleado para realizar la transferencia a la membrana de la Figura 14A, pudiendo observarse el patrón de purificación de la fusión GST-atALKBH9B. Del mismo modo, la membrana de la Figura 14B se tiñó con Red Ponceau (Figura

14D) para corroborar la presencia de la GST en la membrana. Este resultado demuestra que atALKBH9B tiene capacidad para interactuar *in vitro* con el ARN viral.



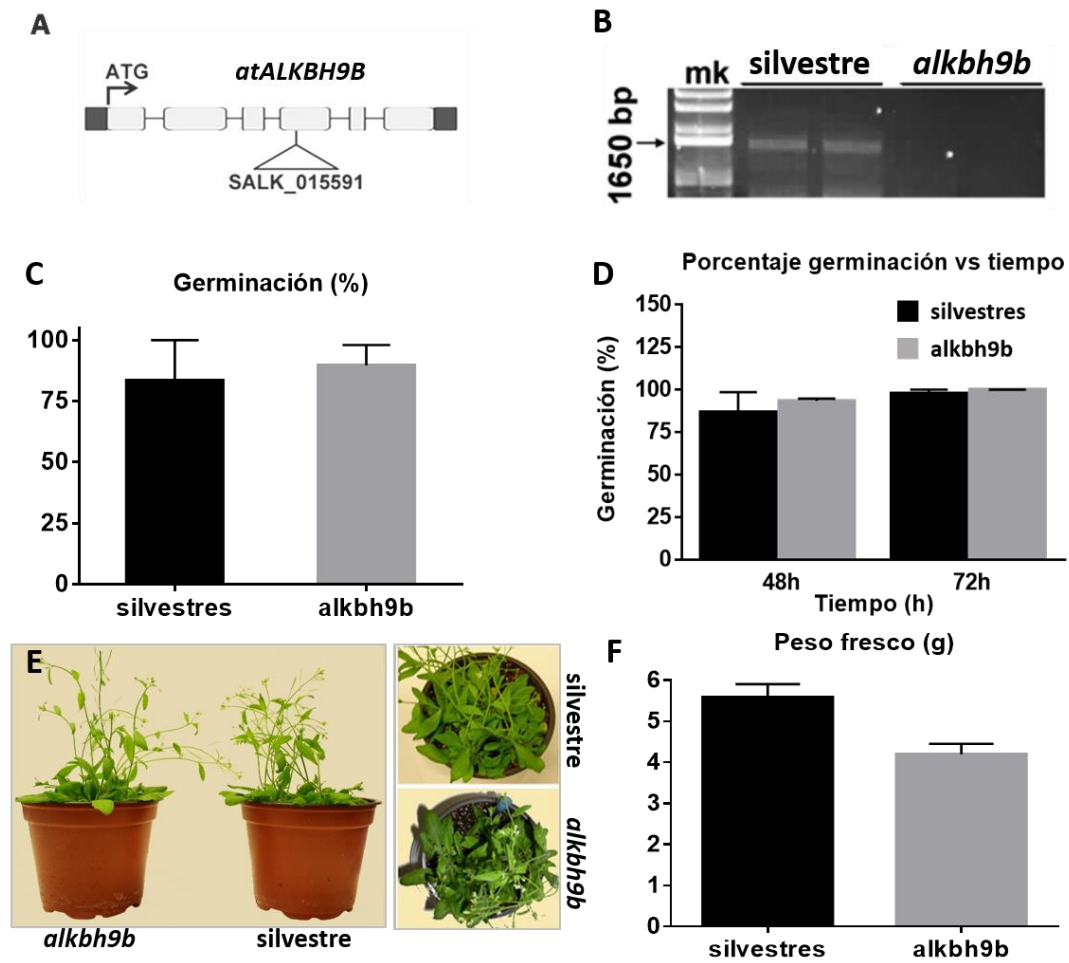
**Figura 14.** North-western de la unión entre la proteína atALKBH9B/GST y el ARN4 del AMV. (A y B) Interacción del ARN4 del AMV con cantidades decrecientes de la fusión GST-atALKBH9B/GST y las proteínas GST y CP del AMV (carriles 5 y 6). (C) Tinción con Coomassie Blue de un gel equivalente a la membrana A. (D) Tinción con Rojo Ponceau de la membrana del panel B. En la parte superior de la figura se indica la cantidad de purificación de proteína empleada para cada carril (µg).

#### 4.4. Caracterización del mutante *alkbh9b*

Una herramienta muy potente para analizar el papel de una proteína huésped en el ciclo viral lo constituye el uso de mutantes de ganancia y pérdida de función del gen de interés. El mutante de Arabidopsis SALK\_015591\_ (*alkbh9*) es un homocigoto que contiene una inserción de T-DNA en el cuarto exón (Figura 15A). Con el fin de comprobar que esta inserción interrumpe la transcripción de un ARN mensajero (ARNm) funcional, se analizó, mediante RT-PCR y cebadores específicos para amplificar el ARNm completo, la acumulación de este ARNm en plantas silvestres y *alkbh9*. Tal y como muestra la Figura 15B, el mensajero completo correspondiente al gen *atALKBH9B* no se amplificó en las plantas mutantes mientras que sí se observa una banda correspondiente al ARNm del tamaño esperado (aproximadamente, 1600 nt) en las plantas silvestres. Estos resultados sugieren que el mutante *alkbh9b* podría ser un mutante de pérdida de función, ya que carece de su ARNm funcional.

Asimismo, se realizaron una serie de experimentos dirigidos a la caracterización fenotípica de dicho mutante. Para ello, se analizó la tasa y tiempo de geminación así como el crecimiento vegetativo de las plantas mutantes respecto a las silvestres. Las gráficas de las Figuras 15C y 15D muestran el porcentaje de germinación total y las diferencias en el tiempo

de germinación, respectivamente. Ninguno de estos parámetros fue significativamente distinto entre las plantas silvestres y *alkbh9b*. En lo que respecta al crecimiento vegetativo, la Figura 15F muestra el peso fresco de la parte aérea de las plantas, en el que sí se encontró una disminución estadísticamente significativa de un 20% en el peso fresco de las plantas mutantes respecto de las silvestres. Así pues, en base a los parámetros evaluados, la carencia de la proteína atALKBH9B estaría afectando algún aspecto del desarrollo vegetativo de la planta.

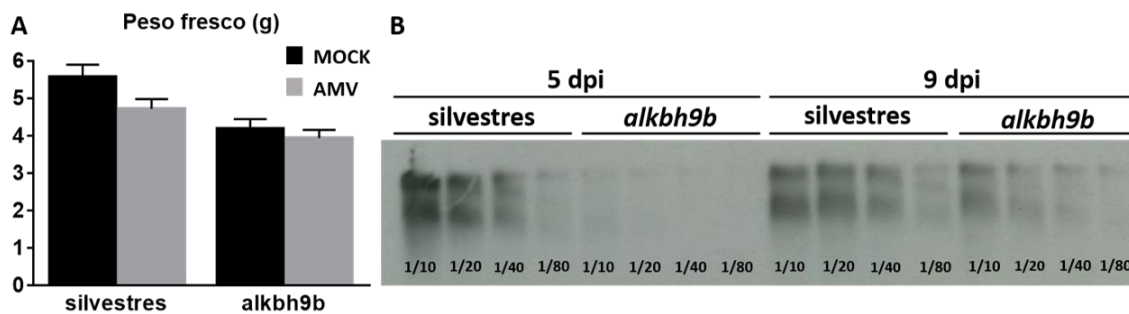


**Figura 15. Caracterización fenotípica del mutante *alkbh9b*.** (A) Representación esquemática de la posición de la inserción T-DNA en el gen *atALKBH9B*. (B) RT-PCR para amplificar el ARNm completo en dos muestras silvestres y dos muestra *alkbh9b* tratadas con ADNasa. (C y D) Comparación de la dormancia de semilla de las plantas silvestres y *alkbh9b* medida como (C) porcentaje de germinación total y (D) porcentaje de germinación frente al tiempo (N=94). Mediana±RI. (E) Imágenes de plantas silvestres y *alkbh9b* (F) Comparación del peso fresco (g) de la parte aérea de plantas silvestres (N=27) y *alkbh9b* (N=33). Media±ESM.

#### 4.5. Comparación de los niveles de infección entre plantas de *Arabidopsis* silvestres y *alkbh9b*

Aparentemente, la infección de AMV en *Arabidopsis* es asintomática. Con el fin de determinar si la infección causa algún efecto sobre el crecimiento vegetativo de la planta se cuantificó el peso fresco de plantas silvestres sanas e infectadas a 20 días post-inoculación (dpi). El resultado, reflejado en la Figura 16A, mostró una disminución estadísticamente significativa de un 18% en el peso fresco de plantas silvestres infectadas respecto de las sanas. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en el caso de las plantas mutantes (Figura 16A). Este hecho podría sugerir que el AMV no afecta por igual a plantas silvestres y *alkbh9b*, por lo que el siguiente paso consistió en la cuantificación del nivel de acumulación del virus en ambas plantas.

En una primera aproximación se comparó la acumulación de virión en hoja inoculada a 5 y 9 dpi. Para ello, se purificaron viriones de una muestra consistente en la mezcla de tres plantas para cada tiempo y se analizaron diluciones de las mismas mediante Northern Blot.

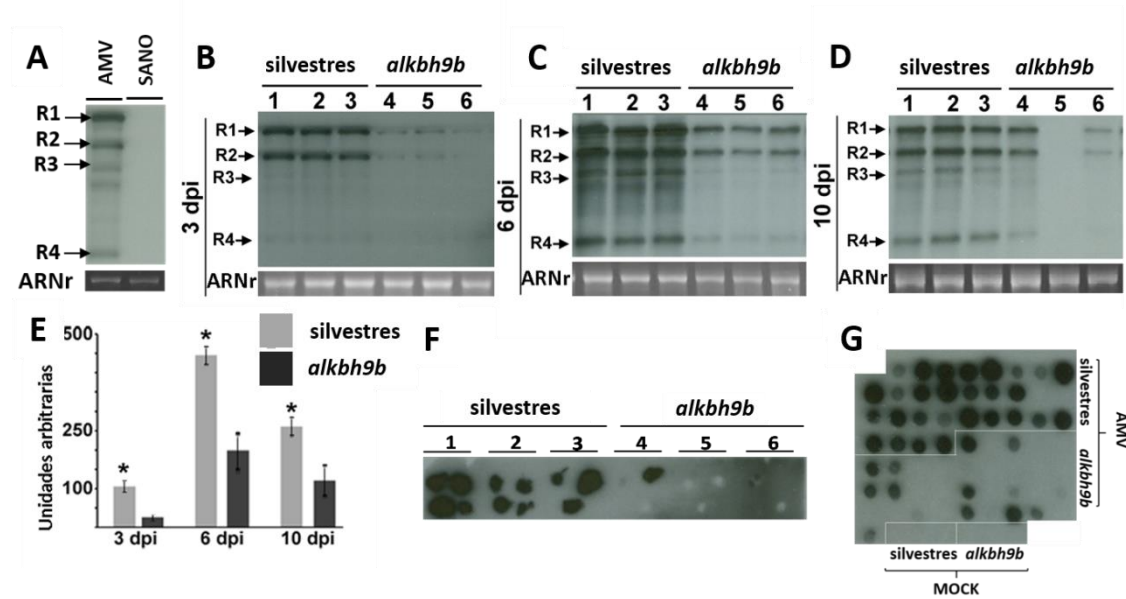


**Figura 16. (A)** Peso fresco (g) de la parte aérea de plantas silvestres sanas (N=27) e infectadas (N=30) y de plantas *alkbh9b* sanas (N=33) e infectadas (N=33). Media±ESM. **(B)** Northern Blot de diluciones seriadas de extracciones de virión de AMV a partir de plantas silvestres y *alkbh9b* de extractos purificados de hoja inoculada a 5 y 9 dpi. En la parte inferior se indica la dilución aplicada.

La Figura 16B muestra el blot correspondiente a la detección de diluciones seriadas del ARN viral encapsidado procedente de cada muestra. En ambos tiempos el nivel de acumulación de virión es menor en la muestra correspondiente a la mezcla de plantas mutantes (unas 8 y 4 veces menor a 5 y 9 dpi, respectivamente).

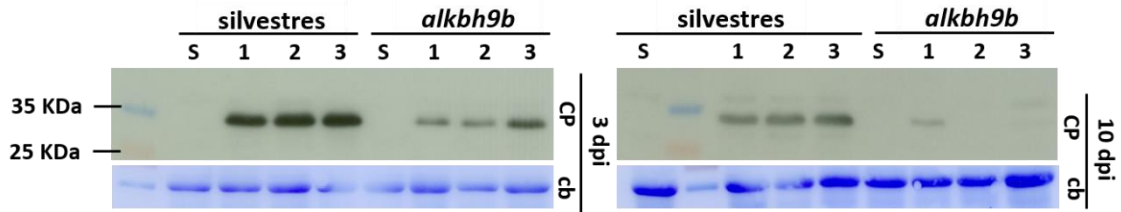
Una vez se comprobó que, efectivamente, existían diferencias en la acumulación de virión entre plantas silvestres y plantas mutantes, se quiso analizar si los procesos de replicación o traducción pudieran estar afectados. Para ello, se analizó la acumulación de ARN viral total y CP a los 3 y 6 dpi en hojas inoculadas y a los 10 dpi en hoja sistémica. Las muestras de material vegetal procedían de plantas individuales silvestres y *alkbh9b*. La acumulación de

ARN viral se analizó utilizando una mezcla de sondas para reconocer de manera específica los 4 ARNs virales (Figura 17A). En hoja inoculada, el nivel de ARN viral detectado en las plantas *alkbh9b* fue notoriamente menor que en las plantas silvestres tanto a 3 como 6 dpi (Figura 17B y C). En el caso de la infección sistémica a los 10 dpi el resultado fue más heterogéneo, mostrando que en una de las muestras *alkbh9b* no se detectó infección sistémica mientras que en otra los niveles de infección fueron menores (Figura 17D). De todas formas, como muestra la gráfica de la Figura 17E, en cualquiera de los tres casos las diferencias obtenidas en el nivel de ARN viral entre plantas silvestres y *alkbh9b* fueron estadísticamente significativas. Este experimento se repitió varias veces obteniéndose en todas ellas un resultado muy similar. Para estudiar con mayor detalle la infección sistémica se analizó la acumulación viral en los tallos de las inflorescencias de plantas de *Arabidopsis* mediante la técnica de *tissue printing*. Los tallos de las inflorescencias se cortaron y presionaron sobre membranas de nylon que posteriormente se hibridaron con la misma sonda usada para detectar los ARNs virales en los análisis tipo Northern Blot. En cada cuadrado (Figura 17F, numerados) se aplicaron 4 tallos, los dos de arriba corresponden a dos inflorescencias distintas de una misma planta y los de abajo a otra planta diferente. Como refleja la Figura 17F, a los 15 dpi, sólo en una de las 6 plantas *alkbh9b* se detectó el virus y, únicamente en uno de sus tallos. Por el contrario, en el caso de las plantas silvestres, la infección sistémica pudo detectarse en todas las plantas analizadas. Estos resultados indican que tanto la acumulación como el transporte sistémico del AMV hacia las inflorescencias florales en las plantas *alkbh9b* está seriamente comprometido. Para poder estimar en qué porcentaje disminuía la infección sistémica, se analizaron 30 plantas silvestres y 33 mutantes (Figura 17G) a los 20 dpi. Como se puede observar en la imagen, prácticamente en el 100% de las plantas silvestres la infección se había transmitido sistémicamente, mientras que el virus sólo se detectó en el 40% de las plantas mutantes.



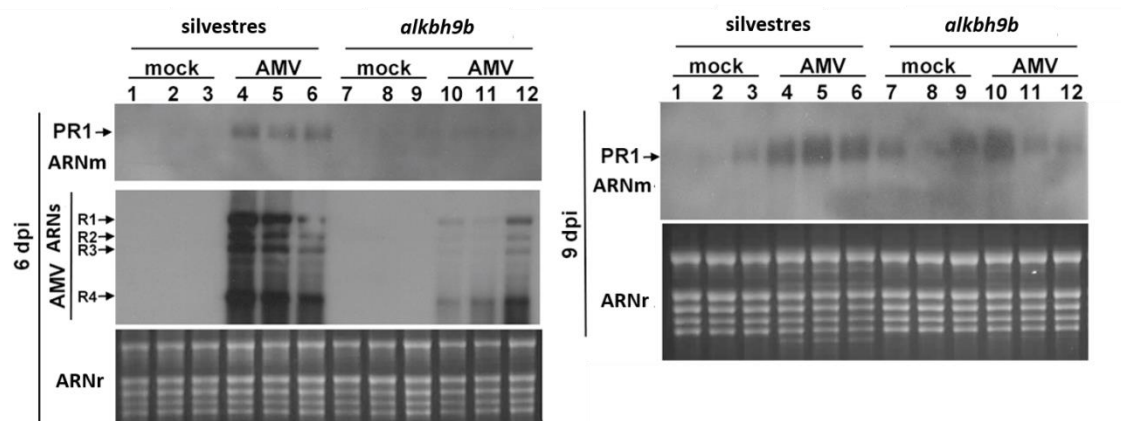
**Figura 17.** Northern Blot para detectar los ARN del AMV de extractos de ARN total en plantas silvestres y *alkbh9b* a diferentes tiempos. (A) Hibridación de muestra infectada por AMV y muestra control. (B y C) Estudio de la infección de hojas inoculadas a los (B) 3 dpi y a los (C) 6 dpi. (D) Análisis del movimiento sistémico del virus a los 10 dpi. Los 4 ARNs del AMV se indican a la izquierda de cada imagen (R1, R2, R3 y R4). Cada carril corresponde a una planta individual. Como control de carga se utilizó la tinción con EtBr del gel antes de la transferencia a la membrana (panel ARNr). (E) Cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a 3, 6 y 10 dpi (unidades arbitrarias). Análisis estadístico mediante test T-student. Las barras de error indican las desviaciones estándar, y los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas. (F) Tissue printing de los tallos de las inflorescencias a los 15 dpi. En cada cuadrado se analizaron dos plantas con dos tallos por planta. (G) Dot-blot de extracción rápida de plantas silvestres y *alkbh9b* infectadas (20 dpi). Las plantas control fueron inoculadas con tampón MOCK.

Posteriormente, se estudió la acumulación de CP mediante la técnica de Western Blot. A partir de muestras de tejido a los mismos tiempos post-inoculación se llevó a cabo una extracción de proteínas y se detectó la CP del AMV con un anticuerpo específico. Coincidiendo con los resultados obtenidos en los análisis tipo Northern, tanto en hoja inoculada (3 dpi), como, en hoja sistémica, (10 dpi), la acumulación de CP fue mucho menor en el mutante *alkbh9b* (Figura 18). Además, a 10 dpi, sólo una de las muestras de las plantas mutantes fue positiva para el virus (Figura 18).



**Figura 18.** Detección mediante Western Blot de la CP del AMV a partir de extractos de proteínas totales procedentes de plantas silvestres y *alkbh9b*. Cada carril corresponde a una planta individual. Los paneles CP muestran la detección de la CP del AMV. Los paneles cb corresponden las membranas teñidas con coomassie blue en las que se muestra una de las proteínas del huésped como control de carga. Los carriles S corresponden a muestras de plantas sanas. En el panel izquierdo, las muestras corresponden a hojas inoculadas a los 3dpi y en el panel derecho, las muestras proceden de hojas sistémicas a 10 dpi.

Una posible explicación de la disminución de la infección viral en *alkbh9b* podría ser que las plantas mutantes tuvieran activada de manera constitutiva alguna ruta de señalización de la respuesta defensiva contra patógenos. Una de las principales hormonas que regulan esta respuesta es el ácido salicílico (SA) y la proteína PR1 (*pathogenesis related protein 1*) es un marcador de la activación de la señalización mediada por SA. Así, mediante análisis tipo Northern se cuantificaron los ARNm del gen PR1 en hojas inoculadas a 6 y 9 dpi en plantas silvestres y *alkbh9b*. Como muestra la Figura 19, la activación transcripcional del ARNm de PR1 sólo ocurre en plantas silvestres infectadas y no en plantas *alkbh9b*. A 9 dpi los resultados son más heterogéneos probablemente debido a que estas hojas empiezan a mostrar síntomas de senescencia. Estos resultados indican que las plantas mutantes no presentan constitutivamente activada la respuesta defensiva contra patógenos mediada por SA.



**Figura 19.** Inducción de PR1 en plantas silvestres y *alkbh9b* a los 6 y 9 dpi. Mock: plantas inoculadas con tampón de inoculación. AMV plantas inoculadas con virión de AMV. Cada carril corresponde a una planta individual. A la izquierda se señalan las bandas correspondientes a PR1 y los 4 ARNs del AM. Como control de carga se empleó la tinción con EtBr del gel antes de la transferencia a la membrana (panel ARNr).



En este trabajo se ha confirmado mediante co-inmunoprecipitación *in vitro* la interacción entre AtALKBH9B (at2g17970) y la CP del AMV, corroborando el resultado previamente observado con rastreo mediante doble híbrido realizado en el laboratorio. La proteína atALKBH9B pertenece a la familia de proteínas AlkB dentro de la superfamilia de las dioxigenasas dependientes de 2OG-Fe (II) (Aravind *et al.*, 2001; Mielecki *et al.*, 2012; Kawai *et al.*, 2014). Interesantemente, se han encontrado dominios AlkB en las replicasas de diversos virus de plantas pertenecientes a la familia *Flexiviridae*. Estos dominios estarían implicados en el mantenimiento de la integridad del ARN viral mediante la reparación de posibles daños causados por agentes alquilantes presentes en el medio (van den Born *et al.*, 2008). Los estudios realizados sugieren que, probablemente, un único virus vegetal adquirió el dominio y, después, este se extendió horizontalmente entre otros virus por medio de fenómenos de recombinación genética (van den Born *et al.*, 2008).

En el caso de Arabidopsis, se ha propuesto que la familia AlkB estaría conformada por 14 genes, entre ellos AtALKBH9B, que estarían implicados en la reparación de daños inducidos por agentes alquilantes en complejos nucleoproteicos celulares (Mielicki *et al.*, 2012). Además, el estudio de su localización subcelular mostró que, a diferencia de AtALKBH9B – localizada únicamente en el citoplasma –, las proteínas codificadas por los dos genes con mayor similitud de secuencia a AtALKBH9B (AtALKBH9A y AtALKBH9C, at1g48980 y at4g36090) presentan una localización núcleo-citoplásmica (Mielecki *et al.*, 2012). Posteriormente, se observó que atALBH9B produce unas formaciones granuladas que, en algunos casos, se encuentran asociadas a microtúbulos (van Beest, 2013). Los resultados obtenidos en este TFM han mostrado, mediante estudios filogenéticos, que la proteína de humanos hsALKBH5 es la más similar a atALKBH9B. Los homólogos de ALKBH5 en mamíferos son proteínas que presentan actividad de desmetilación de ARN eliminando la modificación m<sup>6</sup>A (Zheng *et al.*, 2013). En concreto, hsALKBH5 muestra una clara preferencia por moléculas de ARN de hebra simple, así como una localización nuclear formando unos gránulos que están involucrados en el ensamblaje de factores de procesamiento de ARNm (Zheng *et al.*, 2013). Además, la cristalización de distintas estructuras de alta resolución del núcleo catalítico de hsALKBH5 formando un complejo con diferentes ligandos permitió describir las características estructurales únicas de hsALKBH5 que desempeñan un papel importante en el reconocimiento de sustrato y catálisis de esta proteína (Feng *et al.*, 2014). Algunos de los aminoácidos responsables de esas estructuras únicas están conservados en la proteína atALKBH9B según muestra el alineamiento realizado en este trabajo. Esto podría señalar que atALKBH9B podría estar implicada en la desmetilación de m<sup>6</sup>A, al igual que hsALKBH5, hipótesis respaldada por su interacción *in vitro* con el ARN4 del AMV, demostrada en este TFM.

La caracterización fenotípica del mutante *alkbh9h* no mostró diferencias significativas ni en el porcentaje de germinación total ni en tiempo de germinación, pero sí una reducción del 20% en el peso fresco de la parte aérea de las plantas mutantes. Por tanto, basándose en los parámetros evaluados, la carencia de la proteína atALKBH9B afecta ligeramente a algunos aspectos del desarrollo vegetativo de la planta.

El análisis de la infección del AMV mostró que la ausencia de la proteína atALKBH9B confiere cierta resistencia a la infección sistémica causada por el AMV. En hojas inoculadas se observa una disminución en la acumulación tanto de viriones como de ARN viral y de CP. Por otro lado, el movimiento sistémico se ve seriamente comprometido en las plantas *alkbh9h*. Así, aproximadamente un 60% de las plantas mutantes son resistentes a la infección sistémica y en el caso de las que finalmente son invadidas por el virus, este se acumula generalmente a niveles más bajos que en las plantas silvestres. Si bien es cierto que, en *Arabidopsis*, debido a la presencia de genes homólogos, podrían estar ocurriendo fenómenos de redundancia génica, lo cual explicaría el moderado fenotipo de los mutantes *alkbh9b* y la variabilidad en los niveles de infección sistémica. Por tanto, los resultados presentados en este TFM sugieren que atALKBH9H constituye un factor de susceptibilidad y desempeña, por tanto, una función que favorece la infección del virus. Esta observación contrasta con la anteriormente encontrada en experimentos de expresión transitoria de atALKBH9B en los que se observó que la sobreexpresión de atALKBH9B causaba un efecto negativo en la infección del AMV en hojas inoculadas (van Beest, 2013). En ese trabajo se inocularon plantas de tabaco P12 que son plantas transgénicas que expresan las dos subunidades de la replicasa del AMV, de modo que son inoculadas con el ARN 3 y se analiza la acumulación de este componente viral (Taschner *et al.*, 1991). Además el ARN 3 usado en ese trabajo (R3-GFP) (van Beest, 2013) está modificado de forma que expresa la proteína verde fluorescente (GFP), lo que permite la visualización de los focos de infección pero no el análisis del movimiento sistémico, ya que esta construcción es defectiva en dicho movimiento (Sánchez-Navarro *et al.*, 2001). La discrepancia entre estos resultados podría explicarse por los siguientes motivos: i) en el presente trabajo se ha usado *Arabidopsis* como planta huésped y virión completo como fuente de inóculo, y ii) resultados preliminares realizados en el laboratorio sugieren que, en *Arabidopsis*, el ARNm de *atALKBH9B* se acumula a muy bajos niveles lo que podría indicar que la proteína atALKBH9B se requiera a bajos niveles para su correcta actividad en el citoplasma celular. En los experimentos de sobreexpresión transitoria en plantas P12, atALKBH9B estaría en elevadas cantidades y es posible que, de algún modo, desestabilizara el equilibrio homeostático celular. De hecho, se postuló que la sobre-expresión de atALKBH9B podría bloquear inespecíficamente la red de microtúbulos celulares afectando así a la infección viral (van Beest, 2013). Finalmente,

nuestros resultados sugieren que el efecto positivo sobre la infección viral mediado por atALKBH9B no estaría asociado a la respuesta defensiva contra patógenos mediada por SA.

Una posible línea futura de actuación será analizar la posibilidad de que la proteína atALKBH9B participe en mecanismos relacionados con la regulación y estabilidad de los ARNm. En nuestro laboratorio se ha encontrado que los cuerpos granulosos que forma atALKBH9B co-localizan con siRNA (*small interfering RNA*) bodies y los p-bodies. Los siRNA-bodies están involucrados en la generación de los ta-siRNAs (*trans-acting small interfering RNAs*) (Jouannet *et al.*, 2012) mientras que los p-bodies son gránulos citoplasmáticos que contienen proteínas implicadas en la degradación de los ARNm (Xu and Chua, 2011). Además, recientemente se ha observado que ambos tipos de gránulos podrían en algunos casos interactuar e intercambiar componentes entre ellos (Martínez de Alba *et al.*, 2015).



# Conclusiones



Como resumen de las investigaciones realizadas en el presente TFM es posible establecer las siguientes conclusiones:

1. Mediante estudios de co-inmunoprecipitación *in vitro* se ha determinado que la proteína atALKBH9B interacciona con la CP del AMV reforzando los resultados previamente obtenidos por medio de ensayos de doble híbrido.
2. Dentro de la familia de las AlkB, la proteína caracterizada más cercana evolutivamente a atALKBH9B es la ALKBH5. En humanos, hsALKBH5 actúa eliminando grupos metilo del átomo de nitrógeno en la posición 6 de los residuos de adenina en las moléculas de ARNm. La existencia de motivos importantes conservados entre atALKBH9B y hsALKBH5, así como la interacción *in vitro* entre el ARN 4 del AMV y atALKBH9B podría indicar una similitud funcional entre ambas.
3. El mutante *alkbh9b* presenta una inserción de T-DNA que impide la acumulación de su ARNm correspondiente, lo que sugiere que sería un mutante de pérdida de función. Además, este mutante no presenta diferencias estadísticamente significativas en tiempo de germinación, aunque sí muestra diferencias en peso fresco de la parte aérea respecto de las plantas silvestres.
4. La infección por AMV en plantas de Arabidopsis se ve disminuida en *alkbh9b*, tanto a nivel de ARN como de CP y tanto en hoja inoculada como sistémica. Este efecto negativo en la infección viral no estaría causado por una activación constitutiva de la señalización defensiva mediada por SA en las plantas mutantes. Nuestros resultados sugieren que la proteína atALKBH9B regula positivamente la infección sistémica del AMV y puede considerarse, por tanto, un factor de susceptibilidad de huésped.





# Referencias bibliográficas



**Aparicio F, Vilar M, Perez-Payá E, Pallás V** (2003). The coat protein of prunus necrotic ringspot virus specifically binds to and regulates the conformation of its genomic RNA. *Virology*, 313:213-223.

**Aravind L, Koonin EV** (2001). The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and IprecaN define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biol*, 2:1-7.

**Balasubramaniam M, Kim B-S, Hutchens-Williams HM, Loesch-Fries LS** (2014). The photosystem II oxygen-evolving complex protein PsbP interacts with the coat protein of Alfalfa mosaic virus and inhibits virus replication. *Mol Plant Microbe Interact*, 27:1107-1118.

**Bird A** (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447:396-398.

**Bodi Z, Zhong S, Mehra S, Song J, Graham N, Li H, et al.** (2012). Adenosine methylation in Arabidopsis mRNA is associated with the 3' end and reduced levels cause developmental defects. *Front Plant Sci*, 3:48.

**Bol JF** (2005). Replication of alfalfa- and ilarviruses: role of the coat protein. *Annu Rev Phytopathol*, 43:39-62.

**Bol JF** (2008). Alfalfa Mosaic Virus. *Desk Encyclopedia of plant and fungal virology*. Elsevier, Academic Press, 85-91.

**Bratlie MS, Drabløs F** (2005). Bioinformatic mapping of AlkB homology domains in viruses. *BMC Genomics*, 6:1.

**Culver JN, Padmanabhan MS** (2007). Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annu Rev Phytopathol*, 45:221-243.

**Csepány T, Lin A, Baldick CJ, Beemon K** (1990). Sequence specificity of mRNA N<sup>6</sup>-adenosine methyltransferase. *J Biol Chem*, 265:20117-20122.

**Delaney JC, Smeester L, Wong C, Frick LE, Taghizadeh K, Wishnok JS, et al.** (2005). AlkB reverses etheno DNA lesions caused by lipid oxidation in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 12:855-860.

**Díaz-Ruiz JR, Moreno R** (1972). Symptomatology, morphology and ultrastructural characteristics of a strain of alfalfa mosaic virus found in Spain. *Microbiología española*, 25:127-140.

**Escriu Paradell F, Bergua Vidal M, Vargas Mainar ME, Luis Arteaga MP** (2011). Síntomas, dispersión y daños del virus del mosaico de la alfalfa: un virus muy extendido en todas las zonas de producción con el que se lleva conviviendo muchos años. *VidaRURAL*, 322:48-52.

**Falnes PØ, Johansen RF, Seeberg E** (2002). AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*, 419:178-182.

**Fedeles BI, Singh V, Delaney JC, Li D, Essigmann JM** (2015). The AlkB Family of Fe(II)/ $\alpha$ -Ketoglutarate-dependent Dioxygenases: Repairing Nucleic Acid Alkylation Damage and Beyond. *J Biol Chem*, 290:20734-20742.

**Feng C, Liu Y, Wang G, Deng Z, Zhang Q, Wu W, et al.** (2014). Crystal structures of the human RNA demethylase Alkbh5 reveal basis for substrate recognition. *J Biol Chem*, 289:11571-11583.

**Fernandez-Calvino L, Faulkner C, Walshaw J, Saalbach G, Bayer E, Benitez-Alfonso Y, et al.** (2011). Arabidopsis plasmodesmal proteome. *PLoS ONE*, 6:e18880.

**Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, He C** (2014). Gene expression regulation mediated through reversible m<sup>6</sup>A RNA methylation. *Nat Rev Genet*, 15:293-306.

**Giesler LJ, Ziems AD** (2006). Incidence of Alfalfa mosaic virus, Bean pod mottle virus, and Soybean mosaic virus in Nebraska Soybean Fields. Online. *Plant Health Progress*, doi:10.1094/PHP-2006-0424-01-HM.

**Hegg EL, Que L** (1997). The 2-His-1-carboxylate facial triad--an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron (II) enzymes. *Eur J Biochem*, 250:625-629.

**Heinlein M** (2015). Plant virus replication and movement. *Virology*, 479–480:657-671.

**Herranz MC, Pallas V, Aparicio F** (2012). Multifunctional roles for the N-terminal basic motif of Alfalfa mosaic virus coat protein: nucleolar/cytoplasmic shuttling, modulation of RNA-binding activity, and virion formation. *Mol Plant Microbe Interact*, 25:1093-1103.

**Hieta R, Myllyharju J** (2002). Cloning and characterization of a low molecular weight prolyl 4-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana*. Effective hydroxylation of proline-rich, collagen-like, and hypoxia-inducible transcription factor alpha-like peptides. *J Biol Chem*, 277:23965-23971.

**Hsieh MJ, White PJ, Pouton CW** (2010). Interaction of viruses with host cell molecular motors. *Curr Opin Biotechnol*, 21:633-639.

**Ibrahim A, Hutchens HM, Berg RH, Loesch-Fries LS** (2012). Alfalfa mosaic virus replicase proteins, P1 and P2, localize to the tonoplast in the presence of virus RNA. *Virology*, 433:449-461.

**Jouannet, V, Moreno, AB, Elmayan, T, Vaucheret, H, Crespi, MD, Maizel, A** (2012). Cytoplasmic Arabidopsis AGO7 accumulates in membrane-associated siRNA bodies and is required for ta-siRNA biogenesis. *The EMBO Journal*, 31:1704–1713

**Kawai Y, Ono E, Mizutani M** (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *The Plant Journal*, 78:328-343.

**Keskiaho K, Hieta R, Sormunen R, Myllyharju J** (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* has multiple prolyl 4-hydroxylases, one of which is essential for proper cell wall assembly. *Plant Cell*, 19:256-269.

**Koonin EV** (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol*, 72:2197-2206.

**Krab, IM, Caldwell, C, Gallie, DR, Bol, JF** (2005). Coat protein enhances translational efficiency of *Alfalfa mosaic virus* RNAs and interacts with the eIF4G component of initiation factor eIF4F. *J Gen Virol*, 86:1841-1849

**Laemmli U** (1970). Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227:680 - &.

**Latham LJ, Jones RAC, Coutts BA** (2004). Yield losses caused by virus infection in four combinations of non-persistently aphid-transmitted virus and cool-season crop legume. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44:57.

**Liu C, Mou S, Cai Y** (2013). FTO gene variant and risk of overweight and obesity among children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 8:e82133.

**Lu L, Zhu C, Xia B, Yi C** (2014). Oxidative demethylation of DNA and RNA mediated by non-heme iron-dependent dioxygenases. *Chem Asian J*, 9:2018-29.

**Martínez de Alba, AE, Moreno, AB, Gabriel, M, Mallory, AC, Christ, A, Bounon, R, Balzergue, S, Aubourg, S, Gautheret, D, Crespi, MD, Vaucheret, H, Maizel, A** (2015). In plants, decapping prevents RDR6-dependent production of small interfering RNAs from endogenous mRNAs. *Nucleic Acids Research*. Doi: 10.1093/nar/gkv119.

- Melcher U** (2000). The «30K» superfamily of viral movement proteins. *J Gen Virol*. 81:257-66.
- Meza TJ, Moen MN, Vågbø CB, Krokan HE, Klungland A, Grini PE, et al.** (2012). The DNA dioxygenase ALKBH2 protects *Arabidopsis thaliana* against methylation damage. *Nucleic Acids Res*, 40:6620-6631.
- Mielecki D, Zugaj DL, Muszewska A, Piwowarski J, Chojnacka A, Mielecki M, et al.** (2012). Novel AlkB dioxygenases—alternative models for in silico and in vivo studies. *PloS one*, 7:e30588-e30588.
- Mushegian AR, Koonin EV** (1993). Cell-to-cell movement of plant viruses. *Archives of Virology*, 133:239-257.
- Pallas V, Aparicio F, Herranz MC, Sanchez-Navarro JA, Scott SW** (2013). The molecular biology of ilarviruses. *Adv Virus Res*, 87:139-181.
- Pallas V, Garcia JA** (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J Gen Virol*, 92:2691-2705.
- Pallas, V, Mas, P, Sanchez-Navarro, JA** (1998). Detection of plant RNA viruses by non-isotopic dot-blot hybridization. *Plant Virology Protocols: from virus isolation to transgenic resistance*. Humana Press Inc. G.D. Foster & S.C. Taylor Eds. Lugar de publicación: Totowa, NJ. *Meth Mol Biol*, 81:461-468.
- Peiro A, Izquierdo-Garcia AC, Sanchez-Navarro JA, Pallas V, Mulet JM, Aparicio F** (2014). Patellins 3 and 6, two members of the Plant Patellin family, interact with the movement protein of Alfalfa mosaic virus and interfere with viral movement. *Mol Plant Pathol*, 15:881-891.
- Radtke K, Anderson F, Sodeik B** (2014). A Precipitation-Based Assay to Analyze Interactions of Viral Particles with Cytosolic Host Factors. *Methods Mol Biol*, 1144:191-208.
- Radtke K, Döhner K, Sodeik B** (2006). Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol*, 8:387-400.
- Rozanov MN, Koonin EV, Gorbalenya AE** (1992). Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the «Sindbis-like» supergroup of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol*, 73:2129-2134.

**Sambrook J** (1990). Molecular-Cloning - a Laboratory Manual, 2nd Edition - Sambrook,j, Fritsch,ef, Maniatis,t. Nature, 343:604-605.

**Samson L, Cairns J** (1977). A new pathway for DNA repair in Escherichia coli. Nature, 267:281-283.

**Sánchez-Navarro JA, Bol JF** (2001). Role of the alfalfa mosaic virus movement protein and coat protein in virus transport. Mol Plant Microbe Interact, 14:1051-1062.

**Sanchez-Navarro JA, Herranz MC, Pallas V** (2006). Cell-to-cell movement of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of Ilar-, bromo-, cucumo-, tobamo- and comoviruses and does not require virion formation. Virology, 346:66-73.

**Schoumacher F, Erny C, Berna A, Godefroy-Colburn T, Stussi-Garaud C** (1992). Nucleic acid-binding properties of the alfalfa mosaic virus movement protein produced in yeast. Virology, 188:896-899.

**Smith IM** (1991). Manual de enfermedades de las plantas. Mundi-Prensa, 680.

**Taschner PEM, Van Der Kuyl AC, Neeleman L, Bol JF** (1991). Replication of an incomplete alfalfa mosaic virus genome in plants transformed with viral replicase genes. Virology, 181:445-450.

**Trewick SC, Henshaw TF, Hausinger RP, Lindahl T, Sedgwick B** (2002). Oxidative demethylation by Escherichia coli AlkB directly reverts DNA base damage. Nature, 419:174-178.

**van Beest, GS** (2013). Análisis de la implicación de una proteína de Arabidopsis thaliana perteneciente a la familia de las 2-oxoglutarato oxigenasas dependientes de hierro (II) en el ciclo infeccioso del virus del mosaico de la alfalfa (AMV). Universidad Politécnica de Valencia. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas.

**van den Born E, Bekkelund A, Moen MN, Omelchenko MV, Klungland A, Falnes PØ** (2009). Bioinformatics and functional analysis define four distinct groups of AlkB DNA-dioxygenases in bacteria. Nucleic Acids Res, 37:7124-7136.

**van den Born E, Omelchenko MV, Bekkelund A, Leihne V, Koonin EV, Dolja VV, et al.** (2008). Viral AlkB proteins repair RNA damage by oxidative demethylation. Nucleic Acids Res, 36:5451-5461.

**van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, et al.** (2000). Virus taxonomy. Classification and Nomenclature of viruses. Seventh ICTV Report, Academic Press.

**Weimer JL** (1931). Alfalfa dwarf, a hitherto unreported disease. *Phytopathology*, 21:71-75.

**Xu, J, Chua, NH** (2011). Processing bodies and plant development. *Curr Opin Plant Biol*, 14:88–93.

**Yi C, He C** (2013). DNA repair by reversal of DNA damage. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5:a012575.

**Yu B, Edstrom WC, Benach J, Hamuro Y, Weber PC, Gibney BR, et al.** (2006). Crystal structures of catalytic complexes of the oxidative DNA/RNA repair enzyme AlkB. *Nature*, 439:879-884.

**Zdżalik D, Domańska A, Prorok P, Kosicki K, van den Born E, Falnes PØ, et al.** (2015). Differential repair of etheno-DNA adducts by bacterial and human AlkB proteins. *DNA Repair (Amst)*, 30:1-10.

**Zheng G, Dahl JA, Niu Y, Fedorcsak P, Huang C-M, Li CJ, et al.** (2013). ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Molecular cell*, 49:18-29.

### *Páginas web*

Comité Internacional de Taxonomía de Virus, ICTV, <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Noviembre de 2015.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. Noviembre de 2015.



# Anexos



## Anexo I

### Secuencia del plásmido recombinante pET28a/6His-NYFP-6His.

En rojo, codones de inicio y stop.

En amarillo, colas de histidinas.

GTGGGACGGGAACAATTCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACCATGGGCAGCA  
 GCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGTGAGCAAGGGCGAGGA  
 GCTGTTACCCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTG  
 TCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC  
 TGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGCAGTGCTTCGCCCCGCTACCCCGA  
 CCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC  
 TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCA  
 TCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAAA  
 CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCACCAC  
 CACCACCACCCTGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTG  
 AGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGTTTTTTTTGCTGAAAGGAGGAAC  
 TATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGGGTGTGGTGGTTACGC  
 GCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGC  
 CACGTTCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTAC  
 GGCACCTCGACCCCAAAAAA

### Secuencia de aminoácidos

VGREQFPLE-FCLTLRRRYTNGSSHHHHHSSGLVPRGSHMVSKEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSV  
 SGEGEDATYKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIF  
 FKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNI LGHKLEYNYNSHNVI MAEFCRYPSHWRPLEHH  
 HHHH-DPAANKARKEAELAAATAEQ-LA-PLGASKRVLRFLLKGGTISGLANGTRPVAAH-ARRVWVLR  
 AA-PLHLPAP-RPLLSLSSLPFSPRSPAFPVKL-SGAPFRVPI-CFTAPRPQK

## Anexo II

### Secuencia del plásmido recombinante pGEX-KG+atALKBH9B

En verde, punto de corte de la enzima Nco I. Unión GST-atALKBH9B.

AGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTAAA  
 GACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACGTGAAATGCTGAAAATGTTCGAAGATCGTT  
 TATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGA  
 TGTGTTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCTCCAAAATTAGTTTGTTTTAAAAACGTATT  
 GAAGCTATCCCACAAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGC  
 AAGCCACGTTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCGCGTGGATCCCCGGGAATTC  
 CGGTGGTGGTGGTGGAAATCTAGACTCCATGGAAAACGATCCATTTCTCCGGCAGTACCAGCCGTCGGAG  
 CTTAAGATCGCTTCGGAGTTTCTGACGAATTGGCTTCCTTTTTTATCTAAAGATCTATGCAAGGATTGTA  
 ATCACCTTCTCTCCAATCGAATCCGTTCTCTTGACCCAGCACATTGTAGTAACAACACTGACAAAGTTGA  
 TGGAGAGTGTAAAACTGGTCTTGTTCAGTGGTGGAAAATATGGGATCAGAAAGAGCTAGTAACAATGTG  
 GATGATAATTATGATGAGAAGTCGGAAAATGGCGAAGACTGTGATAATCATTCGTTAGGTAGTTGGAAGG  
 GAAGTGAAATTGTATTTGGTTCCTTTCTGAAGATTTTAGTAGTGTATTGCAATCTAGACCAGCTGTTGT  
 TGAAACAGCAAGCCCTCGTATGCGTTGGGCTGATATGGCACAAGAGGATGAGTTCGATGAGGAGGAGGAG  
 GAGGAGGAAGAGGAGAGGGATTTCGAGTAGGAAAGGTTTTGATGCGAGTTCGATGAAGACTCCAGAGAAGC  
 CTAAGTGTCTAGAGTCAGGG

### Secuencia de aminoácidos

EISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALD  
 VVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPKSDLVPRGSPGIS  
 GGGGGILDSMENDPFLRQYQPSELKIASFLTNWLPFLSKDLCKDCNHLLSNRIRSLDPAHCSNNTDKVD  
 GECKTGSCSVVENMGSERASNVDNYDEKSENGEDCDNHSLGWSWGSEIVFGSFPEDFSSVLQSRPAVV  
 ETASPRMRWADMAQEDEFDEEEEEEEEEERDSSRKGFDASSMKTPEKPKCLESG



