

INDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	25
1.1	EL VIRUS DEL CASCABELO DEL TABACO (TRV)	27
1.1.1	Generalidades	27
1.2	TRV Y ARABIDOPSIS	30
1.3	SILENCIAMIENTO GÉNICO EN ARABIDOPSIS.....	34
1.3.1	Componentes principales de las rutas de silenciamiento en <i>A. thaliana</i>	29
a)	Proteínas DICER	37
b)	Proteínas RDR	39
c)	Proteínas AGO	41
1.3.2	Pequeños RNAs endógenos	47
a)	miRNAs	47
b)	siRNAs	51
1.4	SILENCIAMIENTO GÉNICO Y VIRUS.....	57
1.4.1	El silenciamiento génico como mecanismo antiviral en plantas	57
a)	DCL y silenciamiento antiviral	59
b)	RDR y silenciamiento antiviral	61
c)	AGO y silenciamiento antiviral	61
1.4.2	Silenciamiento de genes endógenos inducido por siRNAs de origen viral	65
1.4.3	Supresores de silenciamiento	66
a)	VSRs que inactivan o bloquean proteínas AGO.....	67
b)	VSRs que interfieren con la producción, estabilidad y/ensamblaje de siRNAs	69

c)	VSRs que bloquean la señal de amplificación del silenciamiento génico	71
d)	VSRs que inhiben la RdDM	71
e)	Efectos colaterales de la supresión del silenciamiento	72
1.4.4	TRV y silenciamiento	75
a)	TRV y silenciamiento.....	75
2	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	83
3	MATERIAL Y MÉTODOS	89
3.1	MATERIAL VEGETAL	91
3.2	AISLADOS VIRALES	92
3.3	INOCULACIÓN VIRAL POR TRV	93
3.4	CLONACIÓN Y MANTENIMIENTO DE CLONES.....	94
3.4.1	Cepas/estirpes bacterianas.....	94
3.5	PLÁSMIDOS EMPLEADOS PARA CLONACIÓN.....	96
3.5.1	Plásmidos base	96
3.5.2	Otras construcciones.....	98
3.6	CONSTRUCCIONES EMPLEADAS EN EXPRESIÓN TRANSITORIA.....	100
3.6.1	Clonación del pequeño RNA 38	100
3.6.2	Clonación de las secuencias precursoras de miRNAs	101
3.6.3	Clonación de las secuencias sensoras.....	101

3.6.4	Clonación de las proteínas de TRV.....	102
3.7	CONSTRUCCIONES EMPLEADAS EN ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE.	103
3.7.1	Clonación de genes AGO 1, AGO2, AGO4 de <i>A. thaliana</i>	103
3.7.2	Clonación de TRV-16K.....	104
3.8	MANTENIMIENTO DE CLONES	106
3.9	MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA.....	107
3.9.1	Extracción de DNA total.....	107
3.9.2	Extracción de DNA plasmídico	107
3.9.3	Amplificación de DNA por PCR.....	108
3.9.4	Electroforesis en gel de agarosa	109
3.9.5	Elución de DNA a partir de agarosa	109
3.9.6	Marcaje radioactivo de sondas	109
3.10	MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA	112
3.10.1	Purificación de RNA.....	112
3.10.2	Fraccionamiento del RNA total.....	112
3.10.3	Transcripción inversa (RT).....	113
3.10.4	Dot Blot	114
3.10.5	Northern Blot	115
3.10.6	Northern Blot de RNA de bajo peso molecular.....	116
3.10.7	Análisis densitométrico de las señales de hibridación	117
3.10.8	5' RACE (Rapid Amplification of CDNA Ends).....	118
3.10.9	Análisis transcriptómico.....	119
3.10.10	Cuantificación de RNA mediante PCR en tiempo real	121
3.11	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	124
3.11.1	Extracción de proteínas del tejido vegetal.....	124
3.11.2	Análisis y manipulación de proteínas.....	124
	a) SDS-PAGE.....	124
	b) Inmunolectrotransferencia (Western Blot).....	125

3.11.3	Ensayos de inmunoprecipitación	126
a)	Inmunoprecipitación con proteína A-agarosa.....	126
b)	Inmunoprecipitación con HA-agarosa.....	128
3.12	UNIÓN <i>IN VITRO</i> PROTEÍNA-siRNAS.....	129
3.12.1	Marcaje y anillamiento de RNAs sintéticos.....	129
3.12.2	Ensayo de unión a RNA	130
4	RESULTADOS.....	131
4.1	miRNAs Y DEFENSA ANTIVIRAL	133
4.1.1	Reconocimiento y procesamiento de secuencias virales por miRNAs.....	133
a)	Requerimientos estructurales y termodinámicos en la interacción entre miRNAs y sus RNAs dianas	134
b)	Identificación de sRNAs endógenos con potencial de interaccionar con secuencias virales	138
c)	Evaluación del reconocimiento y procesamiento de las dianas virales por miRNAs.....	145
4.1.2	Análisis del título viral en mutantes <i>dcl1</i>	159
4.2	IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA SUPRESORA DE SILENCIAMIENTO DE TRV	161
4.2.1.	Identificación del supresor de silenciamiento del TRV	161
4.2.2	Caracterización del modo de acción de la proteína supresora 16K170	
a)	TRV y la iniciación del silenciamiento.....	171
b)	Efecto sobre la acumulación de siRNAs.....	179
c)	Capacidad de unión de siRNAs	182
d)	Capacidad de unión de siRNAsin planta	183
e)	Capacidad de unión de siRNAs in vitro.....	185

f)	Capacidad de estabilización del dúplex miRNA/miRNA*	187
g)	Capacidad de unión de proteínas AGO	189
h)	Efecto sobre la amplificación de la respuesta de silenciamiento	199
4.2.3	Efecto de la proteína supresora 16K sobre la dispersión del silenciamiento génico.....	204
a)	Efecto sobre el movimiento célula a célula de la señal de silenciamiento	204
b)	Efecto sobre el movimiento a larga distancia de la señal de silenciamiento	207
4.2.4	Caracterización molecular de la proteína 16K de TRV	210
4.3	EFECTO DE LA INFECCIÓN DE TRV en <i>A. thaliana</i> SOBRE EL METABOLISMO DE miRNAs	215
4.3.1	Efecto sobre la acumulación y expresión de miRNAs.....	216
a)	Efecto sobre la expresión de genes MIRNA	216
b)	Efecto sobre la acumulación de miRNAs maduros.....	218
4.3.2	Efecto sobre el procesamiento de mRNAs diana.....	222
a)	Análisis del procesamiento de SCL6-IV por miR171 en plantas infectadas	222
b)	Análisis del procesamiento de dianas de miRNAs en plantas infectadas con TRV	226
c)	Análisis de los niveles de mRNAs dianas de miRNAs en plantas infectadas	227
5	DISCUSIÓN	231
6	CONCLUSIONES	249
7	BIBLIOGRAFIA	253