

RESUMEN

Los viroides, pequeños RNAs circulares (246-401 nt) con un elevado contenido en estructura secundaria que hasta ahora sólo han sido detectados en plantas superiores, son los agentes infecciosos más simples de la escala biológica y no codifican proteína alguna. Por lo tanto, dependen de motivos de secuencia y estructura de su genoma para utilizar (e incluso modular) la maquinaria de transcripción, procesamiento y tráfico de sus huéspedes con el fin de ser replicados e invadirlos sistémicamente, superando las barreras de defensa que interponen y llegando a producir enfermedades de importancia económica.

La estructura secundaria de los viroides nucleares (familia *Pospiviroidae*) es en general de tipo varilla, mientras que presenta múltiples ramificaciones en algunos viroides cloroplásticos (familia *Avsunviroidae*). Estas conformaciones están sostenidas por datos: i) *in silico*, mediante algoritmos que predicen la estructura secundaria con menor energía libre, ii) *in vitro*, por métodos biofísicos como el estudio de la movilidad electroforética, la microscopía electrónica y la resonancia magnética nuclear, o bioquímicos como el análisis en solución con RNasas, bisulfito y dimetil sulfato, y más recientemente, por acilación de los grupos 2'-hidroxilo analizada por extensión del cebador (SHAPE), e iii) *in vivo*, derivados de la alta diversidad genética de algunos viroides, de estudios de mutagénesis dirigida de motivos concretos, y de irradiación con luz UV.

La asunción de que la conformación de los RNAs viroidales *in vitro* es similar o incluso idéntica a la que adoptan *in vivo* es cuestionable debido, entre otras razones, a las diferentes condiciones iónicas utilizadas en los análisis *in vitro* con respecto a las existentes *in planta*, así como a las interacciones con proteínas u otros factores del huésped. Por ello, en la presente Tesis Doctoral se han estudiado las estructuras *in vivo* de tres viroides aplicando diferentes metodologías.

En el viroide latente de la berenjena (ELVd), aprovechando su gran variabilidad genética, se han rastreado covariaciones y mutaciones compensatorias en variantes naturales que confirmen o afinen *in vivo* las estructuras de las dos cadenas del viroide predichas *in silico* y las obtenidas *in vitro* mediante SHAPE. Los resultados de las tres metodologías son consistentes entre sí para el ELVd (+) RNA y conducen a una conformación en varilla con una bifurcación en cada extremo. Esta estructura, si bien similar, no es idéntica a la del ELVd (-) RNA, ya que su conformación presenta un

motivo cruciforme central (confirmado *in vivo* por la presencia de covariaciones en el mismo) y, además, ambos RNAs muestran movilidades electroforéticas distintas en geles de poliacrilamida nativos. Los resultados *in vitro* para el ELVd (-) RNA fueron menos consistentes con los obtenidos *in silico* e *in vivo*.

Por otra parte, la alta acumulación de las formas monoméricas circulares (*mc*) positivas de los viroides del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd) y del manchado solar del aguacate (ASBVd) en *Nicotiana benthamiana* y aguacate, respectivamente, ha permitido aplicar una modificación de la metodología SHAPE para determinar la estructura *in vivo* de ambos RNAs, facilitando su comparación directa con las estructuras previamente derivadas *in vitro* mediante la misma técnica, y las predichas *in silico*. Las estructuras *in planta* de los *mc* PSTVd (+) y *mc* ASBVd (+) RNAs son muy similares (pero no idénticas) a las observadas *in silico* y mediante SHAPE *in vitro*. Estos resultados aportan las primeras pruebas directas de que los RNAs circulares de dos viroides, uno nuclear y el otro cloroplástico, se encuentran en su contexto fisiológico mayoritariamente desnudos y no fuertemente asociados a proteínas del huésped. Sin embargo, hemos observado que la región central conservada del *mc* PSTVd (+) RNA, particularmente el bucle E implicado en replicación y otras funciones, muestra una menor reactividad SHAPE *in vivo* posiblemente debida a la interacción con una o más proteínas que medien dichas funciones o a cambios estructurales motivados por otros factores del hábitat natural. Dada la baja concentración en su huésped del *mc* ASBVd (-) RNA, su estructura únicamente se ha estudiado *in silico* y por SHAPE *in vitro*, conduciendo a una conformación de tipo varilla parecida a, pero no la misma que la del *mc* ASBVd (+) RNA, ya que la movilidad electroforética de los dos RNAs en geles nativos de poliacrilamida es ligeramente diferente.