

RESUMEN

El género *Carmovirus* (familia *Tombusviridae*) representa al menos 19 especies de virus de plantas que afectan a numerosas especies cultivadas, en muchos casos con una gran repercusión económica. El genoma del MNSV (gRNA) está compuesto por una molécula de RNA monocatenario de polaridad positiva de 4,3 kb, con un extremo 5' sin estructura "cap" (m^7G^5pppNp) y un extremo 3' no poliadenilado. El genoma del MNSV codifica cinco proteínas funcionales flanqueadas por dos regiones no traducibles de 95 nt (en el extremo 5') y 280 nt (en el extremo 3'). La ORF más próxima al extremo 5' es una proteína de 29 kDa (p29) que finaliza con un codón ámbar y codifica la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). Continuando con la lectura a través de dicho codón se obtiene una proteína de 89 kDa (p89), también implicada en la replicación del virus. Las dos ORFs situadas en la parte central del genoma, codifican dos pequeñas MPs, denominadas generalmente DGBp1 y DGBp2 (*double gene block of proteins*, DGBps). DGBp1 es una proteína que une RNA necesaria para el transporte intercelular del genoma viral, mientras que DGBp2 es una proteína asociada a membrana cuya localización en el PD es imprescindible para el movimiento célula a célula del virus. Por último, la ORF del extremo 3' representa la proteína de cubierta (CP). En el caso del MNSV el virión está formado por partículas isométricas de unos 30 nm de diámetro, constituidas aproximadamente por 180 subunidades de la proteína de cubierta.

Resultados previos obtenidos en el grupo de investigación donde se ha realizado la presente Tesis habían puesto de manifiesto que el MNSV utiliza la ruta de secreción celular, a través de su proteína de membrana DGBp2 (p7B), para alcanzar la periferia celular. Hasta el momento de realizar la presente Tesis los conocimientos sobre las señales/motivos de las proteínas de membrana que facilitan o permiten dicho transporte eran más bien escasos. En este trabajo hemos determinado los residuos implicados en la salida de una proteína transmembrana viral en la ruta de secreción temprana (DGBp2, p7B MNSV). Los residuos implicados se encuentran tanto en la región Nt (citosólica) como en la Ct (luminal) siendo éste uno de los primeros ejemplos descritos en plantas de señal luminal de salida de RE. Con todos estos datos se ha propuesto un modelo en el que después de la inserción y correcto plegamiento de la proteína en la membrana del RE, el Ct luminal de p7B interacciona a través del residuo K₄₉ con un adaptador transmembrana asociado al citoesqueleto de actina para su movimiento y concentración en el RE cortical. El motivo Nt citoplasmático sería necesario para el ensamblaje de la vesícula COPII.

Por otra parte se ha profundizado en el estudio del interactoma de las MPs de los carmovirus y se han identificado, mediante un ensayo de doble híbrido (Y2H), tres proteínas celulares capaces de interactuar con tres DGBp1 procedentes de tres carmovirus diferentes (MNSV, TCV y CarMV). Estos factores celulares son la proteína P3 del ribosoma 60S (RPP3A), la subunidad g del factor de iniciación de la traducción 3 (eIF3g) y el factor de transcripción WRKY36. Estas interacciones fueron confirmadas por BiFC. Además, mediante ensayos de mutagénesis se demostró que el dominio de unión de estas DGBp1 es un dominio Ct (FNF) conservado. El hecho de que estas tres proteínas interactúen con los mismos factores sugiere un posible mecanismo común para todos o la mayor parte de los carmovirus.

Las CPs virales constituyen el paradigma de la multifuncionalidad proteica y, además de su obvio papel estructural, intervienen en un gran número de procesos del ciclo viral, incluyendo el transporte del RNA viral. La región Nt desestructurada de la CP del MNSV, al igual que para otros virus de RNA, generalmente es la encargada de unir el RNA viral por lo que se le suele llamar dominio R. Mediante mutantes de delección y sustitución se ha demostrado que este dominio R (que en el MNSV comprende los primeros 94 residuos) no interviene solo en la encapsidación y unión del genoma viral, sino que es la responsable de la multifuncionalidad de la CP. Mediante EMSAs con mutantes de delección se pudo determinar que la región R es esencial para la unión del RNA. Además se observó que dentro del dominio R se encuentra una región conservada entre los aa 60 al 91, que parece desempeñar un papel tanto en la unión de RNA genómico in vitro como en la encapsidación de RNAs subgenómicos. Sin embargo, en ensayos de encapsidación se observó que todo el dominio R es esencial para la encapsidación del genoma completo y que la región comprendida entre el residuo 31 y el 91 es necesaria para el movimiento tanto célula a célula como sistémico. Finalmente, utilizando PVX como vector de expresión, se demostró que la CP del MNSV puede actuar como un supresor del silenciamiento mediante la unión a los sRNAs.

Con muy contadas excepciones, los virus de plantas utilizan el floema para trasladarse hacia las partes distales de la planta desde los sitios de infección. Con objeto de conocer el proteoma del floema de plantas infectadas y poder en el futuro identificar posibles proteínas del huésped que faciliten o dificulten el transporte sistémico de los virus, en el último capítulo se llevó a cabo un análisis proteómico comparativo, mediante 2D-DIGE, entre floemas de plantas de melón infectadas con MNSV y plantas sanas. Se detectaron 1046 spots de los cuales 25 poseían cambios significativos entre las dos condiciones. Después de someter las proteínas a un análisis de espectrometría de masas, se identificaron 19 proteínas que correspondían a 22 spots (13 de los

cuales estaban sobrerrepresentados y en 9 había disminuido su expresión). Muchas de las proteínas identificadas están involucradas en muerte celular y el control de la homeostasis redox. Dos de estas 19 proteínas no habían sido descritas previamente en ensayos proteómicos: una carboxilesterasa con homología a la hsr203J de tabaco y la fumarilacetoacetato hidrolasa 1, ambas consideradas como reguladores negativos de la muerte celular. Los resultados obtenidos apuntan a que la respuesta de defensa debida a la infección viral puede ser transferida al floema como variaciones en los niveles de proteínas que se encuentran en el mismo para actuar como reguladores clave de esta defensa frente a patógenos manteniendo la señalización sistémica.