



CARACTERIZACIÓN DE  
ACTIVIDADES RNA LIGASA  
IMPLICADAS EN LA  
REPLICACIÓN DE LOS  
VIROIDES NUCLEARES Y  
CLOROPLÁSTICOS

María Ángeles Nohales Zafra  
IBMCP, Septiembre 2011

Directores:  
José Antonio Darós Arnau  
Ricardo Flores Pedauyé



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA





IMAGEN DE PORTADA:

Estructura tridimensional de la DNA ligasa 1 de *Solanum lycopersicum* modelizada con las herramientas disponibles en el servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>).



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



**IBMCP**  
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas



**CSIC**

# CARACTERIZACIÓN DE ACTIVIDADES RNA LIGASA IMPLICADAS EN LA REPLICACIÓN DE LOS VIROIDES NUCLEARES Y CLOROPLÁSTICOS

Memoria presentada por

**María Ángeles Nohales Zafra**

para optar al grado de Doctora por la Universidad Politécnica de Valencia

**IBMCP**

**Valencia, Septiembre 2011**

Directores:

**José Antonio Darós Arnau**

**Ricardo Flores Pedauyé**



El Dr. José Antonio Darós Arnau, Científico Titular del CSIC, y el Dr. Ricardo Flores Pedauyé, Profesor de Investigación del CSIC, ambos pertenecientes al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC) de Valencia

CERTIFICAN:

que la Licenciada en Biología MARÍA ÁNGELES NOHALES ZAFRA ha realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas el trabajo que lleva por título “Caracterización de actividades RNA ligasa implicadas en la replicación de los viroides nucleares y cloroplásticos”, y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Valencia, a 7 de Julio de 2011.

Dr. José Antonio Darós Arnau

Dr. Ricardo Flores Pedauyé



*A mis padres*



# ÍNDICE

---



---

<b>RESÚMENES.....</b>	<b>3</b>
Resumen.....	3
Resum.....	5
Summary.....	7
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>1. Los viroides.....</b>	<b>11</b>
1.1 Características generales de los viroides.....	11
1.2 Estructura y clasificación de los viroides.....	12
1.2.1 Familia <i>Pospiviroidae</i> .....	14
1.2.2 Familia <i>Avsunviroidae</i> .....	18
1.3 Replicación de los viroides.....	19
1.3.1 Transcripción: enzimas implicadas y sitio de inicio.....	21
1.3.2 Corte: estructuras y enzimas implicadas.....	24
1.3.3 Ligación.....	27
1.4 Movimiento de los viroides.....	29
1.4.1 Movimiento intracelular.....	29
1.4.2 Movimiento célula a célula.....	30
1.4.3 Movimiento a larga distancia.....	31
1.5 El silenciamiento génico en el contexto de la infección viroidal.....	32
<b>2. Las ligasas.....</b>	<b>35</b>
2.1 La superfamilia de las nucleotidiltransferasas covalentes.....	35
2.2 Las RNA ligasas.....	39
2.2.1 Las RNA ligasas del fago T4.....	41
2.2.2 La tRNA ligasa.....	45
2.3 Las DNA ligasas.....	50
2.3.1 DNA ligasas dependientes de NAD <sup>+</sup> .....	50
2.3.2 Las DNA ligasas dependientes de ATP.....	52
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>

---

<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
<b>1. Material biológico.....</b>	<b>63</b>
1.1 Material vegetal.....	63
1.2 Bacterias.....	63
<b>2. Manipulación de microorganismos.....</b>	<b>64</b>
2.1 Obtención de células de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ competentes para su transformación por electroporación.....	64
2.2 Transformación de células de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ competentes mediante electroporación.....	64
<b>3. Electroforesis de ácidos nucleicos.....</b>	<b>64</b>
3.1 Geles de poliacrilamida (PAGE).....	64
3.1.1 Condiciones no desnaturalizantes.....	64
3.1.2 Condiciones desnaturalizantes.....	65
3.1.3 Elución de ácidos nucleicos de geles de poliacrilamida.....	65
3.2 Geles de agarosa.....	66
3.2.1 Condiciones no desnaturalizantes.....	66
3.2.2 Condiciones desnaturalizantes.....	66
<b>4. Hibridación <i>Northern</i>.....</b>	<b>66</b>
4.1 Electrotransferencia de RNAs a membranas de hibridación.....	66
4.2 Prehibridación e hibridación.....	67
<b>5. Transcripción <i>in vitro</i> de RNA.....</b>	<b>67</b>
<b>6. Modificaciones de los ácidos nucleicos.....</b>	<b>68</b>
6.1 Fosforilación.....	68
6.2 Desfosforilación.....	68
<b>7. Ligación de insertos.....</b>	<b>69</b>
<b>8. Purificación de plásmidos bacterianos.....</b>	<b>69</b>
<b>9. Análisis de secuencias.....</b>	<b>69</b>
9.1 Secuenciación de plásmidos bacterianos.....	69
9.2 Búsqueda en base de datos.....	69
9.3 Alineamiento de secuencias.....	69
9.4 Traducción <i>in silico</i> .....	69

---

9.5 Predicción de motivos.....	70
<b>10. Obtención de una fracción de proteínas de tomate con actividad RNA ligasa.....</b>	<b>70</b>
<b>11. Síntesis <i>in vitro</i> de RNAs sustrato.....</b>	<b>70</b>
11.1 Viroides nucleares.....	70
11.2 Viroides cloroplásticos.....	72
<b>12. Análisis de la actividad RNA ligasa.....</b>	<b>73</b>
<b>13. Pretratamientos de degradación proteolítica y desnaturalización térmica.....</b>	<b>73</b>
<b>14. Experimentos de adenilación.....</b>	<b>74</b>
<b>15. Ensayos biológicos de infectividad.....</b>	<b>74</b>
<b>16. Extracción y purificación de RNA.....</b>	<b>74</b>
<b>17. Amplificación de ácidos nucleicos.....</b>	<b>75</b>
17.1 Transcripción inversa ( <i>reverse transcription</i> , RT).....	75
17.2 Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaction</i> , PCR).....	75
<b>18. Amplificación rápida de los extremos de un cDNA (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>, RACE).....</b>	<b>75</b>
18.1 3'-RACE.....	75
18.2 5'-RACE.....	76
18.3 Análisis de los productos obtenidos en los experimentos de RACE.....	76
<b>19. Cebadores.....</b>	<b>78</b>
19.1 Amplificación del monómero circular del PSTVd.....	78
19.2 Clonación de la DNA ligasa 1 de tomate (Dnl1SI).....	78
19.3 Clonación de la tRNA ligasa de berenjena (tRnlSm).....	79
19.3.1 3' y 5' RACE.....	79
19.3.2 Clonación en el vector pET23d(+ ).....	81
19.4 Clonación del péptido de tránsito de la tRNA ligasa de <i>A. thaliana</i> (tRnlAt).....	82
19.4.1 5' RACE.....	82
19.4.2 Clonación en el vector pERnl.....	82
<b>20. Expresión de proteínas en <i>E.coli</i> Rosetta 2.....</b>	<b>83</b>
20.1 Inducción.....	83

20.2 Extracción.....	83
20.3 Purificación.....	83
<b>21. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (PAGE-SDS).....</b>	<b>84</b>
<b>22. Tinción de geles PAGE-SDS.....</b>	<b>84</b>
<b>23. Detección mediante análisis <i>Western</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>24. Identificación de proteínas por espectrometría de masas.....</b>	<b>85</b>
24.1 Preparación de las muestras.....	85
24.2 Identificación mediante LC-MS/MS.....	86
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>89</b>
<b>1. Circularización de los viroides nucleares (familia <i>Pospiviroidae</i>).....</b>	<b>89</b>
1.1 Identificación de una actividad RNA ligasa de tomate capaz de unir extremos 5'-P y 3'-OH.....	90
1.2 Caracterización de la actividad RNA ligasa de tomate.....	92
1.2.1 Degradación proteolítica y desnaturalización térmica de la actividad enzimática.....	92
1.2.2 Clonación y secuenciación del producto ligado.....	93
1.2.3 Extremos requeridos por la actividad RNA ligasa de tomate.....	94
1.2.4 Condiciones óptimas de ligación: efecto del MgCl <sub>2</sub> , el pH y la fuerza iónica en la actividad RNA ligasa de tomate.....	95
1.3 Requerimiento de ribonucleósidos trifosfato (NTPs) de la actividad RNA ligasa de tomate y cinética de la reacción.....	97
1.4 Especificidad de sustrato de la nueva actividad RNA ligasa de tomate.....	100
1.5 Actividad adeniltransferasa de la RNA ligasa de tomate.....	103
1.6 Identificación de la proteína responsable de la actividad RNA ligasa de tomate por espectrometría de masas.....	106
1.7 Clonación del cDNA de la DNA ligasa 1 de tomate en un vector de expresión..	112
1.8 Expresión de la DNA ligasa 1 de tomate en <i>E. coli</i> : análisis de las actividades RNA ligasa y adeniltransferasa.....	113
1.9 Especificidad de sustrato de la DNA ligasa 1 de tomate.....	115
1.10 Infectividad de los RNAs monoméricos circulares del PSTVd generados por la DNA ligasa 1 de tomate.....	116

---

<b>2. Circularización de los viroides cloroplásticos (familia <i>Avsunviroidae</i>).....</b>	<b>118</b>
2.1 Clonación de la tRNA ligasa de berenjena.....	119
2.2 Clonación de la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto de la tRNA ligasa de <i>A. thaliana</i> .....	125
2.3 Expresión en <i>E. coli</i> de las tRNA ligasas de berenjena y <i>A. thaliana</i> y análisis de su actividad enzimática.....	125
2.4 Caracterización de la actividad ligasa de la tRNA ligasa de berenjena.....	127
2.4.1 Condiciones óptimas de la reacción de ligación: efecto del MgCl <sub>2</sub> , el pH y la fuerza iónica en la actividad.....	127
2.4.2 Requerimiento de ribonucleósido trifosfato.....	129
2.5 Especificidad de sustrato de la tRNA ligasa de berenjena.....	130
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>135</b>
<b>1. Circularización de los viroides nucleares (familia <i>Pospiviroidae</i>).....</b>	<b>137</b>
<b>2. Circularización de los viroides cloroplásticos (familia <i>Avsunviroidae</i>).....</b>	<b>142</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>153</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>175</b>



# RESÚMENES

---



## Resumen

Los viroides son pequeños RNAs circulares de cadena sencilla (246-401 nt) patógenos de plantas. A pesar de su pequeño tamaño y de no codificar proteínas, son capaces de replicarse autónomamente, moverse sistémicamente y, en la mayoría de los casos, provocar enfermedades en sus plantas huésped. Al no codificar proteínas propias, la replicación de los viroides depende de la interacción del RNA viroidal con factores del huésped. Esta replicación ocurre a través de un mecanismo de círculo rodante con intermediarios de RNA con tres etapas que, con algunas variaciones, se repiten en las cadenas de ambas polaridades: (1) transcripción RNA-RNA que origina RNAs oligoméricos de polaridad complementaria, (2) procesamiento de algunos de estos oligómeros a monómeros lineales, y (3) circularización de estos últimos. La presente Tesis Doctoral ha tenido como objetivo el estudio de los factores del huésped implicados en la tercera etapa de la replicación viroidal.

Con el fin de identificar los factores celulares implicados en la ligación de los RNAs monoméricos lineales de los viroides nucleares (familia *Pospiviroidae*), se ensayó la ligación *in vitro* del RNA monomérico lineal del viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd), abierto por el sitio de procesamiento fisiológico y con extremos 5'-fosfomonoéster (5'-P) y 3'-hidroxilo (3'-OH), en presencia de diferentes fracciones cromatográficas de proteínas de hojas de tomate, huésped experimental de este viroide. Una actividad enzimática capaz de circularizar el RNA viroidal se detectó en las fracciones de la columna de heparina eluidas a concentraciones de KCl en torno a 0.5 M. Esta actividad de ligación resultó ser específica de

los extremos del RNA ensayados y por lo tanto diferente de la única RNA ligasa de plantas conocida: la tRNA ligasa, que reconoce extremos 5'-hidroxilo (5'-OH) y 2',3'-fosfodiéster cíclico (2',3'>P). La nueva actividad de tomate es sensible a desnaturalización térmica y degradación proteolítica, requiere  $Mg^{2+}$  y ATP como cofactores, y muestra una alta especificidad de sustrato, ligando exclusivamente el PSTVd lineal abierto por el sitio de procesamiento fisiológico. La actividad cataliza además la circularización de los RNAs monoméricos lineales de los miembros representativos de los otros géneros de la familia *Pospiviroidae*, todos ellos abiertos por el sitio de procesamiento fisiológico. Empleando [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]ATP en la reacción de ligación se detectó una proteína adenilada de aproximadamente 90 kDa con un comportamiento cromatográfico coincidente con la actividad RNA ligasa. El análisis por espectrometría de masas de una fracción proteica conteniendo esta proteína condujo a concluir que la actividad que circulariza el RNA viroidal reside muy probablemente en la DNA ligasa 1 de tomate. Esta conclusión se confirmó cuando el cDNA correspondiente se clonó y expresó en *Escherichia coli*, y la proteína resultante se purificó y ensayó *in vitro* empleándose como sustrato el PSTVd lineal abierto en el sitio de procesamiento fisiológico.

Respecto a los factores del huésped que pudieran estar implicados en la ligación de los intermediarios replicativos de los viroides cloroplásticos (familia *Avsunviroidae*), recientemente se han identificado isoformas de la tRNA ligasa que, probablemente por un mecanismo de traducción alternativa, contienen un péptido de tránsito al cloroplasto. Esta enzima reconoce específicamente extremos de RNA 5'-OH y 2',3'>P, que son los que produce el autocorte mediado por las ribozimas de cabeza de martillo características de la familia *Avsunviroidae*. Por esta razón, se clonó el cDNA correspondiente a la isoforma cloroplástica de la tRNA ligasa de berenjena y se expresó en *E. coli*. Los ensayos de ligación *in vitro* con la proteína recombinante purificada, empleando como sustrato el RNA monomérico lineal del viroide latente de la berenjena (ELVd) con extremos 5'-OH y 2',3'>P, mostraron que la misma, en una reacción dependiente de  $Mg^{2+}$  y ATP, cataliza la eficiente circularización del ELVd lineal únicamente cuando éste se encuentra abierto por el sitio de procesamiento fisiológico. La tRNA ligasa de berenjena mostró además capacidad de circularizar los RNAs monoméricos lineales de ambas polaridades de los otros viroides cloroplásticos, poniendo de manifiesto que es muy probablemente el factor del huésped implicado en la última etapa de su replicación.

## Resum

Els viroides són menuts RNAs circulars de cadena senzilla (246-401 nt) patògens de plantes. Malgrat la seua xicoteta grandària i de no codificar proteïnes, són capaços de replicar-se autònomament, moure's sistèmicament i, en la majoria dels casos, provocar malalties en les seues plantes hoste. Al no codificar proteïnes pròpies, la replicació dels viroides depèn de la interacció de l'RNA viroidal amb factors de l'hoste. Aquesta replicació ocorre a través d'un mecanisme de cercle rodant amb intermediaris d'RNA amb tres etapes que, amb algunes variacions, es repeteixen en les cadenes d'ambdues polaritats: (1) transcripció RNA-RNA que origina RNAs oligomèrics de polaritat complementària, (2) processament d'alguns d'aquests oligòmers a monòmers lineals, i (3) circularització d'aquests últims. La present Tesi Doctoral ha tingut com a objectiu l'estudi dels factors de l'hoste implicats en la tercera etapa de la replicació viroidal.

Amb la finalitat d'identificar els factors cel·lulars implicats en la lligació dels RNAs monomèrics lineals dels viroides nuclears (família *Pospiviroidae*), es va assajar la lligació *in vitro* de l'RNA monomèric lineal del viroide del tubèrcul fusiforme de la creïlla (PSTVd), obert pel lloc de processament fisiològic i amb extrems 5'-fosfomonoéster (5'-P) i 3'-hidroxil (3'-OH), en presència de diferents fraccions cromatogràfiques de proteïnes de fulles de tomata, hoste experimental d'aquest viroide. Una activitat enzimàtica capaç de circularitzar l'RNA viroidal es va detectar en les fraccions de la columna d'heparina eluïdes a concentracions de KCl al voltant de 0.5 M. Aquesta activitat de lligació va resultar ser específica dels extrems de l'RNA assajats i per tant diferent de la única RNA lligasa de plantes coneguda: la tRNA

l·ligasa, que reconeix extrems 5'-hidroxil (5'-OH) i 2',3'-fosfodiéster cíclic (2',3'>P). La nova activitat de tomata es sensible a desnaturalització tèrmica i degradació proteolítica, requereix  $Mg^{2+}$  i ATP com a cofactors, i mostra una alta especificitat de substrat, lligant exclusivament el PSTVd lineal obert pel lloc de processament fisiològic. L'activitat catalitza a més la circularització dels RNAs monomèrics lineals dels membres representatius dels altres gèneres de la família *Pospiviroidae*, tots ells oberts pel lloc de processament fisiològic. Emprant  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  en la reacció de lligació es va detectar una proteïna adenilada de aproximadament 90 kDa amb un comportament cromatogràfic que coincideix amb l'activitat RNA lligasa. L'anàlisi per espectrometria de masses d'una fracció proteïca contenint aquesta proteïna va portar a concloure que la activitat que circularitza el RNA viroidal resideix molt probablement en la DNA lligasa 1 de tomata. Aquesta conclusió es va confirmar quan el cDNA corresponent es va clonar i expressar en *Escherichia coli*, i la proteïna resultant es va purificar i assajar *in vitro* emprant-se com a substrat el PSTVd lineal obert al lloc de processament fisiològic.

Respecte als factors de l'hoste que pogueren estar implicats en la lligació dels intermediaris replicatius dels viroides cloroplàstics (família *Avsunviroidae*), recentment s'han identificat isoformes de la tRNA lligasa que, probablement per un mecanisme de traducció alternativa, contenen un pèptid de trànsit al cloroplast. Aquest enzim reconeix específicament extrems d'RNA 5'-OH i 2',3'>P, que són els que produeix l'autotall intervingut per els ribozims de cap de martell característics de la família *Avsunviroidae*. Per aquesta raó, es va clonar el cDNA corresponent a la isoforma cloroplàstica de la tRNA lligasa d'albergínia i es va expressar en *E. coli*. Els assajos de lligació *in vitro* amb la proteïna recombinant purificada, emprant com a substrat l'RNA monomèric lineal del viroide latent de l'albergínia (ELVd) amb extrems 5'-OH i 2',3'>P, mostraren que la mateixa, en una reacció dependent de  $Mg^{2+}$  i ATP, catalitza l'eficient circularització de l'ELVd lineal únicament quan aquest es troba obert pel lloc de processament fisiològic. La tRNA lligasa d'albergínia va mostrar a més capacitat de circularitzar els RNAs monomèrics lineals d'ambdues polaritats dels altres viroides cloroplàstics, ficant de manifest que molt probablement es el factor de l'hoste implicat en la última etapa de la seua replicació.

## Summary

Viroids are small, circular, single-stranded, non-protein-coding RNAs (246-401 nt) from plants. Despite these singular properties, viroids can replicate autonomously, move systemically, and in most cases cause disease in their hosts. Given that they do not encode proteins, replication of viroids relies very strictly on their interaction with host factors. This replication occurs via a rolling-circle mechanism based on RNA intermediates with three steps, which with some variations are repeated in the strands of both polarities: (1) RNA-RNA reiterative transcription of the initial circular template that generates oligomeric RNAs of complementary polarity, (2) cleavage of some of these RNAs to linear monomers, and (3) circularization of the latter. This Doctoral Thesis has focused on the study of the host factors involved in the third step of viroid replication.

For the identification of cellular factors involved in ligation of nuclear viroids (family *Pospiviroidae*), circularization of the linear monomeric RNA of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), opened at the physiological processing site and with 5'-phosphomonoester (5'-P) and 3'-hydroxyl (3'-OH) termini, was assayed in the presence of protein chromatographic fractions of tomato, an experimental host of this viroid. An enzymatic activity able to circularize the viroid RNA was detected in fractions of the heparin column eluting around 0.5 M KCl. This ligation activity is specific of the RNA termini assayed and, therefore, different from the only plant RNA ligase known: the tRNA ligase, which recognizes 5'-hydroxyl (5'-OH) and 2',3'-cyclic phosphodiester (2',3'>P) termini. The new tomato activity is sensitive to thermal denaturation and proteolytic digestion, requires ATP and Mg<sup>2+</sup>, and shows high

substrate specificity, circularizing only the linear PSTVd opened at the physiological processing site. The activity also mediates circularization of the linear monomeric RNAs of representative members of other genera of the family *Pospiviroidae*, all opened at their physiological processing sites. By using [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP in the ligation reaction, an adenylated protein of approximately 90 kDa with a chromatographic behavior identical to the RNA ligase activity was detected. Mass spectrometry analysis of a fraction containing this protein strongly suggested that the activity mediating circularization of the viroid RNA probably resides in the tomato DNA ligase 1. This hypothesis was confirmed when the corresponding cDNA was cloned and expressed in *Escherichia coli*, and the resulting protein was purified and tested *in vitro* using the linear PSTVd opened at the physiological processing site as substrate.

Regarding the host factors involved in the circularization of the replicative intermediates of chloroplastic viroids (family *Avsunviroidae*), it has been recently reported that the tRNA ligase may contain a transit peptide to the chloroplast probably resulting from a mechanism of alternative translation. This enzyme specifically recognizes 5'-OH and 2',3'>P RNA termini, which are those characteristically produced by the hammerhead ribozymes that mediate self-cleavage in the family *Avsunviroidae*. Consequently, the cDNA corresponding to the chloroplastic isoform of the eggplant tRNA ligase was cloned and expressed in *E. coli*. *In vitro* ligation assays with the purified recombinant protein, using the monomeric linear RNA of the *Eggplant latent viroid* (ELVd) with 5'-OH and 2',3'>P termini as substrate, showed that the tRNA ligase, in an ATP- and Mg $^{2+}$ -dependent reaction, efficiently catalyzes the circularization of the linear ELVd RNA only when it is opened at the physiological processing site. The enzyme was also able to circularize the monomeric linear RNAs of both polarities of the other chloroplastic viroids, indicating that most likely it is the host factor involved in the last step of their replication.

# INTRODUCCIÓN

---



# 1. Los viroides

## 1.1 Características generales de los viroides

Tras su descubrimiento hace cuatro décadas (Diener, 1971), los viroides siguen siendo hoy en día sistemas únicos para el estudio de las relaciones entre estructura y función en el RNA. Están exclusivamente compuestos por un RNA circular de cadena sencilla y pequeño tamaño (246-401 nt) con un alto grado de autocomplementariedad que promueve un plegamiento compacto (Diener, 2001; Flores *et al.*, 2004; Tabler y Tsagris, 2004; Flores *et al.*, 2005a; Darós *et al.*, 2006; Ding y Itaya, 2007). Al contrario que los virus, no codifican proteínas propias (Davies *et al.*, 1974; Hall *et al.*, 1974; Semancik *et al.*, 1977; revisado en Diener, 2001), pese a lo cual son capaces de replicarse autónomamente e inducir enfermedades en plantas, muchas de ellas de importancia económica. Al no codificar proteínas, toda la información necesaria para seleccionar ciertas plantas huéspedes, replicarse en ellas, moverse a su través y completar su ciclo infeccioso reside en la capacidad del RNA viroidal de interactuar con factores del huésped.

Los viroides infectan diferentes tipos de plantas cultivadas causando síntomas de diversa intensidad que abarcan desde efectos suaves, como una leve reducción del crecimiento, hasta pronunciadas deformaciones, necrosis y clorosis de hojas, frutos y órganos de reserva y marcado enanismo. Sin embargo, algunos viroides no causan síntomas comportándose como simples replicones de RNA más que como patógenos.

La simplicidad estructural y funcional de los viroides, junto con la capacidad de algunos de ellos de formar ribozimas de cabeza de martillo, los motivos de RNA catalítico más simples conocidos (Hutchins *et al.*, 1986; Prody *et al.*, 1986; Forster y Symons, 1987; Flores *et al.*, 2001) (ver más adelante), sustenta la idea de que los viroides tienen un origen evolutivo muy antiguo e independiente del de los virus, pudiendo considerárseles fósiles moleculares derivados de los primeros replicones del mundo de RNA que se postula antecedió a la aparición de la actual vida celular basada en el DNA y las proteínas (Diener, 1989; revisado en Diener, 2001).

## 1.2 Estructura y clasificación de los viroides

Los 32 viroides caracterizados biológica y molecularmente hasta el momento se agrupan en dos familias (Fig. 1). La mayoría de ellos pertenecen a la familia *Pospiviroidae*, cuya especie tipo es el viroide del tubérculo fusiforme de la patata (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd), el primer viroide descrito (Diener, 1971; Gross *et al.*, 1978). Los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de una región central conservada (*central conserved region*, CCR), por carecer de ribozimas y por replicarse y acumularse en el núcleo (Diener, 1971; Harders *et al.*, 1989; Bonfiglioli *et al.*, 1996; Qi y Ding, 2003a). Los restantes cuatro viroides, que se engloban dentro la familia *Avsunviroidae*, con el viroide del manchado solar del aguacate (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) (Symons, 1981) como especie tipo, carecen de la CCR y se replican y acumulan en el cloroplasto (Mohamed y Thomas, 1980; Bonfiglioli *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1994; Bussièrre *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 1999). Además, estos cuatro viroides tienen la propiedad de que sus cadenas de ambas polaridades se autocortan a través de ribozimas de cabeza de martillo (Hutchins *et al.*, 1986; Flores *et al.*, 2001).

Aparte de estos criterios, reconstrucciones filogenéticas a partir de las secuencias completas de los viroides (Flores *et al.*, 2005b) sostienen este esquema de clasificación. Dentro de cada género, el criterio para delimitar la especie viroidal es un nivel de identidad de secuencia menor del 90% y diferentes propiedades biológicas. Los viroides, como los virus, se propagan en sus huéspedes como poblaciones de variantes de secuencia relacionadas (cuasi-especies), aunque una o más suelen predominar en la población. Algunas variantes viroidales con pequeños cambios en ciertas regiones están directamente relacionadas con enfermedades específicas (Reanwarakorn y Semancik, 1998; Malfitano *et al.*, 2003; Palacio-Bielsa *et al.*, 2004) o con alteraciones en la intensidad de los síntomas (Schnölzer *et al.*, 1985; Visvader y Symons, 1986; De la Peña *et al.*, 1999).

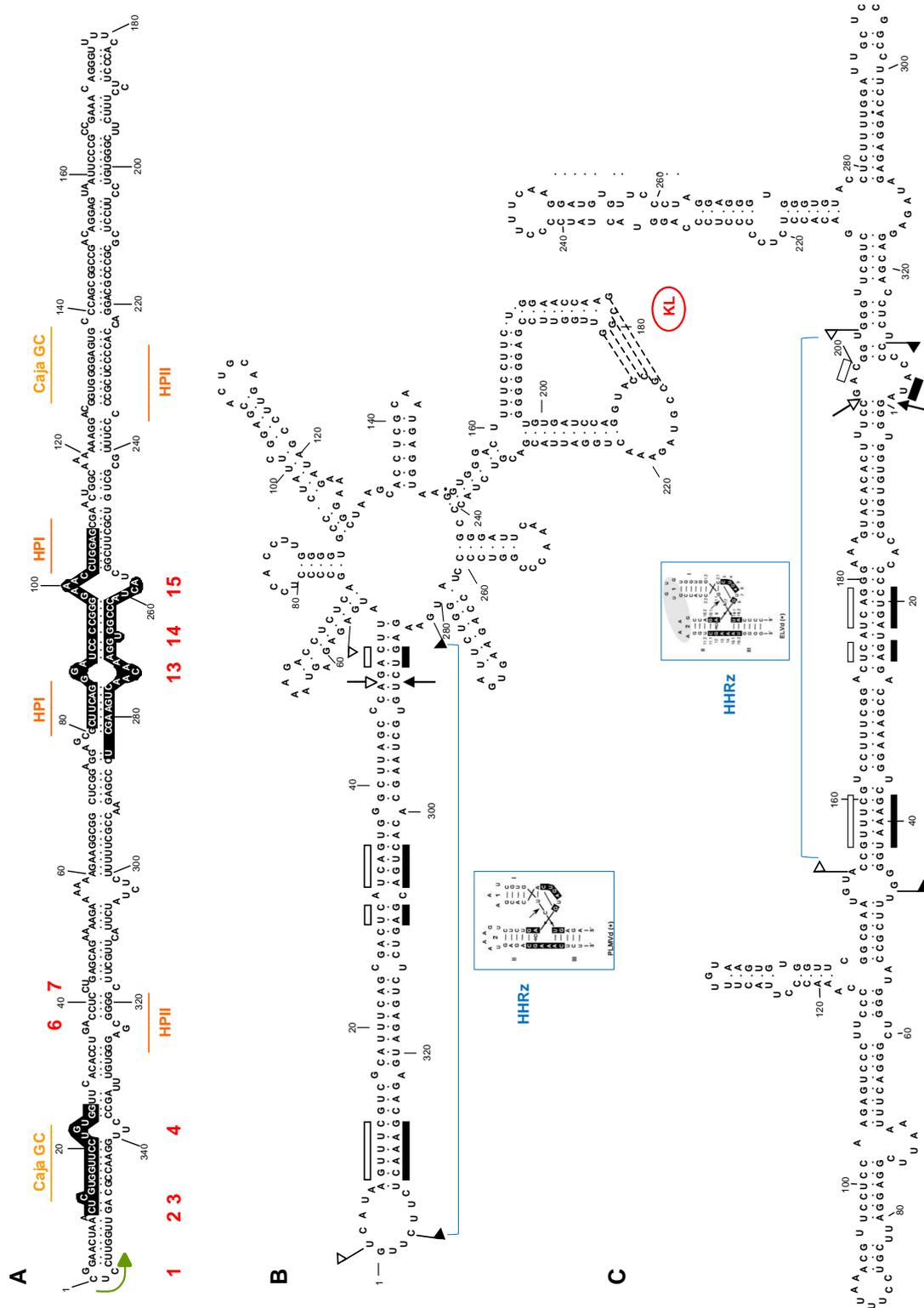
La base de datos de RNA subviral [*The Subviral RNA Database*, <http://subviral.med.uottawa.ca>, (Rocheleau y Pelchat, 2006)] presenta además información actualizada sobre la secuencia y estructura de los viroides y sus variantes.

POSPIVIROIDAE	POSPIVIROIIDE	PSTVd (Viroide de tubérculo fusiforme de la patata)	359 nt	Gross et al., 1978	
		CSVd (Viroide del enanismo del crisantemo)	356 nt	Haseloff y Symons, 1981	
		CEVd (Viroide de la exocortis de los cítricos)	371 nt	Gross et al., 1982	
		TPMVd (Viroide de la planta macho del tomate)	360 nt	Kiefer et al., 1983	
		TASVd (Viroide del enanismo apical del tomate)	360 nt	Kiefer et al., 1983	
		CLVd (Viroide latente de columnnea)	370 nt	Hammond et al., 1989a	
		MPVd (Viroide la papita mexicana)	360 nt	Martinez-Soriano et al., 1996	
		IrVd-1 (Viroide 1 de iresine)	370 nt	Spieker et al., 1996a	
		TCDVd (Viroide del enanismo clorótico del tomate)	360 nt	Singh et al., 1999	
	PCFVd (Viroide del fruto pequeño del pimiento)	348 nt	Verhoeven et al., 2009		
	HOSTUVIROIDE	HSVd (Viroide del enanismo del lúpulo)	297 nt	Ohno et al., 1983a	
	COCADVIROIIDE	CCCVd (Viroide del cadang-cadang del cocotero)	246 nt	Haseloff et al., 1982	
		CTiVd (Viroide de la tinanga del cocotero)	254 nt	Keese et al., 1988	
		HLVd (Viroide latente del lúpulo)	256 nt	Fuchta et al., 1988	
		CBCVd (Viroide de la corteza agrietada de los cítricos)	284 nt	Fuchta et al., 1991	
	APSCAVIROIDE	ASSVd (Viroide de la piel cicatrizada de la manzana)	329 nt	Hashimoto y Koganezawa, 1987	
		GYSVd-1 (Viroide 1 del moteado amarillo de la vid)	367 nt	Koltunow y Rezaian, 1988	
		GYSVd-2 (Viroide 2 del moteado amarillo de la vid)	363 nt	Koltunow et al., 1989	
		AGVd (Viroide australiano de la vid)	369 nt	Rezaian, 1990	
		CBLVd (Viroide de la hoja curvada de los cítricos)	318 nt	Ashulin et al., 1991	
		PBCVd (Viroide de los chancros pustulosos del peral)	315 nt	Hernández et al., 1992	
		CDVd (Viroide del enanismo de los cítricos)	294 nt	Rakowski et al., 1994	
		ADFVd (Viroide del fruto picado del manzano)	306 nt	Di Serio et al., 1996	
		CVd-V (Viroide V de los cítricos)	294 nt	Serra et al., 2008	
		CVd-VI (Viroide VI de los cítricos)	331 nt	Ito et al., 2001	
		COLEVIROIIDE	CbVd-1 (Viroide 1 de <i>CoLeus blumei</i> )	248 nt	Spieker et al., 1990
	CbVd-2 (Viroide 2 de <i>CoLeus blumei</i> )		301 nt	Spieker, 1996b	
	CbVd-3 (Viroide 3 de <i>CoLeus blumei</i> )		361 nt	Spieker et al., 1996	
	AVSUNVIROIDAE	AVSUNVIROIIDE	ASEVd (Viroide del manchado solar del aguacate)	247 nt	Symons, 1981
		PELAMOVIROIDE	PLMVd (Viroide del mosaico latente del melocotonero)	337 nt	Hernández y Flores, 1992
			ChCMVd (Viroide del moteado clorótico del crisantemo)	399 nt	Navarro y Flores, 1997
		ELAVIROIDE	ELVd (Viroide latente de la berenjena)	333 nt	Fadda et al., 2003a

**Figura 1.- Clasificación de los viroides del ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) en su última actualización (2009).** Éstos se agrupan en dos familias, *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, que están compuestas por cinco y tres géneros, respectivamente. Las especies tipo de cada género se destacan en verde. Para cada especie se indica la abreviatura de su nombre en inglés y el nombre completo en castellano, junto con el tamaño en nucleótidos y la referencia del trabajo donde se describió molecularmente.

### 1.2.1 Familia *Pospiviroidae*

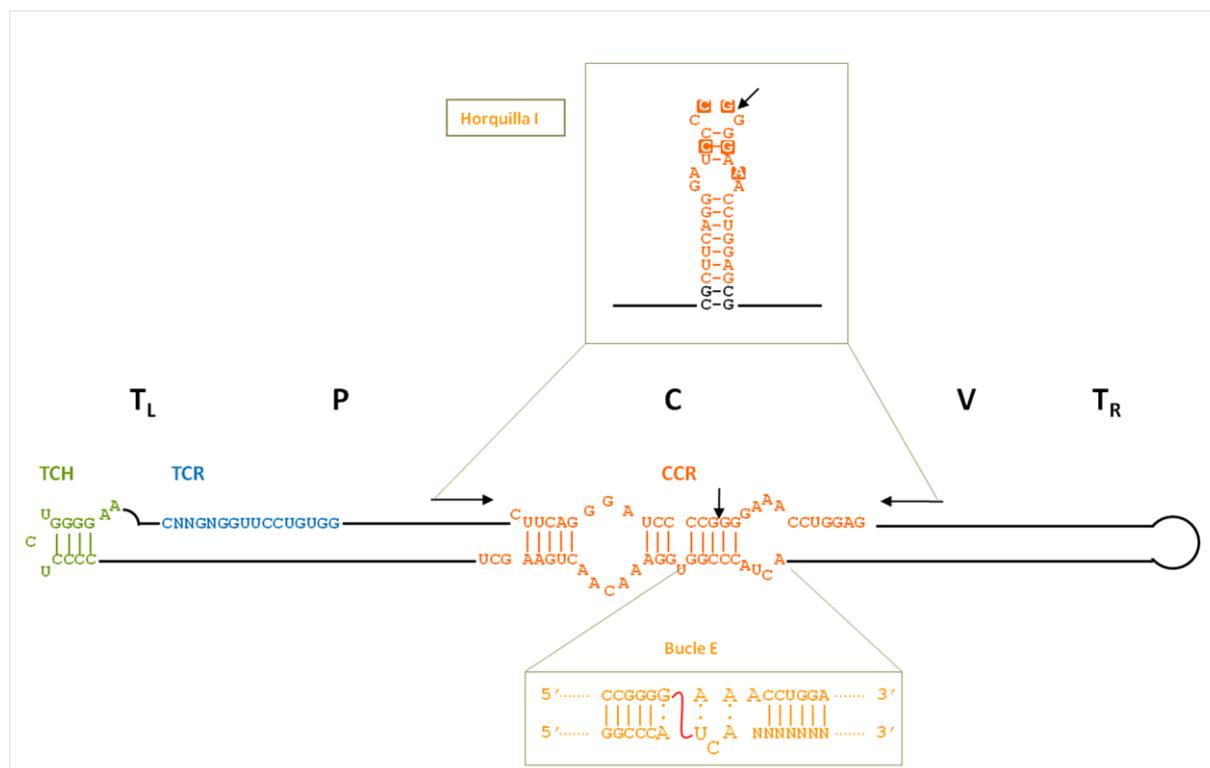
Como se ha comentado anteriormente, la mayoría de las más de 30 especies de viroides conocidas (Flores *et al.*, 2004) pertenecen a la familia *Pospiviroidae*, cuya especie tipo es el PSTVd. Este viroide y presumiblemente otros miembros de su familia adoptan *in vitro* una estructura secundaria de mínima energía libre en forma de varilla (o cuasi-varilla) formada por regiones cortas de doble cadena que se alternan con otras de menor autocomplementariedad que forman bucles de simple cadena (Sogo *et al.*, 1973; Sanger *et al.*, 1976; Dingley *et al.*, 2003) (Fig. 2A). Las repeticiones y deleciones observadas en ciertos viroides, como el viroide del cadang-cadang del cocotero (*Coconut cadang-cadang viroid*, CCCVd) o el viroide de la exocortis de los cítricos (*Citrus exocortis viroid*, CEVd), siempre preservan esta estructura en forma de varilla indicando que muy probablemente también existe *in vivo* (Haseloff *et al.*, 1982; Semancik *et al.*, 1994; Fadda *et al.*, 2003b). A partir de comparaciones de secuencia, esta estructura en forma de varilla se ha dividido en cinco dominios estructurales y funcionales: central (C), patogénico (P), variable (V) y terminal derecho (T<sub>R</sub>) e izquierdo (T<sub>L</sub>) (Keese y Symons, 1985; Sano *et al.*, 1992) (Fig. 3). La CCR que caracteriza a los miembros de esta familia se encuentra en el dominio C y está formada por dos tramos nucleotídicos conservados (y flanqueado el de la rama superior por repeticiones invertidas). Dependiendo de la naturaleza de la CCR y de la presencia o ausencia de una región terminal conservada (*terminal conserved region*, TCR) en la rama superior del dominio T<sub>L</sub>, y de una horquilla terminal conservada (*terminal conserved hairpin*, TCH) también localizada en el dominio T<sub>L</sub> y conservada en secuencia y estructura secundaria, los miembros de esta familia se dividen en cinco géneros (Flores *et al.*, 2005b). Algunos de estos dominios estructurales han sido involucrados en funciones específicas: el dominio C, particularmente la rama superior de la CCR, en el corte y ligación de los intermediarios multiméricos de RNA del PSTVd generados durante su ciclo replicativo (Baumstark *et al.*, 1997; Gas *et al.*, 2007) y el dominio P, en la patogénesis del PSTVd y otros viroides relacionados. La situación *in vivo* es probablemente más complicada, pudiendo algunas funciones ser reguladas por determinantes estructurales localizados en más de un dominio (Sano *et al.*, 1992). Por otra parte, a algunas regiones conservadas, como la TCR y la TCH, todavía no se les ha asignado una función concreta.



**Figura 2.- Estructuras secundarias de mínima energía libre propuestas para viroides de las familias *Pospipviroidae* y *Avsunviroidae*.** (A) Conformación en forma de varilla del PSTVd. Sobre fondo negro se destacan los nucleótidos que forman parte de la TCR y la CCR. Además se indican los nucleótidos que forman el tallo de las horquillas I (HPI) y II (HPII), así como las cajas GC y los bucles implicados en transcripción (1, 2, 3 y 4) (Kolonko *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2008), movimiento célula a célula (6, 7) (Zhong *et al.*, 2007; Takeda *et al.*, 2011) y conformación de la CCR (13, 14, 15). La flecha verde indica el sitio propuesto de inicio de la transcripción U359/C1 de las cadenas (-). (B) Estructura ramificada del PLMVd y (C) en forma de quasi-varilla del ELVD. Los banderines delimitan las ribozimas de cabeza de martillo de ambas polaridades, indicándose con barras los nucleótidos conservados en las mismas. En los cuadros se muestra la estructura de las ribozimas de cabeza de martillo de polaridad positiva de ambos viroides. Las flechas señalan el sitio de autocorte. Los símbolos negros y blancos corresponden a las polaridades positiva y negativa, respectivamente. Las líneas discontinuas en la estructura del PLMVd muestran las interacciones de tipo “kissing loop” (KL) (Bussièrre *et al.*, 2000; Gago *et al.*, 2005).

Además de la conformación más estable en forma de varilla, los viroides de esta familia pueden adoptar durante su desnaturalización térmica (y posiblemente durante su replicación) otras estructuras secundarias metaestables como la horquilla I (*hairpin I*, HPI), formada por la rama superior de la CCR y las secuencias invertidas repetidas que la flanquean (Fig. 2A y 3). Esta estructura parece estar implicada en el procesamiento de los intermediarios oligoméricos generados durante la replicación (Meshi *et al.*, 1985; Visvader *et al.*, 1985; Diener, 1986; Gas *et al.*, 2007), habiéndose cartografiado el sitio de procesamiento *in vivo* entre las posiciones tercera y cuarta de los cuatro nucleótidos que forman el tetrabucle que cierra esta horquilla I (Gas *et al.*, 2007). Una segunda estructura secundaria metaestable, la horquilla II (*hairpin II*, HPII), puede formarse en el PSTVd por interacciones entre las secuencias nucleotídicas 227 a 236 y 319 a 328, localizadas a ambos lados de la CCR en la hebra inferior de la estructura en varilla (Henco *et al.*, 1979; Riesner *et al.*, 1979) (Fig. 2A). Cambios nucleotídicos que impiden la formación de la HPII siempre reversionan a la secuencia silvestre en plantas de tomate infectadas, resaltando la importancia de este elemento estructural. Se ha demostrado la existencia de la HPII *in vitro* como *in vivo* (Schröder y Riesner, 2002) y postulado que es crítica para la transcripción del RNA (-) del PSTVd (Loss *et al.*, 1991; Owens *et al.*, 1991; Qu *et al.*, 1993; Kolonko *et al.*, 2006).

Entre los elementos de estructura terciaria caracterizados en los miembros de la familia *Pospiviroidae*, destaca el denominado bucle E (Fig. 3), inicialmente identificado en el 5S rRNA y posteriormente en la CCR del PSTVd *in vitro* (Branch *et al.*, 1985) e *in vivo* (Eiras *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007b). Este elemento se ha involucrado en la etapa final de ligación del ciclo replicativo (Baumstark *et al.*, 1997; Gas *et al.*, 2007), así como en patogénesis (Qi y Ding, 2003b), adaptación al huésped (Wassenegger *et al.*, 1996; Qi y Ding, 2002; Zhu *et al.*, 2002) y transcripción (Zhong *et al.*, 2006).



**Figura 3.- Esquema de la estructura secundaria característica de un miembro de la familia *Pospiviroidae*.** En la parte superior se indican los dominios  $T_L$  (terminal izquierdo), P (patogénico), C (central), V (variable) y  $T_R$  (terminal derecho). Los nucleótidos que forman parte de las regiones conservadas TCH, TCR y CCR se muestran en verde, azul y naranja, respectivamente. Las flechas que flanquean la rama superior de la CCR indican los nucleótidos que, junto con los conservados, forman repeticiones invertidas imperfectas que dan lugar a la horquilla I. La flecha central en la CCR marca el sitio de procesamiento. En la parte superior de la figura se representa la estructura de la horquilla I del PSTVd, indicándose en blanco los nucleótidos conservados en posiciones similares en la familia *Pospiviroidae* y con una flecha el sitio de procesamiento. En la parte inferior se muestra el bucle E identificado como un elemento de estructura terciaria en la CCR del PSTVd. Las letras N indican los nucleótidos no conservados y las de mayor tamaño los característicos del bucle E. La línea en forma de S señala los nucleótidos que se entrecruzan tras irradiación con luz ultravioleta. Los guiones representan interacciones canónicas Watson-Crick.

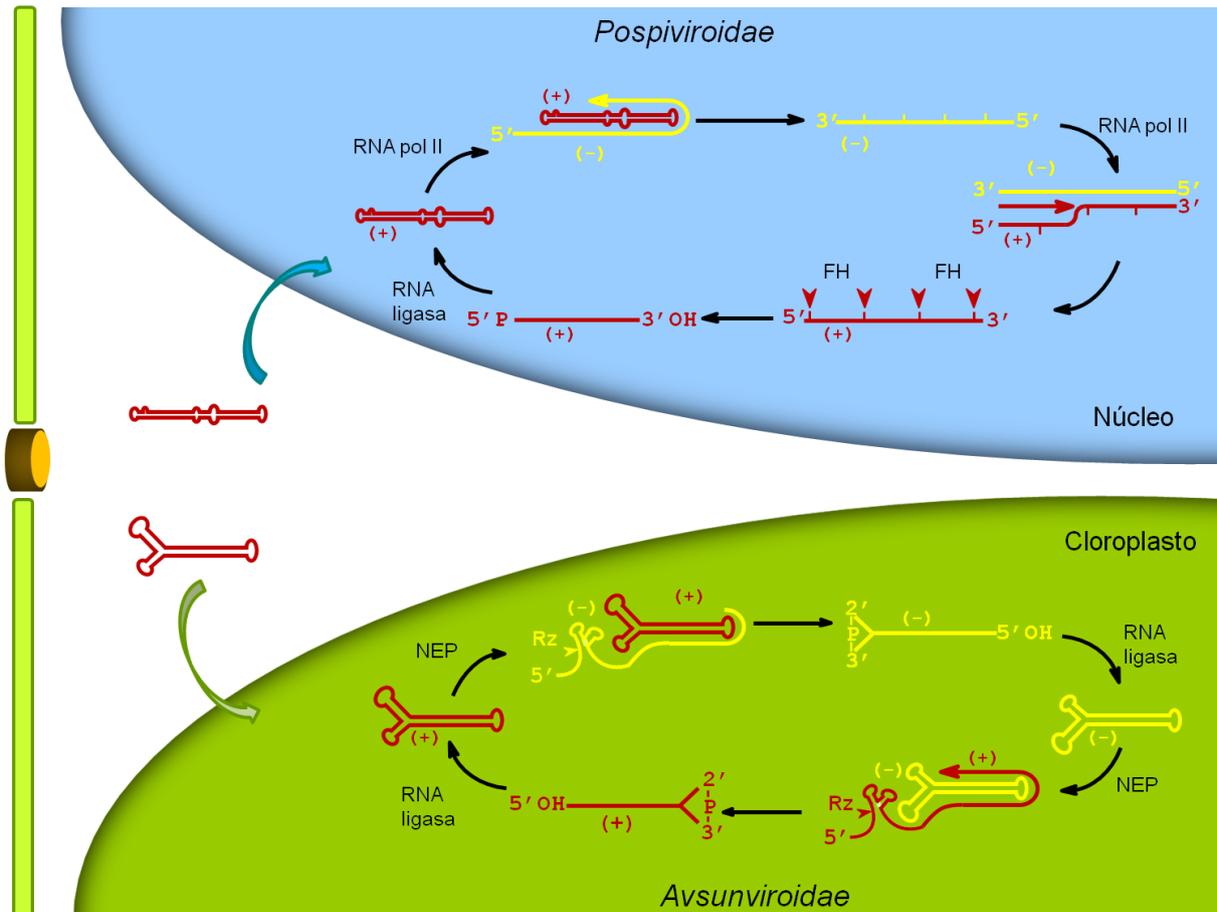
### 1.2.2 Familia *Avsunviroidae*

Los cuatro viroides que forman esta segunda familia (revisado en Flores *et al.*, 2000), cuya especie tipo es el ASBVd, no presentan los motivos conservados CCR, TCR y TCH. Sin embargo, muestran la peculiaridad de formar estructuras ribozimáticas de cabeza de martillo que median el autocorte de los RNAs multiméricos de ambas polaridades originados durante la replicación (Flores *et al.*, 2000; Fadda *et al.*, 2003a) (ver más adelante). Aparte de los nucleótidos conservados que forman el centro catalítico de estas estructuras de cabeza de martillo, no hay más similitudes de secuencia entre ellos. El viroide del mosaico latente del melocotonero (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) y el viroide del moteado clorótico del crisantemo (*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, CChMVd) se agrupan en un mismo género por su estructura secundaria ramificada (Hernández y Flores, 1992; Navarro y Flores, 1997; De la Peña *et al.*, 1999) (Fig. 2B) y por su insolubilidad en LiCl 2 M (Navarro y Flores, 1997). Estas estructuras ramificadas están compuestas por múltiples horquillas y bucles internos y son muy probablemente relevantes biológicamente, ya que la heterogeneidad de secuencia encontrada en diferentes variantes naturales, particularmente del CChMVd, preservan su estabilidad: los cambios aparecen en los bucles o, cuando lo hacen en los tallos, son covariaciones o mutaciones compensatorias (Navarro y Flores, 1997; De la Peña *et al.*, 1999; Gago *et al.*, 2005). La estructura ramificada aparece además estabilizada por elementos de estructura terciaria (pseudonudos de tipo *kissing loop*), que son interacciones canónicas entre nucleótidos de bucles de algunas de las horquillas que forman la estructura ramificada. Estos elementos han sido identificados en el PLMVd por marcaje químico y enzimático *in vitro* (Bussièrre *et al.*, 2000) y en el CChMVd por mutagénesis dirigida, bioensayos y técnicas biofísicas (Gago *et al.*, 2005), donde dicha interacción es crítica para el plegamiento *in vitro* y para la viabilidad *in vivo*. Por su parte, el ASBVd y el viroide latente de la berenjena (*Eggplant latent viroid*, ELVd) adoptan una estructura en forma de cuasi-varilla (Fig. 2C). El ASBVd, el único viroide con un alto contenido en A + U (62%) (Hutchins *et al.*, 1986), forma un género monoespecífico y el ELVd, cuyas propiedades se encuentran entre las de los miembros de los otros dos géneros, también (Fadda *et al.*, 2003a).

### 1.3 Replicación de los viroides

Aunque en un principio se sugirió que el RNA del PSTVd podría haberse originado a partir de genes de solanáceas por creer que contenía secuencias homólogas al DNA de su huésped experimental (tomate) (Hadidi *et al.*, 1976), experimentos posteriores no confirmaron esta propuesta en plantas infectadas por PSTVd o CEVd (Branch y Dickson, 1980; Zaitlin *et al.*, 1980). Tras la identificación en *Gynura aurantiaca* infectada de RNAs complementarios al RNA genómico del CEVd, éstos fueron propuestos como los posibles intermediarios replicativos, restándole soporte a la participación de intermediarios de DNA (Grill y Semancik, 1978). Además, en plantas de tomate infectadas con PSTVd, se observó que el RNA viroidal circular más abundante (arbitrariamente considerado como de polaridad positiva) estaba acompañado de RNAs oligoméricos de polaridad negativa presumiblemente resultantes de la transcripción reiterativa del primero (Branch y Robertson, 1984). También en protoplastos electroporados (Qi y Ding, 2002) las únicas moléculas de polaridad negativa que se acumulan son cadenas oligoméricas. En plantas infectadas por miembros de la familia *Avsunviroidae*, sin embargo, sí que se ha detectado el RNA monomérico circular de polaridad negativa, como por ejemplo en aguacate infectado con ASBVd (Hutchins *et al.*, 1985; Darós *et al.*, 1994) y en melocotonero infectado con PLMVd (Bussière *et al.*, 1999). Se ha comprobado además que en los miembros de esta familia los RNAs de ambas polaridades son capaces de autocortarse *in vitro* a través de ribozimas de cabeza de martillo (Hutchins *et al.*, 1986; Hernández y Flores, 1992; Darós *et al.*, 1994; Navarro y Flores, 1997; Fadda *et al.*, 2003a).

En resumen, dada la existencia en tejidos infectados de RNAs viroidales circulares y oligoméricos de una o las dos polaridades, se asume que el modo de replicación de los viroides ocurre a través de un mecanismo de círculo rodante (Branch y Robertson, 1984) con sólo intermediarios de RNA (Grill y Semancik, 1978). De forma más específica, se han propuesto dos variantes alternativas para la replicación de los viroides de las dos familias: la asimétrica para los miembros de la familia *Pospiviroidae* (Branch y Robertson, 1984; Ishikawa *et al.*, 1984) y la simétrica para los miembros de la familia *Avsunviroidae* (Hutchins *et al.*, 1985; Bussière *et al.*, 1999) (Fig. 4).



**Figura 4.- Mecanismo de círculo rodante propuesto para la replicación de los viroides.** En la parte superior de la figura se representa la variante asimétrica que siguen los miembros de la familia *Pospiviroidae* en el núcleo. En esta variante sólo opera un círculo rodante y es un factor del huésped (FH) el que media el corte de los RNAs oligoméricos (+) dando lugar a monómeros lineales con extremos 5'-P y 3'-OH. En la parte inferior se muestra la variante simétrica seguida por los miembros de la familia *Avsunviroidae* en el cloroplasto, en la que los oligómeros viroidales (+) y (-) se autocortan ribozimáticamente (Rz) generando RNAs lineales de longitud completa con extremos 5'-OH y 2',3'-P. Los RNAs viroidales (+) y (-) se representan en rojo y amarillo, respectivamente. Las puntas de flecha indican los sitios de corte.

En la variante asimétrica, el monómero circular de polaridad positiva es transcrito por una RNA polimerasa dando lugar a un oligómero de polaridad negativa. Éste a su vez ejerce de molde en una segunda transcripción RNA-RNA para la síntesis de un oligómero de polaridad positiva, que es procesado presumiblemente por factores del huésped siendo primero monomerizado y posteriormente circularizado. En la variante simétrica, el monómero circular de polaridad positiva sirve de molde para la transcripción de un oligómero de polaridad negativa que se autocorta a través de ribozimas de cabeza de martillo. Estos monómeros de polaridad negativa se circularizan y ejercen de molde para la síntesis de oligómeros de polaridad positiva, que de nuevo se autocortan y ligan para finalmente dar lugar al monómero circular de polaridad positiva. La diferencia fundamental entre ambas variantes es el molde de polaridad negativa, ya que corte y ligación ocurren únicamente en las cadenas positivas en la variante asimétrica, mientras que en la variante simétrica ocurren en las cadenas de ambas polaridades.

Dado que los viroides no codifican proteínas propias, las tres actividades catalíticas requeridas, RNA polimerasa, RNasa (en el caso de los miembros de la familia *Pospiviroidae*) y RNA ligasa, deben residir en proteínas del huésped. Como ya se ha comentado anteriormente, el corte de los oligómeros de polaridad positiva y negativa ocurre de forma autocatalítica en la familia *Avsunviroidae* y está mediada por ribozimas de cabeza de martillo (Hutchins *et al.*, 1986; Prody *et al.*, 1986; Forster y Symons, 1987).

### 1.3.1 Transcripción: enzimas implicadas y sitio de inicio

A pesar de la existencia en plantas de RNA polimerasas RNA dependientes, su localización citoplasmática es incompatible con su posible intervención en la replicación de los viroides, que, como ya se ha comentado anteriormente, ocurre en el núcleo (familia *Pospiviroidae*) o en el cloroplasto (familia *Avsunviroidae*). Por lo tanto, la localización subcelular de los viroides condiciona los factores con los que interaccionan y para ambas familias se ha postulado que las polimerasas que los transcriben son RNA polimerasas dependientes de DNA. El mecanismo por el cual los viroides son capaces de subvertir la especificidad de molde de estas polimerasas y forzarlas a transcribir un molde de RNA no se conoce.

La enzima que cataliza la polimerización de las cadenas de polaridad tanto positiva como negativa en el PSTVd y otros miembros de la familia *Pospiviroidae* es la RNA polimerasa II nuclear. Análisis de transcripción *in vivo* (Mühlbach y Sängner, 1979) e *in vitro* (Flores y Semancik, 1982; Schindler y Mühlbach, 1992) muestran que la replicación del PSTVd y de otros viroides representativos de esta familia, como el CEVd y el viroide del

enanismo del lúpulo (*Hop stunt viroid*, HSVd), es inhibida por las bajas concentraciones de la toxina fúngica  $\alpha$ -amanitina que característicamente inhiben la RNA polimerasa II nucleoplasmática. Por otra parte, ensayos de inmunoprecipitación de fracciones cromatínicas de tomate infectado por el CEVd con un anticuerpo monoclonal que reconoce un dominio conservado en el extremo terminal carboxílico de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II muestran que esta subunidad coprecipita con las cadenas viroidales de ambas polaridades (Warrilow y Symons, 1999).

En cuanto a otras proteínas que pudieran estar implicadas en la replicación de los viroides nucleares, se ha comprobado que la proteína Virp1, aislada en un rastreo de una genoteca de expresión de tomate y que contiene una señal de localización nuclear (Martínez de Alba *et al.*, 2003), interacciona con las regiones terminales derechas del PSTVd y el HSVd (Gozmanova *et al.*, 2003; Maniataki *et al.*, 2003). Esta proteína parece estar implicada en replicación, puesto que el PSTVd no se replica en protoplastos aislados de plantas de *Nicotiana benthamiana* transgénicas con la expresión de Virp1 suprimida (Kalantidis *et al.*, 2007).

La naturaleza circular de los viroides hace posible que la síntesis de los RNAs viroidales pueda iniciarse tanto en un sitio específico (dirigida por secuencias promotoras) como al azar, pues ambas situaciones permiten la transcripción completa de un molde circular. A este respecto, los datos existentes acerca de los sitios de inicio de la transcripción de los miembros de la familia *Pospiviroidae* se basan mayoritariamente en estudios con el PSTVd e implican al dominio terminal izquierdo como crítico para la iniciación de la transcripción del RNA genómico (+). Análisis *in vitro* con extractos nucleares de patata suplementados con el RNA monomérico (+) circular del PSTVd han cartografiado el sitio de inicio de las cadenas (-) de este viroide en los nucleótidos U359 o C1 del bucle terminal izquierdo del molde de polaridad positiva (Fig. 2A, bucle 1) (Kolonko *et al.*, 2006). Al alargar este bucle mediante mutagénesis, la replicación en protoplastos o la infección en plantas de *N. benthamiana* se ven inhibidas. Por otra lado, la interrupción mediante mutagénesis dirigida de cada uno de los tres bucles consecutivos al bucle terminal izquierdo (Fig. 2A, bucles 2, 3 y 4) inhibe la replicación del PSTVd en protoplastos (Zhong *et al.*, 2008). Estos análisis mutacionales también han involucrado a dos supuestas cajas GC de la estructura secundaria del PSTVd en transcripción (Kolonko *et al.*, 2006).

Se ha propuesto que la RNA polimerasa cloroplástica de codificación nuclear (*nuclear encoded polymerase*, NEP) es la enzima involucrada en la replicación de los miembros de la familia *Avsunviroidae*. Ensayos de transcripción en cloroplastos de aguacate

purificados de tejido infectado con el ASBVd muestran que, mientras la transcripción de diferentes genes cloroplásticos es inhibida por el inhibidor bacteriano tagetitoxina, la síntesis de los oligómeros viroidales no se ve afectada (Navarro *et al.*, 2000). Sin embargo, estudios *in vitro* con el PLMVd y la RNA polimerasa de *Escherichia coli* (Pelchat *et al.*, 2001), apuntan a la implicación de la RNA polimerasa cloroplástica de codificación plastídica (*plastid encoded polymerase*, PEP), aunque este sistema dista mucho de la situación fisiológica real. De hecho, se ha observado que la síntesis y acumulación del PLMVd en el melocotonero son particularmente altas en aquellas zonas de las hojas que muestran un albinismo (cálico) donde el procesamiento de los precursores de los RNAs ribosomales cloroplásticos (y por lo tanto la traducción de proteínas de codificación plastídica como la PEP) están afectados (Rodio *et al.*, 2007). Estas observaciones son por tanto más concordantes con la idea de que, al igual que en el ASBVd, es la NEP la enzima involucrada en la replicación del PLMVd, al tiempo que sugieren que otros factores cloroplásticos que pudieran mediar este proceso también son de codificación nuclear. En este último contexto, mediante irradiación UV de hojas de aguacate infectado por ASBVd, se han identificado dos proteínas cloroplásticas (de codificación nuclear), PARBP33 y PARBP35, que se unen al RNA viroidal (Darós y Flores, 2002). Estas proteínas pertenecen a una familia cuyos miembros están implicados en la estabilización, maduración y edición de transcritos cloroplásticos. Además, PARBP33 se comporta como una chaperona de RNA que estimula *in vitro* el autocorte mediado por ribozimas de cabeza de martillo de transcritos diméricos del ASBVd. Por lo tanto, estas proteínas podrían facilitar de manera indirecta la replicación de este viroide.

En lo que se refiere al sitio de inicio de la transcripción en los viroides cloroplásticos, experimentos de adición de caperuza *in vitro* (*in vitro capping*) con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]GTP y guanililtransferasa (que específicamente marca el extremo 5'-trifosforilado libre característico de los transcritos cloroplásticos primarios) y ensayos de protección frente a RNasas han permitido cartografiar el sitio de iniciación de la transcripción de las cadenas lineales del ASBVd (+) y (-) aisladas de tejido de aguacate infectado. El nucleótido U121 es el sitio de inicio en el RNA (+) y el nucleótido U119 lo es en el (-), estando ambos sitios localizados en el bucle terminal derecho rico en A + U de las estructuras secundarias en cuasi-varilla predichas para ambos RNAs (Navarro y Flores, 2000).

Otros datos obtenidos a partir de análisis por extensión de cebador (*primer extension*) de los extremos 5' de RNAs subgenómicos del PLMVd, presumibles subproductos de la replicación, así como de transcripción *in vitro* de RNAs truncados del PLMVd empleando la RNA polimerasa de *E. coli*, sugieren que los sitios de iniciación de este viroide también se localizan en bucles terminales (Pelchat *et al.*, 2001). Sin embargo,

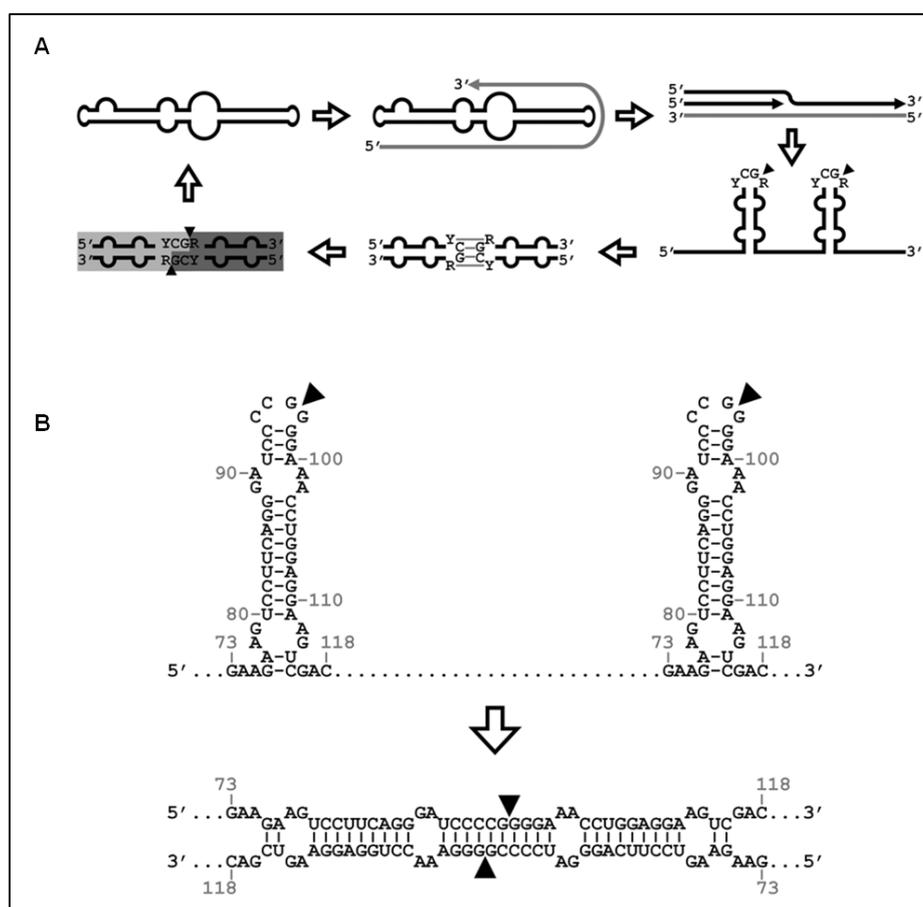
estos sitios no tienen que reflejar necesariamente la situación *in vivo*, ya que experimentos de adición de caperuza *in vitro* dirigidos a cartografiar los extremos 5'-trifosforilados de los RNAs lineales de PLMVd (+) y (-) aislados de tejido infectado indican sitios de iniciación alternativos *in vivo*: C51 y A286 para las cadenas (+) y (-), respectivamente (Delgado *et al.*, 2005). Recientemente, otro estudio independiente ha confirmado los nucleótidos A50/C51 y A284/A286 como los sitios de inicio de la transcripción de las cadenas (+) y (-) del PLMVd, respectivamente (Motard *et al.*, 2008).

### 1.3.2 Corte: estructuras y enzimas implicadas

En los miembros de la familia *Pospiviroidae*, tras la transcripción del RNA oligomérico de polaridad (+), éste debe ser cortado en unidades monoméricas que finalmente serán ligadas dando lugar a la molécula circular infecciosa. Diferentes resultados indican que la actividad RNasa que cataliza el corte de estos multímeros (+) es una enzima cuya especificidad viene determinada por un plegamiento particular del RNA. Los primeros estudios acerca de esta segunda etapa del ciclo replicativo en los miembros de esta familia implicaron a la rama superior de la CCR en el procesamiento de las cadenas oligoméricas de polaridad (+), bien a través de la formación del HPI, bien a través de una estructura de doble cadena de esta misma región (Diener, 1986). Posteriormente, a partir de estudios *in vitro* con extractos nucleares de patata y RNAs multiméricos (+) del PSTVd (Tsagris *et al.*, 1987; Baumstark *et al.*, 1997), se propuso que la especificidad del corte venía dirigida por una estructura ramificada con un tetrabucle metaestable GNRA, que subsiguientemente cambiaría a una conformación extendida con un bucle E que promovería la ligación (Baumstark *et al.*, 1997). Una variación de este esquema se propuso para el viroide del enanismo de los cítricos (*Citrus dwarfing viroid*, CDVd), basándose en estudios de estabilidad estructural y modificaciones químicas (Owens y Baumstark, 2007). Sin embargo, el mecanismo no sería aplicable a otros miembros de la familia *Pospiviroidae* que son incapaces de formar el tetrabucle GNRA y el bucle E.

Recientes estudios *in vivo* (Gas *et al.*, 2007) con *Arabidopsis thaliana* transgénicas transformadas con cDNAs expresando transcritos diméricos (+) de cinco miembros representativos de esta familia (Darós y Flores, 2004) han cartografiado el sitio de procesamiento *in vivo* para estos viroides en la rama superior de la CCR en posiciones equivalentes al sitio determinado *in vitro* para el PSTVd (Baumstark *et al.*, 1997). Sin embargo, el motivo de RNA que dirige el corte *in vivo* no parece ser el bucle GNRA propuesto, sino en una estructura HPI/doble cadena (HPI/dsRNA) (Fig. 5). Según esta propuesta, durante la transcripción de los transcritos oligoméricos (+), se daría una

interacción del tipo *kissing loop* entre los bucles apicales de dos HPI contiguas, promoviendo la formación de una estructura transitoria de doble cadena que sería el sustrato para el corte dejando extremos con dos nucleótidos 3' protuberantes. La ligación ocurriría en un RNA reestructurado estabilizado por la formación de un bucle E. Este modelo, sustentado por análisis mutacionales (Gas *et al.*, 2007), es consistente con otro propuesto anteriormente (Diener, 1986). Dado que las cadenas de PSTVd (-) (que no se procesan) se acumulan en el nucleoplasma, mientras que las (+) lo hacen también en el nucleolo (Qi y Ding, 2003a), dicho procesamiento ocurriría muy probablemente en este último orgánulo, donde también

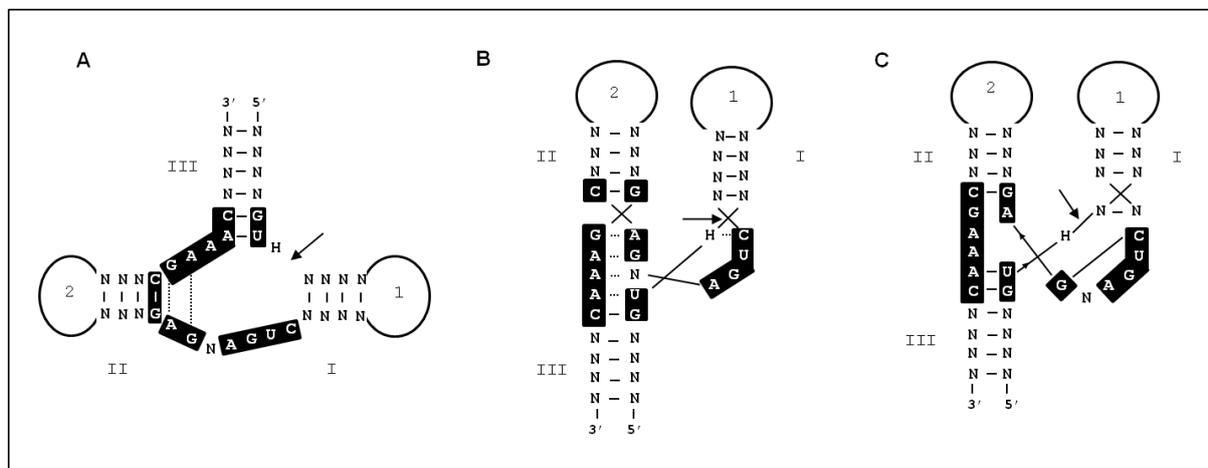


**Figura 5.- Modelo de corte propuesto para los miembros de la familia *Pospiviroidae*.** (A) Durante la replicación a través de un círculo rodante asimétrico tiene lugar una interacción de tipo *kissing loops* entre los bucles apicales de dos horquillas I contiguas que da lugar a la formación de una estructura de doble cadena, que es el sustrato para el corte (Gas *et al.*, 2007). (B) Horquilla I y estructura de doble cadena correspondientes al CEVd. Las puntas de flecha indican los sitios de procesamiento. Adaptada de Gas *et al.*, 2008.

ocurre el procesamiento de los precursores de los rRNAs y tRNAs (Lewis y Tollervey, 2000). Este modelo de procesamiento (HPI/dsRNA) implica además que la enzima que cataliza el corte es una RNasa de la clase III, puesto que el corte en la estructura de doble cadena deja extremos con dos nucleótidos 3' protuberantes. De hecho, los RNAs monoméricos del CEVd producto del corte en las plantas de *A. thaliana* transgénicas, que expresan el cDNA dimerico del CEVd, tienen extremos 5'-fosfomonoéster (5'-P) y 3'-hidroxilo (3'-OH) característicos del corte por una RNasa de esta clase (Gas *et al.*, 2008).

El corte de los oligómeros en los miembros de la familia *Avsunviroidae*, sin embargo, no está catalizado por una enzima del huésped, sino por las ribozimas de cabeza de martillo contenidas en sus cadenas de ambas polaridades. Estas ribozimas, que están formadas por un pequeño motivo de RNA con un núcleo central conservado flanqueado por tres tallos de doble cadena con bajos requerimientos de secuencia y cerrados por bucles (Fig. 6A), se autocortan en un enlace específico mediante una transesterificación en presencia de  $Mg^{2+}$ , produciendo extremos 5'-hidroxilo (5'-OH) y 2',3'-fosfodiéster cíclico (2',3'>P) (Hutchins *et al.*, 1986; Prody *et al.*, 1986; Hernández y Flores, 1992; Navarro y Flores, 1997). Mediante cristalografía de rayos X se ha observado que la forma real no se parece a una cabeza de martillo sino más bien a una Y deformada en la que los tallos III y II son casi colineales (Fig. 6B y C). Estos estudios han revelado además la existencia de una compleja serie de interacciones no canónicas entre los nucleótidos conservados del núcleo central, explicando así su estricta conservación. Modificaciones de los bucles 1 y 2 de ribozimas naturales inducen una marcada disminución de su actividad catalítica, indicando que interacciones terciarias bucle-bucle desempeñan también un importante papel en el plegamiento y la actividad catalítica de las ribozimas naturales, pudiendo favorecer la adopción de la conformación activa a las bajas concentraciones de magnesio que existen *in vivo* (De la Peña *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003). Estas interacciones terciarias podrían ser además estabilizadas *in vivo* por proteínas del huésped que actuarían como chaperonas de RNA. En el contexto de la replicación de los viroides, las ribozimas de cabeza de martillo se forman transitoriamente durante la elongación de las hebras, siendo el sitio de inicio de la transcripción crucial para el correcto plegamiento de la ribozima y su actividad (Delgado *et al.*, 2005). Por lo tanto, esta reacción de autocorte de los RNAs viroidales multiméricos parece estar bajo un estricto control a través de un cambio conformacional entre la ribozima activa, que se forma transitoriamente durante la replicación, y un plegamiento alternativo que promueve la ligación (Flores *et al.*, 2004). En este sentido, chaperonas de RNA, como la proteína cloroplástica PARBP33 (Darós y Flores, 2002), podrían facilitar el correcto

plegamiento de autocorte y la subsiguiente adopción por el RNA monomérico lineal resultante de la conformación alternativa que promueve la ligación.



**Figura 6.- Estructuras de la ribozima de cabeza de martillo.** (A) Representación de su secuencia y estructura propuestas inicialmente por Forster y Symons (Forster y Symons, 1987). (B) y (C) Representación de la estructura de una ribozima de cabeza de martillo en base a los datos cristalográficos obtenidos para una ribozima artificial (Scott *et al.*, 1996) y para la ribozima natural de *Schistosoma mansoni* (Martick y Scott, 2006), respectivamente. Los nucleótidos conservados en las ribozimas de cabeza de martillo naturales se destacan sobre fondo negro. El sitio de autocorte se indica con una flecha. N representa cualquier nucleótido y H cualquier nucleótido excepto G. Las líneas continuas y los puntos indican interacciones canónicas Watson-Crick y no canónicas, respectivamente.

### 1.3.3 Ligación

Aunque algunas RNAs catalizan *in vitro* el correcto corte y ligación de un RNA oligomérico (+) del PSTVd (Tabler *et al.*, 1992), lo más probable es que la enzima que cataliza esta última etapa de la replicación viroidal sea una RNA ligasa. En un principio se postuló que la enzima implicada en la circularización de los monómeros lineales (+) de los viroides nucleares era la tRNA ligasa o una enzima similar, dada la existencia de datos *in vitro* que mostraban que la tRNA ligasa de germen de trigo era capaz de mediar la circularización del RNA monomérico lineal de PSTVd aislado de tejido infectado (Branch *et al.*, 1982). Sin embargo, los extremos que presentan los monómeros lineales producto del procesamiento de los viroides nucleares son 5'-P y 3'-OH (Gas *et al.*, 2008), lo que conlleva que la circularización debe estar catalizada *in vivo* por una ligasa diferente de la tRNA ligasa, la única conocida hasta el momento en plantas y que típicamente liga extremos 5'-OH y 2',3'-P.

Como ya se ha mencionado anteriormente, a partir de estudios con extractos nucleares de patata capaces de procesar RNAs de PSTVd con una repetición de la rama superior de la CCR dando lugar al monómero circular infeccioso, se propuso que el corte enzimático y la ligación del PSTVd (+) están dirigidos por un cambio de la estructura ramificada que contiene el bucle GNRA a una conformación extendida con el bucle E (Baumstark *et al.*, 1997). Los requerimientos para la ligación de los RNAs monoméricos lineales (+) también se han estudiado *in vivo* empleando el sistema de *A. thaliana* transgénicas comentado anteriormente (Darós y Flores, 2004). Estos estudios han puesto de manifiesto que el sustrato para la ligación en los miembros del género *Pospiviroid* es efectivamente la conformación extendida que contiene el bucle E (Gas *et al.*, 2007). Sin embargo, este bucle sólo se forma en los miembros de los géneros *Pospiviroid* y *Cocadviroid*, por lo que los miembros de los otros géneros deben tener motivos alternativos que desempeñen un papel similar.

El mecanismo de ligación de los RNAs producto del autocorte en los miembros de la familia *Avsunviroidae* permanece también sin resolver. La autoligación intra- e intermolecular ha sido demostrada para el PLMVd *in vitro* (Lafontaine *et al.*, 1995; Côte y Perreault, 1997). Sin embargo, esta autoligación produce un enlace 2'-5' fosfodiéster que impide el autocorte *in vitro* (Côte y Perreault, 1997), por lo que, aunque se ha propuesto la existencia de estos enlaces atípicos en RNAs circulares del PLMVd aislados de tejido infectado (Côte *et al.*, 2001), dicha existencia es inconsistente con la observación de que los RNAs circulares del PLMVd aislados de tejido infectado sí que son capaces de autocortarse *in vitro* (Delgado *et al.*, 2005). Además no existen datos previos de la existencia de RNAs naturales con enlaces 2'-5' que sirvan como moldes de transcripción, siendo el enlace 3'-5' el que se halla en la práctica totalidad de los RNAs. Un ensayo mutacional del ELVd en el sistema de *Chlamydomonas reinhardtii* (Molina-Serrano *et al.*, 2007) ha puesto de manifiesto que deleciones que no afectan al corte mediado por la ribozima de cabeza de martillo sí disminuyen notablemente la eficiencia de la ligación, implicando así a otras secuencias o elementos estructurales del ELVd en la ligación *in vivo* (Martínez *et al.*, 2009). Además, el producto de la ligación del monómero lineal del ELVd que se observa *in vivo*, tanto en berenjena como en *C. reinhardtii*, es mucho más abundante que el que se genera *in vitro* como consecuencia de la autoligación, lo que sugiere que existe un mecanismo muy eficiente que opera *in vivo*. Éste estaría mediado probablemente por una RNA ligasa cloroplástica o, alternativamente, por algún factor cloroplástico o algún contexto bioquímico específico que potenciaría la autoligación del ELVd. Sin embargo, existen pruebas de que se necesita una función específica del huésped para la ligación de RNAs generados por una

amplia gama de ribozimas (Reid y Lazinski, 2000). En este sentido, los extremos 5'-OH y 2',3'>P generados por las ribozimas de cabeza de martillo en las reacciones de autocorte son precisamente los requeridos por la tRNA ligasa. Esta enzima, además localizarse en el núcleo donde interviene en la eliminación de los intrones de los tRNAs, puede presentar (por traducción alternativa) un péptido de tránsito al cloroplasto, donde desempeñaría una función por ahora desconocida (Englert *et al.*, 2007). Por estas razones, la tRNA ligasa surge así como una razonable alternativa a la autoligación.

## 1.4 Movimiento de los viroides

Cada vez son más los estudios dedicados a elucidar los mecanismos por los cuales los viroides se mueven dentro de la planta y los factores del huésped con los que interactúan para llevar a cabo dicho movimiento. Tras penetrar inicialmente en una célula del huésped, los viroides deben translocarse al orgánulo correspondiente para su replicación (el núcleo para los miembros de la familia *Pospiviroidae* y el cloroplasto para los de la *Avsunviroidae*) y posteriormente salir al citoplasma, desde donde se mueven a las células vecinas para finalmente alcanzar el sistema vascular de la planta e invadir así sistémicamente las partes más distales de la misma. En contraste con los virus, que codifican sus propias proteínas de movimiento, los viroides deben interactuar directamente con factores del huésped para su movilidad, convirtiéndose así en un sistema único para el estudio del tráfico de RNA en plantas.

### 1.4.1 Movimiento intracelular

La importación al núcleo del PSTVd ha sido estudiada en células de tabaco permeabilizadas e *in planta* (Woo *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2001) y parece ser un proceso independiente del citoesqueleto mediado por un receptor específico y saturable (Woo *et al.*, 1999). Este proceso debe ser además dependiente de estructura primaria o secundaria, puesto que no se observó importación de fragmentos derivados de mRNAs del mismo tamaño o de otros dos viroides de replicación y acumulación cloroplástica. Estudios posteriores han puesto de manifiesto que la CCR superior y/o la horquilla I que forma son suficientes para la importación del PSTVd al núcleo (Abraitene *et al.*, 2008). En este contexto, la proteína de unión al PSTVd Virp1 mencionada anteriormente ha sido propuesta como candidata a mediar este transporte nucleocitoplasmático (Martínez de Alba *et al.*, 2003). Dentro del núcleo, las moléculas (-) del PSTVd se localizan en el nucleoplasma, mientras que las de polaridad (+) lo hacen tanto en el nucleolo como en el nucleoplasma (Qi

y Ding, 2003a). Tras la síntesis de los RNAs (-) y (+) del PSTVd en el nucleoplasma, parece ser que estos últimos son translocados al nucleolo, mientras que los primeros quedan retenidos en el nucleoplasma. Si la molécula (+) que se transloca es lineal o circular no ha sido determinado, aunque, dado que el nucleolo es el orgánulo en el que ocurre el procesamiento de los precursores de los rRNAs y tRNAs (Lewis y Tollervey, 2000), probablemente sea la molécula lineal oligomérica (+) la que se transloca a dicho orgánulo para ser procesada. Estos resultados apuntan a la existencia en eucariotas de una fina maquinaria capaz de discriminar las cadenas de polaridades opuestas de un RNA, bien por secuencia, bien por estructura, y podría tener implicaciones aún desconocidas en mecanismos de regulación génica y patogénesis.

El mecanismo por el cual los miembros de la familia *Avsunviroidae* son importados al cloroplasto está aún por determinar, aunque hay indicios de la existencia de una ruta celular de transporte al cloroplasto, si bien apenas se conocen RNAs exógenos o celulares que sean importados a este orgánulo. Recientemente, se ha descrito que una secuencia derivada del ELVd actuando como región 5' no codificante (vd-5'UTR) es capaz de mediar la importación del mRNA de la proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, GFP) a los cloroplastos en *N. benthamiana*, observándose una acumulación selectiva tanto del mRNA como de la proteína GFP en este orgánulo (Gómez y Pallás, 2010b). Este resultado sugiere la existencia de un mecanismo de transporte de RNAs a los cloroplastos que parece depender más de motivos estructurales que de secuencia (Gómez y Pallás, 2010a).

#### 1.4.2 Movimiento célula a célula

El movimiento célula a célula de los viroides ocurre probablemente vía plasmodesmos, al igual que ocurre con otros ácidos nucleicos y proteínas. El PSTVd microinyectado en células del mesófilo conectadas simplásticamente se mueve rápidamente a las células vecinas, quedando sin embargo retenido cuando es inyectado en células guardia que se encuentran aisladas simplásticamente. El viroide parece además tener determinantes específicos para este movimiento rápido célula a célula a través de plasmodesmos, puesto que es capaz de promover el movimiento por esta ruta de un RNA no relacionado y que de forma natural no se mueve (Ding *et al.*, 1997). Diferentes estudios han aportado pruebas genéticas de la importancia de los bucles de RNA en el transporte de RNA entre células específicas (Qi *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2007). De esta manera se ha observado que un bucle de la estructura secundaria de mínima energía libre predicha para el PSTVd (Fig. 2A, bucle 7) parece mediar el tráfico de este viroide desde la capa empalizada al floema (Zhong *et al.*, 2007). A partir de un estudio mutacional se han

cartografiado hasta once bucles en la estructura del PSTVd críticos para el tráfico sistémico en plantas de *N. benthamiana* (Zhong *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2008). Más recientemente se ha identificado un motivo en el sexto bucle de la estructura secundaria del PSTVd (Fig. 2A, bucle 6) que parece necesario para el tráfico desde las células del mesófilo en empalizada a las del mesófilo esponjoso en hojas de *N. benthamiana* (Takeda *et al.*, 2011).

#### 1.4.3 Movimiento a larga distancia

El movimiento a larga distancia de los viroides ocurre a través del floema, por donde viajan junto a los fotoasimilados hasta diferentes tejidos u órganos sumidero (Palukaitis, 1987; Zhu *et al.*, 2001). Este movimiento está además estrictamente regulado, puesto que el PSTVd no se ha detectado en el meristemo apical del tallo (*shoot apical meristem*, SAM) de plantas de tomate o *N. benthamiana* infectadas, mientras que sí que está presente en el tejido vascular por debajo del SAM, sugiriendo que los plasmodesmos restringen el tráfico del PSTVd al SAM en alguna frontera celular entre este último y el resto de la planta (Zhu *et al.*, 2001). Sin embargo, un miembro de la familia *Avsunviroidae*, el PLMVd, sí que parece capaz de invadir capas celulares muy próximas al SAM (Rodio *et al.*, 2007), lo que sugiere que los mecanismos que regulan el movimiento de los miembros de las dos familias son diferentes. Por otro lado, la entrada y salida del floema parecen estar mediadas por motivos diferentes, como se deduce de la identificación de dos mutantes del PSTVd capaces de entrar y replicarse en el floema, pero incapaces de salir del tejido vascular (Zhu *et al.*, 2002).

El tráfico viroidal por el floema está probablemente facilitado por proteínas del huésped. Existen pruebas *in vitro* e *in vivo* de la formación de un complejo ribonucleoproteico entre el HSVd y la proteína floemática 2 (*phloem protein 2*, PP2) de pepino, que es una proteína de unión a RNA (Gómez y Pallás, 2001; Owens *et al.*, 2001; Gómez y Pallás, 2004) que parece facilitar el movimiento sistémico, incluso a través de injertos interespecíficos. También se ha sugerido que la proteína Virp1 de tomate podría estar involucrada en el movimiento sistémico del PSTVd, del mismo modo que la PP2 lo está en pepino (Maniataki *et al.*, 2003). Sin embargo, en contraste con PP2, la capacidad de Virp1 para interactuar con plasmodesmos y moverse a larga distancia está aún por demostrar.

## 1.5 El silenciamiento génico en el contexto de la infección viroidal

Los viroides parecen ser inductores y diana de la maquinaria de silenciamiento génico postranscripcional (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) de sus huéspedes, con lo que sería posible que procesos de este tipo mediaran la patogénesis viroidal. El PTGS es un mecanismo de defensa y de regulación de la expresión génica en eucariotas mediante el cual se degradan específicamente RNAs monocatenarios (*single-stranded RNAs*, ssRNAs) de origen tanto celular como foráneo (Baulcombe, 2004). En el caso de los RNAs invasores, el inductor característico del PTGS es el RNA bicatenario (*double-stranded RNA*, dsRNA) que se origina como intermediario de la replicación, o que se forma de manera parcial en los ssRNA virales o en los transcritos de los virus de DNA. El dsRNA es procesado en fragmentos de 21-25 nt, los denominados pequeños RNAs interferentes (*small interfering RNAs*, siRNAs), por RNAsas del tipo III denominadas Dicer (*Dicer-like*, DCL, en plantas) (Bernstein *et al.*, 2001). Estos siRNAs, u otros denominados secundarios generados por RNA polimerasas dependientes de RNA (*RNA-dependent RNA polymerases*, RDR) del huésped, se unen a una proteína ARGONAUTA (AGO) en el denominado complejo de silenciamiento inducido por RNA (*RNA-induced silencing complex*, RISC), actuando como los determinantes específicos de secuencia que guían a RISC para degradar los correspondientes ssRNAs (Voinnet, 2008). En el contexto de la regulación génica, Dicer actúa también sobre RNAs precursores endógenos que presentan una estructura secundaria en horquilla dando lugar a los microRNAs (miRNAs), pequeños RNAs no codificantes de tamaño similar a los siRNAs que regulan la expresión génica en determinadas etapas del desarrollo guiando a RISC para degradar ciertos mRNAs en un determinado contexto espacio-temporal (Carrington y Ambros, 2003). En plantas, el PTGS ha sido descrito para ssRNAs citoplasmáticos procedentes de genes nucleares endógenos, de transgenes y de virus de RNA y DNA (Baulcombe, 2004).

Se han detectado por hibridación *Northern* y caracterizado por secuenciación convencional o masiva pequeños RNAs viroidales (*viroid-derived small RNAs*, vd-sRNAs) con propiedades estructurales similares a los siRNAs en plantas infectadas por PSTVd, HSVd y CEVd (Itaya *et al.*, 2001; Papaefthimiou *et al.*, 2001; Markarian *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2007; Carbonell *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2009; Di Serio *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2010), lo que es un firme indicio de que estos viroides inducen PTGS. De manera similar se han identificado y caracterizado vd-sRNAs en plantas infectadas por los viroides cloroplásticos PLMVd, CChMVd y ASBVd (Martínez de Alba *et al.*, 2002; Markarian *et al.*, 2004; Di Serio *et al.*, 2009; St-Pierre *et al.*, 2009; Bolduc *et al.*, 2010). Puesto que no se han descrito procesos de PTGS que ocurran en el cloroplasto, se asume que dichos vd-sRNAs

son generados en el citoplasma durante el movimiento célula a célula del RNA viroidal, una posibilidad que puede extenderse a los viroides nucleares.

Los mecanismos por los cuales ocurre la biogénesis de los pequeños vd-sRNAs están por determinar aún, así como su efecto y la relación que estos vd-sRNAs pueden tener con la patogénesis. No siempre se ha observado una correlación positiva entre los niveles de vd-sRNAs y la intensidad de los síntomas en las diferentes combinaciones viroide-huésped analizadas (Itaya *et al.*, 2001; Papaefthimiou *et al.*, 2001; Martínez de Alba *et al.*, 2002; Markarian *et al.*, 2004; Sano y Matsuura, 2004; Matousek *et al.*, 2007), lo que plantea dudas sobre la asociación entre el silenciamiento de RNA y la patogénesis. Además, los niveles de acumulación de vd-sRNAs inducidos por cepas sintomáticas y asintomáticas del PSTVd y el CChMVd son prácticamente los mismos (Papaefthimiou *et al.*, 2001; Martínez de Alba *et al.*, 2002), con lo que la concentración *in vivo* de los vd-sRNAs no puede explicar las diferencias en los síntomas. En viroides cloroplásticos se ha observado, sin embargo, una correlación inversa entre los niveles de acumulación de las formas maduras del viroide y sus correspondientes vd-sRNAs. Los vd-sRNAs de PLMVd y CChMVd son fácilmente detectables, a pesar de que estos viroides alcanzan bajas concentraciones *in vivo*, mientras que en tejidos donde la concentración del ASBVd es muy alta los correspondientes vd-sRNAs son indetectables (Martínez de Alba *et al.*, 2002) o se acumulan a muy bajos niveles (Markarian *et al.*, 2004). Estos resultados sustentan la implicación de los vd-sRNAs en la respuesta defensiva del huésped mediada por PTGS, que atenuaría los efectos negativos de los viroides a través de la reducción de su título *in vivo* (Martínez de Alba *et al.*, 2002). Datos recientes obtenidos por hibridación *Northern* e *in situ* muestran que la RDR6 (implicada en la generación de ciertos siRNAs y vd-sRNAs secundarios) retrasa la acumulación del PSTVd e impide su invasión meristemática, proporcionando así pruebas genéticas firmes de la existencia de un mecanismo de resistencia antiviroidal (Di Serio *et al.*, 2010). Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los que unos viroides generan una mayor respuesta PTGS que otros. Los fenómenos de protección cruzada (la atenuación por un cierto tiempo del título y los síntomas inducidos por cepas agresiva de un viroide en plantas que han sido preinoculadas con una cepa latente del mismo viroide o de otro estrechamente relacionado) (Niblett *et al.*, 1978; Khoury *et al.*, 1988; De la Peña y Flores, 2002) pueden también deberse a estos mecanismos de silenciamiento, ya que los vd-sRNAs generados por la cepa latente podrían cargar RISC y dirigirlo específicamente contra el RNA de la cepa agresiva y promover así su degradación. En este sentido, se ha comprobado también que la infectividad de algunos viroides se ve retrasada cuando son coinoculados con un exceso de sus correspondientes dsRNAs (Carbonell *et al.*, 2008).

Se ha propuesto que el efecto patogénico de los viroides podría estar relacionado con la actuación de los vd-sRNAs como miRNAs endógenos, que hibridarían con ciertos mRNAs del huésped y promoverían su degradación (Papaefthimiou *et al.*, 2001; Markarian *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Matousek *et al.*, 2007). Esta posibilidad es consistente con la observación de que mínimos cambios que afectan aproximadamente al 1% de la secuencia de miembros representativos de ambas familias viroidales son suficientes para transformar una variante patogénica en otra latente (Schnölzer *et al.*, 1985; Visvader y Symons, 1986; De la Peña *et al.*, 1999; De la Peña y Flores, 2002; Malfitano *et al.*, 2003). Sin embargo, no se han identificado hasta ahora los mRNAs del huésped que serían diana de los vd-sRNAs. Por otra parte, el RNA viroidal maduro podría ser también el efector primario de la patogénesis como consecuencia de su interacción directa con factores del huésped (Diener, 1999; Flores *et al.*, 2005a).

En cualquier caso, a pesar de la presencia de los vd-sRNAs, los viroides son capaces de infectar sus huéspedes y, en algunos casos, de acumularse a niveles relativamente altos (Itaya *et al.*, 2001). Cómo consiguen evadir los efectos del silenciamiento de RNA de sus huéspedes está aún por dilucidar. La estrategia seguida por los virus, que han evolucionado hacia la codificación de proteínas que suprimen el silenciamiento, no puede darse en los viroides, puesto que carecen de capacidad codificadora. Probablemente su compacta estructura secundaria, que aunque facilita su procesamiento por Dicer los hace resistentes a RISC y a otras RNasas, su replicación activa y su compartimentalización en orgánulos desempeñen papeles fundamentales en esta evasión del silenciamiento (Flores *et al.*, 2005a; Gómez y Pallás, 2007; Itaya *et al.*, 2007).

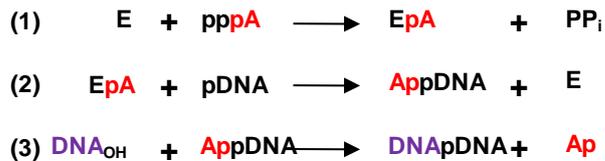
## 2. Las ligasas

### 2.1 La superfamilia de las nucleotidiltransferasas covalentes

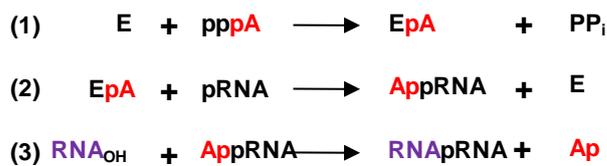
Las DNA ligasas dependientes de ATP y  $\text{NAD}^+$ , las RNA ligasas dependientes de ATP y las enzimas dependientes de GTP que adicionan la estructura de caperuza al mRNA (GTP:RNA guanililtransferasas) conforman la superfamilia de las nucleotidiltransferasas covalentes (revisado en Shuman y Lima, 2004). Estas proteínas catalizan la transferencia de un nucleósido monofosforilado al extremo 5' de un ácido nucleico a través de la formación de un intermediario covalente enzima-(lisil-N)-NMP (Fig. 7). En el caso de las ligasas, la reacción ocurre en tres pasos (Fig. 7A y B). En el primer paso, el ataque al fósforo  $\alpha$  del ATP o  $\text{NAD}^+$ , según el caso, por parte de la enzima resulta en la liberación de pirofosfato ( $\text{PPi}$ ) o un mononucleótido de nicotinamida (NMN), respectivamente, y la formación de un intermediario covalente enzima-(lisil-N)-AMP. A continuación, el AMP es transferido al extremo 5'-fosfomonoéster del ácido nucleico (extremo donador) quedando así adenilado y formándose el intermediario  $\text{A}(5')\text{pp}(5')\text{DNA}$  o  $\text{A}(5')\text{pp}(5')\text{RNA}$ , según el ácido nucleico sustrato de la reacción. Finalmente, la ligasa cataliza el ataque nucleofílico del extremo 3'-hidroxilo (extremo aceptor) sobre el 5'-adenilado, dando lugar al nuevo enlace fosfodiéster y liberándose AMP. Por su parte, la reacción de adición de caperuza es químicamente análoga a los dos primeros pasos de la reacción de ligación (Fig. 7C): el intermediario enzima-(lisil-N)-GMP transfiere el GMP al extremo 5'-difosforilado de los mRNAs nacientes para formar la denominada estructura de caperuza  $\text{G}(5')\text{ppp}(5')\text{RNA}$  (Shuman, 2001). Esta

estructura sólo se encuentra en eucariotas, puesto que las enzimas que catalizan su adición al mRNA son exclusivas de este dominio biológico.

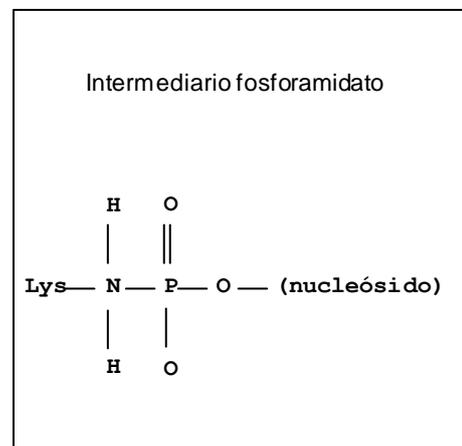
**A DNA ligasa**



**B RNA ligasa**

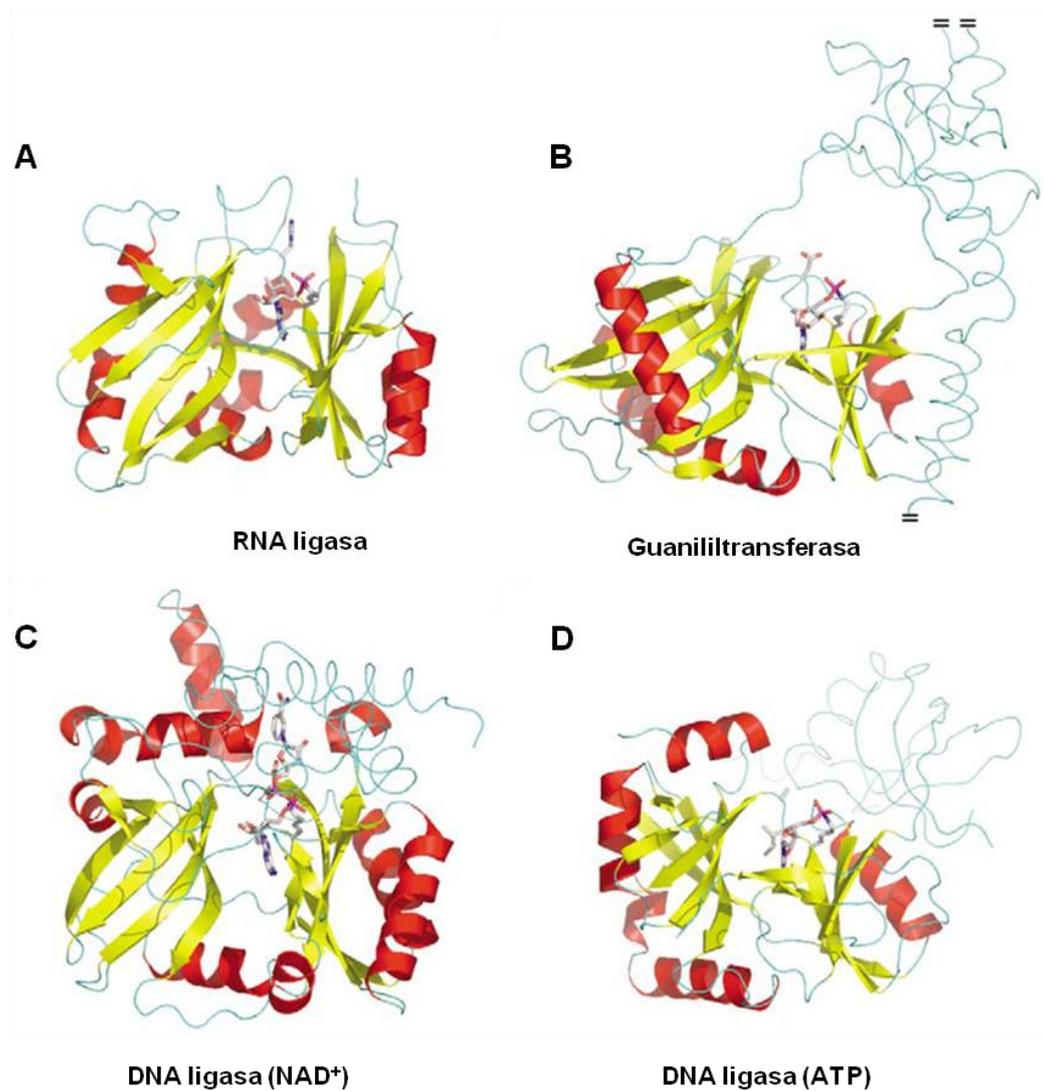


**C Enzima de adición de caperuza al mRNA**



**Figura 7.- Mecanismo conservado de transferencia nucleotídica a extremos 5' de polinucleótidos.** Se muestra esquemáticamente la reacción catalizada por (A) las DNA ligasas, (B) las RNA ligasas y (C) las enzimas de adición de caperuza al mRNA. El primer paso en cada reacción implica el ataque de la enzima (E) al grupo fosforilo α (P) del cofactor nucleotídico para formar un intermediario covalente enzima-NMP (EpA ó EpG, fosforamidato). El segundo paso consiste en la transferencia del NMP (Ap o Gp) al extremo 5'-fosforilado del ácido nucleico. Finalmente, el extremo 3'-hidroxilo (en lila) ataca al extremo 5'-adenilado (en rojo) generando el enlace y liberando AMP (Ap). La estructura del intermediario fosforamidato se muestra en la parte derecha de la figura. Adaptada de Shuman y Lima, 2004.

La superfamilia se caracteriza por cinco motivos peptídicos conservados que rodean al bolsillo de unión del nucleótido y aportan cadenas aminoacídicas laterales esenciales para la catálisis. El más importante de los cinco motivos es el I, formado por la secuencia KX(D/N)G y conservado en todos los miembros de la superfamilia. La lisina de este motivo es la que incorpora el nucleósido monofosforilado durante la adenilación o guanilación de la enzima (Shuman y Schwer, 1995), desempeñando así un papel fundamental en la catálisis. Diferentes estudios mutacionales (Sawaya *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2003; Wang y Shuman, 2005; Wang *et al.*, 2006b) han puesto de manifiesto que los otros motivos, III, IIIa, IV y V, también contienen aminoácidos conservados esenciales para la catálisis, habiéndose demostrado por estudios cristalográficos de diferentes miembros de la superfamilia que los cinco motivos participan en la formación del sitio activo (Subramanya *et al.*, 1996; Hakansson *et al.*, 1997; Singleton *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000). Las DNA ligasas y las enzimas de adición de caperuza al mRNA comparten los cinco motivos de secuencia I, III, IIIa, V y IV (Shuman y Lima, 2004). Sin embargo, los motivos III y IIIa están ausentes en la secuencia de la T4 RNA ligasa 1 (T4Rn1) (Wang *et al.*, 2003), pero no en la T4 RNA ligasa 2 (T4Rn2) (Ho y Shuman, 2002; Yin *et al.*, 2003), que presenta más similitud de secuencia con las DNA ligasas y las enzimas de adición de caperuza que la T4Rn1. Los análisis de las estructuras cristalográficas de varios miembros de las tres familias que conforman la superfamilia (DNA ligasas, RNA ligasas y transferasas de GMP), así como diversos análisis de estructura-función (Odell *et al.*, 2000; Fabrega *et al.*, 2003; Ho *et al.*, 2004; El Omari *et al.*, 2006; Nandakumar *et al.*, 2006), sugieren que sus dominios nucleotidiltransferasa evolucionaron de un ancestro común que posiblemente estuviera implicado en procesos de reparación o recombinación del RNA. Esta evolución habría ocurrido a través de la fusión en C-terminal de diferentes dominios de especificidad a un módulo ancestral con un dominio catalítico, que contendría la lisina que une el nucleótido y los cinco motivos implicados en la catálisis. En un primer momento habría tenido lugar la fusión de dominios que otorgan especificidad a los diferentes sustratos polinucleotídicos (DNA o RNA) y posteriormente la diferenciación del dominio nucleotidiltransferasa para unir ATP, GTP y NAD<sup>+</sup> (revisado en Shuman y Lima, 2004). Se ha propuesto (Ho *et al.*, 2004) que la enzima ancestral era una nucleotidiltransferasa del tipo T4Rn2, ya que la especificidad del bolsillo de unión de esta enzima por el AMP viene exclusivamente determinada por interacciones de la cadena principal y no de las laterales. Posteriormente la especificidad por el GTP, en el caso de las enzimas de adición de caperuza, habría ocurrido por cambios evolutivos en el propio sitio activo.



**Figura 8.- Estructuras de los miembros de la familia de nucleotidil transferasas covalentes.** (A) T4 RNA ligasa 2, (B) mRNA guanililtransferasa de *Candida albicans*, (C) DNA ligasa dependiente de NAD<sup>+</sup> de *Enterococcus faecalis*, y (D) DNA ligasa del virus de *Chlorella*. Las estructuras se alinearon respecto a sus dominios nucleotidiltransferasa, cuyos elementos de estructura secundaria se muestran con hélices  $\alpha$  rojas y hojas  $\beta$  amarillas. Los bucles intermedios y los dominios flanqueantes se muestran en azul. Las rayas horizontales en (B) indican la ausencia de segmentos del dominio OB y de una extensión de la hélice C-terminal particulares de la enzima de adición de caperuza de *C. albicans*. En el centro de cada enzima aparecen representados con estructuras químicas los nucleótidos, la lisina catalítica y otros residuos del motivo I. Adaptada de Shuman y Lima, 2004.

## 2.2 Las RNA ligasas

Las RNA ligasas, que participan en las rutas de reparación, procesamiento (*splicing*) y edición de mRNAs, bien uniendo RNAs, bien alterando su estructura primaria, se han clasificado en dos familias denominadas Rnl1 y Rnl2, aunque recientemente se ha propuesto una tercera llamada DraRnl1 (Raymond y Shuman, 2007) e incluso una cuarta (Tanaka y Shuman, 2011).

La Rnl1 es una pequeña familia de RNA ligasas presentes en virus de eucariotas y procariotas, así como en algunos eucariotas (Wang *et al.*, 2003). Esta familia incluye a la RNA ligasa 1 del fago T4 (Silber *et al.*, 1972; Wang *et al.*, 2003), a la RNA ligasa/polinucleótido quinasa codificada por el baculovirus AcNPV (virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*) (Durantel *et al.*, 1998) y a las RNA ligasas de los bacteriófagos RM378 (Blondal *et al.*, 2003) y TS2126 (Blondal *et al.*, 2005). También se engloban en ella las tRNA ligasas de hongos (Westaway *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 1990; Baymiller *et al.*, 1994) y plantas (Pick *et al.*, 1986; Pick y Hurwitz, 1986; Englert y Beier, 2005; Wang y Shuman, 2005). Estas enzimas reparan escisiones en regiones de simple cadena, bien en el bucle del anticodón de los tRNAs o en la región codificante de mRNAs específicos. Estas escisiones son generadas por endonucleasas de RNA específicas de secuencia que actúan en procesos de eliminación de los intrones presentes en los precursores de muchos tRNAs eucarióticos (Abelson *et al.*, 1998), así como en mecanismos de respuesta antiviral basada en el RNA (Amitsur *et al.*, 1987) o de respuesta a estrés en el retículo endoplasmático por acumulación de proteínas plegadas incorrectamente en el mismo (Sidrauski *et al.*, 1996). La RNA ligasa identificada en baculovirus es similar a la T4Rnl1, pero muestra una característica única entre las RNA ligasas no eucarióticas: la presencia de las actividades polinucleótido quinasa y RNA ligasa en una misma proteína y con la misma orientación (amino terminal-ligasa-quinasa-ciclofosfodiesterasa-carboxilo terminal) observada en las tRNA ligasas de levaduras y plantas (ver más adelante) (Martins y Shuman, 2004b). Esta enzima proviene posiblemente de la fusión de las enzimas T4Rnl1 y T4Pnkp que en el fago T4 residen en proteínas distintas, y podría ser el antecesor común de las tRNA ligasas presentes en todos los eucariotas.

La familia Rnl2, presente en los tres dominios filogenéticos, incluye a la RNA ligasa 2 del fago T4, a las ligasas de edición de RNA (*RNA editing ligases*, RELs) de los protozoos kinetopláctidos *Trypanosoma* y *Leishmania* y a ligasas de arqueas (Ho y Shuman, 2002). La T4Rnl2 y las RELs son muy eficientes en reparar muescas en RNAs de doble cadena (Blanc *et al.*, 1999; Palazzo *et al.*, 2003; Nandakumar *et al.*, 2004), en consonancia con las

funciones de las RELs en la edición del mRNA (Schnauffer *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2005), un proceso esencial que convierte pre-mRNAs no funcionales en mRNAs maduros y traducibles. Esto implica el corte de los pre-mRNAs en el punto en que deben ser editados, la adición o delección específica de uridinas para corregir la secuencia sin sentido y la ligación de nuevo de los fragmentos. De esta manera, un RNA guía (gRNA) de simple cadena dirige el corte endonucleolítico de un pre-mRNA no codificante en el bucle desapareado del híbrido gRNA:mRNA para exponer el extremo 3', que es recortado por una endonucleasa o extendido por adiciones de UMP formando un RNA dúplex con muesca. A continuación la REL lleva a cabo la ligación, facilitada por el gRNA, del extremo 3'-OH remodelado al extremo 5'-P del fragmento distal del mRNA, generándose un nuevo mRNA codificante como consecuencia de la introducción de nuevos codones de iniciación, de cambios de la pauta de lectura o incluso de la creación de nuevas pautas. Se conocen dos ligasas involucradas en esta ruta, la ligasa de edición de RNA 1 (*RNA editing ligase 1*, REL1) y la 2 (*RNA editing ligase 2*, REL2) que forman parte de un complejo de edición (Sabatini y Hajduk, 1995; McManus *et al.*, 2001; Rusche *et al.*, 2001; Schnauffer *et al.*, 2001). El papel de las RELs en esta ruta de reparación de RNA bicatenario es análogo al de las DNA ligasas en la reparación de escisiones o en la eliminación de cebadores de la hebra retrasada, ya que ambos tipos de ligasas reparan muescas en un ácido nucleico bicatenario.

La familia DraRnl1 se limita a bacterias y a bacteriófagos, aunque se ha propuesto la existencia de homólogos en eucariotas. Sólo se ha caracterizado la RNA ligasa de *Deinococcus radiodurans* y hasta el momento se ignora su función. *D. radiodurans* es una bacteria conocida por su extrema resistencia a radiación ionizante (Makarova *et al.*, 2001) y, en este contexto, DraRnl podría contribuir a tolerar la radiación reparando RNAs o sellando DNAs fragmentados que han adquirido un extremo 3'-OH de RNA por adición ribonucleotídica (Raymond y Shuman, 2007). Parece ser que, en condiciones de exposición a la radiación, el gen que codifica esta proteína aumenta su expresión *in vivo*, sugiriendo que su función reparadora de RNA es importante para la célula (Martins y Shuman, 2004a). La caracterización bioquímica de DraRnl ha puesto de manifiesto similitudes funcionales con las enzimas de la familia Rnl2, pues es capaz de sellar muescas en RNAs bicatenarios, pero no de circularizar pequeños RNAs de simple cadena (siendo esta última la reacción característica de las ligasas de la familia Rnl1) (Martins y Shuman, 2004a). El dominio nucleotidiltransferasa de DraRnl y sus homólogos es también estructuralmente similar al de las enzimas de la familia Rnl2. Sin embargo, poseen un extremo N-terminal distinto, que es sin embargo similar en secuencia al dominio B2 de la subunidad  $\beta$  de las fenilalanil tRNA sintetasas bacterianas (Martins y Shuman, 2004a), y carecen de un extremo C-terminal

homólogo al dominio de unión a oligonucleótido/oligosacárido (*oligonucleotide/oligosaccharide binding*, OB) de las DNA ligasas y las enzimas de adición de caperuza o al presente en las Rnl2. DraRnl se distingue además de otras polinucleótido ligasas por su dependencia de  $Mn^{2+}$  como cofactor.

Recientemente se ha identificado en *E. coli* la proteína RtcB como el representante de una nueva familia de RNA ligasas (Tanaka y Shuman, 2011). Es una proteína no relacionada estructuralmente a las clásicas polinucleótido ligasas dependientes de ATP que liga extremos 5'-OH, 2',3'>P aparentemente de forma directa, es decir, sin modificación de los mismos. Su actividad es indiferente a la presencia de ATP, pero sin embargo se ve estimulada por GTP por un mecanismo todavía desconocido. La organización de los genes RtcA (una RNA 3'-fosfato ciclasa) y RtcB en un operón de dos genes en *E. coli* sugiere su participación en rutas de reparación de RNA, reparando y sellando extremos de RNA respectivamente. Se han encontrado homólogos de RtcB en bacterias, arqueas, protozoos y metazoos (Genschik *et al.*, 1998), pero no en hongos y plantas. La proteína homóloga de arqueas, denominada 3'-fosfato RNA ligasa, se ha purificado y caracterizado recientemente (Englert *et al.*, 2011), mostrándose que une correctamente mitades de tRNA producto del procesamiento (*splicing*) y genera un tRNA maduro de longitud completa que contiene el fósforo derivado del extremo 2',3'>P. Curiosamente, la proteína requiere  $Zn^{2+}$  para su actividad. Estudios filogenéticos han puesto de manifiesto la ubiquidad y conservación de RtcB en arqueas y eucariotas, implicando de esta manera a RtcB como la buscada 3'-fosfato RNA ligasa de animales que estaría implicada en el procesamiento de RNA (*splicing*) en estos organismos.

### 2.2.1 Las RNA ligasas del fago T4

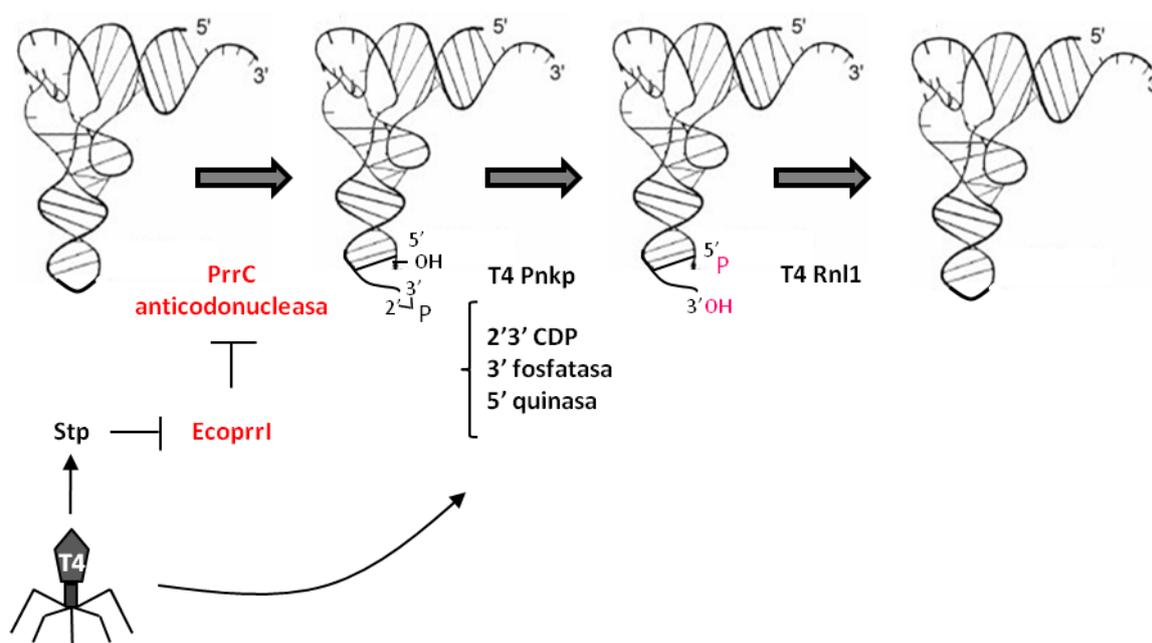
La RNA ligasa 1 del fago T4 (T4Rnl1) fue la primera RNA ligasa descrita y el miembro tipo de la familia de RNA ligasas Rnl1. Fue descubierta por su capacidad para circularizar moléculas lineales de poli(A) formando un enlace covalente intramolecular de los extremos 5'-P y 3'-OH (Silber *et al.*, 1972). La reacción es dependiente de  $Mg^{2+}$  y ATP, que se escinde liberando AMP y pirofosfato en cantidades equimolares a los enlaces formados (Sugino *et al.*, 1977). La T4Rnl1 es una enzima con escasa especificidad de sustrato, siendo incluso capaz de catalizar la unión entre RNA y DNA sin que se afecte demasiado la velocidad de reacción, siempre que el DNA sea el sustrato donador (Snopek *et al.*, 1976; McCoy y Gumpert, 1980). Sin embargo, los requerimientos para el sustrato aceptor son mayores, catalizando la ligación de aceptores desoxirribonucleicos 200 veces más lentamente que la de aceptores ribonucleicos, lo que proporciona a la enzima su

especificidad por el RNA. En cuanto al cofactor nucleotídico, la enzima muestra una especificidad muy alta por NTPs frente a dNTPs, y más concretamente por el ATP (Cranston *et al.*, 1974). Esta RNA ligasa se ha detectado en los fagos de la serie T-par, pero no en los de la serie T-impar ni en el fago  $\lambda$  (Silber *et al.*, 1972).

La T4Rnl1 es un polipéptido de 374 aminoácidos (Rand y Gait, 1984). Mediante cromatografía de afinidad de ácidos nucleicos se aisló la proteína de 43 kDa asociada con la actividad RNA ligasa (Snopek *et al.*, 1976). El gen codificante de esta enzima (el 63 del genoma de T4) fue identificado cartografiando mutaciones que reducían dicha actividad (Snopek *et al.*, 1977). Gait y colaboradores (Thogersen *et al.*, 1985; Heaphy *et al.*, 1987) cartografiaron el sitio de adenilación covalente en la lisina 99 y por mutagénesis dirigida demostraron el papel esencial de dicha lisina en la catálisis. La lisina del sitio activo de la T4Rnl1 está localizada dentro del elemento de secuencia conservado [motivo I, KX(D/N)G] característico de la superfamilia de las nucleotidiltransferasas covalentes, que incluye a las DNA ligasas y a las enzimas de adición de caperuza al mRNA (Shuman y Schwer, 1995; Shuman, 2001). Sin embargo, la T4Rnl1 comparte limitada similitud global de secuencia con las DNA ligasas y las enzimas de adición de caperuza, con las que prácticamente sólo comparte los motivos nucleotidiltransferasa I, IV y V, siendo los dos últimos esenciales para la transferencia nucleotídica covalente (Wang *et al.*, 2003). Además se han identificado otros residuos esenciales fuera de los motivos nucleotidiltransferasa como, por ejemplo, algunos conservados aguas arriba de la lisina del motivo I que no se encuentran en las ligasas del tipo T4Rnl2 ni en las DNA ligasas o las enzimas de adición de caperuza; esta observación sugiere que las enzimas del tipo T4Rnl1 tienen componentes característicos diferentes en sus sitios activos (Sawaya *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003).

La función biológica de la T4Rnl1 es la reparación del corte en el bucle del anticodón del tRNA<sup>Lys</sup> de *E. coli* que se genera por la activación por el fago de una anticodón nucleasa (ACNasa) codificada por el huésped (Amitsur *et al.*, 1987) (Fig. 9). En condiciones normales, la ACNasa se mantiene latente por la asociación de su proteína central, PrrC, con la endonucleasa Ecoprrl, que estabiliza PrrC y enmascara su actividad (Levitz *et al.*, 1990; Amitsur *et al.*, 1992). Cuando ocurre la infección, el bacteriófago T4 expresa el péptido Stp (Chapman *et al.*, 1988) que inhibe Ecoprrl y activa la enzima latente. El corte de los tRNA<sup>Lys</sup> por la PrrC bloquea la síntesis de proteínas del fago y detiene la infección antes de que se propague. Sin embargo, las enzimas del bacteriófago T4 polinucleótido quinasa/fosfatasa (*polynucleotide kinase/phosphatase*, Pnkp) y T4 Rnl1 reparan estos tRNAs rotos contrarrestando de esta manera el mecanismo de defensa del huésped (Fig. 9). La actividad de la endonucleasa sobre el tRNA produce un corte con extremos 5'-OH y 2',3'>P que no

pueden ser ligados por la T4Rnl1. Por esta razón, la T4Pnkp modifica los extremos del tRNA mediante tres actividades: 2',3'-ciclofosfodiesterasa, 3'-fosfatasa y polinucleótido quinasa. Por lo tanto, esta enzima multifuncional abre el enlace cíclico, elimina el grupo fosfomóster presente en el extremo 3' de la molécula del RNA y transfiere el grupo fosforilo y de la molécula de ATP al extremo 5'-OH del RNA (Uhlenbeck, 1983; Amitsur *et al.*, 1987; Galburt *et al.*, 2002), dejando así extremos 3'-OH y 5'-P para que a continuación actúe la T4Rnl1 restaurando el tRNA<sup>Lys</sup> cortado. Así pues, la T4Rnl1 desempeña un importante papel *in vivo*



**Figura 9.- Función biológica de la T4 RNA ligasa en la reparación de los tRNAs del huésped cortados.** Como consecuencia de la expresión del péptido Stp por el fago, la PrrC anticodón nucleasa se activa y corta los tRNA<sup>Lys</sup> para inhibir la síntesis de proteínas del fago. Previamente a la reparación de los tRNAs por la T4 Rnl1, la T4 Pnkp modifica los extremos 5'-OH y 2',3'-P que produce la endonucleasa mediante sus actividades 2',3'-ciclofosfodiesterasa, 3'-fosfatasa y 5'-quinasa, dejando extremos 3'-OH y 5'-P que son los ligados por la T4 Rnl1. Las proteínas del fago se muestran en negro y, en rojo, las del huésped.

para la propagación del bacteriófago, habiéndose demostrado que la ausencia de la T4Pnkp y la T4Rnl1 bloquea la síntesis de proteínas virales a causa de la disminución del tRNA<sup>Lys</sup> (Amitsur *et al.*, 1987). En *Neisseria* se ha detectado un homólogo de PrrC, así como otras ACNasas secretables en enterobacterias (colicina E5 y D) y hongos (zymocina) (Kaufmann,

2000; Lu *et al.*, 2005), lo que induce a pensar que se trata de un mecanismo de defensa contra invasores bastante extendido y que, por añadidura, los mecanismos de reparación del RNA mediados por RNA ligasas también deben ser frecuentes. La restricción/reparación del tRNA del bacteriófago es conceptual y mecanísticamente análoga al proceso de eliminación de intrones (*splicing*) de los tRNAs (ver más adelante) (Abelson *et al.*, 1998; Kaufmann, 2000) (Fig. 10). Sin embargo, este procesamiento del tRNA requiere dos roturas en el esqueleto del pre-tRNA para escindir el intrón, mientras que la restricción del tRNA implica un único corte en el tRNA maduro. Por otra parte, la reparación de extremos y la unión de cadenas en la ruta codificada por el fago son catalizadas por dos enzimas separadas (T4Pnkp y T4Rnl1), mientras que una única enzima, la tRNA ligasa (Trl1), cataliza estos pasos en el procesamiento del tRNA en levadura (Xu *et al.*, 1990; Apostol *et al.*, 1991). En cualquier caso, ambas enzimas, la T4Rnl1 y la Trl1 de levadura, se incluyen dentro de la misma subfamilia de ligasas de RNA, la Rnl1 (Sawaya *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). Una segunda función biológica que se ha propuesto para la T4Rnl1 es la promoción del anclaje de las fibras de la cola (*tail fiber attachment*, TFA) al cuerpo del fago (Snopek *et al.*, 1977), ya que en ausencia de la T4Rnl1 la reacción de TFA procede a baja velocidad. La T4Rnl1 puede aumentar la velocidad hasta 50 veces (Wood *et al.*, 1978), pero no afecta a la producción final de fibras de la cola ancladas. Las actividades Rnl1 y TFA podrían además no estar mecanísticamente relacionadas, puesto que los requerimientos de la reacción y la respuesta a algunos inhibidores es diferente (Snopek *et al.*, 1977). Además, ambas funciones se localizan en dos sitios distintos, pues mutaciones que inactivan la actividad RNA ligasa no afectan a la TFA (Runnels *et al.*, 1982).

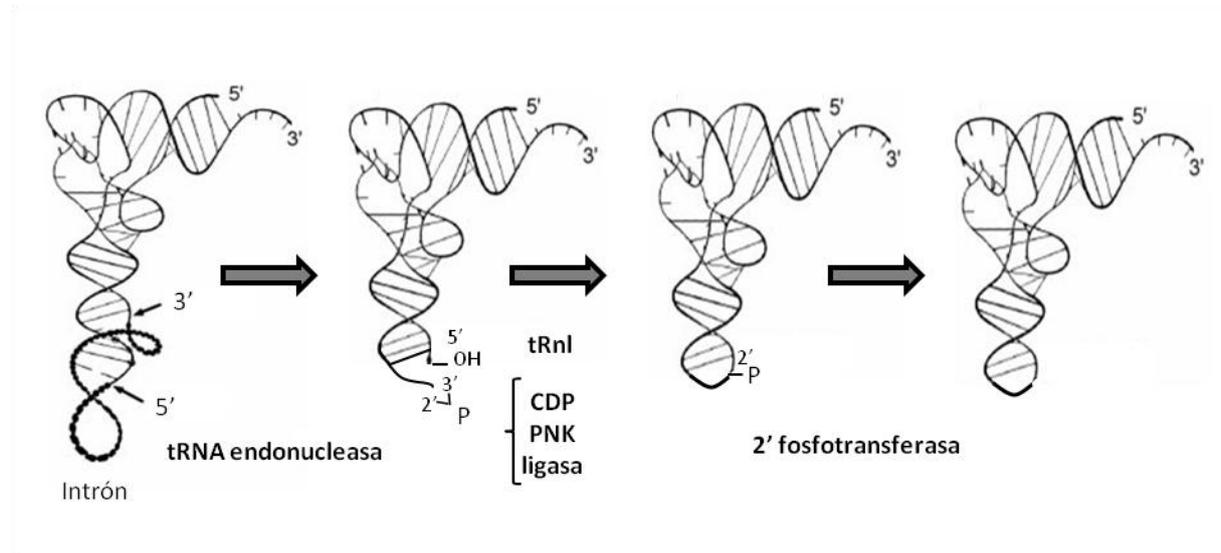
Posteriormente se ha identificado y caracterizado una segunda RNA ligasa del fago T4, la T4Rnl2, codificada por el gen 24.1 del bacteriófago (Ho y Shuman, 2002), habiéndose encontrado un homólogo del mismo en el fago KV40 (Yin *et al.*, 2004). La T4Rnl2 es el miembro tipo de una segunda familia de RNA ligasas (Rnl2) que, al contrario que la T4Rnl1, comparten un alto grado de similitud de secuencia con las DNA ligasas y las enzimas de adición de caperuza, y contienen los cinco motivos conservados en estas enzimas (I, II, IIIa, IV y V) además de una serie de características estructurales únicas y esenciales (Ho y Shuman, 2002). La T4Rnl2, que cataliza la unión de los mismos extremos que la T4Rnl1 y también requiere ATP y  $Mg^{2+}$  (o  $Mn^{2+}$ ), está formada por 334 aminoácidos (Ho y Shuman, 2002). Al igual que en la T4Rnl1, el sustrato aceptor determina la especificidad de la enzima por el RNA, siendo ésta mayor en la T4Rnl2 (Nandakumar *et al.*, 2004). Mediante experimentos de delección se ha comprobado que, mientras que el reconocimiento del extremo 3'-OH y el ataque sobre el RNA adenilado es mediado por aminoácidos del extremo

amino terminal en la T4Rnl2, la actividad de transferencia del AMP de la enzima al extremo 5'-P del RNA reside en el extremo carboxilo terminal (Ho *et al.*, 2004). Esta enzima, además de catalizar la ligación entre RNAs monocatenarios, sella roturas en RNAs de doble cadena y en híbridos RNA:DNA, sugiriendo que podría provenir de un mecanismo de reparación ancestral de ácidos nucleicos (Ho *et al.*, 2004; Nandakumar *et al.*, 2004). En el fago KV40, la enzima se encuentra predominantemente adenilada. La incubación de un RNA con extremos 5'-P y 3'-OH con una preparación purificada de esta enzima adenilada genera moléculas circulares en ausencia de ATP. Al añadir ATP a la reacción, el complejo RNA-proteína se desensambla sin llevar a cabo el último paso de ligación, generando mayoritariamente RNA adenilado en vez de circularizado, de forma similar a lo que ocurre con las transferasas de GMP durante la adición de la estructura de caperuza al mRNA. Como ya se ha comentado, estas últimas y las RNA ligasas dependientes de ATP comparten un ancestro común, por lo que se presume que la reacción catalizada por la enzima del fago KV40 sería un paso evolutivo intermedio entre ambas funciones (Yin *et al.*, 2004).

### 2.2.2 La tRNA ligasa

En 1981 se descubrió una nueva actividad de ligación de RNA en un extracto de germen de trigo (Konarska *et al.*, 1981). Un RNA de 73 nucleótidos con extremos 2',3'>P y 5'-OH o 5'-P era circularizado tras la incubación con un extracto de germen de trigo dando lugar a un enlace atípico 2'-fosfomonoéster, 3',5'-fosfodiéster, donde el grupo fosforilo en 2' derivaba del RNA sustrato (Konarska *et al.*, 1981; Konarska *et al.*, 1982). Más tarde se comprobó que la estructura de los sustratos y los productos de la reacción catalizada por la tRNA ligasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* eran idénticos a los descritos para la enzima de germen de trigo, y que la tRNA ligasa de levadura participaba *in vivo* en el procesamiento (*splicing*) de los precursores de los tRNAs (pre-tRNAs) (Greer *et al.*, 1983). Los genes de los tRNAs que contienen intrones fueron inicialmente descubiertos en *S. cerevisiae* (Goodman *et al.*, 1977), con lo que el mecanismo del procesamiento del tRNA se estudió primero en este organismo, comprobándose que era diferente del procesamiento del mRNA mediado por el espliceosoma y del procesamiento autocatalítico de los intrones de tipo I y II. El procesamiento de los pre-tRNAs es esencial en eucariotas y arqueas, y requiere la acción concertada de tres enzimas (revisado en Hopper y Phizicky, 2003) (Fig. 10). Los pre-tRNAs que contienen el intrón son primero cortados por una endonucleasa específica en los extremos 5' y 3' de la secuencia del intrón, produciéndose dos mitades del tRNA con extremos 2',3'>P y 5'-OH y liberándose el intrón lineal. A continuación, las mitades son unidas por una tRNA ligasa que requiere GTP y ATP generando un enlace 3',5'-fosfodiéster

y dejando un 2'-P en el sitio de unión. Finalmente, el grupo fosforilo en 2' es eliminado por una fosfotransferasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  (Abelson *et al.*, 1998).



**Figura 10.- Procesamiento de los tRNAs.** En primer lugar, el intrón es eliminado por una tRNA endonucleasa y, a continuación, la tRNA ligasa (tRnl) cataliza la unión de los extremos 5'-OH y 2',3'-P a través de sus actividades ciclofosfodiesterasa (CPD), polinucleótido quinasa (PNK) y RNA ligasa. Finalmente el grupo fosforilo presente en 2' es eliminado por una 2'-fosfotransferasa.

La tRNA ligasa de levadura es una proteína monomérica de 92 kDa que contiene tres actividades enzimáticas intrínsecas: un dominio adeniltransferasa en N-terminal que se asemeja al de la T4Rnl1, un dominio central polinucleótido quinasa similar a la T4Pnkp (sin la actividad 3'-fosfatasa), y un dominio ciclofosfodiesterasa (CPDasa) en C-terminal que es reminiscente de la superfamilia de enzimas 2H fosfotransferasas (Phizicky *et al.*, 1986; Apostol *et al.*, 1991; Sawaya *et al.*, 2003). La ligación de las mitades del tRNA resultantes del procesamiento transcurre en tres etapas en las que la tRNA ligasa lleva a cabo una serie de reacciones: (1) el fosfodiéster cíclico 2',3' en el extremo de la mitad 5' del tRNA es hidrolizado por la actividad CPDasa dando lugar a grupos 2'-P y 3'-OH, (2) el grupo 5'-OH en el extremo de la mitad 3' del tRNA es fosforilado por la actividad polinucleótido quinasa dependiente de GTP, y (3) la ligasa se adenila y transfiere el grupo AMP al extremo 5'-P de la mitad 3' del tRNA seguido de la formación del enlace 2'-fosfomonoéster, 3',5'-fosfodiéster que une las dos mitades del tRNA y de la liberación del AMP.

La primera tRNA ligasa de plantas se purificó parcialmente a partir de extractos de germen de trigo comprobándose su asociación con una actividad 2',3'-ciclofosfodiesterasa y polinucleótido quinasa en todos los pasos cromatográficos (Pick *et al.*, 1986; Pick y Hurwitz, 1986). Las tRNA ligasas de germen de trigo y levadura son enzimas multifuncionales que contienen las mismas actividades enzimáticas intrínsecas en un único polipéptido y generan un 2'-P atípico en el punto de unión. Además, las tRNA ligasas de levadura y plantas ligan las mitades de los tRNAs de plantas y levaduras, respectivamente, derivadas de la escisión del intrón por la endonucleasa (Gegenheimer *et al.*, 1983; Stange *et al.*, 1992). A pesar de estas aparentes similitudes generales en estructura y función, las búsquedas iniciales en los genomas secuenciados de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*, empleando la secuencia de la tRNA ligasa de levadura, no identificaron un gen candidato para la tRNA ligasa en ninguno de los dos genomas nucleares. Las primeras tRNA ligasas y los genes que las codifican en organismos eucariotas superiores fueron identificadas posteriormente (Englert y Beier, 2005). La purificación de la tRNA ligasa de germen de trigo por sucesivos pasos cromatográficos permitió la identificación de una proteína de 125 kDa capaz de unir covalentemente AMP, catalizar la ligación de mitades de tRNA, y circularizar intrones lineales. A partir de secuencias peptídicas obtenidas de la proteína de trigo purificada se identificaron las correspondientes proteínas y sus genes en las bases de datos de *A. thaliana* y *O. sativa* (AC026875, AP005124). Las tRNA ligasas de plantas no muestran similitud de secuencia aminoacídica general con las tRNA ligasas fúngicas, pero aún así contienen una serie de módulos enzimáticos intrínsecos que se asemejan a los motivos esenciales caracterizados en la enzima de levadura (Sawaya *et al.*, 2003; Englert y Beier, 2005). El orden físico de las tres actividades enzimáticas y los correspondientes elementos característicos aparecen conservados entre las tRNA ligasas de plantas y hongos, en consonancia con las primeras observaciones respecto a sus similares actividades *in vitro* (Filipowicz y Gross, 1984). Además, se ha demostrado que tanto la tRNA ligasa de plantas de longitud completa como los dominios ligasa y quinasa-CPD expresados separadamente son capaces de complementar a la enzima de levadura en una cepa deficiente en la tRNA ligasa (*trl1Δ*), sugiriendo que la tRNA ligasa de plantas es un verdadero ortólogo de la enzima de levadura (Wang *et al.*, 2003). Posteriormente se han caracterizado hasta tres isoformas de la tRNA ligasa de germen de trigo (Makino *et al.*, 2006).

El mecanismo de la reacción de ligación en vertebrados es diferente del de hongos o plantas. Estudios sobre el procesamiento del tRNA en extractos de células HeLa han mostrado que el grupo fosforilo 3'-terminal de las mitades 5' del tRNA es incorporado a un enlace típico 3',5'-fosfodiéster en el sitio de unión (Filipowicz y Shatkin, 1983). A pesar de

ello, diferentes trabajos han mostrado que en células HeLa también existe una maquinaria de procesamiento similar a la de plantas (Zillmann *et al.*, 1991). Sin embargo, la búsqueda en el genoma humano completamente secuenciado empleando la secuencia de la tRNA ligasa de plantas no ha permitido identificar ningún gen candidato, sugiriendo que las enzimas de mamíferos y plantas podrían haber divergido tanto como las enzimas de hongos y plantas. La reciente identificación de RtcB como una nueva ligasa implicada en reparación de RNA en bacterias (Tanaka y Shuman, 2011) y en el procesamiento de arqueas (Englert *et al.*, 2011) sugiere que podría tratarse de la hasta ahora desconocida 3'-fosfato RNA ligasa implicada en el procesamiento del tRNA en animales y arqueas. Esta proteína presenta además una distribución filogenética en bacterias, arqueas, protozoos y metazoos (Genschik *et al.*, 1998), pero no en hongos y plantas.

Todos los genomas nucleares eucarióticos conocidos codifican genes de tRNAs que contienen intrones y, sin duda, las tRNA ligasas tienen un papel esencial en el procesamiento de los pre-tRNAs. La cuestión es si las tRNA ligasas están también implicadas en otros procesos celulares. El descubrimiento de que la tRNA ligasa de levadura interviene en el procesamiento de determinados mRNAs reguladores de la respuesta a proteínas no plegadas, una vía esencial de señalización intracelular que activa la transcripción de genes de chaperonas cuando en el retículo endoplásmico se acumulan proteínas desplegadas, estableció una conexión inesperada de esta enzima con el metabolismo del mRNA (Sidrauski *et al.*, 1998; González *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2010). Indicios adicionales en esta dirección se han obtenido al comprobar que la mutación del gen que codifica una de las cuatro subunidades de la tRNA endonucleasa de humanos afecta tanto a la maduración de los tRNAs como de los mRNAs (Paushkin *et al.*, 2004). Una tarea más general para las tRNA ligasas podría ser su participación en la reparación de tRNAs rotos, de la misma manera que ésta es la principal función de la T4Rnl1 (Kaufmann, 2000). En este contexto, cabe destacar que el bucle del anticodón es la parte más vulnerable en el tRNA frente a la hidrólisis química y/o enzimática. En extractos de *Chlamydomonas reinhardtii* se ha observado la ligación de mitades 3' con sus correspondientes mitades 5' en el tRNA<sup>Ala</sup> (UGC) y en el tRNA<sup>Pro</sup> (UGG) a través de enlaces 2'-fosfomonoéster, 3',5'-fosfodiéster (Tyc *et al.*, 1983). Aparentemente, estas mitades de los tRNAs no se habían generado por procesamiento del tRNA, ya que los genes correspondientes en genomas de plantas conocidos no contienen intrones y, además, el corte había ocurrido en el anticodón y no en el sitio de procesamiento altamente conservado a un nucleótido 3' del anticodón. Además, la tRNA ligasa de germen de trigo y la tRNA ligasa recombinante de *A. thaliana* catalizan no sólo la unión de mitades de tRNA, sino también la circularización de los intrones

lineales y de diferentes oligo- y polirribonucleótidos naturales y sintéticos, siempre y cuando tengan extremos 2',3'>P, 5'-OH (Konarska *et al.*, 1981; Schwartz *et al.*, 1983). En contraste, la tRNA ligasa de levadura muestra un alto grado de especificidad. La unión de mitades de tRNA por la enzima de levadura es  $10^4$  veces más eficiente que la unión de oligorribonucleótidos artificiales (Phizicky *et al.*, 1986; Greer *et al.*, 1987) y los productos del procesamiento del tRNA en un extracto nuclear de levadura son tRNAs maduros y moléculas de intrones lineales (Knapp *et al.*, 1979). La amplia gama de sustratos de la tRNA ligasa de plantas claramente sugiere que la acción de esta enzima no está limitada al procesamiento de los pre-tRNAs o a la reparación de los tRNAs, sino que participa en otros procesos celulares todavía no detectados.

En cuanto a la localización subcelular, se ha demostrado que el procesamiento de los pre-tRNAs ocurre exclusivamente en el núcleo de vertebrados y en el citoplasma de levadura, respectivamente. Mediante expresión transitoria de las enzimas de procesamiento de *A. thaliana* y *O. sativa* fusionadas a GFP en células epidérmicas de *Allium cepa* y en células guardia de *Vicia faba*, se ha observado que tienen localización nuclear (Englert *et al.*, 2007), mostrando así que el procesamiento de los pre-tRNAs en plantas ocurre preferentemente en este orgánulo. Sin embargo, dos de las enzimas del procesamiento, la tRNA ligasa y la 2'-fosfotransferasa, contienen en sus extremos N-terminal péptidos de tránsito al cloroplasto y son predominantemente dirigidas a cloroplastos y proplástidos, respectivamente (Englert *et al.*, 2007). Los genomas cloroplásticos codifican genes de tRNAs que, de manera opuesta a los nucleares, no contienen intrones y, consecuentemente, la tRNA ligasa y la 2'-fosfotransferasa no son requeridas para un procesamiento convencional de los pre-tRNAs en estos orgánulos, con lo que esta localización alternativa sostiene la idea de que dichas enzimas ejercen múltiples funciones, pudiendo tener un papel en la reparación del tRNA o en el procesamiento de intrones de tipo II atípicos. Adicionalmente, se ha observado que la 2'-fosfotransferasa se asocia a la mitocondria (Englert *et al.*, 2007). Análisis *in vivo* con variantes mutantes sugieren que, para su localización diferencial, las enzimas del procesamiento del pre-tRNA emplean un mecanismo alternativo de iniciación de la traducción.

En plantas y animales se conocen patógenos que dependen de RNA ligasas aún no identificadas para su propagación. El genoma de RNA circular de 1679 nt del virus de la hepatitis  $\delta$  humana (*Hepatitis delta virus*, HDV) se replica por un mecanismo de círculo rodante. Los largos intermediarios replicativos de ambas polaridades son cortados en moléculas de RNA unitarias por ribozimas específicas. Aparentemente, una actividad del huésped presente en células de mamíferos es capaz de unir las moléculas del HDV tanto

intramolecular como bimolecularmente (Reid y Lazinski, 2000). De manera similar, una actividad celular debe de ser utilizada por los viroides que, como se ha comentado anteriormente, también se replican por un mecanismo de círculo rodante en el que los RNAs oligoméricos generados son cortados por RNAsas específicas (familia *Pospiviroidae*) o por ribozimas de cabeza de martillo (familia *Avsunviroidae*). En este sentido, la localización cloroplástica y los extremos 5'-OH y 2',3'-P generados por las ribozimas de cabeza de martillo en las reacciones de autocorte en los miembros de la familia *Avsunviroidae* convierten a la tRNA ligasa en una firme candidata a catalizar la reacción de ligación.

## 2.3 Las DNA ligasas

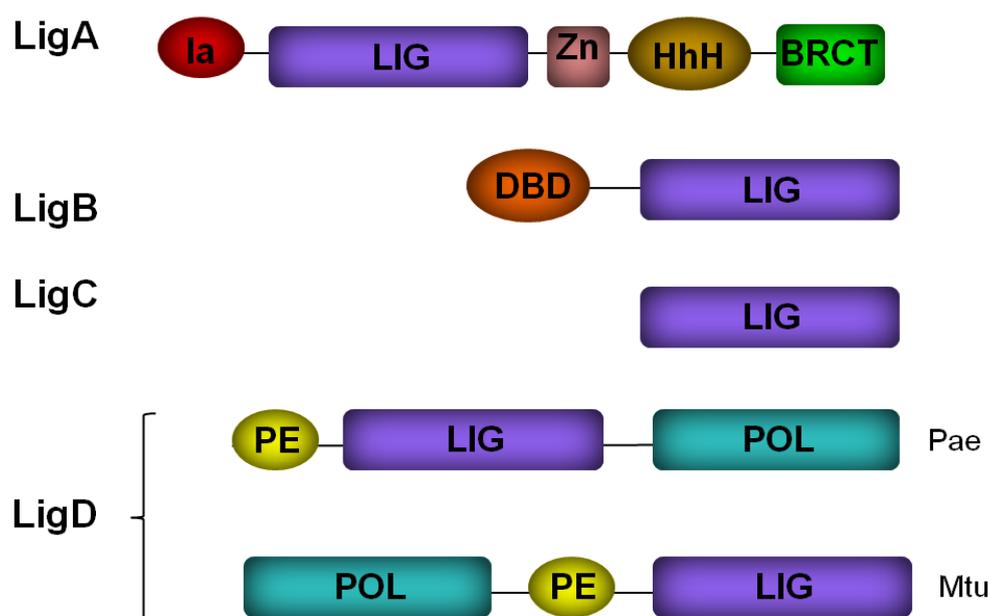
Al unir extremos 5'-P, 3'-OH para formar un enlace fosfodiéster, las DNA ligasas (Lehman, 1974; Soderhall y Lindahl, 1976; Engler y Richardson, 1982) son indispensables para la integridad genómica y la viabilidad celular. Estas enzimas son esenciales para la replicación, recombinación y reparación del DNA en todos los organismos, existiendo en la mayoría de ellos múltiples ligasas que funcionan tanto en la replicación del DNA (uniendo los fragmentos de Okazaki) como en su recombinación o en diferentes rutas de reparación del DNA particulares, tales como la reparación de la escisión de nucleótidos, la reparación de roturas de simple cadena o la reparación de roturas de doble cadena a través de la unión de extremos no homólogos (*non-homologous end joining*, NHEJ) (Tomkinson *et al.*, 2006; Shuman y Glickman, 2007; Ellenberger y Tomkinson, 2008). Deficiencias genéticas en las DNA ligasas humanas se han asociado a síndromes clínicos con características de inmunodeficiencia, sensibilidad a la radiación y anormalidades del desarrollo (Ellenberger y Tomkinson, 2008).

Las DNA ligasas se agrupan en dos familias, las dependientes de ATP y las dependientes de NAD<sup>+</sup>, según sea el requerimiento del sustrato nucleotídico para la formación del intermediario ligasa-AMP. Las DNA ligasas dependientes de ATP se encuentran en los tres dominios de los seres vivos (bacterias, arqueas y eucariotas), mientras que las dependientes de NAD<sup>+</sup> sólo están presentes en bacterias y entomopoxvirus (Sriskanda *et al.*, 2001; Wilkinson *et al.*, 2001).

### 2.3.1 DNA ligasas dependientes de NAD<sup>+</sup>

Las DNA ligasas dependientes de NAD<sup>+</sup> son un grupo particular de enzimas estructuralmente homogéneas que se encuentran en todas las bacterias, habiéndose estudiado sus estructuras cristalográficas en diferentes especies (Singleton *et al.*, 1999; Lee

*et al.*, 2000; Gajiwala y Pinko, 2004). La ligasa LigA de *E. coli* (671 aa), el prototipo de esta familia, tiene una arquitectura modular construida alrededor de un núcleo central ligasa compuesto por un dominio nucleotidiltransferasa (NTasa) y un dominio OB (Fig. 11). Este núcleo ligasa está flanqueado por un dominio denominado la en la región N-terminal y por tres módulos en la C-terminal: un dedo de zinc con cuatro cisteínas, un dominio hélice-horquilla-hélice (HhH) y un dominio repetitivo BRCA1 carboxilo-terminal (BRCT) (Fig. 11).



**Figura 11.- Diferentes DNA ligasas de bacterias compartiendo todas un núcleo catalítico ligasa (LIG).** En las enzimas LigA, el dominio LIG está fusionado a un dominio N-terminal (denominado motivo la) y tres dominios C-terminales: un dedo de zinc con cuatro cisteínas, un dominio hélice-horquilla-hélice (HhH) y un dominio repetitivo BRCA1 carboxilo-terminal (BRCT). El dominio la es único de las ligasas dependientes de  $\text{NAD}^+$ . La enzima LigB consiste de un dominio LIG en la región C-terminal fusionado a un dominio de unión al DNA en la N-terminal (DBD). Las enzimas LigC y LigD son las implicadas en la unión de extremos no homólogos (NHEJ) de bacterias. LigC consiste sólo del núcleo catalítico, mientras que las enzimas LigD son proteínas multifuncionales de reparación que tienen módulos catalíticos polimerasa (POL) y fosfoesterasa (PE) fusionados a los dominios LIG. En LigD se muestran las dos variantes en el orden de los dominios ejemplificadas por las enzimas de *Pseudomonas aeruginosa* (Pae) y *Mycobacterium tuberculosis* (Mtu). Adaptada de Shuman y Glickman, 2007.

Cada paso de la reacción de ligación depende de un conjunto diferente de dominios, siendo el NTasa el único requerido en todos los pasos. El dominio la es característico de las DNA ligasas dependientes de  $\text{NAD}^+$  y es requerido en la reacción de la enzima con el  $\text{NAD}^+$  para formar el intermediario ligasa-AMP, uniéndose además al grupo NMN del  $\text{NAD}^+$

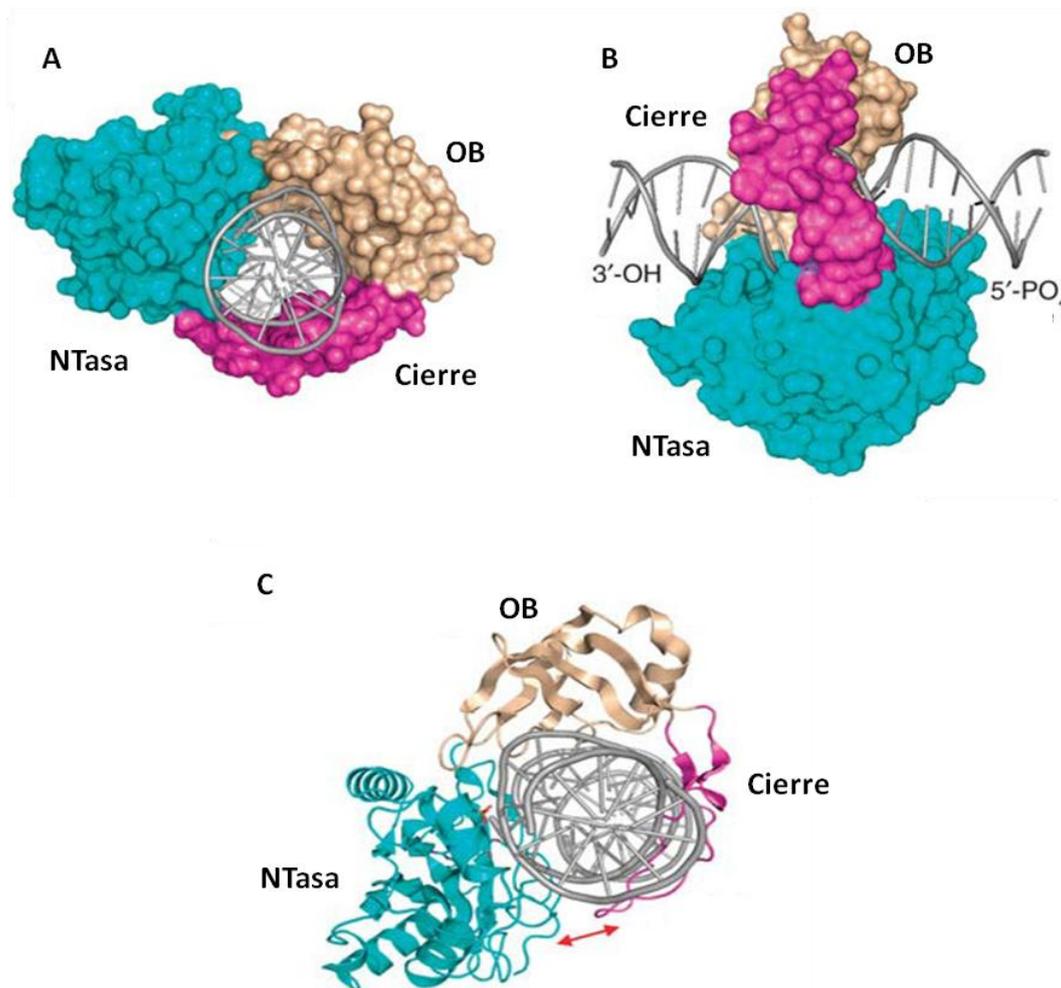
(Sriskanda y Shuman, 2002; Gajiwala y Pinko, 2004). La estructura cristalográfica de la LigA de *E. coli* unida al intermediario adenilado del DNA con muesca (Nandakumar *et al.*, 2007) reveló que la LigA también rodea a la hélice de DNA como una abrazadera proteica en forma de C, al igual que lo hacen las DNA ligasas dependientes de ATP, con abundantes contactos de los dominios NTasa, OB y HhH sobre un pequeño segmento del DNA de doble cadena alrededor de la muesca. La LigA es esencial para la viabilidad de *E. coli* y todas las demás bacterias estudiadas. Su estrecha distribución filogenética, la especificidad de sustrato nucleotídico y la particular estructura de los dominios que la conforman comparada con las DNA ligasas humanas dependientes de ATP, convierten a las DNA ligasas dependientes de NAD<sup>+</sup> en dianas para el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos (Shuman y Lima, 2004).

### 2.3.2 Las DNA ligasas dependientes de ATP

Todas las DNA ligasas eucariotas conocidas son dependientes de ATP (Ellenberger y Tomkinson, 2008) y su número varía entre los diferentes taxones: por ejemplo, los humanos tienen cuatro de estas DNA ligasas mientras que los hongos tienen dos. Las DNA ligasas dependientes de ATP también se encuentran en bacterias y en todas las arqueas conocidas, lo que sugiere la existencia de un ancestro común para la maquinaria de replicación.

Los elementos esenciales de las DNA ligasas dependientes de ATP quedan ejemplificados en la DNA ligasa del virus de *Chlorella* (ChVLig), la más pequeña conocida (298 aa) (Odell *et al.*, 2000) (Fig. 12). La ChVLig consta de un dominio NTasa en la región N-terminal y un dominio OB en la C-terminal. En el dominio NTasa se encuentra el bolsillo de unión al AMP compuesto por los cinco motivos peptídicos que definen a la superfamilia de las nucleotidiltransferasas covalentes, que incluye a las ligasas polinucleotídicas y a las enzimas de adición de caperuza (Shuman y Lima, 2004). El motivo I (KxDGxR) contiene la lisina a la que se une covalentemente el AMP en el primer paso de la reacción de ligación. Diferentes aminoácidos de los motivos I, III, IIIa, IV y V contactan con el AMP y desempeñan papeles esenciales en uno o más pasos de la ruta de ligación. El dominio OB consiste en un barril  $\beta$  de cinco cadenas antiparalelas y una hélice  $\alpha$ . Estos dos dominios (NTasa y OB) son estructuralmente análogos al núcleo catalítico mínimo de las DNA ligasas multidominio más complejas de bacterias (Singleton *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Gajiwala y Pinko, 2004) y en eucariotas superiores (Pascal *et al.*, 2004), así como de las enzimas de adición de caperuza al mRNA (Hakansson *et al.*, 1997). Aunque la ChVLig carece en sus regiones N- y C-terminales de los grandes dominios flanqueantes que se encuentran en las DNA ligasas

eucariotas, puede sin embargo sustentar el crecimiento mitótico, la reparación del DNA y la recombinación no homóloga en levadura cuando es la única actividad ligasa celular (Shuman y Lima, 2004).



**Figura 12.- Modelos de la estructura de la DNA ligasa del virus de *Chlorella* rodeando a un DNA de doble cadena con muesca.** (A) y (C) visión desde la cadena de DNA, y (B) visión lateral (90°). En azul se muestra el dominio nucleotidiltransferasa (Ntasa), en marrón el dominio OB y en fucsia el módulo que cierra la proteína alrededor del DNA. Las flechas rojas indican interacciones entre dominios que cierran la ligasa alrededor del sustrato. Adaptada de Shuman, 2009.

Los datos estructurales sostienen la idea de que la DNA ligasa dependiente de ATP es el miembro ancestral del que evolucionaron las DNA ligasas dependientes de NAD<sup>+</sup> por adquisición de un dominio estructural especializado (Ia) que se une al grupo NMN del NAD<sup>+</sup>. Todas las ligasas dependientes de NAD<sup>+</sup> conocidas presentan el dominio Ia y no pueden usar ATP como sustrato para la adenilación de la enzima, posiblemente porque las LigA carecen del motivo IV del dominio OB, el componente de las DNA ligasas dependientes de ATP que se piensa es el que interacciona con el grupo PPi del ATP (Hakansson *et al.*, 1997; Odell *et al.*, 2000). Sin embargo, algunos estudios acerca de la inespecificidad de nucleótido de las DNA ligasas de algunas arqueas discrepan con esta hipótesis (Sun *et al.*, 2008).

Diversos estudios bioquímicos y de genética molecular en células de mamíferos han puesto de manifiesto que éstas contienen más de una especie de DNA ligasa (Soderhall y Lindahl, 1973; Barnes *et al.*, 1990; Tomkinson *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 1995), y estudios posteriores han revelado la existencia de más de una DNA ligasa también en eucariotas inferiores y en procariotas (Wilson *et al.*, 1997; Sriskanda y Shuman, 2001; Gong *et al.*, 2004). La presencia de múltiples DNA ligasas sugiere que estas enzimas podrían tener funciones celulares específicas, idea que se vió apoyada por los diferentes fenotipos que presentan líneas celulares de mamífero deficientes en diferentes DNA ligasas (Barnes *et al.*, 1992; Caldecott *et al.*, 1994; Caldecott *et al.*, 1996; Riballo *et al.*, 1999). La comparación de los polipéptidos codificados por los genes de mamíferos *LIG1*, *LIG3* y *LIG4* muestra que el dominio catalítico conservado de estas enzimas está flanqueado por secuencias únicas en las regiones N- y C-terminales, que son las que presumiblemente conferirían las funciones celulares específicas a cada una de ellas, participando en interacciones proteína-proteína o de unión al DNA. Estas diferencias también se encuentran entre especies. Por ejemplo, las tres DNA ligasas de mamíferos requieren un dominio adicional de unión a DNA en la región N-terminal (*DNA binding domain*, DBD) para que su actividad de ligación sea eficiente (Pascal *et al.*, 2004). En cualquier caso, las DNA ligasas de mamíferos *LIG1*, *LIG3* y *LIG4* se consideran los miembros prototípicos de las tres familias de DNA ligasas eucariotas. Homólogos de los genes *LIG1* y *LIG4* parecen estar presentes en todos los eucariotas, mientras que el gen *LIG3* parece estar restringido a vertebrados. En cuanto a las funciones que desempeñan, la DNA ligasa I de mamíferos ha sido implicada tanto en la replicación como en la reparación de escisiones del DNA, mientras que la DNA ligasa III parece estar involucrada en reparación y recombinación meiótica del DNA. Por otra parte, se ha sugerido que la DNA ligasa IV de mamíferos funciona en la reparación de roturas de doble cadena del DNA y en el NHEJ (Grawunder *et al.*, 1997; Teo y Jackson, 1997; Wilson *et al.*, 1997; Grawunder *et al.*, 1998). Las DNA ligasas de mamíferos también muestran diferentes

especificidades por el sustrato polinucleotídico *in vitro* (Tomkinson *et al.*, 1996; Nash y Lindahl, 1998). LIG3 puede ligar oligo(dT)/poli(dA), oligo(dT)/poli(rA) y oligo(rA)/poli(dT), mientras que LIG4 no puede ligar oligo(rA)/poli(dT). Por su parte, LIG1 puede ser fácilmente distinguida por su incapacidad para unir un sustrato oligo(dT)/poli(rA) (Nash y Lindahl, 1998).

En el genoma de *A. thaliana* se han identificado cuatro secuencias distintas que codifican DNA ligasas (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), pero sólo tres de ellas se han caracterizado funcionalmente. En este organismo, la DNA ligasa I (AtLIG1) proporciona la actividad DNA ligasa más importante, pues desempeña un papel clave en la replicación del DNA y en las rutas de reparación de escisiones del mismo (Taylor *et al.*, 1998). El gen *AtLIG4* es el homólogo en *A. thaliana* de la DNA ligasa IV de levaduras y mamíferos, que es responsable de catalizar el paso de ligación final en la ruta NHEJ de la reparación de roturas de doble cadena. *AtLIG4* se expresa en todos los tejidos de *A. thaliana*, siendo su transcripción más elevada en flores en apertura y en raíces. La transcripción de *AtLIG4* está inducida por radiación  $\gamma$ , pero no por luz UV, lo que es consistente con la implicación de *AtLIG4* en la reparación de roturas de doble cadena en el DNA (West *et al.*, 2000; Friesner y Britt, 2003; van Attikum *et al.*, 2003). Una tercera y nueva DNA ligasa, la DNA ligasa VI, que parece ser exclusiva de plantas superiores, ha sido también clonada en *A. thaliana* y arroz (West *et al.*, 2000; Bonatto *et al.*, 2005). Esta nueva enzima de *A. thaliana* (AtLIG6) presenta actividad DNA ligasa en ensayos bioquímicos, y parece estar implicada en eventos de reparación de roturas de simple cadena en el DNA relacionados con la longevidad de las semillas (Waterworth *et al.*, 2010).

La DNA ligasa I (790 aa, 87.8 kDa) es la única actividad DNA ligasa esencial en *A. thaliana* y, como ya se ha comentado, está implicada en procesos de replicación, reparación y recombinación del DNA, así como en la inserción de transgenes en la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. La ORF de *AtLIG1* contiene en su extremo 5' tres codones AUG de inicio de la traducción en pauta (designados M1, M2 y M3) localizados en los codones 1, 48 y 60 (Taylor *et al.*, 1998; Willer *et al.*, 1999). Estos codones aparecen separados por secuencias propuestas como de tránsito a la mitocondria (von Heijne, 1986) y posiblemente al cloroplasto (Small *et al.*, 1998), conteniendo en todos los casos una señal de localización nuclear (Taylor *et al.*, 1998). Ya que los genomas de mitocondrias y cloroplastos no codifican ninguna DNA ligasa, esta actividad esencial debe ser importada desde el citosol tanto a estos orgánulos como al núcleo. Parece que las formas mitocondriales y nucleares de la DNA ligasa I de *A. thaliana* se traducen a partir de una sola especie de mRNA a través del control del inicio de la traducción desde el primer

(M1) o el segundo (M2) codón AUG en pauta, respectivamente. La traducción desde M3 ocurre sólo en transcritos en los que M1 y M2 han sido mutagenizados a codones de parada, y no hay pruebas de que esta proteína sea dirigida a cloroplastos (Sunderland *et al.*, 2004, 2006). La isoforma mitocondrial AtLIG1 posee en su región N-terminal tanto una señal de localización mitocondrial como una interna bipartita de localización nuclear (NLS), aunque es dirigida sólo a la mitocondria, demostrando que existe una dominancia jerárquica de la presecuencia mitocondrial sobre la NLS. La longitud de la 5'-UTR, y más significativamente el contexto nucleotídico alrededor de los codones de inicio alternativos en los transcritos AtLIG1, afectan al inicio de la traducción asegurando una síntesis equilibrada de las isoformas AtLIG1 nuclear y mitocondrial, probablemente a través de un mecanismo de rastreo ribosomal con fugas dependiente del contexto. Al no existir pruebas de la importación de AtLIG1 al cloroplasto, la ligasa exclusiva de plantas AtLIG6, cuya ORF contiene posibles señales de localización cloroplástica en la región N-terminal, se convierte en el principal candidato a desempeñar la actividad DNA ligasa en este orgánulo.

# OBJETIVOS

---



En la presente Tesis Doctoral se ha pretendido profundizar en el conocimiento de la replicación de los viroides nucleares y cloroplásticos, y más concretamente, en la etapa final del ciclo, correspondiente a la ligación de los intermediarios monoméricos lineales. Los objetivos específicos han sido:

**1.-** Identificar una nueva actividad RNA ligasa de plantas que ligue extremos viroidales 5'-P y 3'-OH, que pudiera estar implicada en la circularización de los miembros de la familia *Pospiviroidae*.

**2.-** Clonar y expresar dicha RNA ligasa con el fin de caracterizarla bioquímica y funcionalmente y determinar su posible implicación en el ciclo replicativo de los viroides nucleares.

**3.-** Clonar y expresar la tRNA ligasa de un hospedador natural de un miembro de la familia *Avsunviroidae* con el fin de caracterizarla bioquímica y funcionalmente y determinar su posible implicación en el ciclo replicativo de los viroides cloroplásticos.



# MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 1. Material biológico

### 1.1 Material vegetal

Como fuente de tejido para la extracción de proteínas o RNAs se emplearon hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (variedad Rutgers), berenjena (*Solanum melongena* L.) (variedad redonda morada) o *Arabidopsis thaliana* (L.), Heynh. (ecotipo Columbia-0). En los bioensayos de infectividad se emplearon plántulas de tomate. Las plantas de tomate y berenjena se crecieron en invernadero a una temperatura de 25°C empleando como sustrato una mezcla de turba y vermiculita (1:1). Por su parte, las plantas de *A. thaliana* se crecieron en cámaras a 23°C con iluminación fluorescente y un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Con el objetivo de favorecer y sincronizar la germinación, las semillas se mantuvieron en agua un mínimo de 72 h a 4°C antes de ser sembradas en una mezcla de turba, vermiculita y perlita (2:1:1).

### 1.2 Bacterias

Para la propagación y purificación de plásmidos se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , mientras que la cepa de *E. coli* empleada para la expresión de proteínas heterólogas fue Rosetta 2 (DE3) pLysS. Ambas se crecieron en medio Luria-Bertani (LB) líquido [1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl ] o sólido [LB líquido suplementado con 1.5% agar] en presencia del antibiótico adecuado (ampicilina 50 mg/l, cloramfenicol 34 mg/l) a 37°C durante toda una noche.

## 2. Manipulación de microorganismos

### 2.1 Obtención de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ competentes para su transformación por electroporación

Una colonia de *E. coli* DH5 $\alpha$  se sembró en 3 ml de medio LB líquido a 37°C en agitación durante toda una noche. Con este preinóculo se inocularon 250 ml de medio LB líquido fresco que se mantuvieron en agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.5. El cultivo se enfrió entonces en hielo durante al menos 15 min y se centrifugó a 9600 x g durante 5 min a 4°C. El sedimento se lavó dos veces con agua fría y finalmente se resuspendió en 40 ml de glicerol al 10% frío, tras los cual se centrifugó a 9600 x g durante 5 min a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron en 3 ml de glicerol al 10% frío y se fraccionaron en alícuotas de 90  $\mu$ l que se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se guardaron a -80°C hasta su utilización. Todos los pasos se realizaron en condiciones de esterilidad.

### 2.2 Transformación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ competentes mediante electroporación

La transformación de las células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  con los plásmidos de interés se llevó a cabo mediante electroporación a 1500 V con un aparato ECM399 (BTX). Tras el pulso eléctrico, se les añadió a las células 1 ml de medio SOC [2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM glucosa, pH 7.0] y se incubaron durante 1 h a 37°C en agitación para su recuperación. Finalmente, las células se sembraron en placas Petri con medio LB suplementado con el antibiótico adecuado según el plásmido empleado y se incubaron a 37°C durante toda una noche.

## 3. Electroforesis de ácidos nucleicos

### 3.1 Geles de poliacrilamida (PAGE)

#### 3.1.1 Condiciones no desnaturalizantes

Los ácidos nucleicos de pequeño tamaño se fraccionaron en geles de poliacrilamida (5% acrilamida, relación acrilamida:bisacrilamida 37.5:1) de 12 x 14 x 0.2 cm. Las electroforesis se realizaron a una intensidad constante de 75 mA durante 1 h y 30 min en presencia del tampón TAE [40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 7.2], tanto en

el gel como en los electrodos. Las muestras, antes de ser aplicadas, se mezclaron con 0.1 volúmenes de tampón de carga [concentración inicial: 0.0025% azul de bromofenol, 0.0025% cianol de xileno, 50% glicerol, 10 mM EDTA pH 8.0]. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron agitándolos durante 15 min en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y lavándolos tres veces con agua para eliminar el exceso del mismo. Los ácidos nucleicos se visualizaron por irradiación con luz ultravioleta.

### 3.1.2 Condiciones desnaturalizantes

Los geles desnaturalizantes de poliacrilamida (5% acrilamida, relación acrilamida:bisacrilamida 37.5:1) de 12 x 14 x 0.2 cm se prepararon en tampón TBE [89 mM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico y 2 mM EDTA] con 8 M urea, empleándose el mismo tampón sin urea para los electrodos. Previa a su aplicación en el gel, las muestras se mezclaron con un volumen de tampón de carga desnaturalizante [10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 98% formamida, 0.0025% azul de bromofenol y 0.0025% cianol de xileno] y se desnaturalizaron calentándolas 1.5 min a 95°C y enfriándolas rápidamente en hielo. La electroforesis se efectuó a un voltaje constante de 200 V durante 3 h. Una vez finalizada ésta, el gel se tiñó con bromuro de etidio como se ha descrito anteriormente.

### 3.1.3 Elución de ácidos nucleicos de geles de poliacrilamida

Cuando fue necesaria la elución de los RNAs separados por electroforesis, los fragmentos de los geles conteniendo los ácidos nucleicos de interés se cortaron en pequeños cubos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> y se transfirieron a un tubo Eppendorf. Los ácidos nucleicos se eluyeron añadiendo 0.5 ml de tampón de elución [0.1 M Tris-HCl pH 9.0, 0.1 M 2-mercaptoetanol, 10 mM EDTA, 1% SDS] y 0.1 ml de fenol:cloroformo (1:1) pH 8.0 y manteniendo el tubo en agitación durante una noche a temperatura ambiente. La fase acuosa se recuperó centrifugando 5 min a 17000 x g, y la orgánica se extrajo de nuevo con 0.2 ml de tampón de elución y agitación vigorosa. La segunda fase acuosa, recuperada de forma similar, se combinó con la primera y se extrajeron con 0.2 ml de cloroformo. Tras centrifugar 5 min a 17000 x g, los ácidos nucleicos contenidos en la fase acuosa se precipitaron con 1 volumen de isopropanol y 0.1 volúmenes de 3 M acetato sódico pH 5.5 durante 2 h a -20°C. Tras centrifugar 15 min a 17000 x g, se lavó el sedimento con etanol 70% y se resuspendió en agua.

## 3.2 Geles de agarosa

### 3.2.1 Condiciones no desnaturizantes

Para la separación del DNA según su tamaño se emplearon geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE añadiendo a las muestras tampón de carga (ver apartado 3.1.1). Las electroforesis se realizaron durante aproximadamente 1 h a un voltaje constante de 60 o 75 V para geles de 8 x 6.5 x 0.5 cm o 15 x 11 x 0.5 cm, respectivamente. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio. Para recuperar los fragmentos de DNA separados se utilizó el estuche *DNA Clean & Concentrator<sup>TM</sup>-5* (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.2.2 Condiciones desnaturizantes

Las preparaciones de RNA se fraccionaron en geles de agarosa al 1% conteniendo 1 M urea en TBE, empleándose el mismo tampón en los electrodos. Las muestras se mezclaron con 1 volumen de tampón de carga desnaturizante (ver apartado 3.1.2) y antes de cargarlas se desnaturizaron calentándolas 1.5 min a 95°C y enfriándolas rápidamente en hielo. Las electroforesis se realizaron durante aproximadamente 1 h y 30 min a un amperaje constante de 25 mA o 60 mA para geles de 8 x 6.5 x 0.5 cm o 15 x 11 x 0.5 cm, respectivamente. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y la integridad del RNA se visualizó por irradiación con luz UV.

## 4. Hibridación *Northern*

### 4.1 Electrotransferencia de RNAs a membranas de hibridación

Los geles, las membranas de nylon (Whatman) y el papel absorbente (GB005, Whatman) se equilibraron en tampón de electrotransferencia [25 mM Tris, 192 mM glicina] durante 10 min, montándose de la siguiente manera sobre el aparato de electrotransferencia semiseca (Amersham): cátodo - papel (3 capas) - gel - membrana - papel (3 capas) - ánodo. La electrotransferencia se llevó a cabo con una intensidad constante de 1 mA por cm<sup>2</sup> de membrana durante 1 h. Una vez transferidos, los RNAs se fijaron a la membrana irradiando con 0.12 J/cm<sup>2</sup> de luz ultravioleta.

## 4.2 Prehibridación e hibridación

La detección de los RNAs separados por PAGE y transferidos a membrana se realizó mediante hibridación con una ribosonda específica marcada con  $^{32}\text{P}$  (apartado 5). Previamente, las membranas se prehibridaron con 10 ml de solución de hibridación [50% formamida, tampón SSC (5X) [SSC: 150 mM NaCl y 15 mM citrato sódico, pH 7], 0.1% Ficoll, 0.1% polivinilpirrolidona (PVP), 1% SDS y 0.01% DNA de esperma de salmón] a 70°C durante 1 h. Para la hibridación, se diluyó la ribosonda (aproximadamente  $1 \times 10^6$  cpm) en 150  $\mu\text{l}$  de solución de hibridación, se desnaturalizó a 95°C durante 90 s y se mezcló con 10 ml de solución de hibridación. La hibridación se llevó a cabo a 70°C durante 12-14 h, transcurridas las cuales la membrana se lavó tres veces durante 10 min con SSC 2X y 0.1% SDS a temperatura ambiente, y una vez durante 15 min con SSC 0.1X y 0.1% SDS a 55°C. La membrana seca se reveló con una película autorradiográfica.

## 5. Transcripción *in vitro* de RNA

Los RNAs sustrato se transcribieron de los plásmidos correspondientes convenientemente linearizados por digestión con una enzima de restricción. La transcripción se llevó a cabo en un volumen total de 20  $\mu\text{l}$  durante al menos 2 h a 37°C empleando como molde 1  $\mu\text{g}$  de plásmido linearizado en tampón de transcripción [40 mM Tris-HCl pH 8.0, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM ditioneitol (DTT), 2 mM espermidina], junto con 0.1 U de pirofosfatasa inorgánica (Fermentas), 0.5 mM de cada uno de los NTPs, 20 U de inhibidor de RNAsas (*RiboLock™ RNase Inhibitor*, Fermentas) y 50 U de la correspondiente RNA polimerasa (Epicentre). La reacción se paró por adición de un volumen de tampón de carga desnaturizante y calentamiento durante 1.5 min a 95°C. Los RNAs se purificaron por PAGE desnaturizante.

Para preparar las ribosondas marcadas, la reacción de transcripción se llevó a cabo también en un volumen total de 20  $\mu\text{l}$  durante al menos 2 h a 37°C empleando como molde 1  $\mu\text{g}$  de plásmido linearizado en tampón de transcripción, junto con 0.1 U de pirofosfatasa inorgánica, 2 mM de cada uno de los tres NTPs no marcados, 40  $\mu\text{Ci}$  de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$  o  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (800 Ci/mmol), 20 U de inhibidor de RNAsas y 50 U de la correspondiente RNA polimerasa. El molde se digirió con 4 U de DNasa I (Fermentas) a 37°C durante 10 min y la sonda se purificó en columnas de exclusión molecular *Mini Quick Spin Columns Sephadex G-50* (Roche) según instrucciones del fabricante. La sonda se cuantificó en un contador de centelleo (Wallac 1410, Pharmacia).

## 6. Modificaciones de los ácidos nucleicos

### 6.1 Fosforilación

La fosforilación de los cebadores se llevó a cabo en 25  $\mu$ l de tampón de fosforilación [50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 100  $\mu$ M espermidina, 100  $\mu$ M EDTA] conteniendo el cebador (1250 pmoles), ATP a una concentración final de 400  $\mu$ M y 5 U de T4 polinucleótido quinasa (PNK, Fermentas), e incubando a 37°C durante 30 min.

Los RNAs sustrato, entre 10 y 15 pmoles, se fosforilaron en un volumen total de 25  $\mu$ l en tampón de fosforilación con 4 U de inhibidor de RNAsas, 5  $\mu$ Ci de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol) y 10 U de PNK, e incubando a 37°C durante 30 min. La enzima se inactivó calentando durante 10 min a 70°C, y los RNAs se purificaron en columnas de *Sephadex G-50* y se cuantificaron mediante PAGE desnaturalizante y autorradiografía.

### 6.2 Desfosforilación

Para desfosforilar los vectores para clonar los insertos, se mezcló 1  $\mu$ g de vector linearizado con 1 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Fermentas) en un volumen de 40  $\mu$ l de tampón de desfosforilación [10 mM Tris-HCl pH 7.5 y 10 mM MgCl<sub>2</sub>], y se incubó a 37°C durante 1 h. Los productos de la reacción se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y se eluyeron.

La eliminación de los grupos fosforilo  $\gamma$  y  $\beta$  del extremo terminal 5'-trifosforilado de los RNAs generados por transcripción (con el fin de que éstos quedaran con extremos 5'-P y 3'-OH) se llevó a cabo con pirofosfatasa ácida de tabaco (TAP) (Epicentre). Para ello se incubaron 20-25  $\mu$ g de RNA con 10 U de TAP en el tampón correspondiente [50 mM acetato sódico pH 6.0, 1 mM EDTA, 0.1%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.01% Triton X-100] y 80 U de inhibidor de RNAsas durante 1 h a 37°C. En algún caso la eliminación de los grupos fosforilo  $\gamma$  y  $\beta$  se llevó a cabo con la RNA 5' polifosfatasa (Epicentre), para lo cual se incubaron 20-25  $\mu$ g de RNA con 20 U de esta enzima en su correspondiente tampón de reacción [50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1%  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.01% Triton X-100] y 80 U de inhibidor de RNAsas durante 1 h a 37°C, con resultados equivalentes a los obtenidos con la pirofosfatasa ácida de tabaco. En cualquier caso, los RNAs se extrajeron con fenol:cloroformo, se recuperaron mediante precipitación con etanol y se cuantificaron midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.

## 7. Ligación de insertos

En la construcción de plásmidos recombinantes y la clonación de insertos para su secuenciación, las ligaciones se llevaron a cabo en una proporción molar 3:1 (inserto:vector) en 10 µl de tampón de ligación [40 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP] conteniendo 5 U de T4 DNA ligasa (Fermentas) e incubando a 22°C toda la noche.

## 8. Purificación de plásmidos bacterianos

Para este propósito se empleó el estuche *Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), basado en columnas de gel de sílice, siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 9. Análisis de secuencias

### 9.1 Secuenciación de plásmidos bacterianos

La secuencia de los insertos de interés se obtuvo en una o ambas orientaciones con un secuenciador capilar automático (ABI 3100, Applied Biosystems) empleando cebadores específicos.

### 9.2 Búsqueda en base de datos

Las búsquedas, tanto a nivel nucleotídico como aminoacídico, se realizaron en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), utilizando los programas *nucleotide blast*, *protein blast*, *blastx* y *tblastn*.

### 9.3 Alineamiento de secuencias

Para este fin se empleó el algoritmo ClustalW, visualizándose los resultados con el programa *GeneDoc*.

### 9.4 Traducción *in silico*

La obtención de las secuencias aminoacídicas a partir de las nucleotídicas se realizó mediante los programas informáticos de la página web de manipulación de secuencias *The*

*Sequence Manipulation Suite* (<http://www.bioinformatics.org/sms2>).

## 9.5 Predicción de motivos

La predicción del péptido de tránsito al cloroplasto en la secuencia de la tRNA ligasa de berenjena se efectuó con el programa *ChloroP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>).

## 10. Obtención de una fracción de proteínas de tomate con actividad RNA ligasa

Hojas jóvenes (15 g) de plántulas de tomate se trituraron en un mortero con N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino al que se le añadió tres volúmenes de tampón de extracción frío (4°C) [100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1% Nonidet P40 (Roche) y la mezcla de inhibidores de proteasas *Complete* (Roche)]. El extracto se clarificó por centrifugación, primero a 8000 x g durante 15 min para eliminar la mayor parte de los restos celulares y luego a 100000 x g durante 30 min. El sobrenadante de la ultracentrifugación se cargó en una columna de heparina de 1 ml (*HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP*, GE Healthcare) conectada a un aparato de cromatografía ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare). La columna, previamente equilibrada con 10 ml de tampón de extracción sin inhibidores de proteasas, se lavó con 20 ml del mismo tampón y las proteínas se eluyeron con 10 ml de un gradiente lineal de 0.1 a 2 M KCl en tampón de extracción sin inhibidores de proteasas. La cromatografía se llevó a cabo con un flujo de 1 ml/min, recogiendo 20 fracciones de 0.5 ml que se conservaron a 4°C. Para algunos experimentos, alícuotas de las fracciones con actividad RNA ligasa se introdujeron en un dializador con un límite de masa molecular de 10000 kDa (Pierce) y se dializaron tres veces durante 1 h frente a 1 l de tampón de diálisis [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1% Nonidet P40]. Todos los pasos se realizaron a 4°C.

## 11. Síntesis *in vitro* de RNAs sustrato

### 11.1 Viroides nucleares

Los RNAs monoméricos lineales de longitud completa del PSTVd (variante U23058), con extremos 5'-P y 3'-OH y abiertos por las posiciones G95-G96, C1-G2, G97-G98, C264-G265, U15-G16, U35-G36 o G197-G198, se obtuvieron por transcripción *in vitro* con la RNA

polimerasa T3 o SP6, según el caso, a partir de plásmidos linearizados con Eco31I (Fermentas). Estos plásmidos contenían uno u otro promotor en función de los dos primeros nucleótidos del transcrito (GG en la RNA polimerasa T3 y GA en la SP6). El sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Eco31I se introdujo de manera que, tras la digestión con esta enzima, el último nucleótido transcrito correspondiera al último nucleótido de la secuencia del PSTVd, consiguiendo así la síntesis de RNAs monoméricos de longitud completa. Los productos de la transcripción se purificaron por PAGE desnaturizante, y el grupo terminal 5'-trifosforilado se convirtió en monofosforilado mediante la pirofosfatasa ácida de tabaco (Epicentre) o la RNA 5' polifosfatasa (Epicentre).

El RNA monomérico lineal de longitud completa del PSTVd, con extremos 5'-OH y 2',3'>P y abierto por la posición G95-G96, también se obtuvo por transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa T7 a partir del correspondiente plásmido linearizado. En este plásmido, la secuencia del PSTVd está flanqueada en 5' por una variante de la ribozima de cabeza de martillo del RNA satélite del virus de las manchas anulares del tabaco [*Tobacco ringspot virus* satellite (sTRSV)] (Feldstein *et al.*, 1998) de forma que los primeros ocho nucleótidos de su secuencia son complementarios a los primeros ocho nucleótidos de la secuencia del PSTVd comenzando en el G96. De esta manera, al producirse el autocorte *in vitro* queda éste como el primer nucleótido en el RNA transcrito con un grupo terminal 5'-OH. En 3' la secuencia del PSTVd está flanqueada por una variante de la ribozima del virus de la hepatitis  $\delta$  (*Hepatitis delta virus*, HDV) (Schurer *et al.*, 2002), que tiene la propiedad de autocortarse en su primer nucleótido, generando así un RNA del PSTVd cuyo último nucleótido es G95 con un grupo terminal 2',3'>P. Este RNA producto de la transcripción y el autocorte se purificó por PAGE desnaturizante.

El RNA monomérico lineal de longitud completa del PSTVd abierto entre las posiciones G95-G96, así como el del HSVd (D13764) abierto entre las posiciones G82-G83, el del CCCVd (J02050) abierto entre las posiciones G62-G63, el del viroide de la piel cicatrizada de la manzana (*Apple scar skin viroid*, ASSVd) (AF421195) abierto entre las posiciones G90-A91 y el del viroide 1 de *Coleus blumei* (*Coleus blumei viroid 1*, CbVd-1) (X69293 con una G insertada entre 146-147) abierto entre las posiciones G73-C74, todos ellos con extremos 5'-OH y 3'-OH, se generaron por transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa T3 o T7, según el caso, a partir de plásmidos linearizados. Éstos se construyeron de manera que aguas arriba de la secuencia viroidal presentaran una variante de la ribozima de cabeza de martillo del sTRSV en la que los primeros ocho nucleótidos eran complementarios a los primeros ocho nucleótidos de la secuencia del correspondiente viroide. Así, al producirse el autocorte *in vitro*, el primer nucleótido del transcrito es el primer

nucleótido de la secuencia viroidal (con un grupo terminal OH). En el extremo 3' de la secuencia viroidal se introdujo un sitio de reconocimiento para *Eco31I* de manera que, al ser digerido el molde con esta enzima de restricción, el último nucleótido transcrito coincidiera con el último nucleótido de la secuencia viroidal. En resumen, con esta metodología se consiguió la síntesis de monómeros de longitud completa de los diferentes viroides con extremos 5'-OH y 3'-OH, que se purificaron por PAGE desnaturizante. En algunos experimentos, estos transcritos viroidales se fosforilaron en 5' con T4 polinucleótido quinasa en presencia de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP.

## 11.2 Viroides cloroplásticos

El RNA monomérico lineal de longitud completa del ELVd (AJ536613), con extremos 5'-OH y 2',3'>P y abierto por las posiciones A333-G1, se obtuvo por transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa T7 a partir de un plásmido con un inserto dimérico del cDNA viroidal comenzando en el sitio *SaII* (posición G210). Los RNAs monoméricos lineales producto del autocorte *in vitro* durante la transcripción se purificaron por PAGE desnaturizante.

Por otra parte, los RNAs monoméricos lineales de longitud completa del ELVd (AJ536613), con extremos 5'-OH y 2',3'>P y abiertos por las posiciones A263-G264, U245-U246, U176-C177, A103-A104 y U89-U90, se obtuvieron por transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa T3 a partir de plásmidos con la secuencia del ELVd flanqueada en 5' por una variante de la ribozima de cabeza de martillo del sTRSV y en 3' por una variante delecionada de la ribozima del HDV. Al comenzar estas secuencias del ELVd por sitios diferentes al resultante del autocorte *in vivo* de la ribozima de cabeza de martillo, ésta quedaba dentro de dichas secuencias. Los RNAs monoméricos lineales producto del procesamiento *in vitro* por las ribozimas del sTRSV y el HDV, pero que no se habían autocortado con la ribozima interna del ELVd y por tanto eran de longitud completa, se purificaron por PAGE desnaturizante.

Finalmente los RNAs monoméricos lineales de longitud completa de polaridad positiva y negativa del ASBVd (X52041), PLMVd (AJ005303) y CChMVd (AJ878085) se generaron por transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa T3 o T7, según el caso, a partir de plásmidos con insertos diméricos de los mismos. Los RNAs monoméricos lineales producto del autocorte *in vitro* de estos transcritos diméricos, abiertos por los sitios de autocorte [ASBVd (U153-G154), PLMVd (C288-U289) y CChMVd (A294-G295)], se purificaron por PAGE desnaturizante.

## 12. Análisis de la actividad RNA ligasa

Los primeros ensayos de esta actividad se efectuaron incubando a 30°C durante 30 min 4 µl de la fracción de proteínas con 25 ng de RNA sustrato en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT y 1 mM ATP (volumen final 20 µl). Tras la optimización de las condiciones de reacción, en el caso de la actividad RNA ligasa de tomate se cambió el pH del tampón a pH 8.0, la concentración de KCl a 75 mM y la de MgCl<sub>2</sub> a 5 mM. La reacción control con la T4 RNA ligasa 1 (Fermentas) se llevó a cabo también a 30°C durante 30 min en su correspondiente tampón [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT] e incluyendo 1 mM ATP y 25 ng de RNA sustrato. Las condiciones de reacción, una vez optimizadas, para las tRNA ligasas de berenjena y *A. thaliana* fueron: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub> y 5 mM DTT. En todos los casos las reacciones se pararon adicionando 20 µg de proteinasa K (New England Biolabs) y 2 µl de tampón [100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol, 0.5% SDS] e incubando a 42°C 15 min y a 55°C 15 min. Los productos de la reacción se separaron por PAGE desnaturalizante, se electrotransfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con una ribosonda complementaria marcada con <sup>32</sup>P obtenida por transcripción *in vitro* en presencia de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP. En el caso de la ligación de sustratos marcados radiactivamente con <sup>32</sup>P en el extremo 5' terminal, los productos de la reacción se separaron por PAGE desnaturalizante y los geles, fijados durante 30 min en 10% ácido acético y 20% metanol, se secaron mediante vacío y las señales radiactivas se revelaron por autorradiografía.

## 13. Pretratamientos de degradación proteolítica y desnaturalización térmica

La degradación proteolítica se realizó en un volumen final de 10 µl incubando 4 µl de la fracción de proteínas con 20 µg de proteinasa K y tampón [10 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoetanol, 0.05% SDS] a 42°C durante 30 min y a 55°C durante 30 min. Por su parte, la desnaturalización térmica se efectuó incubando los 4 µl de la fracción de proteínas a 55, 70 o 95°C durante 15 minutos en un volumen final de 10 µl. Tras estos tratamientos la actividad de RNA ligasa remanente en los 10 µl tratados se ensayó en las condiciones anteriormente descritas (apartado 12).

## 14. Experimentos de adenilación

En la adenilación de proteínas se sustituyó el ATP no marcado de la reacción de ligación por 5  $\mu\text{Ci}$  de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (800 Ci/mmol). La reacción se paró hirviendo las proteínas en tampón Laemmli y los productos se separaron por SDS-PAGE en geles del 12.5%. Por su parte, en la adenilación del RNA, las reacciones se llevaron a cabo con 250 ng de RNA sustrato y se pararon por digestión con proteinasa K como se ha descrito anteriormente (apartado 12). Los RNAs se separaron por PAGE desnaturizante. En ambos casos los geles se fijaron como se ha indicado anteriormente (apartado 12), se secaron mediante vacío y las señales radiactivas se revelaron por autorradiografía.

## 15. Ensayos biológicos de infectividad

Los bioensayos con el RNA del PSTVd circular producto de la actividad RNA ligasa de tomate se realizaron sobre plántulas de tomate crecidas en invernadero a 25°C. La inoculación se realizó sobre los cotiledones y el inóculo en 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , junto con un volumen de una dispersión de carborundo al 10% en el mismo tampón, se extendió suavemente con la yema de los dedos (con guantes). Para el bioensayo se utilizaron bloques de cuatro plantas, incluyendo un bloque inoculado sólo con tampón como control negativo y otro inoculado con el RNA del PSTVd circularizado por la T4 RNA ligasa 1 como control positivo. La expresión de síntomas se observó durante 30 días después de la inoculación (en los controles positivos aparecieron aproximadamente a los 21 días).

## 16. Extracción y purificación de RNA

El total de RNAs de tomate, berenjena y *A. thaliana* se extrajo homogenizando 5 g de tejido triturado con  $\text{N}_2$  líquido con cinco volúmenes de tampón de extracción [0.1 M Tris-HCl pH 9, 0.1 M NaCl, 10 mM EDTA, 0.1 M 2-mercaptoetanol, 5 M urea] y centrifugando a 12000 x g durante 5 min. El sobrenadante recuperado se mezcló con medio volumen de fenol-cloroformo (1:1) pH 8 y se centrifugó de nuevo a 12000 x g 5 min. Los RNAs de la fase acuosa se precipitaron con un volumen de isopropanol y 0.1 volúmenes de 3 M acetato sódico pH 5.5 durante 2 h a temperatura ambiente. Tras una centrifugación a 12000 x g 15 min, el sedimento se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 1 ml de agua (5 mg de tejido/ $\mu\text{l}$ ). Una cuarta parte de esta preparación se purificó en columna de gel de sílice

empleando un estuche comercial (*Centrifuge Plant RNA Mini Kit*, Nödken) para su uso posterior como molde en las reacciones de retrotranscripción. La integridad del RNA se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con 1 M urea en tampón TBE.

## 17. Amplificación de ácidos nucleicos

### 17.1 Transcripción inversa (*reverse transcription*, RT)

La reacción de retrotranscripción (volumen final 20  $\mu$ l) se llevó a cabo incubando 4  $\mu$ l de RNA total purificado en columna de gel de sílice con 5 pmol del cebador adecuado en 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.5 mM de cada uno de los dNTPs, 10 U de inhibidor de RNAsas y 50 U de la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (*M-MuLV RT*, Fermentas). La reacción se incubó durante 45 min a 42°C, 10 min a 50°C y 5 min a 60°C.

### 17.2 Reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR)

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un volumen final de 20  $\mu$ l conteniendo 1  $\mu$ l de la reacción de RT o 10 ng de plásmido empleado como molde, 10 pmol de cada uno de los cebadores sentido y antisentido, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 3% dimetilsulfóxido (DMSO) y 0.4 U de la DNA polimerasa *Phusion* (Finnzymes) en el tampón de reacción recomendado (tampón HF, Finnzymes). Las condiciones consistieron en una amplificación previa de 30 s a 98°C, seguida de 30 ciclos (10 s a 98°C, 30 s a 55°C y 30 s/kb de amplicón a 72°C), con una extensión final a 72°C durante 10 min. Cuando se llevó a cabo una segunda PCR con cebadores internos se empleó como molde 1  $\mu$ l de la primera reacción de PCR.

## 18. Amplificación rápida de los extremos de un cDNA (*rapid amplification of cDNA ends*, RACE)

### 18.1 3'-RACE

Partiendo de una preparación de RNA total se realizó una transcripción inversa (apartado 17.1) empleando un cebador con una cola poli(dT) en su extremo 3' que hibrida con la cola poli(A) de los mRNAs, y una secuencia conocida en el extremo 5' que se

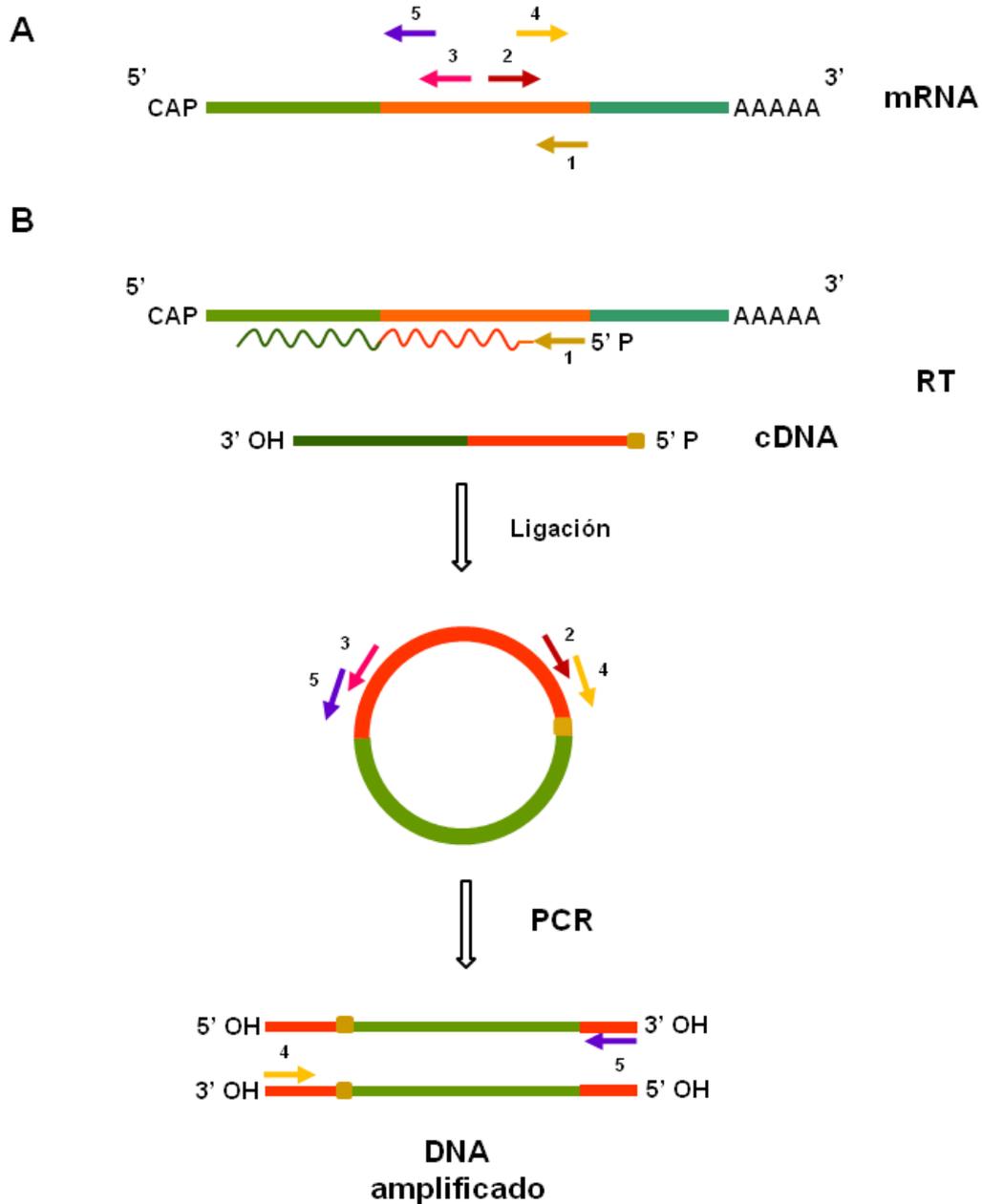
incorpora a los cDNAs sintetizados durante la reacción (Sambrook y Russell, 2001). Estos cDNAs se amplificaron con la DNA polimerasa Phusion mediante dos reacciones de PCR sucesivas (apartado 17.2), en las que la segunda se realizó con cebadores internos respecto a la primera que se fosforilaron previamente. Un cebador de cada pareja se diseñó complementario a la secuencia conocida del cDNA, y el otro complementario a la secuencia específica en 5' introducida con el cebador poli(dT).

### **18.2 5'-RACE**

En este caso el cDNA se generó por RT (apartado 17.1) a partir de una preparación de RNA total empleando un cebador específico previamente fosforilado. Una vez finalizada la reacción, el mRNA se digirió con 1 U de RNasa H a 37°C durante 1 h y el cDNA de simple cadena generado se autoligó con 40 U de T4 RNA ligasa 1 (Fermentas), aumentando el volumen de la reacción a 100 µl (para favorecer la circularización) y con el tampón recomendado para esta enzima [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT] y 1 mM ATP (Snopek *et al.*, 1976; McCoy y Gumpert, 1980). La reacción de ligación se incubó a 30°C durante una noche, y el producto resultante se recuperó por precipitación con dos volúmenes de etanol y 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5.5 durante 2 h a -20°C y, tras centrifugar a 17000 x g 15 min, el sedimento se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 20 µl de agua. Este cDNA circularizado sirvió como molde en una primera reacción de PCR (apartado 17.2) con cebadores específicos divergentes. Posteriormente, 1 µl de esta primera reacción de PCR se empleó como molde para una segunda PCR con una pareja de cebadores específicos (divergentes y adyacentes a los primeros, pero más internos) (Fig. 13), que se fosforilaron para la subsiguiente clonación del producto.

### **18.3 Análisis de los productos obtenidos en los experimentos de RACE**

Los productos de la amplificación con cebadores fosforilados se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% del que se eluyó el fragmento de interés. Dicho fragmento se clonó con extremos romos en el plásmido pUC18 (Norlander *et al.*, 1983) abierto en el sitio *Sma*I y desfosforilado. El plásmido recombinante se purificó con una columna de gel de sílice y se electroporó a una suspensión de células competentes de *E. coli* DH5α. Las células transformadas se sembraron en una placa con medio LB sólido suplementado con ampicilina (50 µg/ml), y las colonias transformantes aisladas se multiplicaron en 3 ml de LB líquido con ampicilina. A partir de estos cultivos se purificó el DNA plasmídico que finalmente se secuenció con un cebador en sentido y otro en antisentido para obtener la secuencia de los insertos en ambas orientaciones.



**Figura 13.- Esquema del protocolo de RACE circular.** (A) A partir de un fragmento interno de secuencia conocida de un mRNA es posible amplificar el resto con cebadores derivados de la misma tanto en dirección 5' como 3'. La línea naranja representa la secuencia conocida, y las verdes, las desconocidas. La flecha ocre indica el cebador que genera el cDNA durante la RT, las flechas roja y fucsia los cebadores divergentes derivados de la secuencia conocida empleados en la primera PCR y las flechas amarilla y lila los cebadores divergentes (internos respecto a los primeros) empleados en la segunda PCR. (B) Con un cebador fosforilado derivado de la secuencia conocida, se genera un cDNA con extremos 5'-P y 3'-OH que es circularizado mediante la T4 RNA ligasa 1. Este molde circular sirve entonces para la amplificación de la secuencia desconocida por PCR con cebadores derivados de la secuencia conocida. En este esquema se muestra la amplificación de una región desconocida aguas arriba de la conocida. La región desconocida del mRNA aguas abajo de la conocida puede amplificarse empleando en la RT un cebador con una cola poli(dT) en 3' y una secuencia determinada en 5'. LA PCR se realiza entonces con cebadores derivados de esta secuencia introducida en la RT y del fragmento conocido.

## 19. Cebadores

En las amplificaciones de ácidos nucleicos por RT y PCR se emplearon los cebadores que a continuación se detallan.

### 19.1 Amplificación del monómero circular del PSTVd

Nombre	Secuencia (5'→3')	Descripción
C1	CCGAGAACCGCTTTTTCTCTATCTTAC	PSTVd(+) CCR inferior
C2	GAGCTTCAGTTGTTTCCACCGGGTAG	PSTVd(-) CCR inferior

### 19.2 Clonación de la DNA ligasa 1 de tomate (Dnl1SI)

Nombre	Secuencia (5'→3')	Descripción
C3	CTTCTTTCCAAATTGAATGTTGTG	5' UTR y CDS Dnl1SI (+) Empealdo en la 1ª PCR
C4	CGCAAGTGCTCTTTGATTAGTCTTC	3' UTR y CDS Dnl1SI (-) Empleado en la RT y en la 1ª PCR
C5	GGCGCGGCCCATGGGAATGTTGTGTTTGAGTTC	Dnl1SI (+), interno respecto a C3 (desde ATG). Empleado en la 2ª PCR (introduce un sitio <i>Nco</i> I)
C6	GGCGCGGCCCTCGAGGTCTTCATCGTTGTC	Dnl1SI (-), interno respecto a C4 (desde 3 nt antes del TGA). Empleado en la 2ª PCR (introduce un sitio <i>Xho</i> I)

### 19.3 Clonación de la tRNA ligasa de berenjena (tRnlSm)

#### 19.3.1 3' y 5' RACE

Nombre	Secuencia (5'→3')	Descripción
<b>C7</b>	ATCACCTTTATGATGGAAAGAGCCG	tRnl tomate (+), extremo 3' del mRNA
<b>C8</b>	GCCGCGCCCTCGAGAAAGAATTCGAGAGTGCCAG	tRnl tomate (-), extremo 3' del mRNA
<b>C9</b>	CTTCCGCCGGTACCAGAAAGACATG	tRnl tomate (+), región central del mRNA hacia 3'
<b>C10</b>	TTCAGTAGAGGAATTCTGACAAGTG	tRnl tomate (-), región central del mRNA hacia 3'
<b>C11</b>	GGACCTACGCTGCGTGAGGTTTGTG	tRnl tomate (+), región central del mRNA hacia 5'
<b>C12</b>	TCCTGGAAAAAAAACGATGAGACCC	tRnl tomate (-), región central del mRNA hacia 5'
<b>C13</b>	AGAGTGAACCTATTGAACGTTTTTG	tRnl tomate (+), extremo 3' del mRNA
<b>C14</b>	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC TTTTTTTTTTTTTTTTTTVN	tRnlSm (-) Empleado en 3' RACE (RT)
<b>C15</b>	CCAGTGAGCAGAGTGACG	tRnlSm (-) Empleado en 3' RACE (1ª PCR), imbricado en el extremo 5' de C14
<b>C16</b>	GAGGACTCGAGCTCAAGC	tRnlSm (-) Empleado en 3' RACE (2ª PCR), imbricado en el extremo 3' de C14
<b>C17</b>	CCGGTGGATTTATATCAATGCGG	tRnlSm (-) Empleado en 5' RACE (RT)

Nombre	Secuencia (5'→3')	Descripción
<b>C18</b>	GTTGCCGCAAAGATGCCAATACAC	tRnlSm (+) Empleado en 5' RACE (1ª PCR)
<b>C19</b>	GTCTGTACAGACTGAGTCCCTCC	tRnlSm (-) Empleado en 5' RACE (1ª PCR)
<b>C20</b>	CCAATACACTACCACAGTTACTTTCC	tRnlSm (+) Empleado en 5' RACE (2ª PCR), imbricado en C18
<b>C21</b>	CCCTCCTCGATAATAGACCTCACAG	tRnlSm (-) Empleado en 5' RACE (2ª PCR), imbricado en C19
<b>C22</b>	GGCGCGGCGCTAGC <b>ATGCCAAACAATCAGAGAAAG</b>	<b>tRnl tomate (+)</b> desde <b>ATG</b>
<b>C23</b>	TGGAAATATTAGGGCTTGAAGGAGC	tRnl tomate (-), región central del mRNA hacia 5' (externo a C12)
<b>C24</b>	GGTGCTAATCCAACGCTGCCAAAC	tRnlSm (-) Empleado en 5' RACE del péptido de tránsito (RT)
<b>C25</b>	TATTACTGAAAGTGGTGCACAGTC	tRnlSm (+) Empleado en 5' RACE del péptido de tránsito (1ª PCR)
<b>C26</b>	GGCCTCACTTGCCATTTTTTTCCTTC	tRnlSm (-) Empleado en 5' RACE del péptido de tránsito (1ª PCR)
<b>C27</b>	GTGGTGCACAGTCTAGTGTTCCAG	tRnlSm (+) Empleado en 5' RACE del péptido de tránsito (2ª PCR), imbricado en C25
<b>C28</b>	CCACCCCTTTCTCTGATTGTTTGG	tRnlSm (-) Empleado en 5' RACE del péptido de tránsito (2ª PCR), imbricado en C26

## 19.3.2 Clonación en el vector pET23d(+)

Nombre	Secuencia (5'→3')	Descripción
<b>C29</b>	CACTCAGAACCCATGTAGGGTTCAC	3' UTR tRnISm (-) (RT)
<b>C30</b>	CCTTTTGTGTAGAACTGAATGTCGG	5' UTR y CDS tRnISm (+) (1ª PCR)
<b>C31</b>	GAGGAATTACAAGTAGAGTTCAAAG	3' UTR y CDS tRnISm (-) (1ª PCR)
<b>C32</b>	GGCGCGGC <u>CCATGG</u> ATGTCGGTTTCGCATAG	tRnISm (+) Empleado en la 2ª PCR, imbricado en C30 (desde ATG) (introduce un sitio <i>Nco</i> I)
<b>C33</b>	GGCGCGGC <u>GCGGCCGC</u> AAAGAATTCGAGAGTG	tRnISm (-) Empleado en la 2ª PCR, imbricado en C31 (desde 3 nt antes del TGA) (introduce un sitio <i>Not</i> I)
<b>C34</b>	ATGTCGGTTTCGCATAGGGTC	tRnISm (+) desde el ATG Empleado en la 1ª mutagénesis de pEtRnISm (delección en 5')
<b>C35</b>	GGTATATCTCCTTCTTAAAG	pET23d(+) (-) Empleado en la 1ª mutagénesis de pEtRnISm (delección en 5')
<b>C36</b>	CACCACCACCACCACACTGAGATCCGGCTG	pET23d(+) (+) Empleado en la 2ª mutagénesis de pEtRnISm (delección en 3')
<b>C37</b>	AAAGAATTCGAGAGTGCCAG	tRnISm (-) desde 3' Empleado en la 2ª mutagénesis de pEtRnISm (delección en 3')

## 19.4 Clonación del péptido de tránsito de la tRNA ligasa de *A. thaliana* (tRnlAt)

### 19.4.1 5' RACE

Nombre	Secuencia (5'→3')	Descripción
<b>C38</b>	GATTGAGACCAACTTTTGTATCTCC	tRnlAt (-) Empleado en 5' RACE del péptido de tránsito (RT)
<b>C39</b>	GGCAACAGAAGTTGGTAAACATC	tRnlAt (+) Empleado en 5' RACE del péptido de tránsito (1ª PCR)
<b>C40</b>	CAAATTGGTTGTTTACTGCTTCTGC	tRnlAt (-) Empleado en 5' RACE del péptido de tránsito (1ª PCR)
<b>C41</b>	GGCTGTCTCACAGATAGGTTCTTC	tRnlAt (+) Empleado en 5' RACE del péptido de tránsito (2ª PCR), imbricado en C39
<b>C42</b>	CTATCACCGGATTCAAATGGAGCATC	tRnlAt (-) Empleado en 5' RACE del péptido de tránsito (2ª PCR), imbricado en C40

### 19.4.2 Clonación en el vector pERnl

Nombre	Secuencia (5'→3')	Descripción
<b>C43</b>	ATGTCGTTAATTCCTCACACAAC	Péptido de tránsito tRnlAt (+)
<b>C44</b>	CTTCGGTTTTACTTGCCACTTC	Péptido de tránsito tRnlAt (-)
<b>C45</b>	ATGGATGCTCCATTTGAATCCGGTGATAG	pERnl (+) desde extremo Nt de la tRnlAt para amplificar el plásmido completo
<b>C46</b>	ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTC	pERnl (-) desde pET23a+ para amplificar plásmido completo

## 20. Expresión de proteínas en *E.coli* Rosetta 2

### 20.1 Inducción

Muestras de las colonias de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS (Novagen) transformadas con las construcciones a expresar se inocularon en un matraz de 50 ml de medio LB líquido con ampicilina y cloramfenicol (50 y 34 µg/ml respectivamente). El cultivo se multiplicó a 37°C en agitación durante toda la noche. Con este precultivo se inocularon 250 ml de LB con ampicilina y cloramfenicol hasta una densidad óptica aproximada de 0.1 a 600 nm de longitud de onda, y el cultivo se mantuvo en agitación a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica aproximada de 0.6 a 600 nm. En ese momento se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 400 µM, y se continuó la incubación del cultivo, esta vez a 28°C durante 3 h. Tras ese período, las células se recuperaron por centrifugación a 9600 x g durante 15 min, se lavaron con 12,5 ml de agua, y se resuspendieron en 2.5 ml de agua con una mezcla de inhibidores de proteasas 3X (*Complete*, Roche).

### 20.2 Extracción

Para romper su pared celular, las células se congelaron a -20°C durante al menos 1 h. Una vez descongeladas, se llevaron a 5 ml con agua y los ácidos nucleicos se digirieron añadiendo 125 U de la endonucleasa Benzonase® (Novagen) en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Nonidet P40, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> y 10 mM 2-mercaptoetanol, e incubando en agitación suave a 4°C durante 45 min. Para evitar interacciones inespecíficas entre las proteínas durante la purificación, se añadió NaCl hasta una concentración final de 500 mM. El volumen del extracto se ajustó a 10 ml con agua y tras una incubación con agitación a 4°C durante 15 min, se ultracentrifugó a 100000 x g durante 30 min. El sobrenadante se recuperó y se le añadió imidazol pH 8 hasta una concentración final de 20 mM.

### 20.3 Purificación

Las proteínas expresadas se purificaron mediante una cromatografía de afinidad con una columna de 1 ml de Ni-sefarosa (*HisTrap<sup>TM</sup> HP*, GE Healthcare) conectada a un aparato de cromatografía ÄKTA Prime Plus. El sobrenadante de la ultracentrifugación se cargó en la columna, previamente equilibrada con 10 ml de tampón de lavado [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 1% Nonidet P40, 10 mM 2-mercaptoetanol, 20 mM imidazol], se lavó con 20 ml del mismo tampón, y las proteínas etiquetadas se eluyeron con 20 ml de tampón de elución [50% tampón de lavado, 50% 1 M imidazol pH 8.0]. La cromatografía se llevó a cabo con un

flujo de 1 ml/min, recog iéndose 10 fracciones de 1 ml (correspondientes a los primeros 10 ml eluidos) que se conservaron a 4°C. Las fracciones en las que eluyó la mayor cantidad de proteína se determinaron por espectrometría, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. Para algunos experimentos se dializaron alícuotas de la fracción con mayor cantidad de proteína, para lo que se introdujeron en un dializador con un límite de masa molecular de 10000 kDa y se dializaron tres veces durante 1 h frente a 1 l de tampón de diálisis [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1% Nonidet P40]. Todos los pasos se realizaron a 4°C.

## **21. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (PAGE-SDS)**

Las proteínas se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (con SDS), siendo por tanto separadas en función de su masa molecular. El gel separativo, de 12 x 14 x 0.1 cm, se preparó con una concentración de acrilamida del 10 o el 12.5% (relación acrilamida:bisacrilamida 37.5:1), según el caso, en tampón 375 mM Tris-HCl pH 8.8 y 0.05% SDS, mientras la concentración de acrilamida del gel de apilamiento fue del 5% y se preparó en tampón 125 mM Tris-HCl pH 6.8 y 0.05% SDS. El tampón de los electrodos consistió en 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.05% SDS. Antes de ser cargadas en el gel, las proteínas se desnaturalizaron en tampón Laemmli [2% SDS, 100 mM DTT, 10% glicerol, 0.01% azul de bromofenol, 60 mM Tris-HCl pH 6.8] incubándolas a 95°C durante 1.5 min y a continuación se separaron aplicando 200 V al gel durante aproximadamente 2 h.

## **22. Tinción de geles PAGE-SDS**

Las proteínas separadas por electroforesis se visualizaron en algunos casos mediante un colorante, para lo que el gel se tuvo durante toda una noche en agitación con solución de tinción [0.25% azul de Coomassie R-250, 0.06% marrón de Bismarck, 10% ácido acético, 50% metanol] y se destiñó posteriormente con una solución de 10% ácido acético y 10% metanol.

## 23. Detección mediante análisis *Western*

En los casos en los que se realizó una detección *Western* de las proteínas separadas por electroforesis, se preparó una membrana de PVDF (GE Healthcare) del tamaño del gel a transferir, que se humedeció en metanol y se lavó posteriormente tres veces con agua. La membrana, el gel y el papel absorbente (GB005, Whatman) se equilibraron durante 10 min en tampón de electrotransferencia, y la transferencia de las proteínas se llevó a cabo como se ha indicado anteriormente para la transferencia de RNAs (apartado 4.1). Una vez transferidas las proteínas, la membrana se bloqueó durante al menos 1 h en tampón de lavado [10 mM Tris-HCl pH 7.5, 154 mM NaCl, 0.1% Nonidet P40] con un 5% de leche desnatada en polvo, y a continuación se incubó la membrana con el anticuerpo convenientemente diluido en tampón de lavado con 5% leche desnatada durante toda la noche a 4°C en agitación. Tras esta incubación, la membrana se lavó tres veces durante 5 min con tampón de lavado y, cuando fue necesario, se incubó durante al menos 1 h con el anticuerpo secundario a una dilución apropiada en tampón de lavado con 5% leche desnatada. Finalmente, la membrana se lavó tres veces durante 5 min con tampón de lavado y se dejó secar. La detección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia empleando el estuche de detección *Amersham™ ECL Plus* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 24. Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Con este propósito, la banda de interés procedente de una PAGE-SDS preparativa al 10% se fijó en una solución del 10% ácido acético y 20% metanol, y se analizó en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia) mediante separación por cromatografía líquida (LC) y espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en un espectrómetro de masas.

### 24.1 Preparación de las muestras

La muestra se incubó en primer lugar a 60°C durante 30 min en presencia de 10 mM DTT y 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , y a continuación, para alquilar los grupos previamente reducidos, durante 30 min en oscuridad con 55 mM iodoacetamida en 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Después de un lavado durante 2 min en  $\text{H}_2\text{O}$ /acetonitrilo y otro durante 5 min en acetonitrilo, se procedió a la digestión proteolítica añadiendo 100 ng de tripsina e incubando 30 min en hielo. Al sobrenadante se le añadieron 20  $\mu\text{l}$  de 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  y, después de una incubación a

37°C durante toda la noche, la reacción se paró con 2 µl de ácido trifluoroacético 10%, midiéndose el pH (que resultó ser 1). Finalmente se efectuó una doble extracción de los péptidos con acetonitrilo y el disolvente de los extractos combinados se eliminó mediante vacío, resuspendiéndose el sedimento en 20 µl de 0.1% ácido trifluoroacético. En el procesado de las muestras se incluyeron 75 ng de seroalbúmina bovina como control de la digestión y un blanco con los reactivos para determinar el origen de una posible contaminación por queratinas.

## 24.2 Identificación mediante LC-MS/MS

Con el fin de hacer una estimación de la concentración de péptidos, una alícuota de la muestra (0.5 µl) se analizó primero por MALDI-TOF/TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - tandem Time-Of-Flight*) en un espectrómetro de masas 4700 *Proteomics Analyzer* (Applied Biosystems). Antes del análisis se calibró la placa y los métodos de adquisición. Los espectros se obtuvieron en modo reflectrón positivo.

Los péptidos se separaron entonces por cromatografía líquida, para lo que se cargó la muestra en una columna trampa (*trap column*, LC Packings PepMap C18, 300 µm x 5 mm) con un flujo isocrático de 0.1% ácido trifluoroacético a 30 µl/min durante 5 min. Los péptidos de esta precolumna se aplicaron en la columna analítica (LC Packings PepMap C18 3 u 100 Å, 75 µm x 15 cm) (solución A de equilibrado y lavado: 0.1% ácido fórmico en H<sub>2</sub>O) y se eluyeron con un gradiente de 5 a 50% de solución B durante 120 min en un espectrómetro de masas nanoESI QTOF (Q STAR, ABSciex) para su identificación por MS/MS [B: 95% acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico]. Se realizaron experimentos de IDA (*Information-Dependent Acquisition*, adquisición de datos retroalimentada por la información obtenida) a lo largo de todo el cromatograma. El volumen de inyección fue de 5 µl y antes del análisis se calibró el instrumento con 200 fmol de una mezcla control de seis proteínas digeridas (LC Packings).

La información combinada de MS/MS se procesó conjuntamente empleando el algoritmo MASCOT versión 2.2 y el software MASCOT DAEMON (Matrix Science) para buscar en las bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [NCBI nr. 20100223 (10461804 secuencias; 3569112434 residuos)]. En las búsquedas se restringió la taxonomía a plantas verdes (Viridiplantae, 353898 secuencias) y se emplearon los siguientes parámetros: modificaciones del tipo carbamidometilación fijas, y del tipo deamidación y oxidación variables, masa molecular no restringida, intervalo de exactitud en la masa del péptido (error) de ± 100 ppm, intervalo de exactitud en la masa del fragmento de ± 0.6 Da, y número máximo de sitios de corte no cortados 2.

# RESULTADOS

---

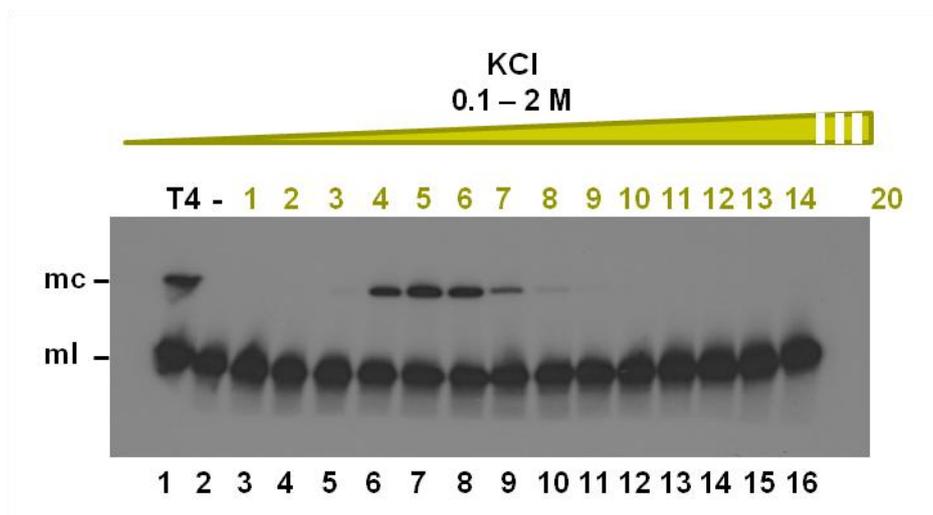


## **1. Circularización de los viroides nucleares (familia *Pospiviroidae*)**

El modelo propuesto recientemente para el procesamiento de los oligómeros de polaridad positiva de los viroides nucleares durante la replicación (Gas *et al.*, 2007; Gas *et al.*, 2008) implica la existencia en plantas de una actividad RNA ligasa capaz de unir los extremos 5'-P y 3'-OH que presentan los monómeros viroidales lineales producto de este procesamiento (Fig. 5). Esta actividad ha de ser nuclear y diferente de la única RNA ligasa conocida hasta el momento en plantas, la tRNA ligasa, que cataliza la unión de extremos 5'-OH y 2',3'-P y que hasta el momento ha sido considerada la enzima que cataliza la circularización de los monómeros de polaridad positiva del PSTVd y, por extensión, de otros miembros de la familia *Pospiviroidae* de la que es el miembro tipo (Branch *et al.*, 1982). Para la identificación de esta nueva actividad enzimática se partió de un extracto de proteínas de tomate, huésped experimental del PSTVd, y se empleó como sustrato el RNA monomérico lineal (ml) de polaridad positiva (+) del PSTVd abierto por el sitio de procesamiento fisiológico (entre las posiciones G95-G96) y con extremos 5'-P y 3'-OH (Gas *et al.*, 2007).

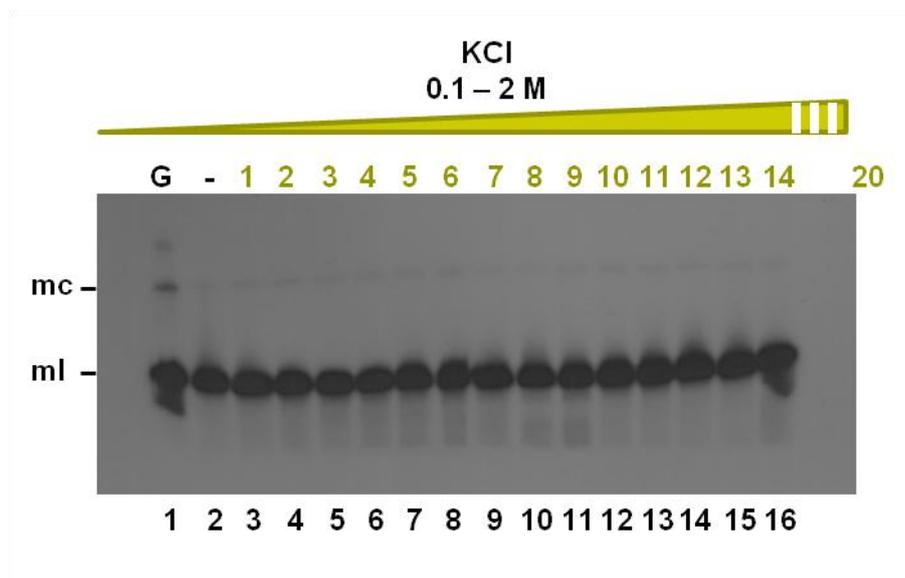
### 1.1 Identificación de una actividad RNA ligasa de tomate capaz de unir extremos 5'-P y 3'-OH

A partir de hojas jóvenes de plantas de tomate de aproximadamente 30 días de edad se llevó a cabo una extracción de proteínas en condiciones nativas. El extracto se clarificó por sucesivos pasos de centrifugación y se fraccionó por cromatografía de afinidad en columna de heparina con un gradiente lineal de 0.1 a 2 M de KCl. La posible actividad RNA ligasa en las 20 fracciones recogidas se ensayó empleando como sustrato el RNA monomérico lineal de polaridad positiva del PSTVd abierto entre las posiciones G95-G96 y con extremos 5'-P y 3'-OH. Los productos de la reacción se separaron por PAGE desnaturizante (8 M urea, tampón TBE) y se detectaron mediante hibridación *Northern* con una ribosonda específica de polaridad complementaria, observándose una actividad capaz de circularizar el RNA sustrato en las fracciones que eluyen de la columna de heparina a concentraciones de KCl en torno a 0.5 M (Fig. 14, carriles 6 a 9), con el pico de elución localizado en la fracción 5 (Fig. 14, carril 7). Como control de la ligación del sustrato en éste y otros experimentos se empleó la T4 RNA ligasa 1, que une específicamente RNAs monocatenarios con extremos 5'-P y 3'-OH (Fig. 14, carril 1).



**Figura 14.- Detección de una actividad RNA ligasa de tomate capaz de unir extremos 5'-P y 3'-OH del PSTVd.** La actividad RNA ligasa en las 20 fracciones recogidas de la columna de heparina se ensayó empleando como sustrato el RNA monomérico lineal de polaridad positiva del PSTVd abierto entre las posiciones G95-G96 y con extremos 5'-P y 3'-OH. Los productos de la reacción se separaron por PAGE desnaturizante y se detectaron por hibridación *Northern*. En la figura se muestra el análisis de los productos generados por las primeras 14 fracciones eluidas de la columna (en verde) con concentraciones crecientes de KCl (indicadas con un triángulo en la parte superior). (1) Control positivo empleando la T4 RNA ligasa 1; (2) control negativo sin proteína; (3-16) fracciones de la cromatografía (en verde). Las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del PSTVd se indican a la izquierda.

Se realizó también un ensayo control con las mismas fracciones de la columna empleando como sustrato el mismo RNA monomérico lineal de polaridad positiva del PSTVd abierto entre las posiciones G95-G96 pero con extremos 5'-OH y 2',3'>P. Este sustrato se generó por transcripción y autocorte *in vitro* de una versión modificada del PSTVd con dos ribozimas en los extremos. En este caso no se observó producción alguna del RNA circular, aparte de una pequeña cantidad que se observa en todos los carriles incluyendo también el correspondiente a la ligación en ausencia de proteína (Fig. 15, carriles 2 a 16). Esta ligación probablemente resulta de la autoligación típica de esta clase de RNA con extremos 5'-OH y 2',3'>P en presencia de Mg<sup>2+</sup> (Côte y Perreault, 1997). Sin embargo, este mismo RNA sí que fue circularizado por un extracto comercial de germen de trigo que contiene la tRNA ligasa (Fig. 15, carril 1) (Makino *et al.*, 2005).



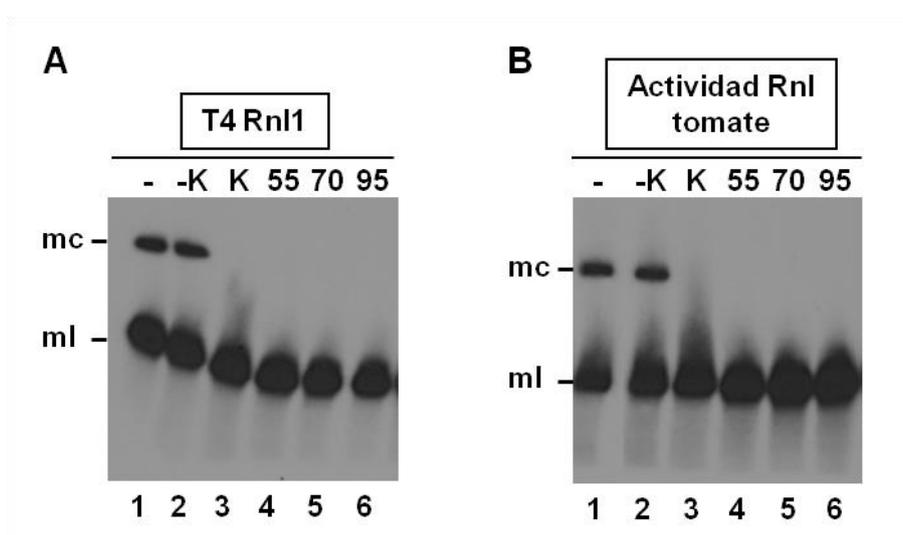
**Figura 15.- Ensayo de la actividad tRNA ligasa de tomate.** La actividad enzimática de las 20 fracciones recogidas de la columna de heparina se ensayó empleando como sustrato el RNA monomérico lineal de polaridad positiva del PSTVd abierto entre las posiciones G95-G96 y con extremos 5'-OH y 2',3'>P. Los productos de la reacción se analizaron por PAGE desnaturalizante e hibridación *Northern*. En la figura se muestra el análisis de los productos generados por las primeras 14 fracciones eluidas de la columna (en verde) con concentraciones crecientes de KCl (indicadas con un triángulo en la parte superior). (1) Control positivo empleando una preparación comercial de la tRNA ligasa de germen de trigo; (2) control negativo sin proteína; (3-16) fracciones de la cromatografía (en verde). Las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del PSTVd se indican a la izquierda.

Estos resultados indican la existencia en tomate de una actividad RNA ligasa no descrita hasta el momento y diferente de la tRNA ligasa, capaz de circularizar el RNA del PSTVd ensayado con extremos 5'-P y 3'-OH.

## 1.2 Caracterización de la actividad RNA ligasa de tomate

### 1.2.1 Degradación proteolítica y desnaturalización térmica de la actividad enzimática

En primer lugar, se confirmó que la nueva actividad RNA ligasa detectada residía en una proteína de tomate, para lo que una alícuota de la fracción de la columna de heparina con máxima actividad (fracción 5) se sometió a una digestión con proteinasa K y a tres tratamientos térmicos desnaturalizantes (55, 70 y 95°C, durante 15 min). Tras estos tratamientos se ensayó la ligación del ml (+) del PSTVd abierto en las posiciones G95-G96 y con extremos 5'-P y 3'-OH, observándose la inactivación total de la actividad en todos los casos (Fig. 16B, carriles 3 a 6). Como control, estos tratamientos se realizaron también con la T4 RNA ligasa 1 comercial (Fig. 16A, carriles 3 a 6).



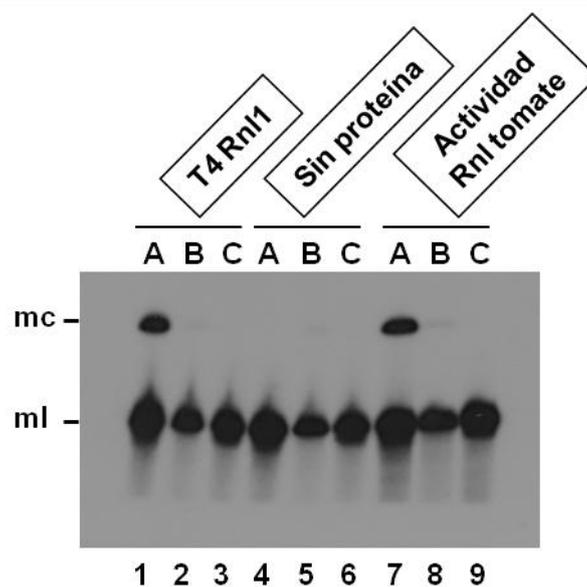
**Figura 16.- Inactivación de la actividad RNA ligasa de tomate por proteólisis y desnaturalización térmica.** Análisis por PAGE desnaturalizante e hibridación *Northern* de los productos resultantes de la ligación catalizada por (A) la T4 RNA ligasa 1, y (B) la actividad RNA ligasa (Rnl) de tomate de la fracción más activa de la columna de heparina pretratada 15 min con proteinasa K y SDS, o preincubada 15 min a tres temperaturas. (1) Control sin tratamiento; (2) control en tampón sin proteinasa K y con SDS; (3) pretratamiento con proteinasa K; (4 a 6) pretratamientos a 55, 70 y 95°C. Las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del PSTVd se indican a la izquierda de cada panel.

### 1.2.2 Clonación y secuenciación del producto ligado

Para descartar que el enlace generado por la actividad RNA ligasa de tomate fuera un enlace anómalo diferente del enlace típico 3'-5', que es el único existente en los viroides nucleares y el que generan la mayoría de las RNA ligasas conocidas, el producto de la ligación se amplificó por RT-PCR. Las transcriptasas inversas detienen la síntesis del cDNA cuando encuentran un enlace anómalo en el molde de RNA (Lorsch *et al.*, 1995). Por esta razón, si tal enlace existiera en el producto generado por la actividad RNA ligasa de tomate, la transcriptasa inversa sería incapaz de amplificarlo en su totalidad, mientras que sí lo haría al emplear como molde el producto generado por la T4 RNA ligasa 1 que sólo contiene enlaces 3'-5'. Con este fin se ensayó la ligación del ml (+) del PSTVd abierto en la posición G95-G96, y con extremos 5'-P y 3'-OH, tanto con la fracción más activa de tomate como con la T4 RNA ligasa 1, que sirvió de control. Los productos circulares de la reacción se separaron por PAGE desnaturalizante (8 M urea, tampón TBE), se eluyeron, y retrotranscribieron con el cebador C2 que hibrida en la hebra inferior de la CCR del PSTVd, fuera de la región donde ocurre la ligación (la hebra superior de la CCR) (ver Fig. 2A). El cDNA se amplificó posteriormente por PCR con los cebadores adyacentes y divergentes C1 y C2 fosforilados, y el producto se separó por PAGE en tampón TAE. Tanto en la ligación con la T4 RNA ligasa 1 como con la fracción de tomate, se obtuvo una banda de aproximadamente 360 pb en consonancia con la amplificación del producto circular del PSTVd de longitud completa (359 nt). El rendimiento de la reacción de RT-PCR en ambos casos fue similar, lo que sugiere la ausencia de un enlace anómalo en el RNA molde. Finalmente, estos fragmentos se clonaron en el vector desfosforilado pUC18 (Norrander *et al.*, 1983), y se secuenciaron, obteniéndose la secuencia completa del PSTVd en ambos casos, lo que pone de manifiesto que se trata de un enlace típico 3',5'-fosfodiéster entre los nucleótidos G96 y G95, respectivamente.

### 1.2.3 Extremos requeridos por la actividad RNA ligasa de tomate

La especificidad de los extremos del RNA sustrato requeridos por la actividad RNA ligasa de tomate se confirmó comparando la actividad de ligación de la fracción de tomate con máxima actividad ligasa (fracción 5) con la de la T4 RNA ligasa 1, empleando como sustrato el ml (+) del PSTVd abierto entre las posiciones G95-G96 con diferentes extremos. Ambas actividades ligasa circularizaron eficientemente el sustrato con extremos 5'-P y 3'-OH (Fig. 17, carriles 1 y 7), pero fueron inactivas sobre sustratos con extremos 5'-OH y 2',3'>P (Fig. 17, carriles 2 y 8), o 5'-OH y 3'-OH (Fig. 17, carriles 3 y 9).

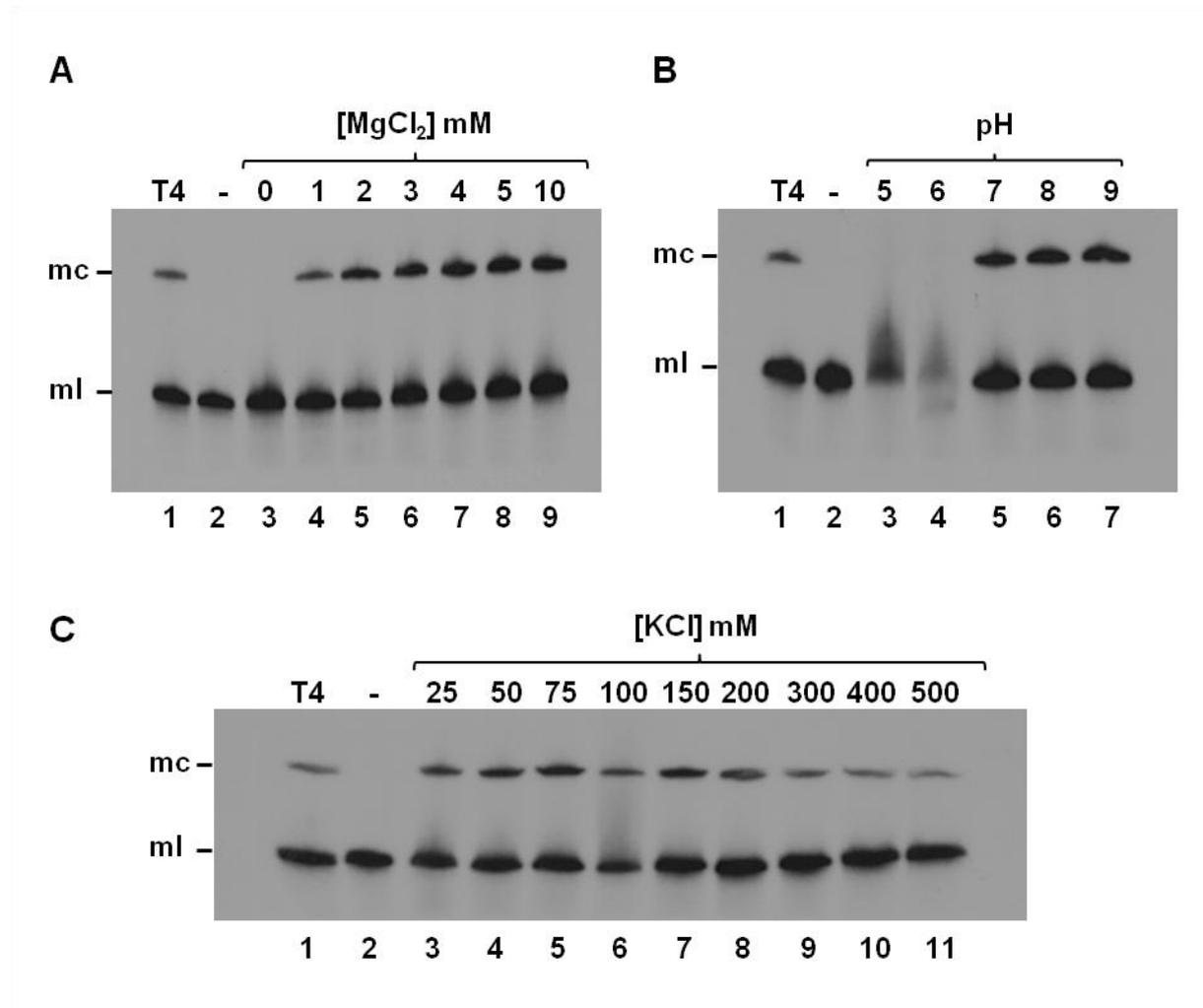


**Figura 17.- Extremos requeridos por la actividad RNA ligasa de tomate.** Análisis por PAGE desnaturalizante e hibridación *Northern* de los productos de la reacción catalizada por la T4 RNA ligasa 1 y la actividad RNA ligasa de tomate, empleando como sustrato el RNA monomérico lineal de polaridad positiva del PSTVd abierto entre las posiciones G95-G96 y con extremos (A) 5'-P y 3'-OH, (B) 5'-OH y 2',3'>P y (C) 5'-OH y 3'-OH. (1 a 3) Control positivo con la T4 RNA ligasa 1; (4 a 6) control negativo en ausencia de proteína; (7 a 9) productos generados por la actividad RNA ligasa de tomate. Las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del PSTVd se indican a la izquierda.

#### 1.2.4 Condiciones óptimas de ligación: efecto del $MgCl_2$ , el pH y la fuerza iónica en la actividad RNA ligasa de tomate

A continuación se dializó una alícuota de la fracción de la columna de heparina con máxima actividad RNA ligasa (fracción 5) frente a un tampón de baja fuerza iónica similar al de extracción pero sin  $Mg^{2+}$  [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1% Nonidet P40], y se determinaron las condiciones óptimas de reacción de la actividad RNA ligasa de tomate. Dado que la mayoría de ligasas conocidas requieren un catión divalente, generalmente  $Mg^{2+}$ , se ensayó la actividad de ligación en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  (1, 2, 3, 4, 5 y 10 mM). La enzima de tomate sólo presentó actividad en presencia de  $MgCl_2$ , con una concentración óptima en torno a 5 mM (Fig. 18A, comparar carril 3 con carriles 4 a 9). En lo referente al pH de reacción óptimo, la enzima de tomate se mostró activa en un intervalo de pH fisiológico entre 7 y 9 (Fig. 18B, carriles 5 a 7). En este experimento los sustratos a pH 5 y 6 se degradaron, posiblemente porque resultan óptimos para muchas RNasas, por lo que no puede descartarse actividad RNA ligasa a estos pHs. Por último, la fracción de tomate se ensayó también a concentraciones crecientes de KCl (entre 25 y 500 mM) (Fig. 18C), observándose que, si bien la RNA ligasa era activa en este intervalo, la máxima actividad fue a 75 mM KCl (Fig. 18C, carril 5) presentándose una inhibición parcial a partir de 300 mM (Fig. 18C, carriles 9 a 11).

Tomando en consideración todos estos resultados, en los siguientes experimentos se ensayó la actividad RNA ligasa en un tampón 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 75 mM KCl, 5 mM  $MgCl_2$  y 5 mM DTT.

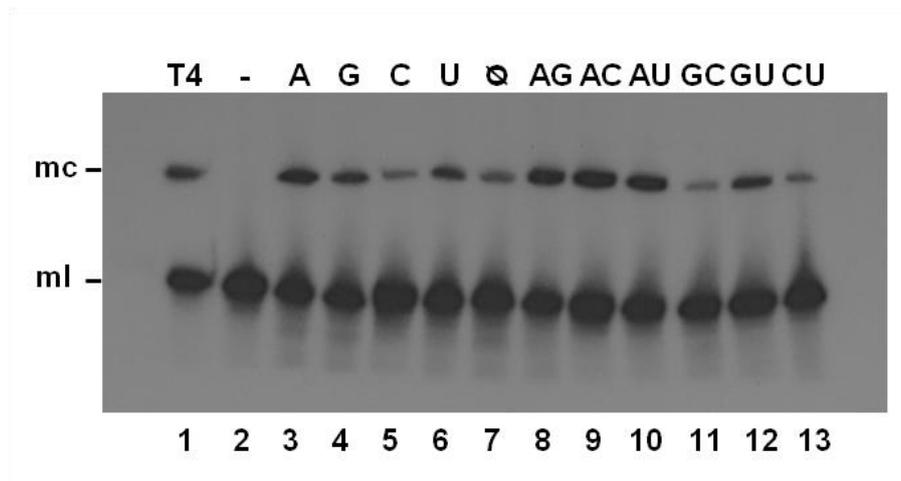


**Figura 18.- Condiciones óptimas de la reacción catalizada por la actividad RNA ligasa de tomate.** Análisis por PAGE desnaturalizante e hibridación *Northern* de los productos resultantes de la ligación catalizada por la enzima de tomate en diferentes condiciones. (A) Efecto del MgCl<sub>2</sub>. (1) Control positivo con la T4 RNA ligasa 1; (2) control negativo en ausencia de proteína; (3 a 9) reacciones catalizadas por la actividad RNA ligasa de tomate en ausencia (3) y en presencia de concentraciones crecientes de MgCl<sub>2</sub> indicadas en la parte superior del panel (4 a 9). (B) Efecto del pH. (1) Control positivo con la T4 RNA ligasa 1; (2) control negativo en ausencia de proteína; (3 a 7) reacciones catalizadas por la actividad RNA ligasa de tomate a pH 5, 6, 7, 8 y 9, respectivamente. (C) Efecto de la concentración de KCl. (1) Control positivo con la T4 RNA ligasa 1; (2) control negativo en ausencia de proteína; (3 a 11) reacciones catalizadas por la actividad RNA ligasa de tomate en presencia de concentraciones crecientes de KCl indicadas en la parte superior del panel. Las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del PSTVd se indican a la izquierda de cada panel.

### 1.3 Requerimiento de ribonucleósidos trifosfato (NTPs) de la actividad RNA ligasa de tomate y cinética de la reacción

Las ligasas tanto de RNA como de DNA que unen extremos 5'-P y 3'-OH emplean una molécula de ATP como cofactor en la reacción de ligación. En una primera etapa, la enzima se adenila uniéndose covalentemente al AMP proveniente del ATP. Posteriormente la enzima transfiere este AMP al extremo 5' del ácido nucleico a circularizar, que finalmente sufre el ataque nucleofílico del extremo 3', liberándose el AMP y formándose el nuevo enlace.

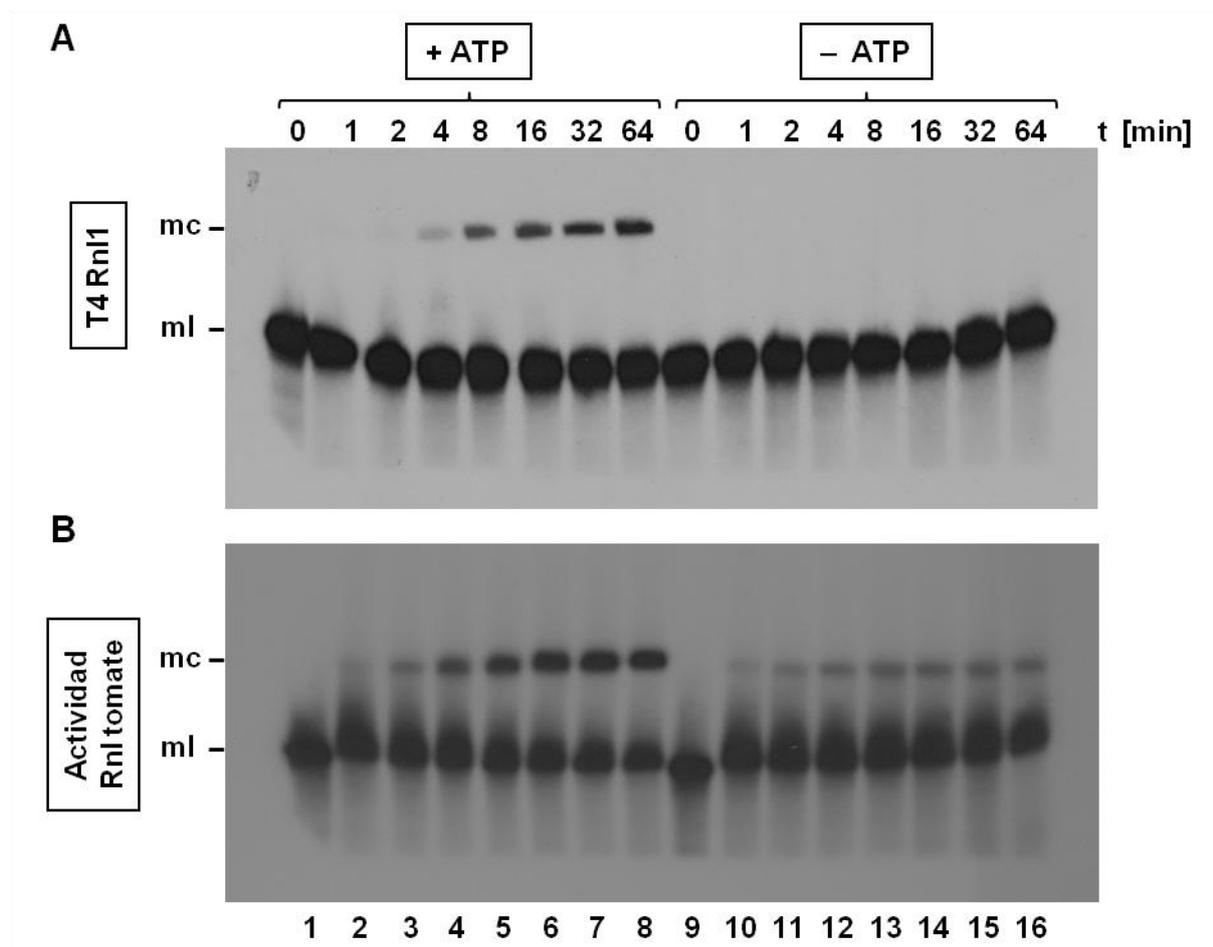
Para estudiar la dependencia de la nueva actividad RNA ligasa de tomate de algún cofactor nucleotídico, se ensayó su actividad enzimática empleando como sustrato el ml (+) del PSTVd abierto en la posición G95-G96 (con extremos 5'-P y 3'-OH) en presencia de ATP, GTP, CTP o UTP, así como de combinaciones de dos de ellos, y en ausencia de cualquiera de ellos.



**Figura 19.- Requerimiento de ribonucleósido trifosfato de la actividad RNA ligasa de tomate.** Análisis por PAGE desnaturalizante e hibridación *Northern* de los productos resultantes de la ligación catalizada por la enzima de tomate en 1 mM de ATP (3), GTP (4), CTP (5), UTP (6), en ausencia de nucleósidos trifosfato (7), y en presencia de combinaciones de dos nucleósidos trifosfato (8 a 13). (1) Control positivo con la T4 RNA ligasa 1; (2) control negativo en ausencia de proteína. Las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del PSTVd se indican a la izquierda.

La máxima actividad se observó con ATP (Fig. 19, carril 3), aunque también se observó actividad con GTP y UTP (Fig. 19, carriles 4 y 6) y algo menos con CTP (Fig. 19, carril 5). Cabe destacar que también se observó ligación en ausencia de nucleósidos trifosfato (Fig. 19, carril 7). Respecto a las combinaciones de dos nucleósidos trifosfato, la actividad máxima se detectó en presencia de ATP (Fig. 19, carriles 8 a 10) y la mínima en presencia de CTP (Fig. 19, carriles 11 y 13). Este resultado indica una mayor actividad RNA ligasa de tomate en presencia de ATP respecto a otros NTPs (posiblemente por ser requerido para la adenilación de la enzima), y un efecto inhibitorio del CTP. También sugiere que al menos parte de la enzima se purifica adenilada, con lo que en ausencia de NTPs es capaz de llevar a cabo la reacción de ligación con una eficiencia limitada por la cantidad de moléculas adeniladas. En presencia de ATP, las moléculas de enzima que han transferido el AMP al sustrato para su ligación presumiblemente se adenilan de nuevo aumentando de esta manera la eficiencia de la reacción.

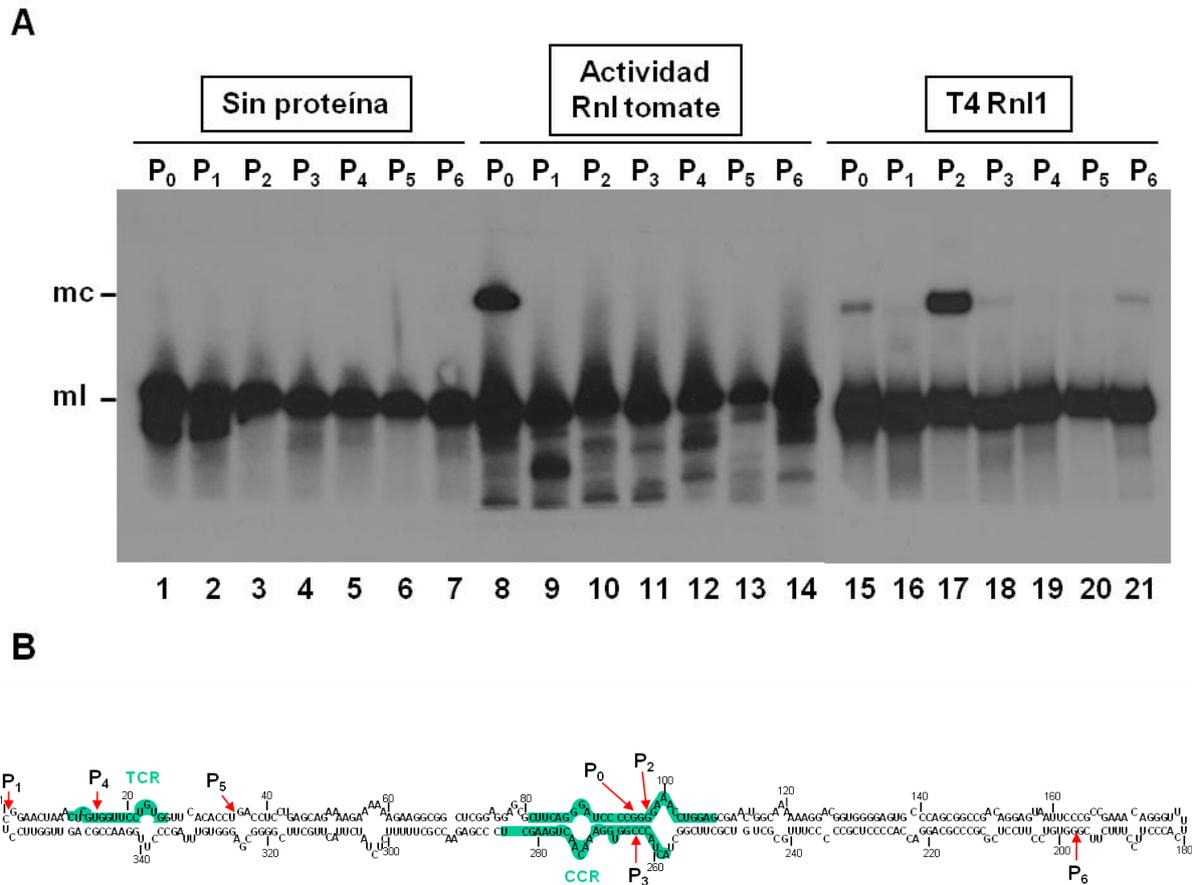
Esta última hipótesis se confirmó mediante el análisis de la cinética de la ligación en presencia y ausencia de 1 mM ATP empleando como sustrato el ml (+) del PSTVd abierto en la posición G95-G96 y con extremos 5'-P y 3'-OH. En presencia de 1 mM ATP la cantidad de producto circular formado aumentó con el tiempo (hasta más de 1 h) de manera consistente con una cinética enzimática, mientras que en ausencia de ATP la reacción alcanzó su máximo a tiempos cortos (2-4 minutos) y a partir de entonces no progresó (Fig. 20B, comparar carriles 1 a 8 con carriles 9 a 16). Estos resultados sostienen la hipótesis de que la enzima se purifica total o parcialmente adenilada, por lo que en ausencia de ATP sólo cataliza un ciclo de ligación. En presencia de ATP, al adenilarse la enzima, puede catalizar sucesivos ciclos de ligación, incrementándose así la cantidad de producto formado con el tiempo. Por su parte, la T4 RNA ligasa 1 se mostró completamente inactiva en ausencia de ATP (Fig. 20A, comparar carriles 1 a 8 con carriles 9 a 16), sugiriendo que esta enzima comercial se purifica en forma no adenilada.



**Figura 20.-** Cinética de la reacción catalizada por la actividad RNA ligasa de tomate. Análisis por PAGE desnaturalizante e hibridación *Northern* de los productos resultantes de la ligación catalizada por (A) la T4 RNA ligasa 1 y (B) la actividad RNA ligasa de tomate en presencia (carriles 1 a 8) y en ausencia (carriles 9 a 16) de 1 mM ATP a diferentes tiempos que se indican en la parte superior de la figura. Las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del PSTVd se indican a la izquierda de cada panel.

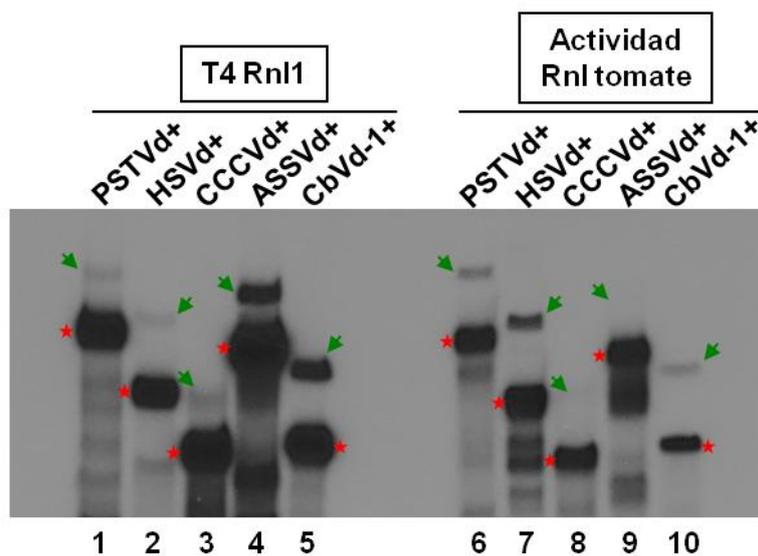
#### **1.4 Especificidad de sustrato de la nueva actividad RNA ligasa de tomate**

Con el fin de estudiar la posible implicación de la nueva actividad RNA ligasa de tomate en el ciclo replicativo de los viroides nucleares, se analizó la especificidad de sustrato respecto a la posición de apertura del RNA monomérico lineal del PSTVd, y respecto a otros viroides nucleares. De manera más específica, se comparó la ligación del monómero lineal de polaridad positiva del PSTVd con extremos 5'-P y 3'-OH (abierto entre las posiciones G95-G96) con la ligación de otros seis monómeros lineales de polaridad positiva del PSTVd con idénticos grupos terminales pero abiertos en diferentes posiciones: (1) C1-G2, (2) G97-G98, (3) C264-G265, (4) U15-G16, (5) U35-G36 y (6) G197-G198. Algunas de estas posiciones corresponden a bucles, mientras que otras corresponden a regiones de doble cadena en la estructura secundaria de mínima energía libre del PSTVd (Fig. 21B). Tan sólo la forma fisiológicamente relevante del PSTVd, es decir, el RNA monomérico lineal abierto entre las posiciones G95-G96, fue circularizada eficientemente por la actividad RNA ligasa de tomate (Fig. 21A, carril 8). Por el contrario, en el experimento control con la T4 RNA ligasa 1, ésta ligó en mayor o menor medida casi todos los sustratos, mostrando una mayor eficiencia con el sustrato abierto entre las posiciones G97-G98 (Fig. 21A, carril 17) y una menor eficiencia con los sustratos abiertos en las posiciones G95-G96, C264-G265, U35-G36 y G197-G198 (Figura 21A, carriles 15, 18, 20 y 21).



**Figura 21.- Especificidad de sustrato de la actividad RNA ligasa de tomate.** (A) Análisis por PAGE desnaturante e hibridación *Northern* de los productos resultantes de la ligación catalizada por la enzima de tomate (carriles 8 a 14) y por la T4 RNA ligasa 1 (carriles 15 a 21) empleando como sustrato el monómero lineal de polaridad positiva del PSTVd con extremos 5'-P y 3'-OH abierto en diferentes posiciones (P<sub>0</sub> a P<sub>6</sub>). Carriles 1 a 7 control negativo sin proteína. Las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del PSTVd se indican a la izquierda de cada panel. (B) Esquema de la estructura secundaria de mínima energía libre del PSTVd donde se indican las posiciones por las que están abiertos los diferentes sustratos: P<sub>0</sub> (G95-G96), P<sub>1</sub> (C1-G2), P<sub>2</sub> (G97-G98), P<sub>3</sub> (C264-G265), P<sub>4</sub> (U15-G16), P<sub>5</sub> (U35-G36) y P<sub>6</sub> (G197-G198). La región terminal conservada (TCR) y la región central conservada (CCR) se muestran en verde.

Al ensayar la ligación de los RNAs monoméricos lineales de polaridad positiva de los miembros representativos de los cinco géneros de la familia *Pospiviroidae* (que además del PSTVd incluyen al HSVd, CCCVd, ASSVd, y CbVd-1) todos con extremos 5'-P y 3'-OH (marcados con  $^{32}\text{P}$  en 5', ver apartado 11.1 de "Materiales y métodos") y abiertos por el sitio de procesamiento *in vivo* determinado o predicho (Gas *et al.*, 2007), la RNA ligasa de tomate catalizó la circularización de todos ellos con una eficiencia variable (Fig. 22, carriles 6 a 10): más eficientemente los monómeros lineales del PSTVd, el HSVd y el CbVd-1 (Fig. 22, carriles 6, 7 y 10), y con menos eficiencia en el caso del CCCVd y el ASSVd (Fig. 22, carriles 8 y 9). En el experimento control se observó que la T4 RNA ligasa 1 también catalizó la circularización de todos los viroides, si bien con una eficiencia diferente a la de tomate: menor con los monómeros lineales del PSTVd, HSVd y CCCVd (Fig. 22, carriles 1 a 3) y sensiblemente mayor con los del ASSVd y CbVd-1 (Fig. 22, carriles 4 y 5).

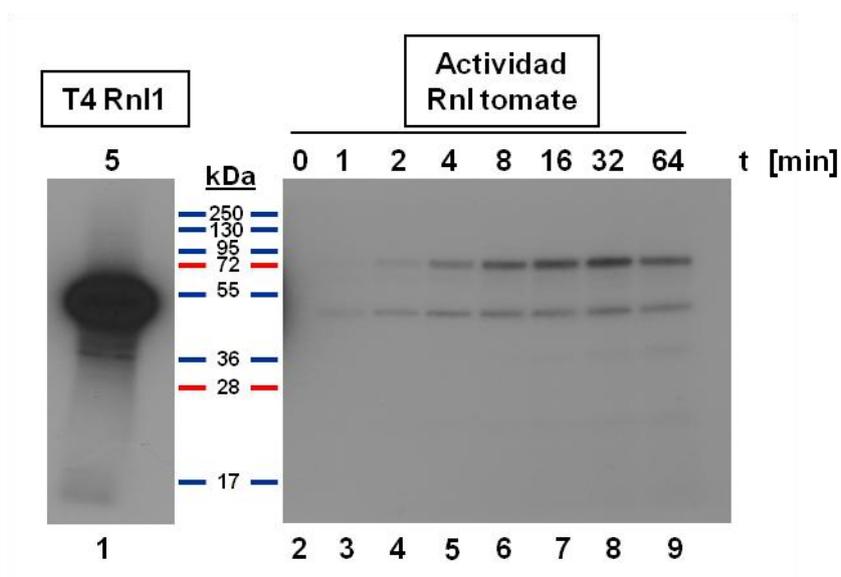


**Figura 22.- Actividad de la RNA ligasa de tomate sobre miembros representativos de la familia *Pospiviroidae*.** Análisis por PAGE desnaturalizante y autorradiografía de la eficiencia de ligación de la T4 RNA ligasa 1 (carriles 1 a 5) y de la actividad RNA ligasa de tomate (carriles 6 a 10) empleando como sustrato los RNAs monoméricos lineales de polaridad positiva de los miembros representativos de los cinco géneros de la familia *Pospiviroidae* (PSTVd, HSVd, CCCVd, ASSVd, y CbVd-1) todos ellos con extremos 5'-P y 3'-OH y abiertos por el sitio de procesamiento *in vivo* determinado o predicho (Gas *et al.*, 2007). La banda superior (indicada con una flecha verde) corresponde en cada caso al monómero circular y la inmediatamente inferior (indicada con una estrella roja), al monómero lineal. Las bandas que aparecen por debajo de esta última corresponden a productos de degradación.

### 1.5 Actividad adeniltransferasa de la RNA ligasa de tomate

El mecanismo de reacción típico de las ligasas de DNA y RNA incluye dos etapas en el curso de la cuales el AMP derivado del cofactor ATP se une covalentemente primero a la enzima y luego al extremo 5' del ácido nucleico sustrato (Pascal, 2008). Para determinar si la nueva actividad RNA ligasa de tomate también sigue este mecanismo de reacción, se abordó la detección de ambos intermediarios de la reacción, es decir, la enzima adenilada y el sustrato adenilado.

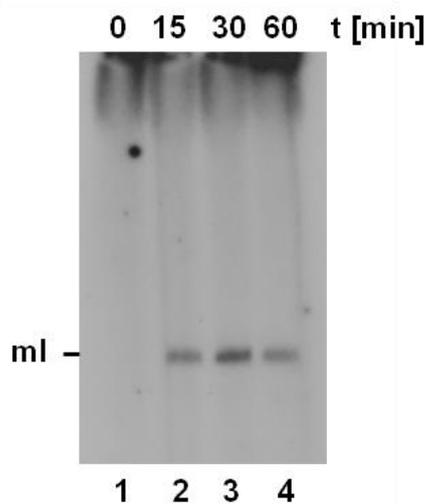
Con este fin se llevó a cabo la reacción de ligación en presencia de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP y se tomaron alícuotas a distintos tiempos antes de detener la reacción con tampón Laemmli e incubación a 95°C durante 2 min. Como control, se llevó a cabo la reacción de ligación con la T4 RNA ligasa 1. Las proteínas adeniladas se analizaron por PAGE-SDS y se revelaron por autorradiografía.



**Figura 23.- Detección del intermediario proteico adenilado en la reacción catalizada por la actividad RNA ligasa de tomate.** La ligación se llevó a cabo en presencia de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP y las proteínas adeniladas se analizaron por PAGE-SDS (al 12.5%) y autorradiografía. (1) Reacción control con la T4 RNA ligasa; (2 a 9) alícuotas de la reacción de ligación catalizada por la enzima de tomate a diferentes tiempos (especificados en la parte superior del panel). La masa molecular de las proteínas marcadoras (en kDa) se indica entre los dos paneles.

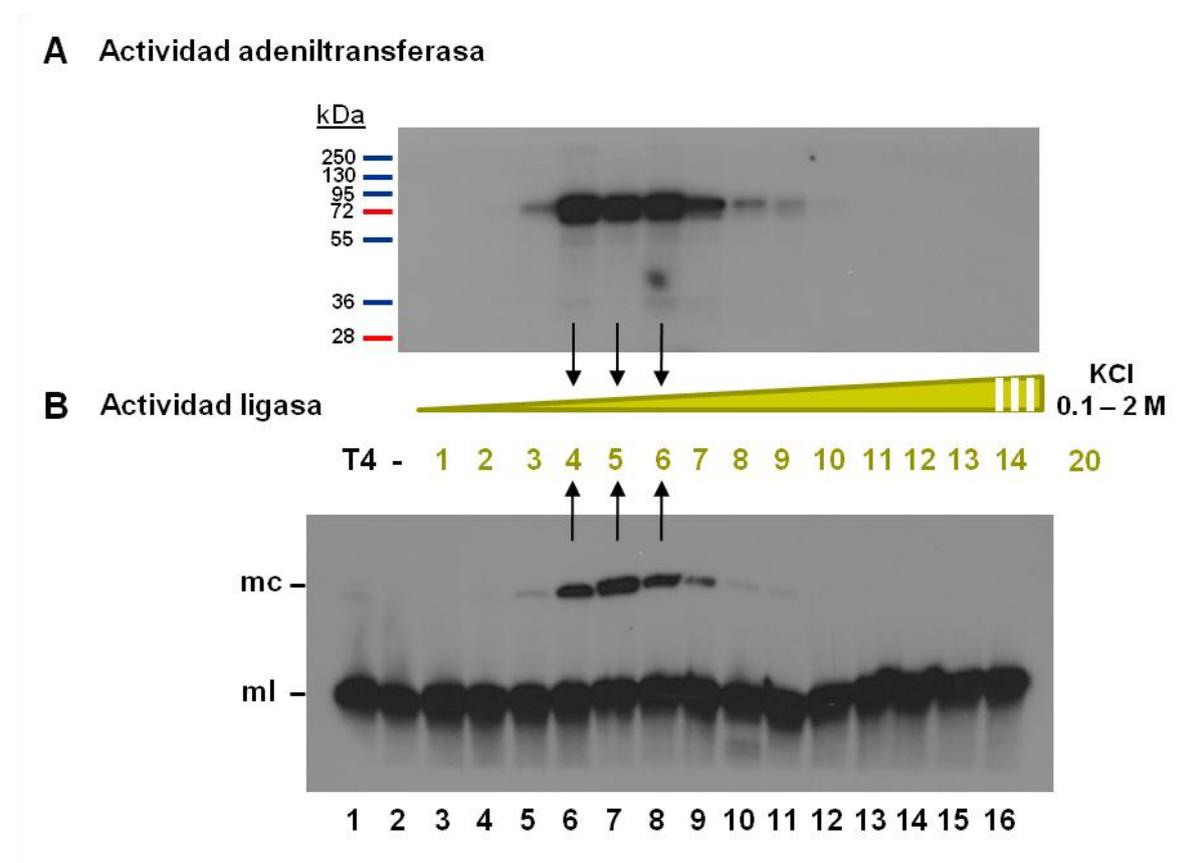
La banda correspondiente a la T4 RNA ligasa 1 (43.5 kDa) adenilada se detectó ligeramente por debajo del marcador de 55 kDa (Fig. 23, carril 1). En el ensayo con la RNA ligasa de tomate se observaron varias bandas, correspondiendo la más intensa a una proteína de aproximadamente 90 kDa (Fig. 23, carriles 2 a 9). Las bandas inferiores podrían estar generadas por productos de degradación de la proteína de mayor tamaño o por otras proteínas adeniladas.

También se realizó una ligación en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  de la que se tomaron alícuotas a los 15, 30 y 60 minutos, parándose esta vez la reacción por digestión con proteinasa K. Los productos de la reacción se separaron por PAGE desnaturalizante y se revelaron por autorradiografía, detectándose una marca radiactiva en la posición correspondiente al RNA monomérico lineal del PSTVd de polaridad positiva empleado como sustrato (Fig. 24).



**Figura 24.- Detección del RNA intermediario adenilado en la reacción catalizada por la actividad RNA ligasa de tomate.** La reacción de ligación se llevó a cabo en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  tomándose alícuotas a diferentes tiempos (carriles 1 a 4). Los productos se analizaron por PAGE (5%) desnaturalizante y autorradiografía. La posición del RNA monomérico lineal (ml) del PSTVd se indica a la izquierda.

Como confirmación de que esta actividad adeniltransferasa residía en la misma proteína que la actividad RNA ligasa, se llevó a cabo la ligación con diferentes fracciones eluidas de la columna de heparina por duplicado: en presencia de ATP marcado radiactivamente y sin marcar. De la primera reacción se analizaron las proteínas adeniladas por PAGE-SDS y autorradiografía y de la segunda se examinó el producto de la ligación por PAGE desnaturizante e hibridación *Northern*. De esta manera se observó una estrecha correlación entre el máximo de la actividad RNA ligasa (Fig. 25B, carriles 6 a 8) y el máximo de la actividad de adenilación (correspondiente a una proteína con un tamaño aparente de 90 kDa (Fig. 25A, carriles 5 a 7).



**Figura 25.- Correlación entre la actividad adeniltransferasa y RNA ligasa en las diferentes fracciones cromatográficas.** (A) La reacción se llevó a cabo en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  y las proteínas adeniladas presentes en las diferentes fracciones (1 a 14, en verde) se analizaron por PAGE-SDS (12.5%) y autorradiografía. (B) Análisis de la actividad RNA ligasa en las fracciones 1 a 14 eluidas de la columna de heparina con concentraciones crecientes de KCl (indicadas con un triángulo en la parte superior). Los productos de la reacción se separaron por PAGE desnaturizante y se detectaron por hibridación *Northern*. (1) Control positivo empleando la T4 RNA ligasa 1; (2) control negativo sin proteína; (3-14) fracciones de la cromatografía. La masa molecular de los marcadores (en kDa) se indica a la izquierda en (A) y las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del PSTVd se indican a la izquierda en (B).

En conjunto, estos resultados indican la existencia de los dos intermediarios de la reacción, enzima-AMP y AMP-RNA, y que las correspondientes actividades enzimáticas presenta unas características físico-químicas que son congruentes con que ambas estén presentes en la misma molécula de proteína. Consecuentemente, la nueva actividad RNA ligasa de tomate sigue el mecanismo clásico de las nucleotidiltransferasas covalentes, que incluyen a las ligasas de DNA y RNA.

### **1.6 Identificación de la proteína responsable de la actividad RNA ligasa de tomate por espectrometría de masas**

Una vez establecida la masa molecular aproximada de la proteína responsable de la nueva actividad RNA ligasa de tomate, se realizó un fraccionamiento a gran escala de proteínas de tomate (a partir de 75 g de tejido) por cromatografía en columna de heparina. El análisis de la actividad RNA ligasa de las 20 fracciones eluidas mostró el máximo de actividad en las fracciones 4 y 5. Las proteínas contenidas en estas fracciones se precipitaron con ácido tricloroacético en acetona y se resuspendieron en tampón para su posterior separación en un gel PAGE-SDS preparativo del 10% del que se cortó el fragmento comprendido entre las masas moleculares de 72 a 95 kDa para su análisis por espectrometría de masas (LC-MS/MS para mezclas complejas de más de 50 proteínas). Entre todos los péptidos identificados y asignados con significatividad estadística a diferentes proteínas de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Fig. 26), dos de ellos (Fig. 27) correspondían significativamente a la DNA ligasa 1 de *Arabidopsis thaliana*. Dado que se trata de una proteína con actividad polinucleótido ligasa que reconoce extremos 5'-P y 3'-OH y que requiere ATP y Mg<sup>2+</sup> como cofactores (Taylor *et al.*, 1998), se consideró que la misma podría catalizar la circularización del ml (+) del PSTVd, abierto entre las posiciones G95-G96 y con extremos 5'-P y 3'-OH, mediante una actividad RNA ligasa no descrita hasta el momento.

<a href="#">gii1707998</a>	RecName: Full=Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial; Short=SHMT;
<a href="#">gii1346155</a>	RecName: Full=Serine hydroxymethyltransferase 1, mitochondrial; Short=SHM
<a href="#">gii1781348</a>	homologous to plastidic aldolases [Solanum tuberosum]
<a href="#">gii31126793</a>	putative glycine hydroxymethyltransferase [Oryza sativa Japonica Group]
<a href="#">gii15809972</a>	AT4g37930/F20D10_50 [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">gii61969078</a>	putative ferredoxin-NADP reductase [Solanum peruvianum]
<a href="#">gii3721540</a>	sulfite reductase [Nicotiana tabacum]
<a href="#">gii462187</a>	RecName: Full=Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial; Short=SHMT;
<a href="#">gii3913651</a>	RecName: Full=Ferredoxin--NADP reductase, leaf-type isozyme, chloroplastic;
<a href="#">gii3687301</a>	subtilisin-like protease [Solanum lycopersicum]
<a href="#">gii120661</a>	RecName: Full=Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic; AltName:
<a href="#">gii4827253</a>	plastidic aldolase [Nicotiana paniculata]
<a href="#">gii169039</a>	aldolase [Pisum sativum]
<a href="#">gii18420348</a>	fructose-bisphosphate aldolase, putative [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">gii18072795</a>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Capsicum annuum]
<a href="#">gii145203152</a>	heat shock protein 70 [Cyclamen persicum]
<a href="#">gii108864705</a>	Heat shock cognate 70 kDa protein, putative, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<a href="#">gii26453355</a>	mRNA binding protein precursor [Solanum lycopersicum]
<a href="#">gii30025966</a>	heat shock protein 70 [Nicotiana tabacum]
<a href="#">gii23477636</a>	Grp94 [Xerophyta viscosa]
<a href="#">gii6899972</a>	chloroplast ferredoxin-NADP+ oxidoreductase precursor [Capsicum annuum]
<a href="#">gii4827251</a>	plastidic aldolase NPALDP1 [Nicotiana paniculata]
<a href="#">gii225427768</a>	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
<a href="#">gii18072799</a>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Capsicum annuum]
<a href="#">gii17017273</a>	serine hydroxymethyltransferase [Zea mays]
<a href="#">gii8919178</a>	alpha-glucosidase [Solanum tuberosum]
<a href="#">gii77540212</a>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit [Glycine max]
<a href="#">gii462013</a>	RecName: Full=Endoplasmic homolog; AltName: Full=Glucose-regulated protein 94 homolog;
<a href="#">gii336390</a>	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase B subunit [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">gii56122688</a>	chloroplast latex aldolase-like protein [Manihot esculenta]
<a href="#">gii12658639</a>	ferredoxin:sulfite reductase precursor [Glycine max]
<a href="#">gii147865450</a>	hypothetical protein [Vitis vinifera]
<a href="#">gii108705994</a>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplast precursor, putative, expressed [Oryza sativa
<a href="#">gii4930123</a>	Chain A, Wild-Type Pea Fnr
<a href="#">gii3687303</a>	subtilisin-like protease [Solanum lycopersicum]
<a href="#">gii544242</a>	RecName: Full=Endoplasmic homolog; AltName: Full=Glucose-regulated
<a href="#">gii111162651</a>	chloroplast aldolase [Nicotiana attenuata]
<a href="#">gii20733</a>	unnamed protein product [Pisum sativum]
<a href="#">gii18252211</a>	aspartate--tRNA ligase - like protein [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">gii115446545</a>	Os02g0538000 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<a href="#">gii62320472</a>	putative protein [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">gii475600</a>	BiP isoform B [Glycine max]
<a href="#">gii3608173</a>	acid invertase [Solanum lycopersicum]
<a href="#">gii77745483</a>	unknown [Solanum tuberosum]
<a href="#">gii51989592</a>	PEN2-like protein [Solanum tuberosum]
<a href="#">gii115478034</a>	Os09g0127800 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<a href="#">gii147838425</a>	hypothetical protein [Vitis vinifera]
<a href="#">gii15226538</a>	coatamer protein complex, subunit alpha, putative [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">gii67043517</a>	subtilisin-like serine protease [Solanum tuberosum]
<a href="#">gii147855642</a>	hypothetical protein [Vitis vinifera]
<a href="#">gii1841704</a>	histidyl tRNA Synthetase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<a href="#">gii79677444</a>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Chara vulgaris]
<a href="#">gii37222955</a>	putative fructose-bisphosphate aldolase protein [Solanum tuberosum]
<a href="#">gii147770508</a>	hypothetical protein [Vitis vinifera]
<a href="#">gii40716077</a>	fructose-bisphosphate aldolase [Pandanus amaryllifolius]
<a href="#">gii13111324</a>	110 kDa 4SNc-Tudor domain protein [Pisum sativum]
<a href="#">gii218157</a>	cytoplasmic aldolase [Oryza sativa Japonica Group]

<a href="#">qii2765081</a>	g5bf [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii115488340</a>	Os12g0420200 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<a href="#">qii79677457</a>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Klebsormidium flaccidum]
<a href="#">qii32492578</a>	RNA binding protein Rp120 [Oryza sativa Japonica Group]
<a href="#">qii2493321</a>	RecName: Full=L-ascorbate oxidase; Short=Ascorbase; Short=ASO; Flags: Precursor
<a href="#">qii3047084</a>	similar to aminoacyl-tRNA synthetases [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii115434198</a>	Os01g0118000 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<a href="#">qii15236768</a>	fructose-bisphosphate aldolase, putative [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii71534902</a>	histidyl-tRNA synthetase [Medicago sativa]
<a href="#">qii22328958</a>	aspartyl-tRNA synthetase, putative / aspartate--tRNA ligase, putative [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii6728986</a>	putative histidyl tRNA synthetase [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii2341032</a>	EST gb ATTS0956 comes from this gene [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii110289257</a>	dehydration-responsive protein, putative, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<a href="#">qii225450527</a>	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
<a href="#">qii1359495</a>	DNA ligase [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii115438604</a>	Os01g0617500 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<a href="#">qii3913525</a>	RecName: Full=DNA polymerase delta catalytic subunit
<a href="#">qii2191162</a>	Similar to threonyl-tRNA synthetase; coded for by A. thaliana cDNA R65376 [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii108707116</a>	subtilisin proteinase, putative, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<a href="#">qii8843758</a>	ABC transporter-like [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii15221411</a>	PTAC2 (PLASTID TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE2) [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii3426038</a>	unknown protein [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii147786974</a>	hypothetical protein [Vitis vinifera]
<a href="#">qii3451071</a>	beta adaptin-like protein [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii84688912</a>	AGO4-2 [Nicotiana benthamiana]
<a href="#">qii9945085</a>	F5A9.21 [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii9294698</a>	unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii3695406</a>	similar to isoleucyl-tRNA synthetases [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii119150</a>	RecName: Full=Elongation factor 1-alpha; Short=EF-1-alpha
<a href="#">qii115529201</a>	isoflavone conjugate-specific beta-glucosidase [Glycine max]
<a href="#">qii3193299</a>	T14P8.19 [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii159486781</a>	gln-glu non-discriminatory tRNA synthetase [Chlamydomonas reinhardtii]
<a href="#">qii5918016</a>	myosin-like protein [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii5531937</a>	acetoacetyl CoA thiolase [Zea mays]
<a href="#">qii28201554</a>	hypothetical protein [Oryza sativa Japonica Group]
<a href="#">qii37932212</a>	pectin acetylesterase [Lactuca sativa]
<a href="#">qii34393513</a>	hypothetical protein [Oryza sativa Japonica Group]
<a href="#">qii28209456</a>	putative polyprotein [Oryza sativa Japonica Group]
<a href="#">qii29367425</a>	heat shock-related protein [Oryza sativa Japonica Group]
<a href="#">qii32488074</a>	OSJNBa0084A10.2 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<a href="#">qii145345433</a>	predicted protein [Ostreococcus lucimarinus CCE9901]
<a href="#">qii10129647</a>	putative protein [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii115450355</a>	Os03g0119300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<a href="#">qii147815446</a>	hypothetical protein [Vitis vinifera]
<a href="#">qii145348499</a>	predicted protein [Ostreococcus lucimarinus CCE9901]
<a href="#">qii115436430</a>	Os01g0348600 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
<a href="#">qii13435254</a>	putative ankyrin [Oryza sativa Japonica Group]
<a href="#">qii108773101</a>	hypothetical protein ScobCp071 [Scenedesmus obliquus]
<a href="#">qii147773688</a>	hypothetical protein [Vitis vinifera]
<a href="#">qii110739422</a>	hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]
<a href="#">qii116308918</a>	OSIGBa0131F24.2 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]
<a href="#">qii12322998</a>	unknown protein [Arabidopsis thaliana]

**Figura 26.- Proteínas identificadas significativamente en el fragmento del gel preparativo.** En azul se muestra el número de acceso en la base de datos del NCBI y a continuación una breve descripción. En rojo se marca la DNA ligasa 1 de *Arabidopsis thaliana* que fue identificada por similitud con dos de los péptidos.

Con la secuencia de la DNA ligasa 1 de *A. thaliana* se buscó en las bases de datos del NCBI la secuencia homóloga de tomate, tanto la nucleotídica como la aminoacídica, empleando los programas *nucleotide blast*, *protein blast*, *blastx* y *tblastn*. La búsqueda con el programa *tblastn* (que compara una secuencia aminoacídica con las secuencias nucleotídicas traducidas presentes en la base de datos) produjo el resultado más interesante: un clon de cDNA de tomate (AK247931), con un codón de iniciación y otro de terminación, mostrando una identidad del 66% con la secuencia de *A. thaliana* (Fig. 27). El alineamiento de la secuencia de tomate, traducida *in silico*, con las secuencias aminoacídicas (aparentemente completas) conocidas de la DNA ligasa 1 de diferentes especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (*A. thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinífera*, *Ricinus communis*, *Trifolium pratense*, *Oryza sativa* y *Sorghum bicolor*), mostró una alta similitud de secuencia, con regiones altamente conservadas entre especies (Fig. 28). La región C-terminal es la más conservada, pudiéndose localizar en ella los cinco motivos que definen a la superfamilia de las nucleotidiltransferasas covalentes (Fig. 28). Por lo tanto, la secuencia de tomate AK 247931 se consideró como la ortóloga a la DNA ligasa 1 y se procedió a su clonación.

*Solanum Lycopersicum* AK247931.1

cDNA

```

ataagttaaattcttcaaaacatcaatcatatgtatttatgagatacatagattatcgctcctcacttcttttctcatctcttatatttttaa
cgaaaatatatttagatgtatcgctactcgatataattgataataaaaaatgcatctccttcttccccgccactcgctcttatttcttccct
tcttctctttacacatttttttcttcttcaaaattga
atgttgtgtttgagttcatatcggtttcactcaactactcttctttacaatttctcctgtaaaccttcttcaatcttcttcttcttcttcaaa
gaagaagcagtttaactctcaaaaccccttcttctctgtaaaccctaattcaaatcaagaaccatgtctgattctctcctgctcctcctc
gctctgctgtttgctgtacttatggcaaatccaagaagaaaacaacctcctcctcacctaagaacgtaaaacccagatgttgaaacttca
agtaaaagccctgttgttaatacaagattcagtttgaagccaattaaggacaccgatttgggtcaatgagtcgaaaagtgaggagtgtggagg
gaagaaacggagtcaagactcaacttgaagccaattgaggacaccatttgggtcaatgagtcgaaaagtgaggagtgtgtgtggaagaaac
ggaaaatgatttagccagatgagagcattgtggaataaagaaaaagctgcgaactttagtccaagaaaggctgtgtattggggagatggt
cagagagtgcggttcatgtttgtagttaaggcgtttgatgcaatttcaaggagtcaggcggattgtgactcagaaattgtgactaatat
gttgaggactgtgattgagacgacgcctgaggatttgttgcctgttgtgactctgtgctaaataagattgcagctgcacacgatgggatgg
agcttggatttgggtgagcttccattatcaagacccttgcctgaagcctgtggtgctaaagaagcacaatacaagaagcaatacaaggagctt
ggagatttgggcttgttgcaaaagcaagctgttcatcacagcctctgatgcaataaccagaagcactgactgttgcaaaagtttttgacac
attcggatcattgccaaggaatctggaagatggttccggttgagataatacagccgaaatgcagaaagaaatactggaagtttcttgacgttgtac
aacccaataatttgattcgtcttctccagacaagctacgattggttgggtgaacaaacactgtagtgcgaatagctcatgcttttgtg
tactcagataagcattcatcacctcctgcagggttagatttctccttgggaagagctgccaagattgttaagcaagtgactctgtgatcc
agtttatgaaaaattatccctgctcttctagctgattggttggaaagcttccagaaacatgagggttctcactggtgttctggtggac
ctatgctagctaaagcaacaaaggagatctgaaattcttgataagttcaggataaggagttcacaatgtaatacaagatgagtggtgaa
cgtgccagatacactacatggaagatggttccggttgagataatacagccgaaatgcagaaagaaatactggaagtttcttgacgttgttac
tgctatctcaagattgaaagaaatcatctgcaacttatttgttcttgactgtgaactggttgcaatagcaccgtgagaacagaagatctgac
ccttcaggctcttactacagctgctgtaaaaaatgttgcattagtgaaatcaaggtcaacgtgtgcaataatgcttttgatacttctgtat
ctaatggacaaccacttcttcaagagcaacttaattgttcgagagagcatttcaagatcatttgaagaagaacctggatatttccagtt
tgctacagctgtaacctcaaatgatcttgaggaaatacaaaatcttgaagatgagggtcaacggcagttgtgagggatgattatcaaaa
cactaaactaaagatgctacataatgagccttcaagcggctcaaaataactggcttaaacgaagaaggactacatggagatattggcgactca
ctggatctggatccaattggtgcttttcatggtcgggggaaacgtactggtttagcggagccttctcctagcttgttatgataagcaaaa
cgaggagttcagagcactctgtaaaatcggaactgggttttctgaaatcagcttgaggaaacgctctccagcctcgttctaaagtattc
ctaaaccaaagtcatattacaggtatggggaaaccatcaatccagatgttgggttgaacctaccgaggtctgggaagtgaagctgctgat
cttactatcagccctgcccacgtgctgcccaggtatcgtggaatcccggaagggaaatttcatatcagatttccacgtctgagccgtgacg
agaagacaagaagcctgagggccctcatcagcagagatggtagcggatagtaatacgcctcagaagcacaatacaaaaaacaatcaggatg
acaacgatgaagactaa
acaagagcacttgccatctaaaagtgatcaggaaggaagggaaacgaaggcaactaatcaaaagatcgcttctgcttaaaaaatgatcaggat
gacgatgagaagactactcaaaagaaagtgtcacgctcaaaaaatgatcaaacatcgcttccacatcttctatctgaatgaatgatcatgt
ccattgtacaacagactacagattgatgtccttggcagatgtaagttgcctcaaaccaatttgtgaaagttgatctattagtaaatgtgtc
tacagttgtgtatgtagattgatcagtttaaaagaaa
    
```

Proteína (802 aa)

```

*VKFFKTSIICIEIHRLLSSLLFSSLLIFLTKIYLDVSYSIY**KCISFLSRHLALISFPFFLYTFFFFFPN*
MLCLSSYRFTQTLLYNFVSKPSSIFLHFYKKKQLTLKPLFFSVNPNNSRIMS D S P P A P P R S A F A V L M A N S K K K T T S S P K K R I T P D V E T S
SKSPV V N Q D S V L K P I K D T D L V N E S K S E E L E V K K R S Q D S T L K P I E D T H L V N E S K S E E C V V K K R M I S P D E S I V E I K K K A A N F D P R K A V Y W G D G
Q R V P F M F V V K A F D A I S K E S G R I V I T E I V T N M L R T V I E T T P E D L L P V V Y L A A N K I A A A H D G M E L G I G D A S I I K A L A E A C G A K E A H I K K Q Y K E L
G D L G L V A K A S R S S Q P L M H K P E A L T V A K V F D T F R I I A K E S G K D S Q E K K N Y I K S L L V A A T D C E P Q Y L I R L L Q T K L R I G L A E Q T L L V A I A H A F V
Y S D K H S P P A G V D S P L E E A A K I V K Q V Y S V I P V Y E K I I P A L L A D G V W K L S E T C G F S P G V P V G P M L A K P T K G V S E I L D K F Q D M E F T C E Y K Y D G E
R A Q I H Y M E D G S V E I Y S R N A E R N T G K F P D V V T A I S R L K K S S A T S F V L D C E L V A Y D R E K Q K I L P F Q V L T T R A R K N V V I S E I K V N V C I Y A F D I L Y
L N G Q P L L Q E Q L N V R R E H L Y K S F E E E P G Y F Q F A T A V T S N D L E E I T K F L E D A V N G S C E G L I I K T L T K D A T Y E P S K R S N N W L K L K D Y M E S I G D S
L D L V P I G A F H G R G K R T G V Y G A F L L A C Y D S N N E E F Q S I C K I G T G F S E L Q L E E R S S S L R S K V I P K P K S Y R Y G E T I N P D V W F E P T E V W E V K A A D
L T I S P V H R A A Q G I V D P A K G I S L R F P R L S R V R E D K K P E E A S A E M V A D M Y N A Q K H N Q K N N Q D D N E D *
S K S T C A S K S D Q E G K T K A T N Q R S L R L K M I R M T M K K T T Q R K C H V * K N D Q T S R S H L L S E * M I M S I V Q O T T D * C P W Q M * V A S N Q F C E S * S I S Q C V
Y S C C M Y D L I S L K E
    
```

Figura 27.- Secuencias nucleotídica (arriba) y aminoácídica (abajo) del clon de cDNA de tomate (AK247931). Este clon muestra una identidad aminoácídica del 66% con la secuencia la DNA ligasa 1 de *A. thaliana*. En negro se muestra la región codificante y en verde las 5' y 3' no traducidas. En rojo se indican los aminoácidos de los péptidos identificados por espectrometría de masas comunes con la secuencia de *A. thaliana*.



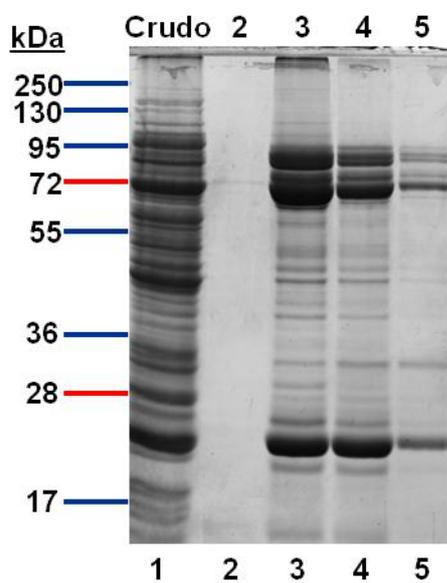
**Figura 28.- Alineamiento de la secuencia aminoacídica de tomate AK247931 traducida *in silico*, con las secuencias aminoacídicas conocidas de la DNA ligasa 1 de diferentes especies de plantas.** El nombre abreviado de cada especie (*A. thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera*, *Ricinus communis*, *Trifolium pratense*, *Oryza sativa* y *Sorghum bicolor*) se indica a la izquierda. En negro se resaltan los aminoácidos conservados en todas las especies y en gris los conservados sólo en algunas de ellas. En rojo se enmarcan los cinco motivos conservados que definen a la superfamilia de las nucleotidil transferasas covalentes (I, III, IIIa, IV y V).

## 1.7 Clonación del cDNA de la DNA ligasa 1 de tomate en un vector de expresión

Partiendo de la secuencia del clon AK 247931 de tomate se diseñaron dos parejas de cebadores adyacentes e imbricados para su amplificación por PCR imbricada (*Nested PCR*). Una preparación de RNA total de tomate, obtenida con un tampón conteniendo urea 5 M, se purificó en columna de gel de sílice y se empleó como molde para la síntesis de un cDNA de la DNA ligasa 1 de tomate por retrotranscripción con el cebador específico C4 (que cubre el final de la región codificante y el principio de la 3' no traducida). Con este cDNA se amplificó la secuencia codificante de la DNA ligasa 1 mediante dos rondas consecutivas de PCR, la primera con los cebadores C3 (que cubre el final de la región 5' no traducida y el principio de la codificante) y C4, y la segunda con los cebadores internos C5 y C6. Este último par amplifica la región codificante completa (sin el codón de parada) e introduce en la secuencia dos sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* en 5' y 3', respectivamente. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa y el DNA del tamaño esperado se clonó de forma dirigida entre las dianas *NcoI* y *XhoI* del sitio de clonación múltiple del vector de expresión pET23d(+) (Novagen). Esta estrategia de clonación generó un plásmido recombinante (pEDn1SI) que, al traducirse en *E. coli*, introduce dos aminoácidos extra (metionina y glicina) en el extremo N-terminal de la proteína. Por otro lado, este mismo plásmido contiene la parte correspondiente al extremo C-terminal de la proteína una corta secuencia en fase con la de la DNA ligasa 1 (sin codón de parada) que, al ser traducida, incorpora dos aminoácidos extra (leucina y ácido glutámico) y una cola de seis histidinas a la proteína expresada. Estas histidinas permitieron su purificación por afinidad con una resina de níquel.

### 1.8 Expresión de la DNA ligasa 1 de tomate en *E. coli*: análisis de las actividades RNA ligasa y adeniltransferasa

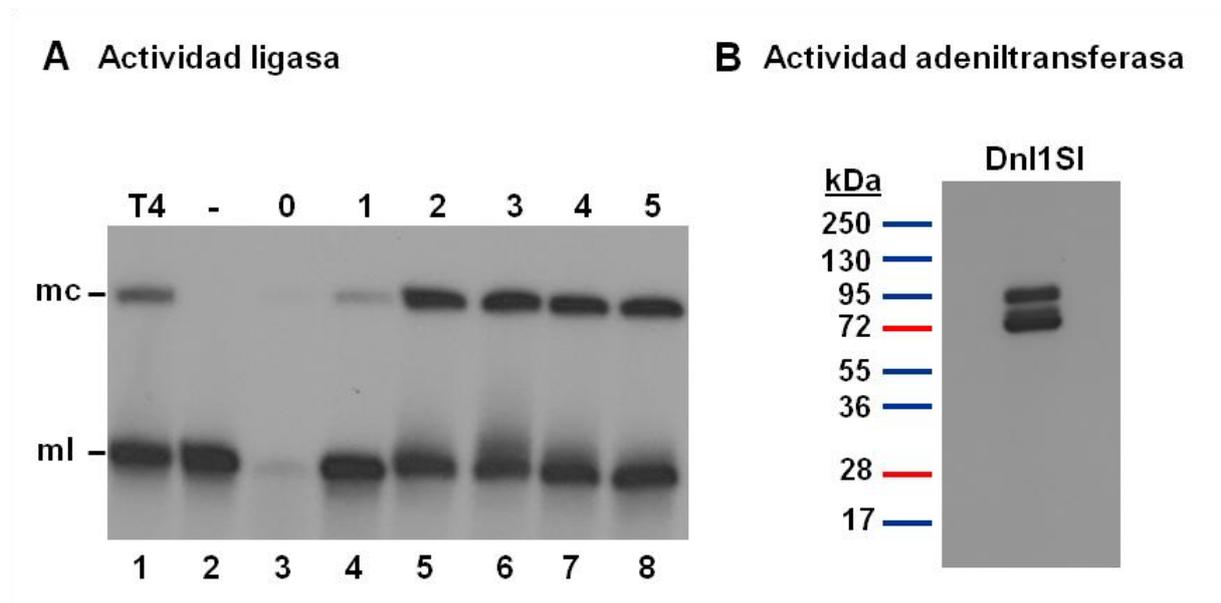
La construcción pEDn1SI se electroporó en la cepa de expresión Rosetta 2 de *E. coli* y se procedió a la expresión heteróloga de la DNA ligasa 1 de tomate y posterior purificación por cromatografía de afinidad en columna de Ni-Sefarosa, de la que se eluyeron diez fracciones. El contenido proteico de las primeras fracciones se analizó por PAGE-SDS en geles del 10% y tinción con azul Coomassie, comprobándose la elución de la mayor parte de la proteína en la tercera fracción (Fig. 29, carril 3).



**Figura 29.-** Análisis por PAGE-SDS (10%) de la expresión de la DNA ligasa 1 de tomate en *E. coli* Rosetta 2. Proteínas presentes en el extracto total (1) y en las primeras fracciones eluidas de la columna de Ni-Sefarosa (3 a 5). Tras la electroforesis el gel se reveló con azul de Coomassie. La masa molecular de los marcadores (en kDa) se indica a la izquierda.

Por otra parte, se ensayó la actividad de ligación de las cinco primeras fracciones eluidas empleando como sustrato el ml (+) del PSTVd abierto entre las posiciones G95-G96 y con extremos 5'-P y 3'-OH (Fig. 30A, carriles 3 a 8), detectándose la actividad máxima en la tercera fracción de la columna (Fig. 30A, carril 6). Este resultado muestra que, efectivamente, la DNA ligasa 1 de tomate cataliza de manera muy eficiente la ligación de la forma fisiológicamente relevante del PSTVd *in vitro*.

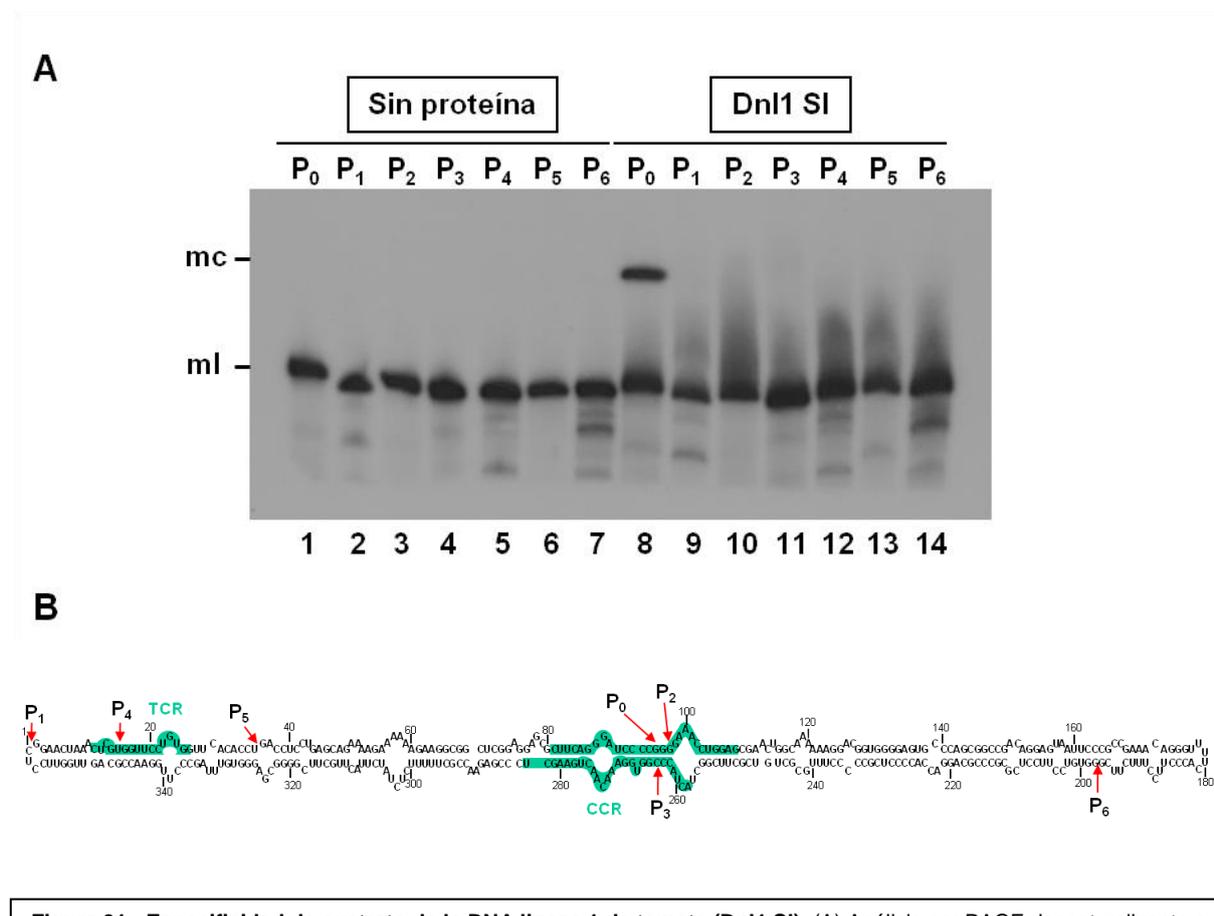
También se analizó la actividad adeniltransferasa de la DNA ligasa 1 de tomate, para lo cual la reacción de ligación se llevó a cabo en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  y se detuvo hirviendo 2 minutos a  $95^\circ\text{C}$  en presencia de tampón Laemmli. La proteína adenilada se analizó por PAGE-SDS en un gel del 10% y autorradiografía, observándose una banda con la migración esperada para la DNA ligasa 1 adenilada (89.8 kDa) y otra banda correspondiente a una proteína de menor tamaño posible producto de la degradación de la primera (Fig. 30B). Este perfil es consistente con el observado para la actividad RNA ligasa de tomate (Fig. 23 y 25), y le da crédito a la hipótesis de que la actividad de adenilación observada reside en la DNA ligasa 1 de tomate.



**Figura 30.- Examen de la actividad RNA ligasa y adeniltransferasa en diferentes fracciones cromatográficas resultantes de aplicar un extracto de *E. coli* expresando la DNA ligasa 1 de tomate a una columna de Ni-Sefarosa.** (A) Análisis mediante PAGE desnaturalizante e hibridación *Northern* de la actividad RNA ligasa en las cinco primeras fracciones eluidas. (1) Control positivo con la T4 RNA ligasa 1; (2) control negativo sin proteína; (3) extracto total sin fraccionar; (4-8) fracciones de la cromatografía. Las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del PSTVd se indican a la izquierda. (B) Análisis mediante PAGE-SDS y autorradiografía de los productos de una reacción de ligación en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  empleando la fracción 3 de la cromatografía. La masa molecular de los marcadores (en kDa) se indica a la izquierda de este panel.

## 1.9 Especificidad de sustrato de la DNA ligasa 1 de tomate

Para estudiar la especificidad de sustrato de la proteína clonada de tomate, se analizó su actividad RNA ligasa frente a RNAs monoméricos lineales del PSTVd abiertos en distintas posiciones. Más específicamente, se comparó la ligación del ml (+) del PSTVd con extremos 5'-P y 3'-OH abierto entre las posiciones G95-G96 con la ligación de los otros seis ml (+) del PSTVd con los mismos extremos pero abiertos en las posiciones mencionados anteriormente (apartado 1.4). De nuevo se comprobó que tan sólo la forma fisiológicamente relevante del PSTVd, es decir, el monómero lineal abierto entre las posiciones G95-G96, fue eficientemente circularizada por la DNA ligasa 1 de tomate (Fig. 31, carril 8).



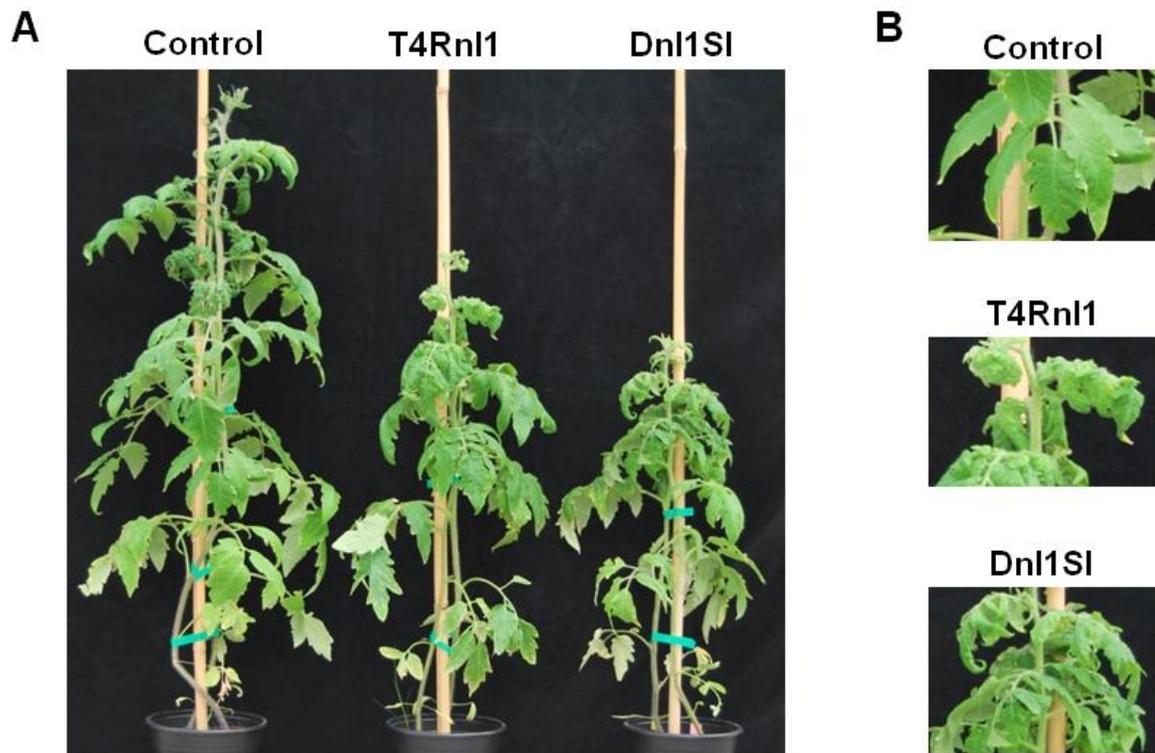
**Figura 31.- Especificidad de sustrato de la DNA ligasa 1 de tomate (Dnl1 SI).** (A) Análisis por PAGE desnaturalizante e hibridación *Northern* de los productos resultantes de la ligación catalizada por la DNA ligasa 1 de tomate (carriles 8 a 14) empleando como sustrato el RNA monomérico lineal de polaridad (+) del PSTVd (con extremos 5'-P y 3'-OH) abierto en diferentes posiciones (P<sub>0</sub> a P<sub>6</sub>). Carriles 1 a 7 control negativo sin proteína. Las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del PSTVd se indican a la izquierda. (B) Esquema de la estructura secundaria de mínima energía libre del PSTVd donde se indican las posiciones por las que están abiertos los diferentes sustratos: P<sub>0</sub> (G95-G96), P<sub>1</sub> (C1-G2), P<sub>2</sub> (G97-G98), P<sub>3</sub> (C264-G265), P<sub>4</sub> (U15-G16), P<sub>5</sub> (U35-G36) y P<sub>6</sub> (G197-G198). La región terminal conservada (TCR) y la región central conservada (CCR) se muestran en verde.

En conjunto estos resultados indican que la DNA ligasa 1 de tomate posee actividad RNA ligasa que es específica, no sólo de los grupos químicos terminales del RNA sustrato, sino también de su disposición espacial en la molécula, puesto que únicamente circulariza el RNA correspondiente a la forma fisiológicamente relevante del PSTVd. Por lo tanto, parece muy plausible la participación de la DNA ligasa 1 en el ciclo replicativo de los viroides nucleares, y lo que aún es más importante, que en ciertas situaciones la DNA ligasa 1 cataliza la ligación de RNA.

### **1.10 Infectividad de los RNAs monoméricos circulares del PSTVd generados por la DNA ligasa 1 de tomate**

Para comprobar que las formas monoméricas circulares generadas *in vitro* por la actividad RNA ligasa de la DNA ligasa 1 de tomate mostraban las propiedades biológicas esperadas, se ensayó su infectividad en plantas de tomate. Con este fin se utilizaron tres bloques de cuatro plantas en el estadio de dos hojas verdaderas, uno inoculado con tampón como control negativo, otro con 5 ng/planta de formas circulares generadas con la T4 RNA ligasa 1 y el tercero con 5 ng/planta de formas circulares generadas con la DNA ligasa 1 de tomate. Estas dos últimas preparaciones de RNA se obtuvieron de reacciones de ligación del ml (+) del PSTVd con extremos 5'-P y 3'-OH (y abierto entre las posiciones G95-G96), separando a continuación los productos resultantes por PAGE desnaturizante y eluyendo las formas circulares. Mientras que las plantas control permanecieron asintomáticas tres semanas después de la inoculación, las restantes mostraron los síntomas típicos de la infección por PSTVd, tales como enanismo y epinastia foliar, con intensidad similar independientemente del origen de los RNAs viroidales circulares (Fig. 32).

De este resultado se concluye por tanto que las moléculas viroidales circulares generadas por la DNA ligasa 1 de tomate son infecciosas y capaces de producir síntomas.



**Figura 32.- Comprobación de la actividad biológica de los RNAs monoméricos circulares del PSTVd generados por la DNA ligasa 1 de tomate.** (A) De izquierda a derecha se muestran plantas de tomate inoculadas con tampón y con RNAs circulares del PSTVd generados por la T4 RNA ligasa 1 (T4Rnl1) y la DNA ligasa 1 de tomate (Dnl1SI), observándose una significativa reducción de tamaño de las plantas infectadas respecto a las control. (B) Detalle de las hojas donde se observan los síntomas de clorosis y epinastia inducidos por las preparaciones de RNA del PSTVd circularizadas por T4Rnl1 y Dnl1SI.

## **2. Circularización de los viroides cloroplásticos (familia *Avsunviroidae*)**

A tenor del enlace que se genera y de la eficiencia de la reacción de ligación *in vivo*, en los últimos años se ha sugerido la implicación de un factor del huésped en la ligación de los RNAs monoméricos lineales producto del autocorte ribozimático de los miembros de la familia *Avsunviroidae* (Delgado *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2009). También se ha identificado la necesidad de una función específica del huésped para la ligación de otros RNAs generados por ribozimas distintas de las de cabeza de martillo (Reid y Lazinski, 2000). Los extremos 5'-OH y 2',3'>P generados por estas últimas en las reacciones de autocorte son precisamente los requeridos por la tRNA ligasa, que, además de localizarse en el núcleo, puede presentar por traducción alternativa un péptido de tránsito al cloroplasto (Englert *et al.*, 2007). Esta enzima muestra además una amplia especificidad de sustrato siempre y cuando éste presente extremos 5'-OH y 2',3'>P (Konarska *et al.*, 1981; Schwartz *et al.*, 1983). La amplia gama de sustratos de la tRNA ligasa de plantas sugiere su implicación en procesos celulares más allá de los relacionados con el procesamiento (*splicing*) de los pre-tRNAs o a la reparación de los tRNAs. Para investigar la posible implicación de la tRNA ligasa en el ciclo replicativo de los viroides cloroplásticos, se clonó esta enzima de berenjena, huésped natural del ELVd. Su actividad de ligación se ensayó y caracterizó empleando como sustrato el RNA monomérico lineal (ml) de polaridad positiva (+) del ELVd abierto por el sitio de autocorte con extremos 5'-OH y 2',3'>P. Como control se expresó también la tRNA ligasa de *A. thaliana* y se ensayó su actividad de ligación empleando el mismo sustrato.

## 2.1 Clonación de la tRNA ligasa de berenjena

Dada la alta similitud de secuencia existente entre la tRNA ligasa de *A. thaliana* y la de *O. sativa* (Englert y Beier, 2005), así como entre las de diferentes especies de dicotiledóneas y monocotiledóneas (Fig. 33), se partió de la secuencia nucleotídica de la tRNA ligasa de tomate (Molina-Serrano, Flores y Darós, datos no publicados) para la clonación de la tRNA ligasa de berenjena, por tratarse de especies del mismo género entre las que cabía esperar un elevado grado de conservación de secuencia.

Partiendo de una preparación de RNA total de berenjena, obtenida mediante homogenización en un tampón con urea 5 M y posterior fraccionamiento en columna de gel de sílice, se generó por retrotranscripción un cDNA empleando el cebador C14, con una cola poli(dT) en su extremo 3' y una secuencia definida en 5'. Este cDNA sirvió como molde para la amplificación por PCR de diversos fragmentos específicos de la tRNA ligasa de berenjena con diferentes parejas de cebadores derivados de la secuencia homóloga de tomate (C7/C8, C9/C10 y C11/C12). El fragmento de entre 800 y 900 pb amplificado con la pareja de cebadores C7/C8 se clonó, secuenció y tradujo *in silico*, mostrando una alta similitud de secuencia nucleotídica y aminoacídica con la tRNA ligasa de tomate. Con la secuencia de este primer fragmento específico de la tRNA ligasa de berenjena, aparentemente cercano al extremo 3' del mensajero, se utilizó la metodología 3' RACE para determinar la secuencia completa del extremo 3' (Fig. 13). Con este fin, y empleando como molde el cDNA retrotranscrito con el cebador C14, se realizaron dos reacciones de PCR consecutivas primero con los cebadores C7 y C15, y posteriormente con los cebadores imbricados C13 y C16: en la reacción de retrotranscripción el cebador C14 hibrida con el extremo 3' poliadenilado del mRNA e introduce una cola de secuencia conocida en el extremo 5' del cDNA, con la que hibrida el cebador C15 en la primera reacción de PCR y el cebador interno C16 en la segunda. Mediante esta técnica se amplificó un fragmento de aproximadamente 1200 pb que se clonó y secuenció, determinándose así la secuencia del extremo 3' del mRNA que codifica la tRNA ligasa de berenjena. Al alinear esta secuencia con la de la tRNA ligasa de tomate, se observó una alta identidad de secuencia entre las regiones 3' de ambas.

T.aestivum : MSLS-----\*-----20-----\*-----40-----\*-----60-----\*-----80-----\*-----100-----S : 50  
T.aestivum : MSLS-----\*-----20-----\*-----40-----\*-----60-----\*-----80-----\*-----100-----S : 58  
T.aestivum : MSLS-----\*-----20-----\*-----40-----\*-----60-----\*-----80-----\*-----100-----S : 58  
O.sativa : MSLSSTSTSSLL-LILSPRGNERRLLLELLLP-----RLSSSSAAAAA-----PERRDRHGKQTPQCKRPPKATD-----FAAAAPVAVAASSPASSTSSSADF : 94  
S.lycopers : MENNRK-GGVEKKEKCVRSSN-----RVPGSSMDEASPATGAADRLSSLNITE-----SGAOS-SVVA-----S : 63  
V.vinifera : MSAQRILCGFLTPTSHSRSPRLRAFIFSR-----SLNLRSSISDSVSSNESASAAEAVTNRFGLLADE-----SSGQTVCVDP-----S : 81  
A.thaliana : MSLIPHTTHFAFSINHLSATSRSSILLRSSSPYFYLARSLCFNSSIRFLSSDLPKCKKRRDHAERQKWCVKPMDAPFESGDSATVAEAVNNOFGLSLKESN : 105

T.aestivum : ANVERALAP-STAG-AAQVWVPRGYPTSASSSS-SS-AVTAAEQGG-----AGDLSRLIKG--AAEFVNDNTFTE-CIRATFYKFEKESDQ : 135  
T.aestivum : ANVERALAP-SAAG-AAQVWVPRGYPTSASSSS-SS-AVTAAEQGG-----AGDLSRLIKG--AAEFVNDNTFTE-CIRATFYKFEKESDQ : 143  
T.aestivum : ANVERALAP-STAG-AAQVWVPRGYPTSASSSS-SS-AVAAEQGG-----ASDLSRLIKG--AAEFVNDNTFTE-CIRATFYKFEKESDQ : 143  
O.sativa : GGVERTIISF-SFOGGASQVWVPRGYPTSASSSSSSSSAAAAEQRI-----DAELSRVFA--AFNEVNDNTFTE-CIRATFYKFEKESDQ : 181  
S.lycopers : LQFGSGLAPFVQCHQVWVPRGYPTSASSSSSSSSAAAAEQRI-----SALLSKLFGSILENTVDLSTFSA-CIRATFYKFEKESDQ : 151  
V.vinifera : VQFGSLPADLAIVCGQEAIPAPSPVSGARVVEVEKTPDKTGEVILGNGAEMVAEKSCACLKLESSNALADFTVDLSTFSA-CIRATFYKFEKESDQ : 186  
A.thaliana : TNAIVLPSCTINHFVQNIWVPRGYPTSASSSSATEVGTSAVSQGGSSGD-----TKVGLLSKIFGGNLLERFSDKSTYCH-CIRATFYKFEKESDQ : 203

T.aestivum : ETRTRMIEIVSGLATLIVTSKHSGSLFMYAGHGGAYARNISFGNIITAVCVFVLRRLPEAWGKPEFAWCAEFNFLEKNNICISMEIVTAVLGDHGQREKDY : 240  
T.aestivum : ETRTRMIEIVSGLATLIVTSKHSGSLFMYAGHGGAYARNISFGNIITAVCVFVLRRLPEAWGKPEFAWCAEFNFLEKNNICISMEIVTAVLGDHGQREKDY : 248  
T.aestivum : ETRTRMIEIVSGLATLIVTSKHSGSLFMYAGHGGAYARNISFGNIITAVCVFVLRRLPEAWGKPEFAWCAEFNFLEKNNICISMEIVTAVLGDHGQREKDY : 248  
O.sativa : ETRTRMIEIVSGLATLIVTSKHSGSLFMYAGHGGAYARNISFGNIITAVCVFVLRRLPEAWGKPEFAWCAEFNFLEKNNICISMEIVTAVLGDHGQREKDY : 286  
S.lycopers : ETRTRMIEIVSGLATLIVTSKHSGSLFMYAGHGGAYARNISFGNIITAVCVFVLRRLPEAWGKPEFAWCAEFNFLEKNNICISMEIVTAVLGDHGQREKDY : 256  
V.vinifera : ETRTRMIEIVSGLATLIVTSKHSGSLFMYAGHGGAYARNISFGNIITAVCVFVLRRLPEAWGKPEFAWCAEFNFLEKNNICISMEIVTAVLGDHGQREKDY : 291  
A.thaliana : ETRTRMIEIVSGLATLIVTSKHSGSLFMYAGHGGAYARNISFGNIITAVCVFVLRRLPEAWGKPEFAWCAEFNFLEKNNICISMEIVTAVLGDHGQREKDY : 308

T.aestivum : VVVTAVTEILGKGPFFYSTHVLVFCRWRRLPTNHVWLSSTRKSTSEFAAYDALCEEGLATEVCKALTEIADIVPSSKDFVWQGEIIEGLVARIVSESSVC : 345  
T.aestivum : VVVTAVTEILGKGPFFYSTHVLVFCRWRRLPTNHVWLSSTRKSTSEFAAYDALCEEGLATEVCKALTEIADIVPSSKDFVWQGEIIEGLVARIVSESSVC : 353  
T.aestivum : VVVTAVTEILGKGPFFYSTHVLVFCRWRRLPTNHVWLSSTRKSTSEFAAYDALCEEGLATEVCKALTEIADIVPSSKDFVWQGEIIEGLVARIVSESSVC : 353  
O.sativa : VVVTAVTEILGKGPFFYSTHVLVFCRWRRLPTNHVWLSSTRKSTSEFAAYDALCEEGLATEVCKALTEIADIVPSSKDFVWQGEIIEGLVARIVSESSVC : 391  
S.lycopers : VVVTAVTEILGKGPFFYSTHVLVFCRWRRLPTNHVWLSSTRKSTSEFAAYDALCEEGLATEVCKALTEIADIVPSSKDFVWQGEIIEGLVARIVSESSVC : 361  
V.vinifera : VVVTAVTEILGKGPFFYSTHVLVFCRWRRLPTNHVWLSSTRKSTSEFAAYDALCEEGLATEVCKALTEIADIVPSSKDFVWQGEIIEGLVARIVSESSVC : 396  
A.thaliana : VVVTAVTEILGKGPFFYSTHVLVFCRWRRLPTNHVWLSSTRKSTSEFAAYDALCEEGLATEVCKALTEIADIVPSSKDFVWQGEIIEGLVARIVSESSVC : 413

T.aestivum : MBEVLRNHFESLDCGDSDLGSLRDCAAANRSDEKQICALLNVEGSMCPDHRWFGVSGLE-ACSRNADKSVVTFLOAHPDYTKKLOEMIRMLRKNHS : 449  
T.aestivum : MBEVLRNHFESLDCGDSDLGSLRDCAAANRSDEKQICALLNVEGSMCPDHRWFGVSGLE-PCSRNADKSVVTFLOAHPDYTKKLOEMIRMLRKNHS : 457  
T.aestivum : MBEVLRNHFESLDCGDSDLGSLRDCAAANRSDEKQICALLNVEGSMCPDHRWFGVSGLE-PCSRNADKSVVTFLOAHPDYTKKLOEMIRMLRKNHS : 457  
O.sativa : IBEVLRNHFESLDCGDSDLGSLRDCAAANRSDEKQICALLNVEGSMCPDHSWFGCSGLDDHCSANRSVVTFLQOHPDYTKKLOEMIRMLRKNHS : 496  
S.lycopers : MBEVLRNHFESLDCGDSDLGSLRDCAAANRSDEKQICALLNVEGSMCPDHRWFGVSGLE-SHRSNADKSVVTFLOAHPDYTKKLOEMIRMLRKNHS : 464  
V.vinifera : IBEVLRNHFESLDCGDSDLGSLRDCAAANRSDEKQICALLNVEGSMCPDHSWFGCSGLDDHCSANRSVVTFLQOHPDYTKKLOEMIRMLRKNHS : 500  
A.thaliana : MBEVLRNHFESLDCGDSDLGSLRDCAAANRSDEKQICALLNVEGSMCPDHRWFGVSGLE-PCSRNADKSVVTFLOAHPDYTKKLOEMIRMLRKNHS : 514

T.aestivum : ASFSYNNYCVVDSLNDLICKVIVIEVSDSFRFRYCEMRKNGELWPLYRGFFVVDNLFANRKAARELSKDSNILLRNINGALDSLSSKDGGLADESNLMV : 554  
T.aestivum : ASFSYNNYCVVDSLNDLICKVIVIEVSDSFRFRYCEMRKNGELWPLYRGFFVVDNLFANRKAARELSKDSNILLRNINGALDSLSSKDGGLADESNLMV : 562  
T.aestivum : ASFSYNNYCVVDSLNDLICKVIVIEVSDSFRFRYCEMRKNGELWPLYRGFFVVDNLFANRKAARELSKDSNILLRNINGALDSLSSKDGGLADESNLMV : 562  
O.sativa : AAFKCYNNHEKMLDLSLDFKVIIEVSDSFRFRYCEMRKNGELWPLYRGFFVVDNLFANRKAARELSKDSNILLRNINGALDSLSSKDGGLADESNLMV : 601  
S.lycopers : AAFKCYNNHEKMLDLSLDFKVIIEVSDSFRFRYCEMRKNGELWPLYRGFFVVDNLFANRKAARELSKDSNILLRNINGALDSLSSKDGGLADESNLMV : 561  
V.vinifera : AAFKCYNNHEKMLDLSLDFKVIIEVSDSFRFRYCEMRKNGELWPLYRGFFVVDNLFANRKAARELSKDSNILLRNINGALDSLSSKDGGLADESNLMV : 603  
A.thaliana : AAFKCYNNHEKMLDLSLDFKVIIEVSDSFRFRYCEMRKNGELWPLYRGFFVVDNLFANRKAARELSKDSNILLRNINGALDSLSSKDGGLADESNLMV : 613

T.aestivum : KIKELVYKIRTFILRNGLSLEKGGPSAYRYLRLQMKWGTSDGKQKELCKMLDEWAVIRRKGKQKESSTYLSAEPFLECYAKRSFANQALIGAGDVIQ : 659  
T.aestivum : KIKELVYKIRTFILRNGLSLEKGGPSAYRYLRLQMKWGTSDGKQKELCKMLDEWAVIRRKGKQKESSTYLSAEPFLECYAKRSFANQALIGAGDVIQ : 667  
T.aestivum : KIKELVYKIRTFILRNGLSLEKGGPSAYRYLRLQMKWGTSDGKQKELCKMLDEWAVIRRKGKQKESSTYLSAEPFLECYAKRSFANQALIGAGDVIQ : 667  
O.sativa : KIKELVYKIRTFILRNGLSLEKGGPSAYRYLRLQMKWGTSDGKQKELCKMLDEWAVIRRKGKQKESSTYLSAEPFLECYAKRSFANQALIGAGDVIQ : 706  
S.lycopers : KMKELVYKIRTFILRNGLSLEKGGPSAYRYLRLQMKWGTSDGKQKELCKMLDEWAVIRRKGKQKESSTYLSAEPFLECYAKRSFANQALIGAGDVIQ : 666  
V.vinifera : KIKELVYKIRTFILRNGLSLEKGGPSAYRYLRLQMKWGTSDGKQKELCKMLDEWAVIRRKGKQKESSTYLSAEPFLECYAKRSFANQALIGAGDVIQ : 708  
A.thaliana : KMKELVYKIRTFILRNGLSLEKGGPSAYRYLRLQMKWGTSDGKQKELCKMLDEWAVIRRKGKQKESSTYLSAEPFLECYAKRSFANQALIGAGDVIQ : 718

T.aestivum : TENFLAILDAQRDEGDLAEFGTAPSSHTSLSLWVSKDEGLIVFFFGIPGAKSALCOILNTPGGLGDNRFHLSIMGDRTKGRYKQVAVERRKRPFIILA : 764  
T.aestivum : TENFLAILDAQRDEGDLAEFGTAPSSHTSLSLWVSKDEGLIVFFFGIPGAKSALCOILNTPGGLGDNRFHLSIMGDRTKGRYKQVAVERRKRPFIILA : 772  
T.aestivum : TENFLAILDAQRDEGDLAEFGTAPSSHTSLSLWVSKDEGLIVFFFGIPGAKSALCOILNTPGGLGDNRFHLSIMGDRTKGRYKQVAVERRKRPFIILA : 772  
O.sativa : TENFLAILDAQRDEGDLAEFGTAPSSHTSLSLWVSKDEGLIVFFFGIPGAKSALCOILNTPGGLGDNRFHLSIMGDRTKGRYKQVAVERRKRPFIILA : 811  
S.lycopers : VEDMAIVEG-ELVEGDLPTDDEPSNIGSKNVEGLIVFFFGIPGAKSALCOILNTPGGLGDNRFHLSIMGDRTKGRYKQVAVERRKRPFIILA : 770  
V.vinifera : AEDFLAIVEGDEGDLAEFGTAPSSHTSLSLWVSKDEGLIVFFFGIPGAKSALCOILNTPGGLGDNRFHLSIMGDRTKGRYKQVAVERRKRPFIILA : 813  
A.thaliana : TENFLAIVEGDEGDLAEFGTAPSSHTSLSLWVSKDEGLIVFFFGIPGAKSALCOILNTPGGLGDNRFHLSIMGDRTKGRYKQVAVERRKRPFIILA : 823

T.aestivum : DKNAPNEVWRQIEDMGRITKAAVAVVVDSEGTDSNFFSLLDALAVFMFRVLCRNHFGLDKSNAGYILLMFYLYGGRREFFESSELERFSGSIVRMPLLK : 869  
T.aestivum : DKNAPNEVWRQIEDMGRITKAAVAVVVDSEGTDSNFFSLLDALAVFMFRVLCRNHFGLDKSNAGYILLMFYLYGGRREFFESSELERFSGSIVRMPLLK : 877  
T.aestivum : DKNAPNEVWRQIEDMGRITKAAVAVVVDSEGTDSNFFSLLDALAVFMFRVLCRNHFGLDKSNAGYILLMFYLYGGRREFFESSELERFSGSIVRMPLLK : 877  
O.sativa : DKNAPNEVWRQIEDMGRITKAAVAVVVDSEGTDSNFFSLLDALAVFMFRVLCRNHFGLDKSNAGYILLMFYLYGGRREFFESSELERFSGSIVRMPLLK : 916  
S.lycopers : DKNAPNEVWRQIEDMGRITKAAVAVVVDSEGTDSNFFSLLDALAVFMFRVLCRNHFGLDKSNAGYILLMFYLYGGRREFFESSELERFSGSIVRMPLLK : 875  
V.vinifera : DKNAPNEVWRQIEDMGRITKAAVAVVVDSEGTDSNFFSLLDALAVFMFRVLCRNHFGLDKSNAGYILLMFYLYGGRREFFESSELERFSGSIVRMPLLK : 918  
A.thaliana : DKNAPNEVWRQIEDMGRITKAAVAVVVDSEGTDSNFFSLLDALAVFMFRVLCRNHFGLDKSNAGYILLMFYLYGGRREFFESSELERFSGSIVRMPLLK : 928

T.aestivum : PERPELGGIVAVIIEGMSLFLHOSRHGRAPESKGSYCEWAOEERLRVWISRNANYLSIQVPHVAVKVEVLEQLKAVAGKLVKIPDAKRRGGIVFAAVI : 974  
T.aestivum : PERPELGGIVAVIIEGMSLFLHOSRHGRAPESKGSYCEWAOEERLRVWISRNANYLSIQVPHVAVKVEVLEQLKAVAGKLVKIPDAKRRGGIVFAAVI : 982  
T.aestivum : PERPELGGIVAVIIEGMSLFLHOSRHGRAPESKGSYCEWAOEERLRVWISRNANYLSIQVPHVAVKVEVLEQLKAVAGKLVKIPDAKRRGGIVFAAVI : 982  
O.sativa : PERPELGGIVAVIIEGMSLFLHOSRHGRAPESKGSYCEWAOEERLRVWISRNANYLSIQVPHVAVKVEVLEQLKAVAGKLVKIPDAKRRGGIVFAAVI : 1021  
S.lycopers : PERPELGGIVAVIIEGMSLFLHOSRHGRAPESKGSYCEWAOEERLRVWISRNANYLSIQVPHVAVKVEVLEQLKAVAGKLVKIPDAKRRGGIVFAAVI : 980  
V.vinifera : SDRSTMDSVNCHIEGMSLFLHOSRHGRAPESKGSYCEWAOEERLRVWISRNANYLSIQVPHVAVKVEVLEQLKAVAGKLVKIPDAKRRGGIVFAAVI : 1023  
A.thaliana : SDRPELGGIVAVIIEGMSLFLHOSRHGRAPESKGSYCEWAOEERLRVWISRNANYLSIQVPHVAVKVEVLEQLKAVAGKLVKIPDAKRRGGIVFAAVI : 1033

T.aestivum : VQDAILSLRKLKGENGNFNGIK--VEDNLSKHWTLAHRRHGVAVVAGVYVQCEVVSFNFELVTDKMAALEAQLGTVNGERIDSKNDWVAVITAT : 1077  
T.aestivum : VQDAILSLRKLKGENGNFNGIK--VEDNLSKHWTLAHRRHGVAVVAGVYVQCEVVSFNFELVTDKMAALEAQLGTVNGERIDSKNDWVAVITAT : 1085  
T.aestivum : VQDAILSLRKLKGENGNFNGIK--VEDNLSKHWTLAHRRHGVAVVAGVYVQCEVVSFNFELVTDKMAALEAQLGTVNGERIDSKNDWVAVITAT : 1085  
O.sativa : LPPADLIGALKEAEDT-DANFNNNTK--LADNLSKHWTLAHRRHGVAVVAGVYVQCEVVSFNFELVTDKMAALEAQLGTVNGERIDSKNDWVAVITAT : 1123  
S.lycopers : LHVEPELHGLNDIAKMLVAGGFKDSS--LSCQKHLTLAHRRHGVAVVAGVYVQCEVVSFNFELVTDKMAALEAQLGTVNGERIDSKNDWVAVITAT : 1083  
V.vinifera : LHVEPELHGLNDIAKMLVAGGFKDSS--LSCQKHLTLAHRRHGVAVVAGVYVQCEVVSFNFELVTDKMAALEAQLGTVNGERIDSKNDWVAVITAT : 1126  
A.thaliana : LBAICVHSLKLAANPTIRSFTEGKKSICERLDSKHWTLAHRRHGVAVVAGVYVQCEVVSFNFELVTDKMAALEAQLGTVNGERIDSKNDWVAVITAT : 1093

T.aestivum : AFGVAPPEANLIPOLFSQKARVLDPPITITGVDFY : 1116  
T.aestivum : AFGVAPPEANLIPOLFSQKARVLDPPITITGVDFY : 1124  
T.aestivum : AFGVAPPEANLIPOLFSQKARVLDPPITITGVDFY : 1124  
O.sativa : AFGVAPPEANLIPOLFSQKARVLDPPITITGVDFY : 1162  
S.lycopers : GAGATADANLIPOLFSQKARVLDPPITITGVDFY : 1122  
V.vinifera : GAGVAPPEANLIPOLFSQKARVLDPPITITGVDFY : 1165  
A.thaliana : : ;

**Figura 33.- Alineamiento de la secuencia de la tRNA ligasa de diferentes especies de dicotiledóneas y monocotiledóneas depositadas en la base de datos del NCBI.** Estas especies incluyen *T. aestivum* (isoformas 1, 2 y 3), *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera* y *A. thaliana*, con el nombre de cada especie indicado a la izquierda. Los aminoácidos conservados en todas las especies se resaltan en negro, y en gris, los conservados sólo en algunas de ellas. En rojo se enmarcan los cinco motivos conservados característicos de la tRNA ligasa: Lig, I, IIIa, IV, polinucleótido quinasa (PNK) y ciclofosfodiesterasa (CPD).

Una vez conocida la porción 3' terminal del mRNA de la tRNA ligasa de berenjena, se utilizó una metodología 5' RACE circular para determinar el extremo 5' de dicho mRNA. Para este propósito se diseñaron, a partir de la secuencia de berenjena amplificada con los cebadores C7 y C8, un cebador para retrotranscripción (C17) y otros cuatro divergentes para PCR (C18/C19 y C20/C21). El cDNA obtenido con el cebador C17 se circularizó con la T4 RNA ligasa 1 y se empleó como molde para las reacciones de PCR imbricadas con los cebadores C18 y C19 primero y C20 y C21 después. La amplificación, clonación y secuenciación de un producto de 800-900 pb verificó que efectivamente correspondía a un fragmento del mRNA de la tRNA ligasa de berenjena aguas arriba de la secuencia 3' conocida. Puesto que este fragmento presentó de nuevo una alta identidad de secuencia con la del mRNA de la tRNA ligasa de tomate en los alineamientos realizados, se decidió intentar amplificar la región 5' completa (desde el codón de inicio) del primero empleando cebadores derivados de la del segundo, para evitar así la repetición de numerosas rondas de 5' RACE circular. De esta manera, empleando como molde un cDNA obtenido con el cebador específico de berenjena C17, se llevó a cabo una PCR hemi-imbricada con los cebadores C22 y C23 primero, y C22 y C12 después, que generó un fragmento de unas 2000 pb. Su clonación y secuenciación permitió comprobar, mediante alineamiento con el mRNA de la tRNA ligasa de tomate, que efectivamente correspondía a la región 5' conteniendo el codón de inicio ATG del mRNA de la tRNA ligasa de berenjena. Finalmente, para determinar la secuencia codificante del péptido de tránsito al cloroplasto de la tRNA ligasa de berenjena, y dado que se desconoce esta secuencia en la tRNA ligasa de tomate, se llevó a cabo una 5' RACE circular desde el extremo 5' conocido del mRNA de berenjena. Para ello se obtuvo un cDNA con el cebador C24, se circularizó con la T4 RNA ligasa 1, y sobre este molde se realizó una PCR imbricada con los cebadores C25/C26 y C27/C28. El fragmento de unas 500 pb amplificado se clonó y secuenció, determinándose así la existencia aguas arriba del codón de inicio ya identificado de una secuencia de 135 pb en fase con dicho codón de inicio. La traducción *in silico* de esta secuencia y su análisis con el programa *ChloroP* para la predicción de péptidos de tránsito al cloroplasto la identificó como el péptido de tránsito al cloroplasto del mRNA de la tRNA ligasa de berenjena.

tRNA ligasa *Solanum melangena*

cdNA

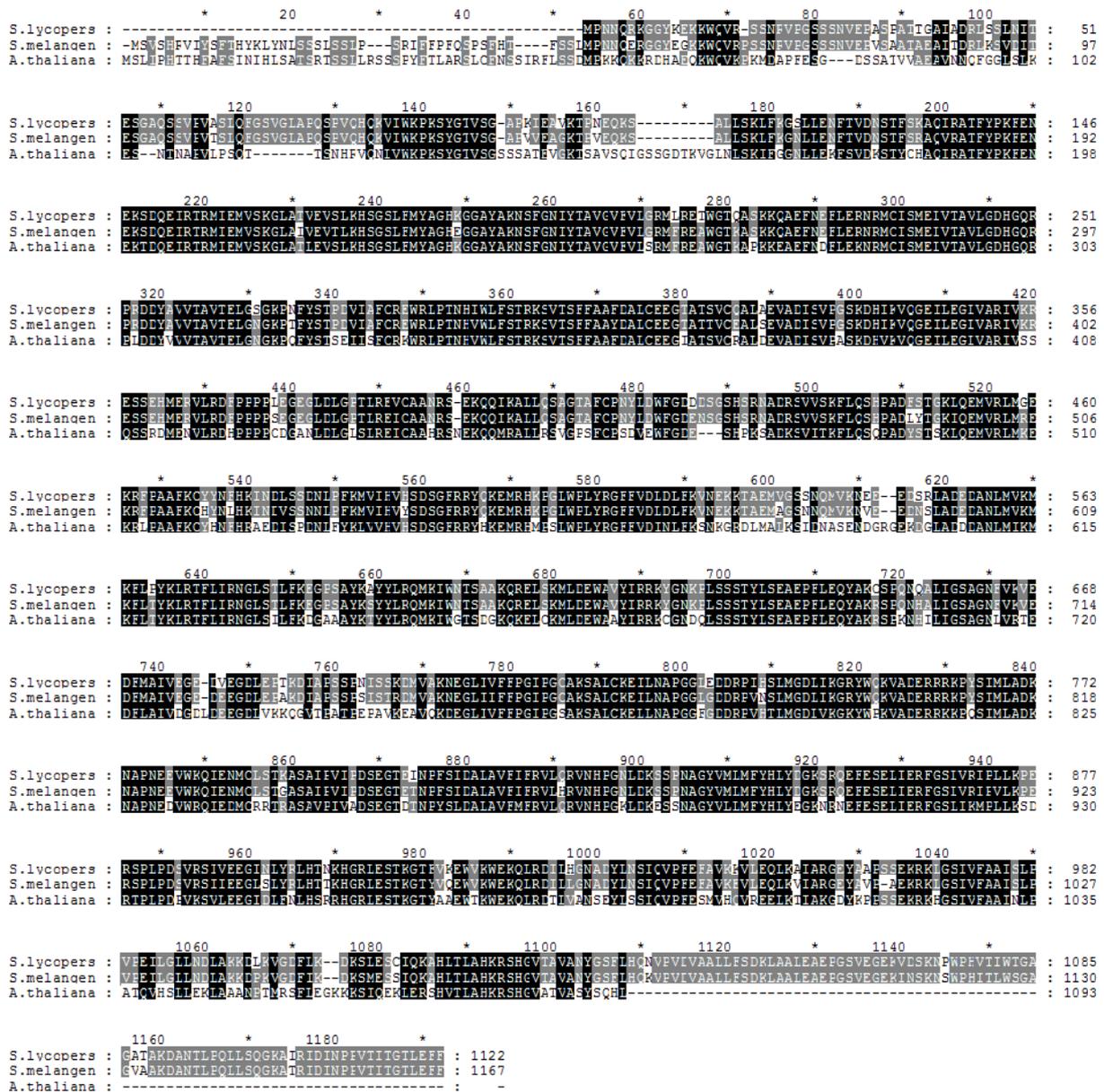
atgctcggttctgcataagggtcatttactctttcactcattacaacctctataatctctctctctctcttctcttatacatctttgccttctagaatctt  
cttcccttttcaatctctctcttcttccacagttctcttctcactcatgcccaacaatcaggaaagggtgggtatgaaggaaaaaatggcaag  
tgaggccaagttccaatagggtaccaggctcgtcttcaaatgtggaacctgtaactgctgcaactgctgaagccattaccgaccgtctaaag  
tccgtggatattactgaaagtggtgcacagctagtgttccagctcacatctcttcagtttggcagcgttggattagcaccagtcacctgt  
gcaacatcaaaaagtaatctggaaccccaatcatatggaacagtgctggagccccagtggtgaagctggaaaaaacaccagttgaaacaaa  
aaagtctcttttaagtaaatattcaagggttaattatggaaaattttactgtagataactcaacattctcgagagcccaagtaaggcc  
actttctacccaaaatttgagaatgagaaatcagatcaggagatcaggacaaggatgatagagatggctcctcaaaaggcttggctatagtga  
ggctcacacttaagcattctggatctctttttatgtatgctgggatgaagggtggagcatatgccaagaatagcttccgggaatctataactg  
ccgttggcgtcttctgtcttggacggatgttctgtgagcagtggtgggaactaaagcaagcaagaagcaagcagagttcaatgagttcttctgag  
cgcaactgatgtgcatacaatggagttggtcagggcagtggtgggggaccaggaacacgcccacagagatgattaagcgttctgactgc  
agtcacggagttgggaaatggaaaaccaactttctattcaactcccagtgtaattgcttttgcagggaatggcgaattaccaacaaaatcagt  
tatggctgttctcaacaaggaaatcagtgacttcttcttctgtctgctatgatgactttgaggaaggatcagcaaccaccgttctgagag  
gctctcagcgaagttgctgataattctgtacctggatcaaaagaccataaaaagtgcagggtgaaatttggagggtctctggtggcccgcat  
cgtaaacgtgagagctcagagcatatggagcgggttctgagagatttctctctccgccatcagaggggtgaggggttggacctgggacct  
cgttacgtgaaatttggctgcaaacagatcagaaaagcagcaataaaaggcacttctcagagtgctggcagcggcttctgcccgaattat  
ttggactgggttggagatgaaaactctggttcacattcaagaaatgctgactgctgctcctcaaaagtcttacaactcacatctctgctga  
tctttatacaggaaaaatacaggaaatgggttctgctgaggggaaaagcgttctctctgctgctttcaagtgctcattataacttacaataaaa  
ttaatgatgtatcagtaacaacctgcctttcaaatgggtgacatgatataatgagttcaggcttccgcccgttaccagaaagagatgagg  
cacaaccaggactatggcctttgtatcgaggcttttctgtgacctggatttatacagggtcaatgagaagaaaactgctgaaatggcagg  
aagcaacaatcaaatggtaaaaaatgtggaagaggacaacagtttagctgatgaagatgcaaatctgagtggtcaagatgaaatttcttactt  
acaagttgagaacttttttctgactccgtaattggcttctgactctttcaaaagaaaggaccttctgctgataagctcttattacctgaggcaaatg  
aaaaattggaatacttcagcagccaagcaacgagaactcagcaagatgcttgaatgggagcagtaataatcgcagaaaatagggaaacaa  
accattgtcatcatccacatacctaagtgaagctgagccttcttgaacaataatgcaagcgtagtcacacaaatcagcttctgtaggat  
ctgctggaaaatttctcaaaagtgaagatttctggttgaaggagaagatgaagaggggtgactcagcctgcaagaaatgagaaatgct  
cctcaagcccttagtaattccaccagagacatgggtggcaagaaatgagggctcattatttcttccagaaatcaccaggttctgctaaatc  
tgcaacttggtaaggaaatcagtaactcagaggggtctggagatgactcagcagtgtaaacagtttaaggggtgacttataaagctagat  
attggcaaaaagtgtctgtagaacgtcgaagaaaaccttactcagatcagcttctgctgacaagaatgacacaaaatgaggaagatggaacaa  
attgagaacatgtgcctaaagcaccggagcactctgctatctcagttatcctgattcagaaggaaactgaaactaatccattctctattgatgc  
acttggcgtttttatattccgagctactcaccgtgtcaatcatccgggaaaactctgacaagtcactcctcaaatgctggaatgtagtgc  
tgctttatcacctttatgagaaagagccgtcaggagttcagagtgagcttattgaacgtttggatcagcttgcagaatcaccaggttctgctaaatc  
aaacctgagaggtctctcttccggattctgtgaggtctattatcagaggaggactcagctctgtacagactcacaacgaaacatggaag  
attggagctcacaaggagacataatgacaagagtggttaaatgggagaagcaattgagagatattctacttggaaatgcagactatctca  
attcaatacaggttccatttgaatttgcggttaagaaagtccttgaacaactgaaagtatttgcgagggggcgaatagcagtgccctgctgag  
aagaggaagctaggatccattgtattcgcgctatcagcctgccagttccagaaatctaggtctcttaaatgatctagcaaaagaaagatcc  
aaaggttggccttattcaataggaacaagacatggagagcagcattcagaagcccaactctaccctggctcacaagagaagcagctgctgca  
ctgcaagtgccaattacggttcttctctcatcaaaaggtgccaagtagcagtgctgcttcttctcctccgataaaattggctgcaactagaa  
gctgagcctggctctgttgaaggtgaaaagatcaattctaaaaactcagggcccaatcacattatggctctggtgcaggagtgccgcaaa  
agatgccaatacactaccaggttactttcccaagggaaggctacccgacttgatataaatccaccggctcactataactggcactctcgaat  
tcttttga

Proteína (1167 aa)

MSVSHRVIYSFTHYKLYNLSSLSLSPSRIFPPFQSPFHTFSSLMPNNOERGGYEGKKWQVRPSSNRVPGSSSNVEPVSAAAEAITDRLK  
SVDITESGAQSSVPTSLQFGSVGLAPQSPVQHOKVIWPKPSYGTVSGAPVVEAGKTPVEQKSAALLSKLFGNLLNFTVDNSTFSRAQVRA  
TFYPKFENEKSDQEIRTRMIEMVSKGLAIVEVTLKHSGSLFMYAGHEGGAYAKNSFGNIYTAGVVFVLRGMFREAAGTKASKKQAEFNEFLE  
RNRMCISMELVTAVALGDHGRPRDDYAVVTAATELGNKPTFYSTPDVIAFCREWRLPTNHVWLFSTRKSVTSFFAAAYDALCEEGTATTVCE  
ALSEVADISVPGSKDHIKVQGEILEGLVARIVKRESSEHMERVLRDFPPPPSEGEGLDLPGLREICAAANRSEKQKIKALLQSAGTAFCPNY  
LDWFGDENSGSHSRNADRSVVSKEFLQSHPADLYTGKIQEMVRLMREKRFPAAFKCHYNLHKINDVSSNNLPFKMVIHVYSDSGFRRYQKEMR  
HKPGLWPLYRGGFFVLDLDFKVNKKTAEMAGSNNQMVKNVEEDNSLADEDANLMVMKMKFLTYKLRFTLIRNGLSTLFKEGSPAYKSYVLRQM  
KIWNTSAKQRELSKMLDEWAVYIRRYGNKPLSSSTYLSEAEFFLEQYAKRSPQNHALIGSAGNFVKVEDFMAIVEGEDEEGDLEPAKDIA  
PSSPSISTRDMVAKNEGLIIFPPGIPGCAKSAALCKEILNAPGGLDGDRPVNSLMGDLIKGRYWQKVADERRRKPYSINLADKNAPNEEVVKQ  
IENMCLSTGASAIPIVDPDEGTETNPFSDALAVFIFRVLHRVNHGPNLDKSSPNAGYVMLMFYHLYDGKSRQEFESLIERFGSLVRIPL  
KPERSPLPDSVRSIIIEGLSLYRLHTTKHGRLESTKGTYYQEVWKWEKQLRDLILGNADYLNLSIQVPFEFAVKEVLEQLKVIARGEYAVPAE  
KRKLGSIVFAAISLFPVEILGLLNDLAKKDPKVGDFIKDKSMESIQKAHLTLAHRKSHGVTAVANYGSFLHQKVPVDVAALLFSDKLAALAE  
AEPGSVEGEKINSKNSWPHITLWSGAGVAAKDANTLPQLSQKATRIDINPPVTITGTFLEFF\*

Figura 34.- Secuencia codificante nucleotídica (arriba) y aminoacídica (abajo) completa de la tRNA ligasa de berenjena.

Al alinear la secuencia aminoacídica completa de la tRNA ligasa de berenjena (Fig. 34) con las homólogas de *A. thaliana* y tomate (Fig. 35), se observó que las de tomate y berenjena eran prácticamente idénticas (88% de identidad y 92% de similitud) y no muy distintas de la de *A. thaliana*. Respecto a esta última, la secuencia de la tRNA ligasa de tomate presentaba un 58% de identidad y un 71% de similitud, mientras que la secuencia de berenjena era idéntica en un 59% y similar en un 73%, confirmando así la alta conservación de la tRNA ligasa entre especies de plantas. En esta última figura se observa



**Figura 35.- Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la tRNA ligasa de tomate (*Solanum lycopersicum*), berenjena (*Solanum melongena*) y *A. thaliana*. El nombre de cada especie se indica a la izquierda. Los aminoácidos conservados en todas las especies se resaltan en negro, y en gris, los conservados sólo en dos de ellas.**

además que la secuencia de tomate disponible en el laboratorio (Molina-Serrano, Flores y Darós, datos no publicados) no contiene el péptido de tránsito al cloroplasto, por lo que se trata de una secuencia incompleta.

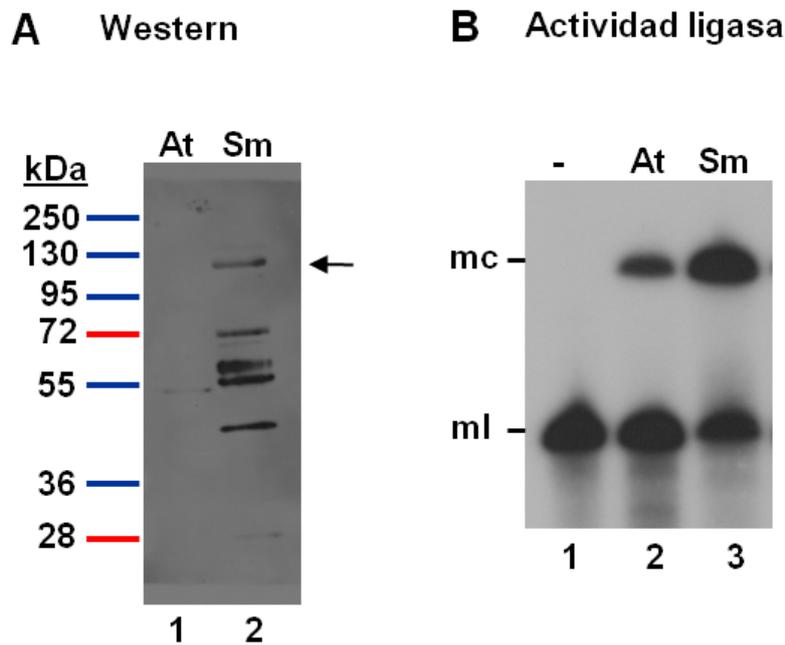
Una vez conocida la secuencia nucleotídica completa del mRNA de la tRNA ligasa de berenjena (Fig. 34), se diseñaron cebadores para la amplificación del cDNA completo y su clonación en el vector de expresión heteróloga en *Escherichia coli* pET23d(+) mencionado anteriormente (apartado 1.7). A partir de la preparación de RNA total de berenjena previamente descrita, se llevó a cabo una retrotranscripción con el cebador específico C29 que hibrida en la región 3' no traducida del mRNA. El cDNA generado se empleó como molde para una primera PCR con los cebadores C30 y C31, sometiéndose el producto obtenido a una segunda PCR imbricada con los cebadores C32 y C33 que en sus extremos 5' contienen colas con sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Nco*I y *Not*I, respectivamente. El producto de la amplificación se clonó por tanto de forma dirigida entre los sitios *Nco*I y *Not*I del plásmido de expresión pET23d(+). La construcción resultante se mutagenizó posteriormente de forma que la secuencia exacta de la proteína quedara fusionada a la cola de seis histidinas en el extremo C-terminal sin aminoácidos extra y en pauta. Con este fin se delecionaron dos regiones, una de 4 pb en 5' y otra de 15 pb en 3' mediante dos rondas de mutagénesis por PCR: una primera con los cebadores C34 y C35 (delección en 5') y una segunda con los cebadores C36 y C37 (delección en 3'), generándose así la construcción pEtRnlSm.

## 2.2 Clonación de la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto de la tRNA ligasa de *A. thaliana*

La clonación de la secuencia codificante de este péptido se realizó también mediante 5' RACE circular desde el extremo 5' conocido del mRNA (AC026875) (Englert *et al.*, 2007), sirviendo además como control de la metodología 5' RACE circular empleada. A partir de una preparación de RNA total de *A. thaliana* obtenida por homogenización en tampón con urea 5 M y purificada en columna de gel de sílice, se generó un cDNA con el cebador C38 que hibrida en la región 5' del mRNA. Este cDNA se circularizó con T4 RNA ligasa 1 y se empleó como molde para las reacciones de PCR imbricadas con los cebadores divergentes C39 y C40 en la primera reacción, y los cebadores divergentes (internos a los primeros) C41 y C42 en la segunda reacción. El fragmento amplificado de unas 500 pb se clonó y secuenció, determinándose así la secuencia de 175 pb que codifica el péptido de tránsito al cloroplasto de la tRNA ligasa de *A. thaliana*, que resultó idéntica al compararla con la ya publicada (Englert *et al.*, 2007). Esta secuencia se obtuvo a partir de la preparación de RNA total: la síntesis del cDNA se realizó con el cebador específico C42 y la amplificación por PCR, con los cebadores C43 y C44. Puesto que el laboratorio se disponía de la construcción pERnI resultante de clonar la tRNA ligasa de *A. thaliana* sin el péptido de tránsito en el vector pET23a(+) (Novagen), el fragmento amplificado de 175 pb se clonó en este plásmido en fase con el resto de la secuencia de la proteína. La clonación se realizó amplificando por PCR el plásmido pERI con los cebadores C45 y C46, y ligando el fragmento de 175 pb con extremos romos: la nueva construcción se denominó pEtRnIAt.

## 2.3 Expresión en *E. coli* de las tRNA ligasas de berenjena y *A. thaliana* y análisis de su actividad enzimática

Los plásmidos pEtRnISm y pEtRnIAt se electroporaron en la cepa Rosetta 2 de *E. coli* y se procedió a la expresión heteróloga de las tRNA ligasas de berenjena y *A. thaliana*. Estas proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad en columna de Ni-Sefarosa eluyéndose diez fracciones en cada caso. La medida de la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm mostró una máxima concentración de proteínas en la tercera fracción. La presencia de las tRNA ligasas de berenjena y *A. thaliana* en dicha fracción se determinó por PAGE-SDS y análisis *Western* con un anticuerpo monoclonal de ratón (conjugado a la peroxidasa de rábano) que reconoce específicamente la cola de seis histidinas (*6xHis mAb/HRP Conjugate*, Clontech).



**Figura 36.- Expresión y purificación de la tRNA ligasa de *A. thaliana* (At) y berenjena (Sm).** (A) La presencia de la tRNA ligasa de *A. thaliana* (carril 1) y berenjena (carril 2) en la tercera fracción eluida de la columna de Ni-Sefarosa se determinó por PAGE-SDS (10%) y análisis *Western*. La masa molecular de los marcadores (en kDa) se indica a la izquierda. (B) Análisis de la actividad enzimática de la tRNA ligasa de *A. thaliana* (carril 1) y berenjena (carril 2) en la tercera fracción eluida de la columna de Ni-Sefarosa. Los productos de la reacción se separaron por PAGE desnaturalizante (5%) y se detectaron por hibridación *Northern*. (1) Control negativo sin proteína. Las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del ELVd se indican a la izquierda.

La tRNA ligasa de berenjena se expresó mucho más eficientemente que la de *A. thaliana* (Fig. 36A, comparar carriles 1 y 2), detectándose en el primer caso una banda de 130 kDa correspondiente a la tRNA ligasa (Fig. 36A, carril 2) y una serie de bandas de mayor movilidad correspondientes a proteínas de menor tamaño que posiblemente son productos de la degradación de la primera. Sin embargo, el ensayo de ligación empleando como sustrato el ml (+) del ELVd abierto por el sitio de autocorte con extremos 5'-OH y 2',3'>P mostró actividad de ligación en ambas fracciones (Fig. 36B, carriles 2 y 3), siendo ésta mayor en berenjena, posiblemente por haberse purificado en mayor cantidad. Este resultado indica que, efectivamente, las tRNA ligasas de berenjena y *A. thaliana* son capaces de ligar muy eficientemente *in vitro* la forma fisiológicamente relevante del ELVd. Dado que el objetivo principal del presente trabajo fue determinar la posible implicación de la tRNA ligasa de berenjena, el huésped natural del ELVd, en el ciclo replicativo de este viroide cloroplástico, y teniendo en cuenta el bajo rendimiento obtenido con la tRNA ligasa de *A.*

*thaliana*, la subsiguiente caracterización de la actividad de ligación se llevó a cabo únicamente con la enzima de berenjena.

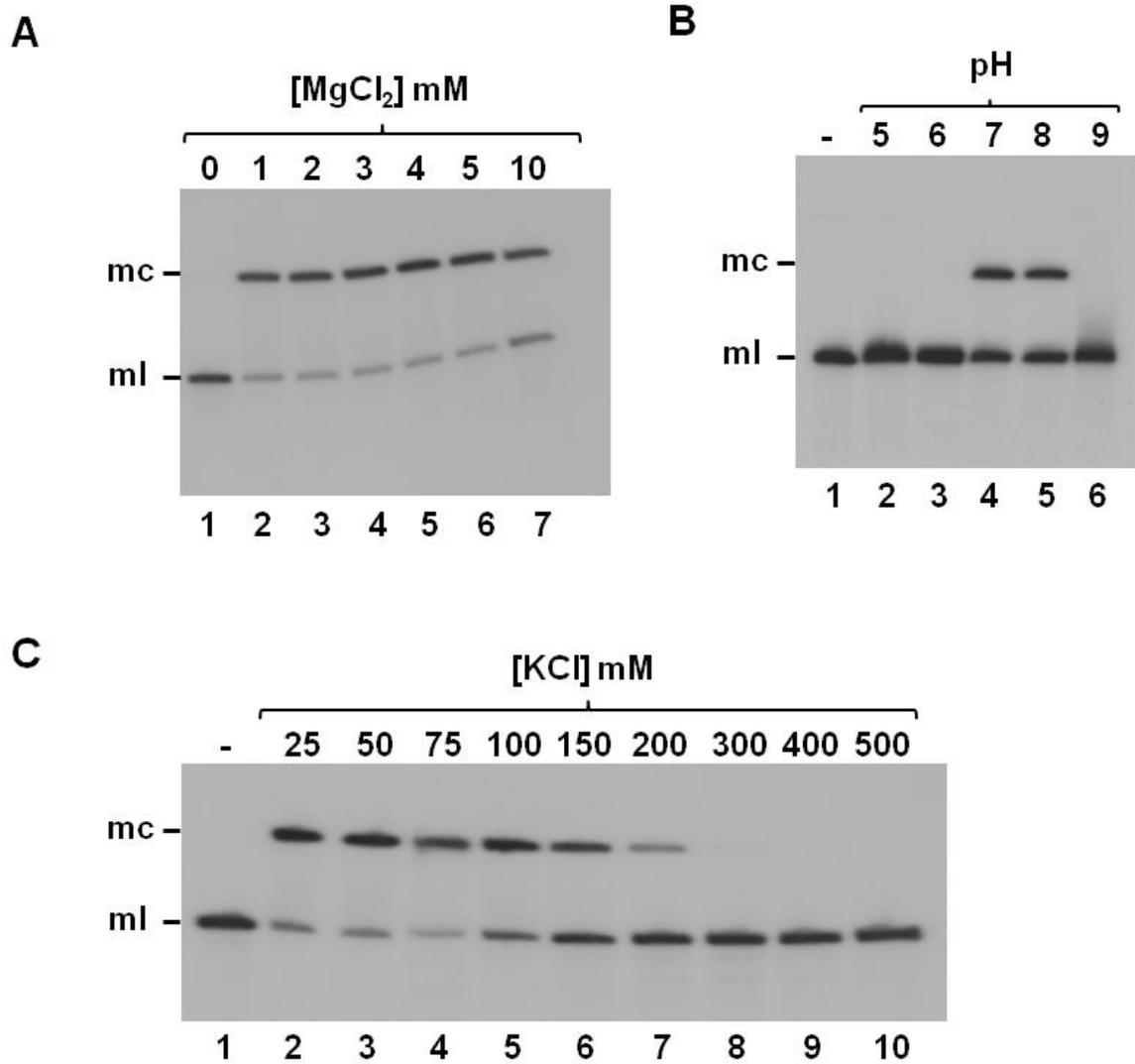
## **2.4 Caracterización de la actividad ligasa de la tRNA ligasa de berenjena**

### **2.4.1 Condiciones óptimas de la reacción de ligación: efecto del MgCl<sub>2</sub>, el pH y la fuerza iónica en la actividad**

Una alícuota de la fracción 3 con la máxima actividad, dializada frente a un tampón de baja fuerza iónica sin Mg<sup>2+</sup> [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1% Nonidet P40], se empleó para determinar las condiciones óptimas de la reacción de ligación. En primer lugar se ensayó la actividad enzimática en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>. Como era de esperar, la tRNA ligasa de berenjena sólo mostró actividad en presencia de MgCl<sub>2</sub>, con una concentración óptima en torno a 4 mM (Fig. 37A). En lo referente al pH de reacción óptimo, la tRNA ligasa de berenjena únicamente presentó actividad a pH fisiológico, es decir, en el intervalo de pH de 7 a 8 (Fig. 37B, carriles 4 y 5).

La actividad de la fracción dializada se ensayó también a concentraciones crecientes de KCl (entre 25 y 500 mM), observándose un máximo en torno a 50 mM KCl (Fig. 37C, carril 3) y una inhibición en condiciones de mayor fuerza iónica a partir de 200 mM KCl (Fig. 37C, carriles 7 a 10).

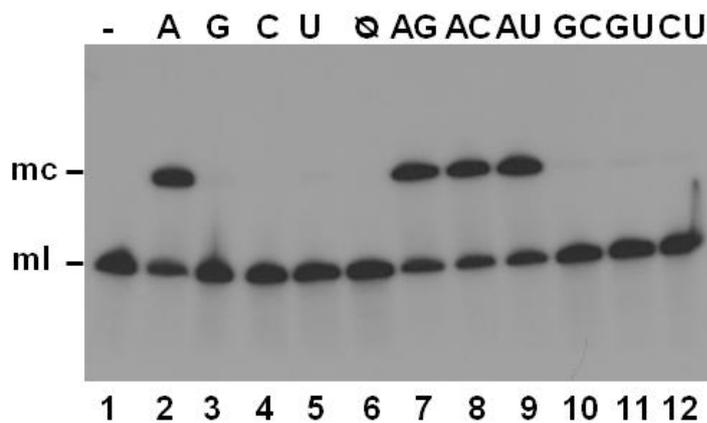
Tomando en consideración todos estos resultados, en los siguientes experimentos se ensayó la actividad de ligación en un tampón 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub> y 5 mM DTT.



**Figura 37.- Condiciones óptimas de la reacción de ligación catalizada por la tRNA ligasa de berenjena.** Análisis por PAGE desnaturalizante e hibridación *Northern* de los productos resultantes de la ligación en diferentes condiciones. (A) Efecto del MgCl<sub>2</sub>. (1) Reacción en ausencia de MgCl<sub>2</sub>; (2 a 7) reacciones en presencia de concentraciones crecientes de MgCl<sub>2</sub> (indicadas en la parte superior). (B) Efecto del pH. (1) Control negativo en ausencia de proteína; (2 a 6) reacciones a pH 5, 6, 7, 8 y 9, respectivamente. (C) Efecto de la concentración de KCl. (1) Control negativo en ausencia de proteína; (2 a 10) reacciones en presencia de concentraciones crecientes de KCl (indicadas en la parte superior). Las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del ELVd se indican a la izquierda de cada panel.

### 2.4.2 Requerimiento de ribonucleósido trifosfato

La tRNA ligasa emplea una molécula de GTP o de ATP para la fosforilación del grupo 5'-OH del RNA y otra molécula de ATP para adenilarse, siendo posteriormente transferido el grupo AMP al extremo 5'-P (Abelson *et al.*, 1998). La dependencia del ATP de la tRNA ligasa de berenjena se estudió ensayando la actividad de la fracción dializada empleando como sustrato el ml (+) del ELVd abierto por el sitio de autocorte (con extremos 5'-OH y 2',3'>P) en presencia de 1 mM ATP, GTP, CTP o UTP, así como de combinaciones de dos de ellos y en ausencia de cualquier nucleósido trifosfato. Como era de esperar, únicamente se observó actividad en presencia de ATP, tanto sólo como en combinación con los otros tres nucleósidos trifosfato (Fig. 38, carriles 2, 7, 8 y 9).



**Figura 38.- Requerimiento de ribonucleósido trifosfato de la tRNA ligasa de berenjena.** Análisis por PAGE desnaturalizante e hibridación *Northern* de los productos resultantes de la ligación en presencia de 1 mM ATP (2), GTP (3), CTP (4), UTP (5), en ausencia de nucleósido trifosfato (6), y en presencia de combinaciones de dos nucleósidos trifosfato (7 a 12). El control negativo en ausencia de proteína se muestra en (1) y las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del ELVd se indican a la izquierda.

## 2.5 Especificidad de sustrato de la tRNA ligasa de berenjena

Con el fin de profundizar en la posible implicación de esta enzima en el ciclo replicativo de los viroides cloroplásticos, se analizó su especificidad de sustrato respecto a la posición de apertura del RNA monomérico lineal del ELVd, así como respecto a otros RNAs viroidales cloroplásticos.

De manera más específica se comparó la ligación del RNA monomérico lineal de polaridad positiva del ELVd (con extremos 5'-OH y 2',3'>P) abierto por el sitio de autocorte con la ligación de otros cinco RNAs monoméricos lineales de polaridad positiva del ELVd con idénticos extremos, pero abiertos en diferentes posiciones: (1) A263-G264, (2) U245-U246, (3) U176-C177, (4) A103-A104 y (5) U89-U90. Estas posiciones se encuentran en bucles de distinta clase excepto una localizada en una región de doble cadena en la estructura secundaria de mínima energía libre del ELVd (Fig. 39B). Es interesante destacar que tan sólo la forma fisiológicamente relevante del ELVd, es decir, el RNA monomérico lineal abierto por el sitio de autocorte, fue ligada eficientemente por la tRNA ligasa de berenjena (Fig. 39A, carril 7).

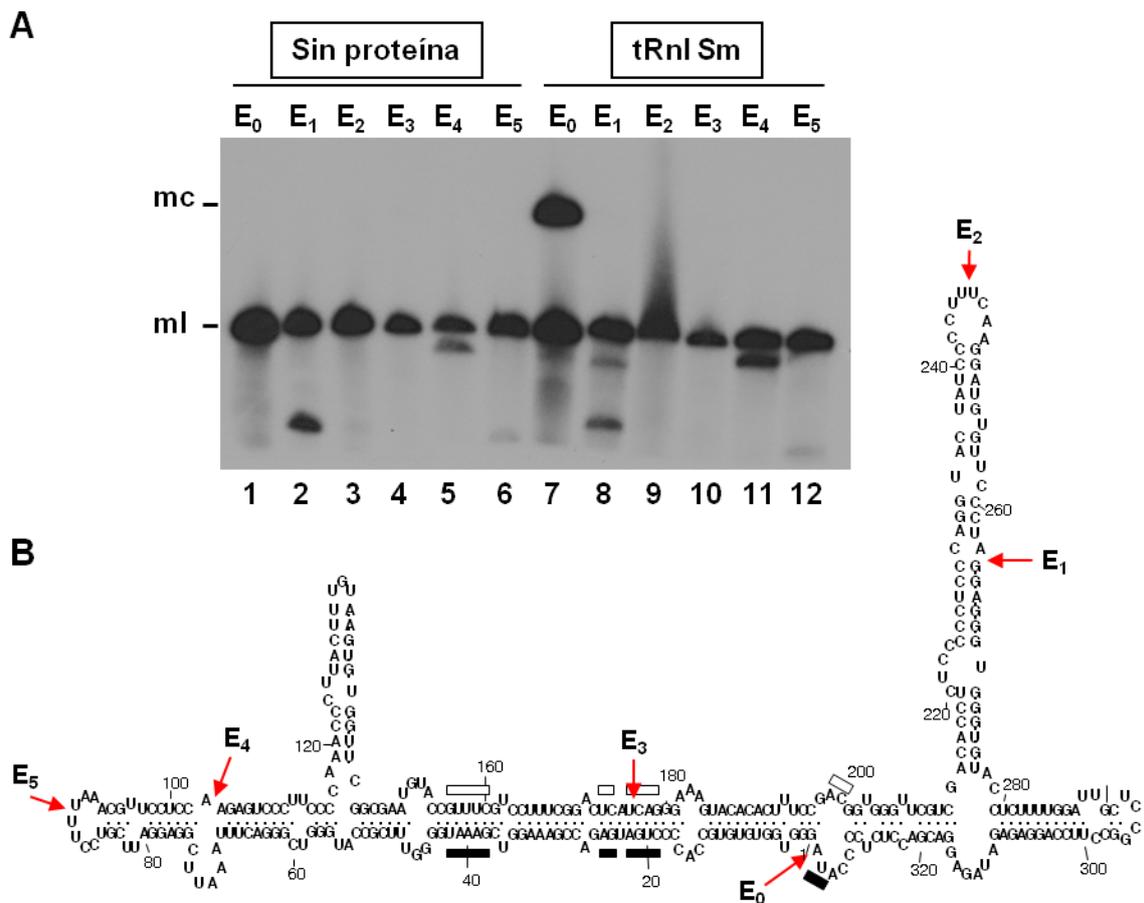
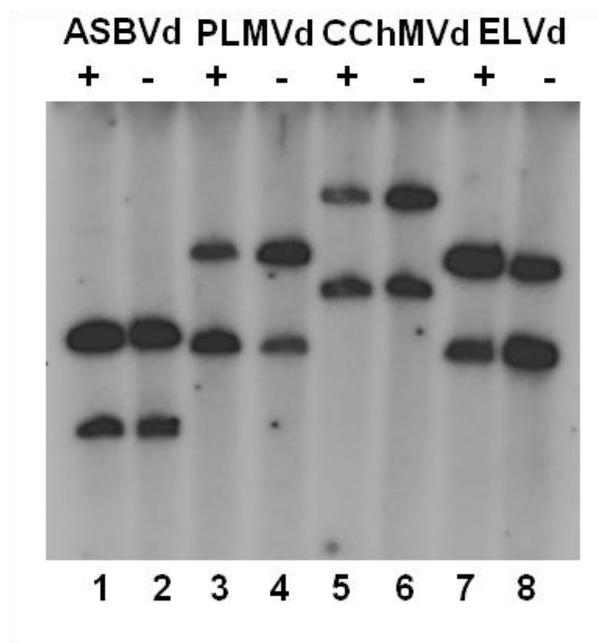


Figura 39.- **Especificidad de sustrato de la tRNA ligasa de berenjena.** (A) Análisis por PAGE desnaturalizante e hibridación *Northern* de los productos resultantes de la ligación (carriles 7 a 12) empleando como sustrato el RNA monomérico lineal de polaridad positiva del ELVd (con extremos 5'-OH y 2',3'-P) abierto en diferentes posiciones (E<sub>0</sub> a E<sub>5</sub>). Los controles negativos sin proteína se muestran en los carriles 1 a 6. Las posiciones del RNA monomérico circular (mc) y lineal (ml) del ELVd se indican a la izquierda de cada panel. (B) Esquema de la estructura secundaria de mínima energía libre del ELVd mostrando las posiciones por las que están abiertos los diferentes sustratos: E<sub>0</sub> (A333-G1), E<sub>1</sub> (A263-G264), E<sub>2</sub> (U245-U246), E<sub>3</sub> (U176-C177), E<sub>4</sub> (A103-A104) y E<sub>5</sub> (U89-U90). Las barras indican los nucleótidos conservados que intervienen en la formación de las ribozimas de cabeza de martillo en la polaridad positiva (negro) y negativa (blanco).

Como se ha comentado anteriormente, la tRNA ligasa emplea una molécula de GTP o de ATP para la fosforilación del grupo 5'-OH y otra molécula de ATP para adenilarse y transferir posteriormente el grupo AMP al nuevo extremo 5'-P (Abelson *et al.*, 1998). Por lo tanto, llevando a cabo la reacción de ligación en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , es posible detectar los sustratos fosforilados *de novo* por la tRNA ligasa previamente a su ligación. Al ensayar en estas condiciones la ligación de los RNAs monoméricos lineales de ambas polaridades de los cuatro miembros de la familia *Avsunviroidae* (ASBVd, PLMVd, CChMVd y ELVd), todos ellos abiertos por sitio de autocorte y con extremos 5'-OH y 2',3'>P, la tRNA ligasa de berenjena se mostró capaz de ligar todos ellos muy eficientemente (Fig. 40), lo que era de esperar dada la alta conservación de esta enzima entre especies (Fig. 33 y 35).



**Figura 40.- Ligación de los cuatro viroides miembros de la familia *Avsunviroidae* por la tRNA ligasa de berenjena.** Análisis por autorradiografía de la actividad de ligación de la tRNA ligasa de berenjena empleando como sustrato los RNAs monoméricos lineales de polaridad positiva (+) y negativa (-) de los cuatro miembros de la familia *Avsunviroidae*: ASBVd (carriles 1 y 2), PLMVd (carriles 3 y 4), CChMVd (carriles 5 y 6) y ELVd (carriles 7 y 8), todos abiertos por sitio de autocorte y con extremos 5'-OH y 2',3'>P. La banda superior corresponde en cada caso al RNA monomérico circular y la inferior al lineal.

En resumen, los resultados obtenidos indican que la tRNA ligasa de berenjena circulariza muy eficientemente la forma fisiológicamente relevante del ELVd y de los otros viroides cloroplásticos, sugiriendo que ésta es la enzima que cataliza la etapa final del ciclo replicativo de los viroides cloroplásticos.

# DISCUSIÓN

---



La replicación de los viroides ocurre a través de un mecanismo de círculo rodante (Branch y Robertson, 1984) con intermediarios exclusivamente de RNA (Grill y Semancik, 1978). Se han propuesto dos variantes alternativas: la asimétrica para los miembros de la familia *Pospiviroidae* (Branch y Robertson, 1984; Ishikawa *et al.*, 1984) y la simétrica para los de la *Avsunviroidae* (Hutchins *et al.*, 1985; Bussière *et al.*, 1999) (Fig. 4). La diferencia entre ambas variantes viene determinada por el molde de polaridad (-). En la variante asimétrica tan sólo las cadenas oligoméricas de polaridad (+) son cortadas y ligadas, mientras que en la simétrica las dos reacciones ocurren en las cadenas de ambas polaridades. En cualquier caso, y de forma general, el mecanismo consta de tres etapas: (1) transcripción RNA-RNA que origina cadenas viroidales oligoméricas, (2) corte de estos oligómeros a monómeros lineales, y (3) circularización de estos últimos. Al carecer de capacidad codificante, el RNA viroidal depende de factores del huésped para llevar a cabo estas tres etapas del ciclo replicativo (transcripción, corte y ligación). Los datos disponibles indican que la transcripción del PSTVd y otros miembros de la familia *Pospiviroidae* está mediada por la RNA polimerasa II nuclear (Mühlbach y Sängner, 1979; Flores y Semancik, 1982; Schindler y Mühlbach, 1992; Warrilow y Symons, 1999) mientras que en la transcripción del ASBVd y otros miembros de la familia *Avsunviroidae* la enzima implicada es la RNA polimerasa cloroplástica de codificación nuclear (*nuclear encoded polymerase*, NEP) (Navarro *et al.*, 2000). La segunda etapa de la replicación, el corte de los oligómeros para generar los monómeros lineales, ocurre de forma autocatalítica en la familia *Avsunviroidae* y está mediada por ribozimas de cabeza de martillo (Hutchins *et al.*, 1986; Prody *et al.*, 1986; Forster y Symons, 1987; Darós *et al.*, 1994); en la familia *Pospiviroidae*, sin embargo, esta reacción parece estar mediada por una RNasa de la clase III (Gas *et al.*, 2007; Gas *et al.*, 2008). La última etapa del ciclo replicativo, la ligación de los RNAs

monoméricos lineales para dar lugar a las moléculas circulares, es la peor conocida. Aunque se ha propuesto que la ligación de los viroides cloroplásticos (familia *Avsunviroidae*) podría ocurrir, al igual que el corte, de forma autocatalítica generando un enlace atípico (Lafontaine *et al.*, 1995; Côte y Perreault, 1997; Côte *et al.*, 2001), otros datos apuntan a la implicación de una función específica del huésped en esta reacción (Reid y Lazinski, 2000; Delgado *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2009). Por otra parte, estudios recientes *in vitro* e *in vivo* (Gas *et al.*, 2007; Gas *et al.*, 2008) proponen que la circularización de los viroides nucleares (familia *Pospiviroidae*) está catalizada por una actividad RNA ligasa, no descrita hasta el momento en plantas, capaz de ligar los extremos que presentan los intermediarios lineales *in vivo* [5'-fosfomonoéster (5'-P) y 3'-hidroxilo (3'-OH)]. En este contexto, el objetivo del presente trabajo ha sido identificar los factores del huésped implicados en esta última etapa de la replicación de los viroides de ambas familias.

## 1. Circularización de los viroides nucleares (familia *Pospiviroidae*)

Durante bastante tiempo se ha asumido que la enzima implicada en la circularización de los monómeros lineales (+) de los viroides nucleares es la tRNA ligasa o una enzima similar, teniendo en cuenta datos mostrando la capacidad de la tRNA ligasa de germen de trigo de circularizar *in vitro* el RNA monomérico lineal del PSTVd (Branch *et al.*, 1982; Kikuchi *et al.*, 1982). Sin embargo, el descubrimiento de que los monómeros lineales de un miembro representativo de la familia *Pospiviroidae* presenta extremos 5'-P y 3'-OH (Gas *et al.*, 2008) sugiere la existencia en plantas de una nueva actividad RNA ligasa específica de este tipo de extremos, que mediaría el paso de circularización de estos viroides en el núcleo.

El ensayo de la ligación *in vitro* del RNA monomérico lineal (+) del PSTVd, abierto por el sitio de procesamiento fisiológico G95-G96 (Gas *et al.*, 2007) y con extremos 5'-P y 3'-OH, en presencia de una preparación de proteínas de tomate, huésped experimental de este viroide, ha permitido detectar una actividad enzimática capaz de circularizar eficientemente el RNA viroidal. Dicha preparación de proteína se obtuvo mediante homogenización del tejido, clarificación, y fraccionamiento por cromatografía en columna de heparina, un polianión empleado para el fraccionar proteínas de unión a ácidos nucleicos. Se constató además que la actividad detectada reside en una proteína diferente de la tRNA ligasa, la única de esta clase conocida en plantas, ya que no liga los extremos 5'-OH y 2',3'-P característicos de los sustratos de esta última (Konarska *et al.*, 1982). Por otro lado, el enlace generado por la nueva actividad RNA ligasa de tomate parece ser un enlace típico 3'-5' fosfodiéster, que es el que presentan los viroides nucleares y que generan la mayoría de las RNA ligasas descritas. La nueva actividad, que utiliza ATP y Mg<sup>2+</sup> como cofactores,

mostró además alta especificidad respecto a los grupos terminales, así como a la posición por la que se encuentra linearizado el RNA sustrato, ligando exclusivamente el PSTVd lineal abierto en el sitio de procesamiento fisiológico. La T4 RNA ligasa 1 también mostró una preferencia diferencial en la ligación de los RNAs monoméricos viroidales abiertos en diferentes posiciones, si bien no tan acusada como la actividad de tomate. Este resultado sugiere que existen requerimientos de estructura o secuencia más estrictos en la reacción catalizada por esta última: bien el plegamiento de la molécula de RNA a ligar, bien los nucleótidos terminales o el contexto nucleotídico en torno al sitio de ligación desempeñan un papel fundamental en dicha reacción. Las estructuras cristalográficas de diferentes ligasas de DNA y RNA unidas a sus sustratos han mostrado que el correcto alineamiento de los extremos polinucleotídicos a ligar es importante en la reacción (Pascal, 2008), por lo que en estos casos parece ser la estructura de los sustratos lo que restringe la ligación.

La reacción catalizada por las ligasas de RNA y DNA ocurre típicamente en tres pasos (Shuman y Lima, 2004; Pascal, 2008). En primer lugar, la enzima se adenila uniéndose covalentemente al AMP y liberándose PPI del ATP (o del NAD<sup>+</sup>, según el caso). Posteriormente la enzima transfiere el AMP al extremo 5'-P del ácido nucleico sustrato, que finalmente sufre un ataque nucleofílico del extremo 3'-OH dando lugar al nuevo enlace. En este contexto, la identificación de los dos intermediarios, enzima adenilada y sustrato adenilado, sugiere que efectivamente la nueva actividad RNA ligasa de tomate actúa a través del mecanismo de reacción típico de las nucleotidiltransferasas covalentes.

El análisis de la actividad de adenilación de las diferentes fracciones cromatográficas en presencia de  $\alpha$ ATP (marcado con <sup>32</sup>P) en relación a la actividad de ligación de dichas fracciones permitió además asignar un tamaño específico a la proteína presumiblemente responsable de la reacción de ligación. El tamaño del intermediario proteico adenilado (90 kDa) resultó significativamente menor al de la tRNA ligasa [130 kDa, incluyendo el péptido de tránsito al cloroplasto (Englert *et al.*, 2007)] y mayor al de la T4 RNA ligasa 1 [43 kDa (Snopek *et al.*, 1976)] o al de la T4 RNA ligasa 2 [38 kDa (Ho y Shuman, 2002)].

Las proteínas contenidas en la fracción más activa con una masa molecular de entre 72 y 95 kDa se analizaron por espectrometría de masas, sugiriendo los resultados que la actividad RNA ligasa residía en la DNA ligasa 1, pues presenta características muy similares a las observadas para la actividad RNA ligasa de tomate: masa molecular de 90 kDa, actividad polinucleótido ligasa específica de extremos 5'-P y 3'-OH, y requerimiento de ATP y Mg<sup>2+</sup> como cofactores (Taylor *et al.*, 1998). Además, en el contexto fisiológico de la replicación de los viroides nucleares, la proteína implicada en su circularización debe tener

localización nuclear, como ocurre con la DNA ligasa 1. Y puesto que los viroides son capaces de redirigir la especificidad de molde de las RNA polimerasas que los transcriben (que son dependientes de DNA) (Mühlbach y Sängner, 1979; Flores y Semancik, 1982; Warrilow y Symons, 1999; Navarro *et al.*, 2000), parece plausible que puedan hacer algo similar con las ligasas que los circularizan.

Tras clonar y expresar en *E. coli* la DNA ligasa 1 de tomate, los ensayos *in vitro* con la proteína recombinante confirmaron para la misma un perfil de adenilación consistente con el observado para la actividad RNA ligasa de tomate, y capacidad de circularizar *in vitro* el PSTVd lineal abierto por el sitio de procesamiento fisiológico generando una molécula viroidal circular infecciosa. Sin embargo, no presentó actividad de ligación al emplear como sustrato el monómero lineal del PSTVd abierto en posiciones diferentes a la fisiológica, a pesar de contener extremos 5'-P y 3'-OH.

En estudios previos se ha observado que la DNA ligasa bacteriana *LIG1* y la del virus de *Chlorella* unen sustratos en los que la cadena situada en el extremo 3' de la muesca es RNA (Sriskanda y Shuman, 2001; Pascal *et al.*, 2004). Incluso se ha observado que algunas DNA ligasas bacterianas dependientes de ATP requieren un ribonucleótido en el extremo 3'-OH reactivo para una actividad óptima (Zhu y Shuman, 2008). Sin embargo, no existen datos acerca de DNA ligasas capaces de unir dos sustratos de RNA, lo que resalta la novedad de los resultados aquí presentados. En un contexto evolutivo, se considera que las ligasas actuales evolucionaron a partir de un dominio nucleotidiltransferasa (NTasa) ancestral que operaba sobre sustratos de RNA (Nandakumar y Shuman, 2004; Shuman y Lima, 2004). Esta hipótesis viene sustentada por el estudio de las estructuras cristalográficas de ciertas ligasas de DNA y RNA unidas a sus ácidos nucleicos sustrato, habiéndose identificado que el correcto alineamiento de los extremos polinucleotídicos requiere una conformación del sustrato de tipo RNA en el entorno de la muesca (Pascal, 2008). Aparentemente, para poder unir sustratos de DNA, las DNA ligasas han modificado sus dominios NTasa y han incorporado un dominio OB para alterar las dimensiones del surco menor y facilitar localmente una forma de tipo RNA en un sustrato de DNA. Es en el extremo 5' en el que parece residir la especificidad de sustrato de las ligasas de DNA. Parece ser que la interacción del dominio OB con el dúplex de DNA en la parte 5' de la muesca requiere una conformación de tipo B del sustrato (presente en el DNA), que permite a las DNA ligasas seleccionar estos sustratos frente a otros con una forma A (de RNA) en la región 5' de la muesca (Sriskanda y Shuman, 1998; Pascal *et al.*, 2004). Por su parte, el dominio NTasa de la T4RnI2 media interacciones con el surco menor del sustrato que parecen seleccionar a sustratos de RNA frente a DNA en la parte 3' de la muesca

(Nandakumar *et al.*, 2006). Estos resultados resaltan que la estructura del sustrato polinucleotídico desempeña un importante papel en la determinación de la especificidad de las polinucleótido ligasas y, por lo tanto, en su actividad.

En el modelo propuesto recientemente para el procesamiento de los viroides nucleares (Gas *et al.*, 2007; Gas *et al.*, 2008), se sugiere que el motivo de RNA que dirige el corte es una estructura HPI/doble cadena (HPI/dsRNA) (Fig. 5). Durante la elongación de los transcritos oligoméricos (+), aparentemente ocurre una interacción del tipo *kissing loop* entre los bucles apicales de dos horquillas HPI contiguas que conduce a la formación de una estructura transitoria de doble cadena. Esta estructura bicatenaria de RNA es el sustrato del corte de una RNasa de la clase III, que deja extremos 5'-P y 3'-OH. La ligación, sin embargo, parece ocurrir en un RNA reestructurado y estabilizado por la adopción de un bucle E a través de un cambio conformacional, posiblemente facilitado por RNA helicasas. Esta conformación, con el RNA viroidal plegado en forma de varilla o cuasi-varilla a causa de la alta autocomplementariedad de bases, y con los extremos del RNA físicamente próximos, se comportaría como un RNA bicatenario con una muesca, que sería la estructura reconocida por la DNA ligasa 1. En los trabajos mencionados anteriormente se observó también que los requerimientos estructurales para la reacción de ligación exceden a los de la reacción de corte (Gas *et al.*, 2007). Estas observaciones pueden estar relacionadas con los estrictos requerimientos estructurales que muestra la DNA ligasa 1 para circularizar un sustrato de RNA: los sustratos no fisiológicos en los que la molécula viroidal está abierta por diferentes posiciones, al plegarse de forma diferente a como lo hace el fisiológicamente relevante, no serían reconocidos por la DNA ligasa 1. Parece existir por tanto una estricta adaptación del RNA viroidal a su huésped en lo relativo al reconocimiento de su estructura para la ligación, ya que es el único de los sustratos ensayados capaz de adoptar la estructura reconocida por la DNA ligasa 1.

Como se ha comentado anteriormente, se ha propuesto que las nucleotidiltransferasas covalentes evolucionaron de un ancestro común que posiblemente estuviera implicado en procesos de reparación o recombinación del RNA (Shuman y Lima, 2004). La enzima ancestral probablemente fuera una nucleotidiltransferasa del tipo T4Rnl2 (Ho *et al.*, 2004), de la que provendría el resto por fusión de diversos dominios de especificidad en la región C-terminal. La T4Rnl2 y las RELs (ambas pertenecientes a la familia de RNA ligasas Rnl2) son muy eficientes en la reparación de muescas en RNAs de doble cadena (Blanc *et al.*, 1999; Palazzo *et al.*, 2003; Nandakumar *et al.*, 2004). El papel de las RELs en la ruta de reparación de RNA bicatenario puede además considerarse análogo al de las DNA ligasas en la reparación de escisiones o en la unión de los fragmentos de

Okazaki en la hebra retrasada durante la replicación, ya que ambos tipos de ligasas reparan muescas en un ácido nucleico bicatenario. Tomando esto en consideración, cabe la posibilidad de que la DNA ligasa 1 sea capaz de “recordar” su actividad ancestral de ligación de RNA en determinadas circunstancias o frente a un determinado plegamiento del RNA. Por otra parte, el hecho de que la DNA ligasa 1 de tomate circularice con diferente eficiencia los cinco miembros representativos de los cinco géneros de la familia *Pospiviroidae* podría indicar la existencia de cierta especificidad de huésped. Cada viroide se habría adaptado por lo tanto a los requerimientos específicos de la DNA ligasa 1 de las especies vegetales que infecta.

A la vista de los resultados aquí mostrados cabe concluir que la DNA ligasa 1 es presumiblemente el factor del huésped implicado en la circularización de los viroides nucleares durante su replicación. Sin embargo, son necesarios estudios *in vivo* para confirmar esta idea.

La DNA ligasa 1 es una enzima esencial para la replicación, recombinación y reparación del DNA en todos los organismos, y en la mayoría de ellos existen múltiples ligasas que funcionan en diferentes procesos (Tomkinson *et al.*, 2006; Shuman y Glickman, 2007; Ellenberger y Tomkinson, 2008). En *A. thaliana*, la DNA ligasa 1 es la más importante y desempeña un papel clave en la replicación del DNA y en las rutas de reparación de escisiones del DNA y recombinación del DNA (Taylor *et al.*, 1998). No puede descartarse que la interacción directa de los viroides nucleares con la DNA ligasa 1, derivándola de sus funciones esenciales, pudiera tener un papel en la patogénesis, apuntando al RNA viroidal como el efector primario de este proceso (Diener, 1999; Flores *et al.*, 2005a).

## 2. Circularización de los viroides cloroplásticos (familia *Avsunviroidae*)

Los oligómeros de los miembros de la familia *Avsunviroidae* se autocortan mediante sus ribozimas de cabeza de martillo produciendo extremos 5'-hidroxilo y 2',3'-fosfodiéster cíclico (Hutchins *et al.*, 1986; Prody *et al.*, 1986; Hernández y Flores, 1992; Darós *et al.*, 1994; Navarro y Flores, 1997). Esta reacción de autocorte parece estar regulada a través de un cambio conformacional entre la ribozima activa, que se forma transitoriamente de manera cotranscripcional, y un plegamiento alternativo distinto al catalíticamente activo que promovería la ligación (Flores *et al.*, 2004) y podría estar facilitado por chaperonas de RNA. Se ha propuesto que esta ligación podría a su vez ocurrir de forma autocatalítica en los viroides cloroplásticos (Lafontaine *et al.*, 1995; Côte y Perreault, 1997; Côte *et al.*, 2001). Sin embargo, el bajo rendimiento de esta reacción observado *in vitro* y el enlace que genera (2'-5' fosfodiéster), así como los datos obtenidos de estudios mutacionales *in vivo* empleando el ELVd, apuntan a la implicación de una enzima del huésped en la circularización de los RNAs de la familia *Avsunviroidae* (Martínez *et al.*, 2009), al igual que ocurre en la familia *Pospiviroidae*.

La única RNA ligasa identificada en plantas es la tRNA ligasa (Pick *et al.*, 1986; Pick y Hurwitz, 1986; Englert y Beier, 2005; Makino *et al.*, 2010), una enzima multifuncional con tres actividades enzimáticas localizadas en diferentes regiones de la proteína: un dominio adeniltransferasa en la N-terminal, un módulo central con actividad polinucleótido quinasa y un dominio ciclofosfodiesterasa en la región C-terminal (Phizicky *et al.*, 1986; Apostol *et al.*, 1991; Sawaya *et al.*, 2003). La enzima reconoce extremos 5'-OH y 2',3'>P en el RNA y

cataliza la formación de un enlace 2'-fosfomonoéster, 3',5'-fosfodiéster por la acción concertada de estas tres actividades. Es una proteína conservada en todos los organismos eucariotas y está implicada en el procesamiento (*splicing*) de los tRNAs nucleares (Abelson *et al.*, 1998), en el procesamiento de determinados mRNAs reguladores de la respuesta a proteínas no plegadas (Mori *et al.*, 2010) y posiblemente en la reparación de tRNAs fragmentados (Kaufmann, 2000). Además, las tRNA ligasas de germen de trigo y *A. thaliana* catalizan, aparte de la unión de las mitades de los tRNAs, la circularización de los intrones lineales que se escinden durante el procesamiento de los primeros, así como la circularización de diferentes oligo- y polirribonucleótidos naturales y sintéticos, con el único requisito de que éstos presenten extremos 5'-OH y 2',3'>P (Konarska *et al.*, 1981; Schwartz *et al.*, 1983). La laxitud de los requerimientos de las tRNA ligasas de plantas respecto a sus sustratos sugiere que podrían estar implicadas en otras funciones por ahora desconocidas. En este contexto, se ha demostrado que las tRNA ligasas de plantas pueden contener, por traducción alternativa, un péptido de tránsito al cloroplasto en su extremo N-terminal (Englert *et al.*, 2007). Así, además de localizarse en el núcleo, también lo hacen en el cloroplasto, lo que sugiere su implicación en nuevas funciones en este orgánulo.

En conjunto, estos datos (los extremos del RNA requeridos por la tRNA ligasa, su capacidad de unir eficientemente sustratos distintos de las mitades de los tRNAs y su localización cloroplástica) convierten a esta enzima en una firme candidata a catalizar la circularización de los monómeros lineales de los miembros de la familia *Avsunviroidae*, puesto que se replican en el cloroplasto, se autocortan generando extremos 5'-OH y 2',3'>P, y el enlace que presentan las formas circulares maduras es 3',5'-fosfodiéster (Marcos y Flores, 1993; Delgado *et al.*, 2005; Molina-Serrano, Flores y Darós, datos no publicados).

Por lo tanto, se procedió a la clonación del cDNA correspondiente a la isoforma cloroplástica de la tRNA ligasa de berenjena, el huésped natural del ELVd. Los datos existentes indicaban que secuencias de las tRNA ligasas de *A. thaliana* y *O. sativa* presentan una alta similitud aminoacídica entre sí, a diferencia de lo que ocurre con la enzima homóloga de levadura (Englert y Beier, 2005). Esta similitud se comprobó al alinearlas con las secuencias de las enzimas de otras especies de dicotiledóneas y monocotiledóneas como vid o trigo, identificándose en todas los motivos característicos de las tRNA ligasas [Lig, I, IIIa, IV, polinucleótido quinasa (PNK) y ciclofosfodiesterasa (CPD)]. En el laboratorio se disponía además de la secuencia de la tRNA ligasa de tomate (Molina-Serrano, Flores y Darós, datos no publicados) (aunque incompleta, sin la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto), con lo que, al ser tomate y berenjena especies del mismo género, se partió de la secuencia de tomate para diseñar cebadores con los que amplificar

un primer fragmento específico del cDNA correspondiente a la tRNA ligasa de berenjena. Conocida esta primera secuencia, fue posible amplificar los extremos 3' y 5' del mRNA mediante técnicas de 3' RACE y 5' RACE y obtener de esta manera la secuencia completa de la enzima.

Puesto que en el laboratorio se disponía de una construcción de la tRNA ligasa de *A. thaliana* pero sin la secuencia del péptido de tránsito, se decidió completarla clonando esta última. Aunque dicha secuencia se conocía (Englert *et al.*, 2007), se empleó para su clonación la misma metodología de 5' RACE circular utilizada para la tRNA ligasa de berenjena, sirviendo así para comprobar dicha técnica.

La secuencia nucleotídica de la tRNA ligasa de berenjena se tradujo *in silico* y se alineó con las secuencias aminoacídicas de las tRNA ligasas de *A. thaliana* y tomate mediante el programa *ClustalW*, mostrando una alta identidad de secuencia con ambas. Las diferencias más destacables se identificaron en los extremos N- y C-terminales. La secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto en el primero de ellos es en la que más difieren las proteínas de *A. thaliana* y berenjena, no disponiéndose de la de tomate. Esta secuencia tampoco está conservada entre otras especies como trigo, arroz o vid. Por otra parte, tomate y berenjena presentan una serie de aminoácidos extra en el extremo C-terminal con un motivo ciclofosfodiesterasa adicional, presente también en las proteínas homólogas de trigo, arroz y vid, pero curiosamente no en la de *A. thaliana*.

La expresión de las tRNA ligasas de berenjena y *A. thaliana* en *E. coli* resultó ser mucho más eficiente en el caso de la primera, detectable por su actividad y por análisis *Western*, mientras que la segunda sólo se pudo detectar por su actividad ligasa. Al tratarse de proteínas muy semejantes es difícil encontrar una explicación a este menor rendimiento, aunque ya se había constatado antes la imposibilidad de expresar eficientemente la tRNA ligasa de *A. thaliana* en *E. coli*, siendo necesario para este fin el empleo de un sistema *in vitro* derivado de germen de trigo para su expresión (Englert y Beier, 2005). En cualquier caso, al ensayar la actividad de ligación de ambas enzimas empleando como sustrato el monómero lineal (+) del ELVd abierto por el sitio de autocorte y con extremos 5'-OH y 2',3'>P, se comprobó la capacidad de ambas para catalizar dicha reacción, lo que no es sorprendente, ya que son dos proteínas muy similares. Se procedió a caracterizar tan sólo la enzima de berenjena, ya que la de *A. thaliana* se purificó en muy baja cantidad y resultó además ser más inestable. Por otra parte, la tRNA ligasa de berenjena constituía el objeto principal de nuestro interés, por ser esta planta el huésped natural de uno de los viroides cloroplásticos (ELVd).

Los ensayos *in vitro* realizados con la tRNA ligasa de berenjena purificada mostraron que la reacción de ligación ocurre a pH fisiológico y que es dependiente de ATP y  $MgCl_2$ . Este resultado es consistente con datos previos acerca de los requerimientos de nucleósido trifosfato de la tRNA ligasa de germen de trigo (Pick *et al.*, 1986; Pick y Hurwitz, 1986) y con otros de las tRNA ligasas de *A. thaliana* y tomate (Molina-Serrano, Flores y Darós, datos no publicados). La tRNA ligasa de levadura también presenta esta preferencia por el ATP (Belford *et al.*, 1993; Westaway *et al.*, 1993). Las tRNA ligasas emplean dos moléculas de NTP: una de GTP o ATP para la fosforilación del grupo 5'-OH (actividad catalizada por el dominio polinucleótido quinasa) y otra de ATP para adenilarse (en el dominio RNA ligasa), siendo posteriormente transferido el grupo AMP al nuevo extremo 5'-P (Abelson *et al.*, 1998). En la tRNA ligasa de levadura el ATP es imprescindible para la adenilación y, aunque la fosforilación también puede ocurrir con ATP, es más eficiente con cualquiera de los otros NTPs, fundamentalmente GTP (Belford *et al.*, 1993; Westaway *et al.*, 1993). Por esta razón, dicha enzima cataliza más eficientemente la ligación del sustrato si además de ATP está presente en la reacción cualquiera de los otros tres NTPs y especialmente GTP (Belford *et al.*, 1993). Estudios mutacionales han confirmado que la tRNA ligasa de levadura posee dos sitios de unión diferentes para NTPs, uno para ATP y otro para GTP (Sawaya *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios similares de mutación puntual realizados con la tRNA ligasa de *A. thaliana* no han permitido caracterizar su sitio de unión al GTP (Wang *et al.*, 2006a). Los resultados obtenidos en el presente trabajo con la tRNA ligasa de berenjena, así como los obtenidos previamente con las de germen de trigo (Pick *et al.*, 1986; Pick y Hurwitz, 1986) y de *A. thaliana* y tomate (Molina-Serrano, Flores y Darós, datos no publicados), muestran que estas enzimas sólo requieren ATP para la ligación, siendo la eficiencia similar cuando éste se halla en combinación con otro NTP. Estos resultados sugieren que las tRNA ligasas de plantas contienen un sitio único de unión para NTPs.

Al analizar la especificidad de sustrato de la tRNA ligasa de berenjena respecto a la posición por la que se abre el RNA monomérico lineal del ELVd, se observó que la enzima únicamente circulariza el sustrato abierto por el sitio de procesamiento fisiológico, a pesar de tener todos los sustratos ensayados extremos 5'-OH y 2',3'>P. La integridad de los extremos se constató al observar en todos los casos el fenómeno de autoligación, típico de sustratos de RNA con extremos 5'-OH y 2',3'>P en presencia de  $Mg^{2+}$  (Côte y Perreault, 1997). Aunque las tRNA ligasas de plantas tengan requerimientos de sustrato menores que la enzima de levadura, que muestra una alta especificidad por las mitades de tRNA (Phizicky *et al.*, 1986; Greer *et al.*, 1987), este resultado sugiere que no son capaces de actuar sobre cualquier sustrato. Como ya se ha comentado, las polinucleótido ligasas en general no son

especialmente restrictivas respecto a sus sustratos, siendo muchas de ellas activas sobre RNA y DNA. Sin embargo, la estructura parece determinar de forma más específica la susceptibilidad de un sustrato para ser ligado. De hecho se ha comprobado que la T4Rnl1, que se ha empleado para la ligación de RNAs de simple cadena de cualquier índole, presenta una especificidad intrínseca por la estructura terciaria del tRNA (Wang *et al.*, 2007a). Volviendo a los viroides, éstos son RNAs altamente estructurados cuyo plegamiento desempeña un papel fundamental en diversos aspectos de su biología. Al igual que ocurre con los miembros de la familia *Pospiviroidae*, el sustrato abierto por el sitio de procesamiento fisiológico es probablemente el único que presenta un plegamiento adecuado para su circularización por la tRNA ligasa. Los RNAs multiméricos generados durante la replicación de los viroides cloroplásticos adoptan cotranscripcionalmente una conformación catalíticamente activa que conduce a su autocorte. Los RNAs monoméricos resultantes adoptan subsiguientemente una conformación alternativa específica que es la que promueve la ligación. Esta conformación de ligación se da, no sólo en el ELVd, sino también en los otros tres miembros que integran la familia *Avsunviroidae*, pues la tRNA ligasa de berenjena fue capaz de ligar los RNAs monoméricos lineales de ambas polaridades del ASBVd, PLMVd y CChMVd abiertos por el sitio de autocorte y con extremos 5'-OH y 2',3'>P. De estos resultados se infiere la existencia de condicionantes estructurales que afectan a la ligación de los viroides, condicionantes que cumplen las formas fisiológicamente relevantes de los viroides, pero no otros RNAs como el del ELVd abierto en posiciones distintas a la natural. Por lo tanto parece existir una adaptación de los viroides a sus huéspedes para poder usurpar las enzimas que catalizan su circularización. Dada la alta conservación de la tRNA ligasa en plantas, cabe esperar que el ELVd también sea circularizado por la tRNA ligasa de otras especies vegetales.

Del conjunto de estos resultados cabe inferir que la tRNA ligasa es muy probablemente el factor del huésped implicado en la circularización de los viroides cloroplásticos durante su replicación, aunque esta idea requiere ser confirmada con otros estudios *in vivo*.

# CONCLUSIONES

---



**1.-** Se ha identificado una nueva actividad RNA ligasa de tomate capaz de ligar RNAs viroidales con extremos 5'-P y 3'-OH, que es diferente de la única RNA ligasa descrita hasta el momento en plantas, la tRNA ligasa.

**2.-** Esta actividad produce un enlace 3'-5' y genera moléculas circulares de RNA viroidal infecciosas.

**3.-** La reacción de ligación catalizada por la nueva actividad RNA ligasa, que sigue una cinética típicamente enzimática, ocurre a pH fisiológico y es dependiente de ATP y MgCl<sub>2</sub>.

**4.-** Dicha reacción es altamente específica respecto a los grupos terminales, así como a la posición por la que se encuentra linearizado el RNA sustrato. La nueva actividad RNA ligasa únicamente cataliza la circularización de RNAs del PSTVd abiertos por el sitio de procesamiento fisiológicamente relevante, mediando también la circularización de los RNAs de otros miembros representativos de la familia *Pospiviroidae* abiertos por dicha posición.

**5.-** La nueva actividad RNA ligasa de tomate actúa a través del mecanismo de reacción típico de las nucleotidiltransferasas covalentes, habiéndose detectado los dos intermediarios: enzima adenilada y sustrato adenilado.

**6.-** El análisis por espectrometría de masas ha permitido identificar a la DNA ligasa 1 como la proteína en la que reside la nueva actividad RNA ligasa.

**7.-** La clonación y expresión heteróloga de la DNA ligasa 1 de tomate ha permitido efectuar ensayos *in vitro* que demuestran que dicha proteína es efectivamente capaz de

circularizar el monómero lineal (+) del PSTVd abierto por el sitio de procesamiento fisiológico y con extremos 5'-P y 3'-OH, siendo además muy específica respecto al sitio por el que está abierta la molécula de RNA.

**8.-** El conjunto de estos resultados es un firme indicio de que la DNA ligasa 1 es el factor del huésped implicado en la circularización de los viroides nucleares durante su replicación.

**9.-** Se ha clonado el cDNA de la tRNA ligasa de berenjena, el huésped natural del ELVd, con su correspondiente péptido de tránsito al cloroplasto, y se ha expresado la proteína en *E. coli*.

**10.-** Los ensayos *in vitro* realizados con la tRNA ligasa de berenjena purificada han mostrado que la reacción de ligación ocurre a pH fisiológico y es dependiente de ATP y MgCl<sub>2</sub>.

**11.-** El ensayo de su actividad de ligación empleando como sustrato el monómero lineal (+) del ELVd abierto por el sitio de autocorte y con extremos 5'-OH y 2',3'>P, ha puesto de manifiesto que la enzima es capaz de llevar a cabo dicha reacción.

**12.-** Esta reacción parece ser, sin embargo, muy específica del sitio por el que está abierto el monómero lineal del ELVd (pues sólo circulariza el sustrato fisiológicamente relevante abierto por el sitio de autocorte), aunque también cataliza la circularización de los otros miembros de la familia *Avsunviroidae*, en su polaridad positiva y negativa, abiertos por dicho sitio.

**13.-** En conjunto, estos resultados *in vitro* indican que la tRNA ligasa es muy probablemente el factor del huésped implicado en la circularización de los viroides cloroplásticos durante su replicación.

# BIBLIOGRAFÍA

---



- Abelson, J., Trotta, C.R. y Li, H. (1998). tRNA splicing. *J Biol Chem* **273**, 12685-12688.
- Abraitene, A., Zhao, Y. y Hammond, R. (2008). Nuclear targeting by fragmentation of the potato spindle tuber viroid genome. *Biochem Biophys Res Commun* **368**, 470-475.
- Amitsur, M., Levitz, R. y Kaufmann, G. (1987). Bacteriophage T4 anticodon nuclease, polynucleotide kinase and RNA ligase reprocess the host lysine tRNA. *EMBO J* **6**, 2499-2503.
- Amitsur, M., Morad, I., Chapman-Shimshoni, D. y Kaufmann, G. (1992). HSD restriction-modification proteins partake in latent anticodon nuclease. *EMBO J* **11**, 3129-3134.
- Apostol, B.L., Westaway, S.K., Abelson, J. y Greer, C.L. (1991). Deletion analysis of a multifunctional yeast tRNA ligase polypeptide. Identification of essential and dispensable functional domains. *J Biol Chem* **266**, 7445-7455.
- Ashulin, L., Lachman, O., Hadas, R. y Bar-Joseph, M. (1991). Nucleotide sequence of a new viroid species, citrus bent leaf viroid (CBLVd) isolated from grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res* **19**, 4767.
- Barnes, D.E., Johnston, L.H., Kodama, K., Tomkinson, A.E., Lasko, D.D. y Lindahl, T. (1990). Human DNA ligase I cDNA: cloning and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6679-6683.
- Barnes, D.E., Tomkinson, A.E., Lehmann, A.R., Webster, A.D. y Lindahl, T. (1992). Mutations in the DNA ligase I gene of an individual with immunodeficiencies and cellular hypersensitivity to DNA-damaging agents. *Cell* **69**, 495-503.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.
- Baumstark, T., Schroder, A.R. y Riesner, D. (1997). Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J* **16**, 599-610.
- Baymiller, J., Jennings, S., Kienzle, B., Gorman, J.A., Kelly, R. y McCullough, J.E. (1994). Isolation and sequence of the t-RNA ligase-encoding gene of *Candida albicans*. *Gene* **142**, 129-134.
- Belford, H.G., Westaway, S.K., Abelson, J. y Greer, C.L. (1993). Multiple nucleotide cofactor use by yeast ligase in tRNA splicing. Evidence for independent ATP- and GTP-binding sites. *J Biol Chem* **268**, 2444-2450.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. y Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.
- Blanc, V., Alfonzo, J.D., Aphasizhev, R. y Simpson, L. (1999). The mitochondrial RNA ligase from *Leishmania tarentolae* can join RNA molecules bridged by a complementary RNA. *J Biol Chem* **274**, 24289-24296.
- Blondal, T., Hjorleifsdottir, S.H., Fridjonsson, O.F., Aevansson, A., Skirnisdottir, S., Hermannsdottir, A.G., Hreggvidsson, G.O., Smith, A.V. y Kristjansson, J.K. (2003). Discovery and characterization of a thermostable bacteriophage RNA ligase homologous to T4 RNA ligase 1. *Nucleic Acids Res* **31**, 7247-7254.
- Blondal, T., Thorisdottir, A., Unnsteinsdottir, U., Hjorleifsdottir, S., Aevansson, A., Ernstsson, S., Fridjonsson, O.H., Skirnisdottir, S., Wheat, J.O., Hermannsdottir, A.G., *et al.* (2005). Isolation and characterization of a thermostable RNA ligase 1 from a *Thermus scotoductus* bacteriophage TS2126 with good single-stranded DNA ligation properties. *Nucleic Acids Res* **33**, 135-142.

- Bolduc, F., Hoareau, C., St-Pierre, P. y Perreault, J.P. (2010). In-depth sequencing of the siRNAs associated with peach latent mosaic viroid infection. *BMC Mol Biol* **11**, 16.
- Bonato, D., Revers, L.F., Brendel, M. y Henriques, J.A. (2005). The eukaryotic Pso2/Snm1/Artemis proteins and their function as genomic and cellular caretakers. *Braz J Med Biol Res* **38**, 321-334.
- Bonfiglioli, R.G., Mc Fadden, G.I. y Symons, R.H. (1994). In situ hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and coconut cadang cadang viroid in the nucleus. *Plant J* **6**, 99-103.
- Bonfiglioli, R.G., Webb, D.R. y Symons, R.H. (1996). Tissue and intracellular distribution of coconut cadang cadang viroid and citrus exocortis viroid determined by in situ hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. *Plant J* **9**, 457-465.
- Branch, A.D. y Dickson, E. (1980). Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by Southern hybridization. *Virology* **104**, 10-26.
- Branch, A.D., Robertson, H.D., Greer, C., Gegenheimer, P., Peebles, C. y Abelson, J. (1982). Cell-free circularization of viroid progeny RNA by an RNA ligase from wheat germ. *Science* **217**, 1147-1149.
- Branch, A.D. y Robertson, H.D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science* **223**, 450-455.
- Branch, A.D., Benenfeld, B.J. y Robertson, H.D. (1985). Ultraviolet light-induced crosslinking reveals a unique region of local tertiary structure in potato spindle tuber viroid and HeLa 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6590-6594.
- Bussière, F., Lehoux, J., Thompson, D.A., Skrzeczkowski, L.J. y Perreault, J. (1999). Subcellular localization and rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. *J Virol* **73**, 6353-6360.
- Bussière, F., Ouellet, J., Côte, F., Levesque, D. y Perreault, J.P. (2000). Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J Virol* **74**, 2647-2654.
- Caldecott, K.W., McKeown, C.K., Tucker, J.D., Ljungquist, S. y Thompson, L.H. (1994). An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Mol Cell Biol* **14**, 68-76.
- Caldecott, K.W., Aoufouchi, S., Johnson, P. y Shall, S. (1996). XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res* **24**, 4387-4394.
- Carbonell, A., Martínez de Alba, A.E., Flores, R. y Gago, S. (2008). Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families. *Virology* **371**, 44-53.
- Carrington, J.C. y Ambros, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **301**, 336-338.
- Côte, F. y Perreault, J.P. (1997). Peach latent mosaic viroid is locked by a 2',5'-phosphodiester bond produced by in vitro self-ligation. *J Mol Biol* **273**, 533-543.
- Côte, F., Levesque, D. y Perreault, J.P. (2001). Natural 2',5'-phosphodiester bonds found at the ligation sites of peach latent mosaic viroid. *J Virol* **75**, 19-25.

- Cranston, J.W., Silber, R., Malathi, V.G. y Hurwitz, J. (1974). Studies on ribonucleic acid ligase. Characterization of an adenosine triphosphate-inorganic pyrophosphate exchange reaction and demonstration of an enzyme-adenylate complex with T4 bacteriophage-induced enzyme. *J Biol Chem* **249**, 7447-7456.
- Chapman, D., Morad, I., Kaufmann, G., Gait, M.J., Jorissen, L. y Snyder, L. (1988). Nucleotide and deduced amino acid sequence of *stp*: the bacteriophage T4 anticodon nuclease gene. *J Mol Biol* **199**, 373-377.
- Darós, J.A., Marcos, J.F., Hernández, C. y Flores, R. (1994). Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12813-12817.
- Darós, J.A. y Flores, R. (2002). A chloroplast protein binds a viroid RNA in vivo and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *EMBO J* **21**, 749-759.
- Darós, J.A. y Flores, R. (2004). Arabidopsis thaliana has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6792-6797.
- Darós, J.A., Elena, S.F. y Flores, R. (2006). Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. *EMBO Rep* **7**, 593-598.
- Davies, J.W., Kaesberg, P. y Diener, T.O. (1974). Potato spindle tuber viroid. XII. An investigation of viroid RNA as a messenger for protein synthesis. *Virology* **61**, 281-286.
- De la Peña, M., Navarro, B. y Flores, R. (1999). Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: a tetraloop within the in vivo branched RNA conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9960-9965.
- De la Peña, M. y Flores, R. (2002). Chrysanthemum chlorotic mottle viroid RNA: dissection of the pathogenicity determinant and comparative fitness of symptomatic and non-symptomatic variants. *J Mol Biol* **321**, 411-421.
- De la Peña, M., Gago, S. y Flores, R. (2003). Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *EMBO J* **22**, 5561-5570.
- Delgado, S., Martínez de Alba, A.E., Hernández, C. y Flores, R. (2005). A short double-stranded RNA motif of Peach latent mosaic viroid contains the initiation and the self-cleavage sites of both polarity strands. *J Virol* **79**, 12934-12943.
- Di Serio, F., Aparicio, F., Alioto, D., Ragozzino, A. y Flores, R. (1996). Identification and molecular properties of a 306 nucleotide viroid associated with apple dimple fruit disease. *J Gen Virol* **77**, 2833-2837.
- Di Serio, F., Gisel, A., Navarro, B., Delgado, S., Martínez de Alba, A.E., Donvito, G. y Flores, R. (2009). Deep sequencing of the small RNAs derived from two symptomatic variants of a chloroplastic viroid: implications for their genesis and for pathogenesis. *PLoS One* **4**, e7539.
- Di Serio, F., Martínez de Alba, A.E., Navarro, B., Gisel, A. y Flores, R. (2010). RNA-dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a viroid that replicates in the nucleus. *J Virol* **84**, 2477-2489.
- Diener, T.O. (1971). Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. 3. Subcellular location of PSTV-RNA and the question of whether virions exist in extracts or in situ. *Virology* **43**, 75-89.
- Diener, T.O. (1986). Viroid processing: a model involving the central conserved region and hairpin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 58-62.

- Diener, T.O. (1989). Circular RNAs: relics of precellular evolution? *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9370-9374.
- Diener, T.O. (1999). Viroids and the nature of viroid diseases. *Arch Virol Suppl* **15**, 203-220.
- Diener, T.O. (2001). The viroid: biological oddity or evolutionary fossil? *Adv Virus Res* **57**, 137-184.
- Ding, B., Kwon, M.O., Hammond, R. y Owens, R. (1997). Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant J* **12**, 931-936.
- Ding, B. y Itaya, A. (2007). Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 7-20.
- Dingley, A.J., Steger, G., Esters, B., Riesner, D. y Grzesiek, S. (2003). Structural characterization of the 69 nucleotide potato spindle tuber viroid left-terminal domain by NMR and thermodynamic analysis. *J Mol Biol* **334**, 751-767.
- Durantel, D., Croizier, L., Ayres, M.D., Croizier, G., Possee, R.D. y Lopez-Ferber, M. (1998). The pnk/pnl gene (ORF 86) of Autographa californica nucleopolyhedrovirus is a non-essential, immediate early gene. *J Gen Virol* **79**, 629-637.
- Eiras, M., Kitajima, E.W., Flores, R. y Darós, J.A. (2007). Existence in vivo of the loop E motif in potato spindle tuber viroid RNA. *Arch Virol* **152**, 1389-1393.
- El Omari, K., Ren, J., Bird, L.E., Bona, M.K., Klarmann, G., LeGrice, S.F. y Stammers, D.K. (2006). Molecular architecture and ligand recognition determinants for T4 RNA ligase. *J Biol Chem* **281**, 1573-1579.
- Ellenberger, T. y Tomkinson, A.E. (2008). Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights. *Annu Rev Biochem* **77**, 313-338.
- Engler, M.J. y Richardson, C.C. (1982). DNA ligases (New York, Academic Press).
- Englert, M. y Beier, H. (2005). Plant tRNA ligases are multifunctional enzymes that have diverged in sequence and substrate specificity from RNA ligases of other phylogenetic origins. *Nucleic Acids Res* **33**, 388-399.
- Englert, M., Latz, A., Becker, D., Gimple, O., Beier, H. y Akama, K. (2007). Plant pre-tRNA splicing enzymes are targeted to multiple cellular compartments. *Biochimie* **89**, 1351-1365.
- Englert, M., Sheppard, K., Aslanian, A., Yates, J.R., 3rd y Soll, D. (2011). Archaeal 3'-phosphate RNA splicing ligase characterization identifies the missing component in tRNA maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1290-1295.
- Fabrega, C., Shen, V., Shuman, S. y Lima, C.D. (2003). Structure of an mRNA capping enzyme bound to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell* **11**, 1549-1561.
- Fadda, Z., Darós, J.A., Fagoaga, C., Flores, R. y Duran-Vila, N. (2003a). Eggplant latent viroid, the candidate type species for a new genus within the family Avsunviroidae (hammerhead viroids). *J Virol* **77**, 6528-6532.
- Fadda, Z., Darós, J.A., Flores, R. y Duran-Vila, N. (2003b). Identification in eggplant of a variant of citrus exocortis viroid (CEVd) with a 96 nucleotide duplication in the right terminal region of the rod-like secondary structure. *Virus Res* **97**, 145-149.
- Feldstein, P.A., Hu, Y. y Owens, R.A. (1998). Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6560-6565.

- Filipowicz, W. y Shatkin, A.J. (1983). Origin of splice junction phosphate in tRNAs processed by HeLa cell extract. *Cell* **32**, 547-557.
- Filipowicz, W. y Gross, H.J. (1984). RNA ligation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **9**, 68-71.
- Flores, R. y Semancik, J.S. (1982). Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 6285-6288.
- Flores, R., Darós, J.A. y Hernández, C. (2000). Avsunviroidae family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Adv Virus Res* **55**, 271-323.
- Flores, R., Hernández, C., De la Peña, M., Vera, A. y Darós, J.A. (2001). Hammerhead ribozyme structure and function in plant RNA replication. *Methods Enzymol* **341**, 540-552.
- Flores, R., Delgado, S., Gas, M.E., Carbonell, A., Molina, D., Gago, S. y De la Peña, M. (2004). Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Lett* **567**, 42-48.
- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A.E., Darós, J.A. y Di Serio, F. (2005a). Viroids and viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 117-139.
- Flores, R., Randles, J.W., Owens, R.A., Bar-Joseph, M. y Diener, T.O. (2005b). Viroids. In *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature VIII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger y A.L. Ball, eds. (Elsevier/Academic press, London), pp. 1145-1159.
- Forster, A.C. y Symons, R.H. (1987). Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* **49**, 211-220.
- Friesner, J. y Britt, A.B. (2003). Ku80- and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *Plant J* **34**, 427-440.
- Gago, S., De la Peña, M. y Flores, R. (2005). A kissing-loop interaction in a hammerhead viroid RNA critical for its in vitro folding and in vivo viability. *RNA* **11**, 1073-1083.
- Gajiwala, K.S. y Pinko, C. (2004). Structural rearrangement accompanying NAD<sup>+</sup> synthesis within a bacterial DNA ligase crystal. *Structure* **12**, 1449-1459.
- Galburt, E.A., Pelletier, J., Wilson, G. y Stoddard, B.L. (2002). Structure of a tRNA repair enzyme and molecular biology workhorse: T4 polynucleotide kinase. *Structure* **10**, 1249-1260.
- Gas, M.E., Hernández, C., Flores, R. y Darós, J.A. (2007). Processing of nuclear viroids in vivo: an interplay between RNA conformations. *PLoS Pathog* **3**, e182.
- Gas, M.E., Molina-Serrano, D., Hernández, C., Flores, R. y Darós, J.A. (2008). Monomeric linear RNA of citrus exocortis viroid resulting from processing in vivo has 5'-phosphomonoester and 3'-hydroxyl termini: implications for the RNase and RNA ligase involved in replication. *J Virol* **82**, 10321-10325.
- Gegenheimer, P., Gabius, H.J., Peebles, C.L. y Abelson, J. (1983). An RNA ligase from wheat germ which participates in transfer RNA splicing in vitro. *J Biol Chem* **258**, 8365-8373.
- Genschik, P., Drabikowski, K. y Filipowicz, W. (1998). Characterization of the Escherichia coli RNA 3'-terminal phosphate cyclase and its sigma54-regulated operon. *J Biol Chem* **273**, 25516-25526.

- Gómez, G. y Pallás, V. (2001). Identification of an in vitro ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 910-913.
- Gómez, G. y Pallás, V. (2004). A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with Hop stunt viroid RNA. *J Virol* **78**, 10104-10110.
- Gómez, G. y Pallás, V. (2007). Mature monomeric forms of Hop stunt viroid resist RNA silencing in transgenic plants. *Plant J* **51**, 1041-1049.
- Gómez, G. y Pallás, V. (2010a). Can the import of mRNA into chloroplasts be mediated by a secondary structure of a small non-coding RNA? *Plant Signal Behav* **5**.
- Gómez, G. y Pallás, V. (2010b). Noncoding RNA mediated traffic of foreign mRNA into chloroplasts reveals a novel signaling mechanism in plants. *PLoS One* **5**.
- Gong, C., Martins, A., Bongiorno, P., Glickman, M. y Shuman, S. (2004). Biochemical and genetic analysis of the four DNA ligases of mycobacteria. *J Biol Chem* **279**, 20594-20606.
- González, T.N., Sidrauski, C., Dorfler, S. y Walter, P. (1999). Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response pathway. *EMBO J* **18**, 3119-3132.
- Goodman, H.M., Olson, M.V. y Hall, B.D. (1977). Nucleotide sequence of a mutant eukaryotic gene: the yeast tyrosine-inserting ochre suppressor SUP4-o. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5453-5457.
- Gozmanova, M., Denti, M.A., Minkov, I.N., Tsagris, M. y Tabler, M. (2003). Characterization of the RNA motif responsible for the specific interaction of potato spindle tuber viroid RNA (PSTVd) and the tomato protein Virp1. *Nucleic Acids Res* **31**, 5534-5543.
- Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M. y Lieber, M.R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* **388**, 492-495.
- Grawunder, U., Zimmer, D., Kulesza, P. y Lieber, M.R. (1998). Requirement for an interaction of XRCC4 with DNA ligase IV for wild-type V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in vivo. *J Biol Chem* **273**, 24708-24714.
- Greer, C.L., Peebles, C.L., Gegenheimer, P. y Abelson, J. (1983). Mechanism of action of a yeast RNA ligase in tRNA splicing. *Cell* **32**, 537-546.
- Greer, C.L., Soll, D. y Willis, I. (1987). Substrate recognition and identification of splice sites by the tRNA-splicing endonuclease and ligase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**, 76-84.
- Grill, L.K. y Semancik, J.S. (1978). RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected *Gynura aurantiaca*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 896-900.
- Gross, H.J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H. y Sanger, H.L. (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* **273**, 203-208.
- Gross, H.J., Krupp, G., Domdey, H., Raba, M., Jank, P., Lossow, C., Alberty, H., Ramm, K. y Sanger, H.L. (1982). Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. *Eur J Biochem* **121**, 249-257.

- Hadidi, A., Jones, D.M., Gillespie, D.H., Wong-Staal, F. y Diener, T.O. (1976). Hybridization of potato spindle tuber viroid to cellular DNA of normal plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 2453-2457.
- Hakansson, K., Doherty, A.J., Shuman, S. y Wigley, D.B. (1997). X-ray crystallography reveals a large conformational change during guanyl transfer by mRNA capping enzymes. *Cell* **89**, 545-553.
- Hall, T.C., Wepprich, R.K., Davies, J.W., Weathers, L.G. y Semancik, J.S. (1974). Functional distinctions between the ribonucleic acids from citrus exocortis viroid and plant viruses: cell-free translation and aminoacylation reactions. *Virology* **61**, 486-492.
- Hammond, R., Smith, D.R. y Diener, T.O. (1989). Nucleotide sequence and proposed secondary structure of Columnea latent viroid: a natural mosaic of viroid sequences. *Nucleic Acids Res* **17**, 10083-10094.
- Harders, J., Lukacs, N., Robert-Nicoud, M., Jovin, T.M. y Riesner, D. (1989). Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J* **8**, 3941-3949.
- Haseloff, J. y Symons, R.H. (1981). Chrysanthemum stunt viroid: primary sequence and secondary structure. *Nucleic Acids Res* **9**, 2741-2752.
- Haseloff, J., Mohamed, N.A. y Symons, R.H. (1982). Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconuts. *Nature* **229**, 316-321.
- Hashimoto, J. y Koganezawa, H. (1987). Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid. *Nucleic Acids Res* **15**, 7045-7052.
- Heaphy, S., Singh, M. y Gait, M.J. (1987). Effect of single amino acid changes in the region of the adenylylation site of T4 RNA ligase. *Biochemistry* **26**, 1688-1696.
- Henco, K., Sanger, H.L. y Riesner, D. (1979). Fine structure melting of viroids as studied by kinetic methods. *Nucleic Acids Res* **6**, 3041-3059.
- Hernández, C., Elena, S.F., Moya, A. y Flores, R. (1992). Pear blister canker viroid is a member of the apple scar skin subgroup (apscaviroids) and also has sequence homology with viroids from other subgroups. *J Gen Virol* **73**, 2503-2507.
- Hernández, C. y Flores, R. (1992). Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave in vitro via hammerhead structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3711-3715.
- Ho, C.K. y Shuman, S. (2002). Bacteriophage T4 RNA ligase 2 (gp24.1) exemplifies a family of RNA ligases found in all phylogenetic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12709-12714.
- Ho, C.K., Wang, L.K., Lima, C.D. y Shuman, S. (2004). Structure and mechanism of RNA ligase. *Structure* **12**, 327-339.
- Hopper, A.K. y Phizicky, E.M. (2003). tRNA transfers to the limelight. *Genes Dev* **17**, 162-180.
- Hutchins, C.J., Keese, P., Visvader, J.E., Rathjen, P.D., Mc Innes, J.L. y Symons, R.H. (1985). Comparison of multimeric plus and minus forms of viroids and virusoids. *Plant Mol Biol* **4**, 293-304.
- Hutchins, C.J., Rathjen, P.D., Forster, A.C. y Symons, R.H. (1986). Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res* **14**, 3627-3640.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.

- Ishikawa, M., Meshi, T., Ohno, T., Okada, Y., Sano, T., Ueda, I. y Shikata, E. (1984). A revised replication cycle for viroids: the role of longer than unit length RNA in viroid replication. *Mol Gen Genet* **196**, 421-428.
- Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R.S. y Ding, B. (2001). Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 1332-1334.
- Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., Harris, A.R., Molina, C., Nelson, R.S. y Ding, B. (2007). A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *J Virol* **81**, 2980-2994.
- Ito, T., Ieki, H. y Ozaki, K. (2001). Characterization of a new citrus viroid species tentatively termed Citrus viroid OS. *Arch Virol* **146**, 975-982.
- Kalantidis, K., Denti, M.A., Tzortzakaki, S., Marinou, E., Tabler, M. y Tsagris, M. (2007). Virp1 is a host protein with a major role in Potato spindle tuber viroid infection in Nicotiana plants. *J Virol* **81**, 12872-12880.
- Kaufmann, G. (2000). Anticodon nucleases. *Trends Biochem Sci* **25**, 70-74.
- Keese, P. y Symons, R.H. (1985). Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4582-4586.
- Keese, P., Osorio-Keese, M.E. y Symons, R.H. (1988). Coconut tinangaja viroid: sequence homology with coconut cadang-cadang viroid and other potato spindle tuber viroid related RNAs. *Virology* **162**, 508-510.
- Khoury, I., Singh, R.P., Boucher, A. y Coombs, D.H. (1988). Concentration and distribution of mild and severe strains of potato spindle tuber viroid in cross-protected tomato plants. *Phytopathology* **78**, 1331-1336.
- Khvorova, A., Lescoute, A., Westhof, E. y Jayasena, S.D. (2003). Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nat Struct Biol* **10**, 708-712.
- Kiefer, M.C., Owens, R.A. y Diener, T.O. (1983). Structural similarities between viroids and transposable genetic elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6234-6238.
- Kikuchi, Y., Tyc, K., Filipowicz, W., Sanger, H.L. y Gross, H.J. (1982). Circularization of linear viroid RNA via 2'-phosphomonoester, 3', 5'-phosphodiester bonds by a novel type of RNA ligase from wheat germ and Chlamydomonas. *Nucleic Acids Res* **10**, 7521-7529.
- Knapp, G., Ogden, R.C., Peebles, C.L. y Abelson, J. (1979). Splicing of yeast tRNA precursors: structure of the reaction intermediates. *Cell* **18**, 37-45.
- Kolonko, N., Bannach, O., Aschermann, K., Hu, K.H., Moors, M., Schmitz, M., Steger, G. y Riesner, D. (2006). Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts in the left terminal loop. *Virology* **347**, 392-404.
- Koltunow, A.M. y Rezaian, M.A. (1988). Grapevine yellow speckle viroid: structural features of a new viroid group. *Nucleic Acids Res* **16**, 849-864.
- Koltunow, A.M. y Rezaian, M.A. (1989). Grapevine viroid 1B, a new member of the apple scar skin viroid group contains the left terminal region of tomato planta macho viroid. *Virology* **170**, 575-578.

- Konarska, M., Filipowicz, W., Domdey, H. y Gross, H.J. (1981). Formation of a 2'-phosphomonoester, 3',5'-phosphodiester linkage by a novel RNA ligase in wheat germ. *Nature* **293**, 112-116.
- Konarska, M., Filipowicz, W. y Gross, H.J. (1982). RNA ligation via 2'-phosphomonoester, 3',5'-phosphodiester linkage: requirement of 2',3'-cyclic phosphate termini and involvement of a 5'-hydroxyl polynucleotide kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 1474-1478.
- Lafontaine, D., Beaudry, D., Marquis, P. y Perreault, J.P. (1995). Intra- and intermolecular nonenzymatic ligations occur within transcripts derived from the peach latent mosaic viroid. *Virology* **212**, 705-709.
- Lee, J.Y., Chang, C., Song, H.K., Moon, J., Yang, J.K., Kim, H.K., Kwon, S.T. y Suh, S.W. (2000). Crystal structure of NAD(+)-dependent DNA ligase: modular architecture and functional implications. *EMBO J* **19**, 1119-1129.
- Lehman, I.R. (1974). DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science* **186**, 790-797.
- Levitz, R., Chapman, D., Amitsur, M., Green, R., Snyder, L. y Kaufmann, G. (1990). The optional E. coli prr locus encodes a latent form of phage T4-induced anticodon nuclease. *EMBO J* **9**, 1383-1389.
- Lewis, J.D. y Tollervey, D. (2000). Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus. *Science* **288**, 1385-1389.
- Lima, M.I., Fonseca, M.E., Flores, R. y Kitajima, E.W. (1994). Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by in situ hybridization. *Arch Virol* **138**, 385-390.
- Lorsch, J.R., Bartel, D.P. y Szostak, J.W. (1995). Reverse transcriptase reads through a 2'-5'linkage and a 2'-thiophosphate in a template. *Nucleic Acids Res* **23**, 2811-2814.
- Loss, P., Schmitz, M., Steger, G. y Riesner, D. (1991). Formation of a thermodynamically metastable structure containing hairpin II is critical for infectivity of potato spindle tuber viroid RNA. *EMBO J* **10**, 719-727.
- Lu, J., Huang, B., Esberg, A., Johansson, M.J. y Bystrom, A.S. (2005). The *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin targets tRNA anticodons. *RNA* **11**, 1648-1654.
- Makarova, K.S., Aravind, L., Wolf, Y.I., Tatusov, R.L., Minton, K.W., Koonin, E.V. y Daly, M.J. (2001). Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 44-79.
- Makino, S., Sawasaki, T., Endo, Y. y Takai, K. (2005). Purification and sequence determination of an RNA ligase from wheat embryos. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, pp. 319-320.
- Makino, S., Sawasaki, T., Tozawa, Y., Endo, Y. y Takai, K. (2006). Covalent circularization of exogenous RNA during incubation with a wheat embryo cell extract. *Biochem Biophys Res Commun* **347**, 1080-1087.
- Makino, S., Sawasaki, T., Endo, Y. y Takai, K. (2010). In vitro dissection revealed that the kinase domain of wheat RNA ligase is physically isolatable from the flanking domains as a non-overlapping domain enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **397**, 762-766.
- Malfitano, M., Di Serio, F., Covelli, L., Ragozzino, A., Hernández, C. y Flores, R. (2003). Peach latent mosaic viroid variants inducing peach calico (extreme chlorosis) contain a characteristic insertion that is responsible for this symptomatology. *Virology* **313**, 492-501.

- Maniataki, E., Martínez de Alba, A.E., Sagesser, R., Tabler, M. y Tsagris, M. (2003). Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with the host protein VirP1. *RNA* **9**, 346-354.
- Marcos, J.F. y Flores, R. (1993). The 5' end generated in the in vitro self-cleavage reaction of avocado sunblotch viroid RNAs is present in naturally occurring linear viroid molecules. *J Gen Virol* **74**, 907-910.
- Markarian, N., Li, H.W., Ding, S.W. y Semancik, J.S. (2004). RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Arch Virol* **149**, 397-406.
- Martick, M. y Scott, W.G. (2006). Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell* **126**, 309-320.
- Martín, R., Arenas, C., Darós, J.A., Covarrubias, A., Reyes, J.L. y Chua, N.H. (2007). Characterization of small RNAs derived from Citrus exocortis viroid (CEVd) in infected tomato plants. *Virology* **367**, 135-146.
- Martínez-Soriano, J.P., Galindo-Alonso, J., Maroon, C.J., Yucel, I., Smith, D.R. y Diener, T.O. (1996). Mexican papita viroid: putative ancestor of crop viroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9397-9401.
- Martínez de Alba, A.E., Flores, R. y Hernández, C. (2002). Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *J Virol* **76**, 13094-13096.
- Martínez de Alba, A.E., Sagesser, R., Tabler, M. y Tsagris, M. (2003). A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds potato spindle tuber viroid RNA in vitro and in vivo. *J Virol* **77**, 9685-9694.
- Martínez, F., Marqués, J., Salvador, M.L. y Darós, J.A. (2009). Mutational analysis of eggplant latent viroid RNA processing in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *J Gen Virol* **90**, 3057-3065.
- Martínez, G., Donaire, L., Llave, C., Pallás, V. y Gómez, G. (2010). High-throughput sequencing of Hop stunt viroid-derived small RNAs from cucumber leaves and phloem. *Mol Plant Pathol* **11**, 347-359.
- Martins, A. y Shuman, S. (2004a). An RNA ligase from *Deinococcus radiodurans*. *J Biol Chem* **279**, 50654-50661.
- Martins, A. y Shuman, S. (2004b). Characterization of a baculovirus enzyme with RNA ligase, polynucleotide 5'-kinase, and polynucleotide 3'-phosphatase activities. *J Biol Chem* **279**, 18220-18231.
- Matousek, J., Kozlova, P., Orctova, L., Schmitz, A., Pesina, K., Bannach, O., Diermann, N., Steger, G. y Riesner, D. (2007). Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *Biol Chem* **388**, 1-13.
- McCoy, M.I. y Gumpert, R.I. (1980). T4 ribonucleic acid ligase joins single-strand oligo(deoxyribonucleotides). *Biochemistry* **19**, 635-642.
- McManus, M.T., Shimamura, M., Grams, J. y Hajduk, S.L. (2001). Identification of candidate mitochondrial RNA editing ligases from *Trypanosoma brucei*. *RNA* **7**, 167-175.
- Meshi, T., Ishikawa, M., Watanabe, Y., Yamaya, J., Okada, Y., Sano, T. y Shikata, E. (1985). The sequence necessary for the infectivity of hop stunt viroid cDNA clones. *Mol Gen Genet* **200**, 199-206.

- Mohamed, N.A. y Thomas, W. (1980). Viroid-like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocados. *J Gen Virol* **46**, 157-167.
- Molina-Serrano, D., Suay, L., Salvador, M.L., Flores, R. y Darós, J.A. (2007). Processing of RNAs of the family Avsunviroidae in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *J Virol* **81**, 4363-4366.
- Mori, T., Ogasawara, C., Inada, T., Englert, M., Beier, H., Takezawa, M., Endo, T. y Yoshihisa, T. (2010). Dual functions of yeast tRNA ligase in the unfolded protein response: unconventional cytoplasmic splicing of HAC1 pre-mRNA is not sufficient to release translational attenuation. *Mol Biol Cell* **21**, 3722-3734.
- Motard, J., Bolduc, F., Thompson, D. y Perreault, J.P. (2008). The peach latent mosaic viroid replication initiation site is located at a universal position that appears to be defined by a conserved sequence. *Virology* **373**, 362-375.
- Mühlbach, H.P. y Sängler, H.L. (1979). Viroid replication is inhibited by alpha-amanitin. *Nature* **278**, 185-188.
- Nandakumar, J., Ho, C.K., Lima, C.D. y Shuman, S. (2004). RNA substrate specificity and structure-guided mutational analysis of bacteriophage T4 RNA ligase 2. *J Biol Chem* **279**, 31337-31347.
- Nandakumar, J. y Shuman, S. (2004). How an RNA ligase discriminates RNA versus DNA damage. *Mol Cell* **16**, 211-221.
- Nandakumar, J., Shuman, S. y Lima, C.D. (2006). RNA ligase structures reveal the basis for RNA specificity and conformational changes that drive ligation forward. *Cell* **127**, 71-84.
- Nandakumar, J., Nair, P.A. y Shuman, S. (2007). Last stop on the road to repair: structure of *E. coli* DNA ligase bound to nicked DNA-adenylate. *Mol Cell* **26**, 257-271.
- Nash, R. y Lindahl, T. (1998). DNA ligases. In *DNA Replication in Eukaryotic Cells* (Plainview, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 575-586.
- Navarro, B. y Flores, R. (1997). Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11262-11267.
- Navarro, B., Pantaleo, V., Gisel, A., Moxon, S., Dalmay, T., Bisztray, G., Di Serio, F. y Burgyan, J. (2009). Deep sequencing of viroid-derived small RNAs from grapevine provides new insights on the role of RNA silencing in plant-viroid interaction. *PLoS One* **4**, e7686.
- Navarro, J.A., Darós, J.A. y Flores, R. (1999). Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: identification in chloroplasts and characterization. *Virology* **253**, 77-85.
- Navarro, J.A. y Flores, R. (2000). Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. *EMBO J* **19**, 2662-2670.
- Navarro, J.A., Vera, A. y Flores, R. (2000). A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. *Virology* **268**, 218-225.
- Niblett, C.L., Dickson, E., Fernow, K.H., Horst, R.K. y Zaitlin, M. (1978). Cross protection among four viroids. *Virology* **91**, 198-203.
- Norrande, J., Kempe, T. y Messing, J. (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**, 101-106.

- Odell, M., Sriskanda, V., Shuman, S. y Nikolov, D.B. (2000). Crystal structure of eukaryotic DNA ligase-adenylate illuminates the mechanism of nick sensing and strand joining. *Mol Cell* **6**, 1183-1193.
- Ohno, T., Takamatsu, N., Meshi, T. y Okada, Y. (1983). Hop stunt viroid: molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA copy. *Nucleic Acids Res* **11**, 6185-6197.
- Owens, R.A., Thompson, S.M. y Steger, G. (1991). Effects of random mutagenesis upon potato spindle tuber viroid replication and symptom expression. *Virology* **185**, 18-31.
- Owens, R.A., Blackburn, M. y Ding, B. (2001). Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 905-909.
- Owens, R.A. y Baumstark, T. (2007). Structural differences within the loop E motif imply alternative mechanisms of viroid processing. *RNA* **13**, 824-834.
- Palacio-Bielsa, A., Romero-Durban, J. y Duran-Vila, N. (2004). Characterization of citrus HSVd isolates. *Arch Virol* **149**, 537-552.
- Palazzo, S.S., Panigrahi, A.K., Igo, R.P., Salavati, R. y Stuart, K. (2003). Kinetoplastid RNA editing ligases: complex association, characterization, and substrate requirements. *Mol Biochem Parasitol* **127**, 161-167.
- Palukaitis, P. (1987). Potato spindle tuber viroid: Investigation of the long-distance, intra-plant transport route. *Virology* **158**, 239-241.
- Papaefthimiou, I., Hamilton, A., Denti, M., Baulcombe, D., Tsagris, M. y Tabler, M. (2001). Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res* **29**, 2395-2400.
- Pascal, J.M., O'Brien, P.J., Tomkinson, A.E. y Ellenberger, T. (2004). Human DNA ligase I completely encircles and partially unwinds nicked DNA. *Nature* **432**, 473-478.
- Pascal, J.M. (2008). DNA and RNA ligases: structural variations and shared mechanisms. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 96-105.
- Paushkin, S.V., Patel, M., Furia, B.S., Peltz, S.W. y Trotta, C.R. (2004). Identification of a human endonuclease complex reveals a link between tRNA splicing and pre-mRNA 3' end formation. *Cell* **117**, 311-321.
- Pelchat, M., Côte, F. y Perreault, J.P. (2001). Study of the polymerization step of the rolling circle replication of peach latent mosaic viroid. *Arch Virol* **146**, 1753-1763.
- Phizicky, E.M., Schwartz, R.C. y Abelson, J. (1986). *Saccharomyces cerevisiae* tRNA ligase. Purification of the protein and isolation of the structural gene. *J Biol Chem* **261**, 2978-2986.
- Pick, L., Furneaux, H. y Hurwitz, J. (1986). Purification of wheat germ RNA ligase. II. Mechanism of action of wheat germ RNA ligase. *J Biol Chem* **261**, 6694-6704.
- Pick, L. y Hurwitz, J. (1986). Purification of wheat germ RNA ligase. I. Characterization of a ligase-associated 5'-hydroxyl polynucleotide kinase activity. *J Biol Chem* **261**, 6684-6693.
- Prody, G.A., Bakos, J.T., Buzayan, J.M., Schneider, I.R. y Bruening, G. (1986). Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* **231**, 1577-1580.
- Puchta, H., Ramm, K. y Sanger, H.L. (1988). The molecular structure of hop latent viroid (HLV), a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucleic Acids Res* **16**, 4197-4216.

- Puchta, H., Ramm, K., Luckinger, R., Hadas, R., Bar-Joseph, M. y Snger, H.L. (1991). Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CVd IV), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res* **19**, 6640.
- Qi, Y. y Ding, B. (2002). Replication of Potato spindle tuber viroid in cultured cells of tobacco and *Nicotiana benthamiana*: the role of specific nucleotides in determining replication levels for host adaptation. *Virology* **302**, 445-456.
- Qi, Y. y Ding, B. (2003a). Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. *Plant Cell* **15**, 2566-2577.
- Qi, Y. y Ding, B. (2003b). Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *Plant Cell* **15**, 1360-1374.
- Qi, Y., Pelissier, T., Itaya, A., Hunt, E., Wassenegger, M. y Ding, B. (2004). Direct role of a viroid RNA motif in mediating directional RNA trafficking across a specific cellular boundary. *Plant Cell* **16**, 1741-1752.
- Qu, F., Heinrich, C., Loss, P., Steger, G., Tien, P. y Riesner, D. (1993). Multiple pathways of reversion in viroids for conservation of structural elements. *EMBO J* **12**, 2129-2139.
- Rakowski, A.G., Szychowski, J.A., Avena, Z.S. y Semancik, J.S. (1994). Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroids. *J Gen Virol* **75**, 3581-3584.
- Rand, K.N. y Gait, M.J. (1984). Sequence and cloning of bacteriophage T4 gene 63 encoding RNA ligase and tail fibre attachment activities. *EMBO J* **3**, 397-402.
- Raymond, A. y Shuman, S. (2007). *Deinococcus radiodurans* RNA ligase exemplifies a novel ligase clade with a distinctive N-terminal module that is important for 5'-PO<sub>4</sub> nick sealing and ligase adenylation but dispensable for phosphodiester formation at an adenylylated nick. *Nucleic Acids Res* **35**, 839-849.
- Reanwarakorn, K. y Semancik, J.S. (1998). Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. *J Gen Virol* **79**, 3163-3171.
- Reid, C.E. y Lazinski, D.W. (2000). A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 424-429.
- Rezaian, M.A. (1990). Australian grapevine viroid--evidence for extensive recombination between viroids. *Nucleic Acids Res* **18**, 1813-1818.
- Riballo, E., Critchlow, S.E., Teo, S.H., Doherty, A.J., Priestley, A., Broughton, B., Kysela, B., Beamish, H., Plowman, N., Arlett, C.F., *et al.* (1999). Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr Biol* **9**, 699-702.
- Riesner, D., Henco, K., Rokohl, U., Klotz, G., Kleinschmidt, A.K., Domdey, H., Jank, P., Gross, H.J. y Sanger, H.L. (1979). Structure and structure formation of viroids. *J Mol Biol* **133**, 85-115.
- Rocheleau, L. y Pelchat, M. (2006). The Subviral RNA Database: a toolbox for viroids, the hepatitis delta virus and satellite RNAs research. *BMC Microbiol* **6**, 24.
- Rodio, M.E., Delgado, S., De Stradis, A., Gómez, M.D., Flores, R. y Di Serio, F. (2007). A viroid RNA with a specific structural motif inhibits chloroplast development. *Plant Cell* **19**, 3610-3626.
- Runnels, J.M., Soltis, D., Hey, T. y Snyder, L. (1982). Genetic and physiological studies of the role of the RNA ligase of bacteriophage T4. *J Mol Biol* **154**, 273-286.

- Rusche, L.N., Huang, C.E., Piller, K.J., Hemann, M., Wirtz, E. y Sollner-Webb, B. (2001). The two RNA ligases of the *Trypanosoma brucei* RNA editing complex: cloning the essential band IV gene and identifying the band V gene. *Mol Cell Biol* **21**, 979-989.
- Sabatini, R. y Hajduk, S.L. (1995). RNA ligase and its involvement in guide RNA/mRNA chimera formation. Evidence for a cleavage-ligation mechanism of *Trypanosoma brucei* mRNA editing. *J Biol Chem* **270**, 7233-7240.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3ª edn (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sänger, H.L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H.J. y Kleinschmidt, A.K. (1976). Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 3852-3856.
- Sano, T., Candresse, T., Hammond, R.W., Diener, T.O. y Owens, R.A. (1992). Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10104-10108.
- Sano, T. y Matsuura, Y. (2004). Accumulation of short interfering RNAs characteristic of RNA silencing precedes recovery of tomato plants from severe symptoms of potato spindle tuber viroid infection. *J Gen Plant Pathol* **70**, 50-53.
- Sawaya, R., Schwer, B. y Shuman, S. (2003). Genetic and biochemical analysis of the functional domains of yeast tRNA ligase. *J Biol Chem* **278**, 43928-43938.
- Scott, W.G., Murray, J.B., Arnold, J.R., Stoddard, B.L. y Klug, A. (1996). Capturing the structure of a catalytic RNA intermediate: the hammerhead ribozyme. *Science* **274**, 2065-2069.
- Schindler, I.M. y Mühlbach, H.P. (1992). Involvement of nuclear DNAdependent RNA-polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci* **84**, 221-229.
- Schnauffer, A., Panigrahi, A.K., Panicucci, B., Igo, R.P., Jr., Wirtz, E., Salavati, R. y Stuart, K. (2001). An RNA ligase essential for RNA editing and survival of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Science* **291**, 2159-2162.
- Schnölzer, M., Haas, B., Raam, K., Hofmann, H. y Sänge, H.L. (1985). Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTV). *EMBO J* **4**, 2181-2190.
- Schröder, A.R. y Riesner, D. (2002). Detection and analysis of hairpin II, an essential metastable structural element in viroid replication intermediates. *Nucleic Acids Res* **30**, 3349-3359.
- Schurer, H., Lang, K., Schuster, J. y Morl, M. (2002). A universal method to produce in vitro transcripts with homogeneous 3' ends. *Nucleic Acids Res* **30**, e56.
- Schwartz, R.C., Greer, C.L., Gegenheimer, P. y Abelson, J. (1983). Enzymatic mechanism of an RNA ligase from wheat germ. *J Biol Chem* **258**, 8374-8383.
- Semancik, J.S., Conejero, V. y Gerhart, J. (1977). Citrus exocortis viroid: survey of protein synthesis in *Xenopus laevis* oocytes following addition of viroid RNA. *Virology* **80**, 218-221.
- Semancik, J.S., Szychowski, J.A., Rakowski, A.G. y Symons, R.H. (1994). A stable 463 nucleotide variant of citrus exocortis viroid produced by terminal repeats. *J Gen Virol* **75**, 727-732.

- Serra, P., Barbosa, C.J., Darós, J.A., Flores, R. y Duran-Vila, N. (2008). Citrus viroid V: molecular characterization and synergistic interactions with other members of the genus *Apscaviroid*. *Virology* **370**, 102-112.
- Shuman, S. y Schwer, B. (1995). RNA capping enzyme and DNA ligase: a superfamily of covalent nucleotidyl transferases. *Mol Microbiol* **17**, 405-410.
- Shuman, S. (2001). Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **66**, 1-40.
- Shuman, S. y Lima, C.D. (2004). The polynucleotide ligase and RNA capping enzyme superfamily of covalent nucleotidyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 757-764.
- Shuman, S. y Glickman, M.S. (2007). Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat Rev Microbiol* **5**, 852-861.
- Shuman, S. (2009). DNA ligases: progress and prospects. *J Biol Chem* **284**, 17365-17369.
- Sidrauski, C., Cox, J.S. y Walter, P. (1996). tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **87**, 405-413.
- Sidrauski, C., Chapman, R. y Walter, P. (1998). The unfolded protein response: an intracellular signalling pathway with many surprising features. *Trends Cell Biol* **8**, 245-249.
- Silber, R., Malathi, V.G. y Hurwitz, J. (1972). Purification and properties of bacteriophage T4-induced RNA ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 3009-3013.
- Simpson, L., Sbicego, S. y Aphasizhev, R. (2003). Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a complex business. *RNA* **9**, 265-276.
- Singh, R.P., Nie, X. y Singh, M. (1999). Tomato chlorotic dwarf viroid: an evolutionary link in the origin of pospiviroids. *J Gen Virol* **80**, 2823-2828.
- Singleton, M.R., Hakansson, K., Timson, D.J. y Wigley, D.B. (1999). Structure of the adenylation domain of an NAD<sup>+</sup>-dependent DNA ligase. *Structure* **7**, 35-42.
- Small, I., Wintz, H., Akashi, K. y Mireau, H. (1998). Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol Biol* **38**, 265-277.
- Snopek, T.J., Sugino, A., Agarwal, K.L. y Cozzarelli, N.R. (1976). Catalysis of DNA joining by bacteriophage T4 RNA ligase. *Biochem Biophys Res Commun* **68**, 417-424.
- Snopek, T.J., Wood, W.B., Conley, M.P., Chen, P. y Cozzarelli, N.R. (1977). Bacteriophage T4 RNA ligase is gene 63 product, the protein that promotes tail fiber attachment to the baseplate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3355-3359.
- Soderhall, S. y Lindahl, T. (1973). Two DNA ligase activities from calf thymus. *Biochem Biophys Res Commun* **53**, 910-916.
- Soderhall, S. y Lindahl, T. (1976). DNA ligases of eukaryotes. *FEBS Lett* **67**, 1-8.
- Sogo, J.M., Koller, T. y Diener, T.O. (1973). Potato spindle tuber viroid. X. Visualization and size determination by electron microscopy. *Virology* **55**, 70-80.
- Spieker, R.L., Haas, B., Charng, Y.C., Freimuller, K. y Sanger, H.L. (1990). Primary and secondary structure of a new viroid 'species' (CbVd 1) present in the *Coleus blumei* cultivar 'Bienvenue'. *Nucleic Acids Res* **18**, 3998.
- Spieker, R.L. (1996a). A new sequence variant of *Coleus blumei* viroid 1 from the *Coleus blumei* cultivar 'Rainbow Gold'. *Arch Virol* **141**, 2153-2161.

- Spieker, R.L. (1996b). The molecular structure of Iresine viroid, a new viroid species from Iresine herbstii ('beefsteak plant'). *J Gen Virol* **77**, 2631-2635.
- Spieker, R.L., Marinkovic, S. y Sanger, H.L. (1996). A new sequence variant of Coleus blumei viroid 3 from the Coleus blumei cultivar 'Fairway Ruby'. *Arch Virol* **141**, 1377-1386.
- Sriskanda, V. y Shuman, S. (1998). Specificity and fidelity of strand joining by Chlorella virus DNA ligase. *Nucleic Acids Res* **26**, 3536-3541.
- Sriskanda, V., Moyer, R.W. y Shuman, S. (2001). NAD<sup>+</sup>-dependent DNA ligase encoded by a eukaryotic virus. *J Biol Chem* **276**, 36100-36109.
- Sriskanda, V. y Shuman, S. (2001). A second NAD<sup>(+)</sup>-dependent DNA ligase (LigB) in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* **29**, 4930-4934.
- Sriskanda, V. y Shuman, S. (2002). Role of nucleotidyl transferase motif V in strand joining by chlorella virus DNA ligase. *J Biol Chem* **277**, 9661-9667.
- St-Pierre, P., Hassen, I.F., Thompson, D. y Perreault, J.P. (2009). Characterization of the siRNAs associated with peach latent mosaic viroid infection. *Virology* **383**, 178-182.
- Stange, N., Beier, D. y Beier, H. (1992). Intron excision from tRNA precursors by plant splicing endonuclease requires unique features of the mature tRNA domain. *Eur J Biochem* **210**, 193-203.
- Stuart, K.D., Schnaufer, A., Ernst, N.L. y Panigrahi, A.K. (2005). Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci* **30**, 97-105.
- Subramanya, H.S., Doherty, A.J., Ashford, S.R. y Wigley, D.B. (1996). Crystal structure of an ATP-dependent DNA ligase from bacteriophage T7. *Cell* **85**, 607-615.
- Sugino, A., Snoper, T.J. y Cozzarelli, N.R. (1977). Bacteriophage T4 RNA ligase. Reaction intermediates and interaction of substrates. *J Biol Chem* **252**, 1732-1738.
- Sun, Y., Seo, M.S., Kim, J.H., Kim, Y.J., Kim, G.A., Lee, J.I., Lee, J.H. y Kwon, S.T. (2008). Novel DNA ligase with broad nucleotide cofactor specificity from the hyperthermophilic crenarchaeon Sulfolobococcus zilligii: influence of ancestral DNA ligase on cofactor utilization. *Environ Microbiol* **10**, 3212-3224.
- Sunderland, P.A., West, C.E., Waterworth, W.M. y Bray, C.M. (2004). Choice of a start codon in a single transcript determines DNA ligase 1 isoform production and intracellular targeting in Arabidopsis thaliana. *Biochem Soc Trans* **32**, 614-616.
- Sunderland, P.A., West, C.E., Waterworth, W.M. y Bray, C.M. (2006). An evolutionarily conserved translation initiation mechanism regulates nuclear or mitochondrial targeting of DNA ligase 1 in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **47**, 356-367.
- Symons, R.H. (1981). Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Res* **9**, 6527-6537.
- Tabler, M., Tzortzakaki, S. y Tsagris, M. (1992). Processing of linear longer-than-unit-length potato spindle tuber viroid RNAs into infectious monomeric circular molecules by a G-specific endoribonuclease. *Virology* **190**, 746-753.
- Tabler, M. y Tsagris, M. (2004). Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci* **9**, 339-348.
- Takeda, R., Petrov, A.I., Leontis, N.B. y Ding, B. (2011). A Three-Dimensional RNA Motif in Potato spindle tuber viroid Mediates Trafficking from Palisade Mesophyll to Spongy Mesophyll in Nicotiana benthamiana. *Plant Cell* **23**, 258-272.

- Tanaka, N. y Shuman, S. (2011). RtcB is the RNA ligase component of an Escherichia coli RNA repair operon. *J Biol Chem* **286**, 7727-7731.
- Taylor, R.M., Hamer, M.J., Rosamond, J. y Bray, C.M. (1998). Molecular cloning and functional analysis of the Arabidopsis thaliana DNA ligase I homologue. *Plant J* **14**, 75-81.
- Teo, S.H. y Jackson, S.P. (1997). Identification of Saccharomyces cerevisiae DNA ligase IV: involvement in DNA double-strand break repair. *EMBO J* **16**, 4788-4795.
- Thogersen, H.C., Morris, H.R., Rand, K.N. y Gait, M.J. (1985). Location of the adenylation site in T4 RNA ligase. *Eur J Biochem* **147**, 325-329.
- Tomkinson, A.E., Roberts, E., Daly, G., Totty, N.F. y Lindahl, T. (1991). Three distinct DNA ligases in mammalian cells. *J Biol Chem* **266**, 21728-21735.
- Tomkinson, A.E., Chen, J., Besterman, J. y Husain, I. (1996). Cellular functions of mammalian DNA ligases. In DNA Damage and Repair, Vol 2: DNA Repair in Higher Eukaryotes, J.A. Nickoloff y M.F. Hoekstra, eds. (Totowa, NJ, Humana Press), pp. 181-198.
- Tomkinson, A.E., Vijayakumar, S., Pascal, J.M. y Ellenberger, T. (2006). DNA ligases: structure, reaction mechanism, and function. *Chem Rev* **106**, 687-699.
- Tsagris, M., Tabler, M., Muhlbach, H.P. y Sanger, H.L. (1987). Linear oligomeric potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs are accurately processed in vitro to the monomeric circular viroid proper when incubated with a nuclear extract from healthy potato cells. *EMBO J* **6**, 2173-2183.
- Tyc, K., Kikuchi, Y., Konarska, M., Filipowicz, W. y Gross, H.J. (1983). Ligation of endogenous tRNA 3' half molecules to their corresponding 5' halves via 2'-phosphomonoester,3',5'-phosphodiester bonds in extracts of Chlamydomonas. *EMBO J* **2**, 605-610.
- Uhlenbeck, O.C. (1983). T4 RNA ligase. *Trends Biochem Sci* **8**, 94-96.
- van Attikum, H., Bundock, P., Overmeer, R.M., Lee, L.Y., Gelvin, S.B. y Hooykaas, P.J. (2003). The Arabidopsis AtLIG4 gene is required for the repair of DNA damage, but not for the integration of Agrobacterium T-DNA. *Nucleic Acids Res* **31**, 4247-4255.
- Verhoeven, J.T., Jansen, C.C., Roenhorst, J.W., Flores, R. y de la Pena, M. (2009). Pepper chat fruit viroid: biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. *Virus Res* **144**, 209-214.
- Visvader, J.E., Forster, A.C. y Symons, R.H. (1985). Infectivity and in vitro mutagenesis of monomeric cDNA clones of citrus exocortis viroid indicates the site of processing of viroid precursors. *Nucleic Acids Res* **13**, 5843-5856.
- Visvader, J.E. y Symons, R.H. (1986). Replication of in vitro constructed viroid mutants: location of the pathogenicity-modulating domain of citrus exocortis viroid. *EMBO J* **5**, 2051-2055.
- Voinnet, O. (2008). Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 464-470.
- von Heijne, G. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J* **5**, 1335-1342.
- Wang, L.K., Ho, C.K., Pei, Y. y Shuman, S. (2003). Mutational analysis of bacteriophage T4 RNA ligase 1. Different functional groups are required for the nucleotidyl transfer and

- phosphodiester bond formation steps of the ligation reaction. *J Biol Chem* **278**, 29454-29462.
- Wang, L.K. y Shuman, S. (2005). Structure-function analysis of yeast tRNA ligase. *RNA* **11**, 966-975.
- Wang, L.K., Schwer, B., Englert, M., Beier, H. y Shuman, S. (2006a). Structure-function analysis of the kinase-CPD domain of yeast tRNA ligase (Trl1) and requirements for complementation of tRNA splicing by a plant Trl1 homolog. *Nucleic Acids Res* **34**, 517-527.
- Wang, L.K., Schwer, B. y Shuman, S. (2006b). Structure-guided mutational analysis of T4 RNA ligase 1. *RNA* **12**, 2126-2134.
- Wang, L.K., Nandakumar, J., Schwer, B. y Shuman, S. (2007a). The C-terminal domain of T4 RNA ligase 1 confers specificity for tRNA repair. *RNA* **13**, 1235-1244.
- Wang, M.B., Bian, X.Y., Wu, L.M., Liu, L.X., Smith, N.A., Isenegger, D., Wu, R.M., Masuta, C., Vance, V.B., Watson, J.M., *et al.* (2004). On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3275-3280.
- Wang, Y., Zhong, X., Itaya, A. y Ding, B. (2007b). Evidence for the existence of the loop E motif of Potato spindle tuber viroid in vivo. *J Virol* **81**, 2074-2077.
- Warrilow, D. y Symons, R.H. (1999). Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato in vivo. *Arch Virol* **144**, 2367-2375.
- Wassenegger, M., Spieker, R.L., Thalmeir, S., Gast, F.U., Riedel, L. y Sanger, H.L. (1996). A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for nicotiana tabacum. *Virology* **226**, 191-197.
- Waterworth, W.M., Masnavi, G., Bhardwaj, R.M., Jiang, Q., Bray, C.M. y West, C.E. (2010). A higher plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *Plant J*.
- Wei, Y.F., Robins, P., Carter, K., Caldecott, K., Pappin, D.J., Yu, G.L., Wang, R.P., Shell, B.K., Nash, R.A., Schar, P., *et al.* (1995). Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA ligase IV and DNA ligase III, an enzyme active in DNA repair and recombination. *Mol Cell Biol* **15**, 3206-3216.
- West, C.E., Waterworth, W.M., Jiang, Q. y Bray, C.M. (2000). Arabidopsis DNA ligase IV is induced by gamma-irradiation and interacts with an Arabidopsis homologue of the double strand break repair protein XRCC4. *Plant J* **24**, 67-78.
- Westaway, S.K., Phizicky, E.M. y Abelson, J. (1988). Structure and function of the yeast tRNA ligase gene. *J Biol Chem* **263**, 3171-3176.
- Westaway, S.K., Belford, H.G., Apostol, B.L., Abelson, J. y Greer, C.L. (1993). Novel activity of a yeast ligase deletion polypeptide. Evidence for GTP-dependent tRNA splicing. *J Biol Chem* **268**, 2435-2443.
- Wilkinson, A., Day, J. y Bowater, R. (2001). Bacterial DNA ligases. *Mol Microbiol* **40**, 1241-1248.
- Wilson, T.E., Grawunder, U. y Lieber, M.R. (1997). Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature* **388**, 495-498.
- Willer, M., Rainey, M., Pullen, T. y Stirling, C.J. (1999). The yeast CDC9 gene encodes both a nuclear and a mitochondrial form of DNA ligase I. *Curr Biol* **9**, 1085-1094.

- Woo, Y.M., Itaya, A., Owens, R.A. y Tang, L. (1999). Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *Plant J* **17**, 627-635.
- Wood, W.B., Conley, M.P., Lyle, H.L. y Dickson, R.C. (1978). Attachment of tail fibers in bacteriophage T4 assembly. Purification, properties, and site of action of the accessory protein coded by gene 63. *J Biol Chem* **253**, 2437-2445.
- Xu, Q., Teplow, D., Lee, T.D. y Abelson, J. (1990). Domain structure in yeast tRNA ligase. *Biochemistry* **29**, 6132-6138.
- Yin, S., Ho, C.K. y Shuman, S. (2003). Structure-function analysis of T4 RNA ligase 2. *J Biol Chem* **278**, 17601-17608.
- Yin, S., Kiong Ho, C., Miller, E.S. y Shuman, S. (2004). Characterization of bacteriophage KVP40 and T4 RNA ligase 2. *Virology* **319**, 141-151.
- Zaitlin, M., Niblett, C.L., Dickson, E. y Goldberg, R.B. (1980). Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by solution and filter hybridization. *Virology* **104**, 1-9.
- Zhao, Y., Owens, R.A. y Hammond, R.W. (2001). Use of a vector based on Potato virus X in a whole plant assay to demonstrate nuclear targeting of Potato spindle tuber viroid. *J Gen Virol* **82**, 1491-1497.
- Zhong, X., Leontis, N., Qian, S., Itaya, A., Qi, Y., Boris-Lawrie, K. y Ding, B. (2006). Tertiary structural and functional analyses of a viroid RNA motif by isostericity matrix and mutagenesis reveal its essential role in replication. *J Virol* **80**, 8566-8581.
- Zhong, X., Tao, X., Stombaugh, J., Leontis, N. y Ding, B. (2007). Tertiary structure and function of an RNA motif required for plant vascular entry to initiate systemic trafficking. *EMBO J* **26**, 3836-3846.
- Zhong, X., Archual, A.J., Amin, A.A. y Ding, B. (2008). A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. *Plant Cell* **20**, 35-47.
- Zhu, H. y Shuman, S. (2008). Bacterial nonhomologous end joining ligases preferentially seal breaks with a 3'-OH monoribonucleotide. *J Biol Chem* **283**, 8331-8339.
- Zhu, Y., Green, L., Woo, Y.M., Owens, R. y Ding, B. (2001). Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology* **279**, 69-77.
- Zhu, Y., Qi, Y., Xun, Y., Owens, R. y Ding, B. (2002). Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. *Plant Physiol* **130**, 138-146.
- Zillmann, M., Gorovsky, M.A. y Phizicky, E.M. (1991). Conserved mechanism of tRNA splicing in eukaryotes. *Mol Cell Biol* **11**, 5410-5416.



# AGRADECIMIENTOS

---



En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, José Antonio y Ricardo, el darme la oportunidad de realizar este trabajo y el aconsejarme durante toda esta etapa. En especial me gustaría agradecer a José Antonio, en cuyo laboratorio me he formado y del que tanto he aprendido, su dedicación. Al final creo que hemos conseguido entendernos y me llevo un grato recuerdo de estos años.

A mis compañeros del lab 22b, luego 2.05 y finalmente 1.05 he de agradecerles el buen ambiente que siempre ha habido en el lab. Ha sido un placer trabajar con vosotros y os agradezco vuestra paciencia con mis manías y meticulosidad.

También quiero agradecer a los compañeros del lab 1.04 que siempre me hayan tendido una mano y me hayan prestado tantas cosas. En especial quiero agradecer a Amparo su ayuda con las plantitas y su siempre amable sonrisa. Y a Selma, que tantos y tan buenos consejos me ha dado siempre; sin duda he aprendido mucho de ella. Gracias también a Toni, por aconsejarme siempre con gusto.

Gracias a toda la gente con la que he compartido estos años en el IBMCP, porque al fin y al cabo todos compartimos ilusiones, proyectos y decepciones. Gracias a todos aquellos que me han tendido una mano cuando lo he necesitado. Gracias por las amenas charlas durante las comidas. Gracias por los cafés de media tarde. Gracias por convertirnos muchos de vosotros en mis amigos.

Agradezco también a la gente de los servicios del IBMCP su contribución de una u otra manera a este trabajo. Sobre todo a la gente del invernadero por su ayuda con las plantas.

No puedo dejar de mencionar a la gente del laboratorio de plantas del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología donde me inicié en esto de la ciencia. Son inolvidables las risas, los cafés, esas cenas en el tráfico y todo lo que allí aprendí.

Durante estos años, la tesis ha sido una parte muy importante de mi vida, que tengo la suerte de compartir con muy buenos amigos; del DSV, de la facultad, de la ciencia y de la vida, como me gusta decir. Gracias a todos por estar ahí, por escucharme, por animarme, por enseñarme, por quererme como soy, por encontrarnos en el cedro, en beni, por los viajes, por los cafés, por las cervezas, por las risas, por los encuentros y desencuentros, por los asados, por hacerme tía...por todo chic@s! ¡Gracias! Y en especial gracias a Rafa y a Kuki por sus inestimables contribuciones a esta tesis.

Por supuesto nada de esto sería posible sin mi familia. Mucho de lo que soy se lo debo sin duda a mis padres, que tanto amor me han dado. Sobran las palabras. GRACIAS. Y gracias a mi hermano Pau, del que sin duda no dejo de aprender. OS QUIERO.

Y por último, me gustaría agradecer a Javi el amor que me da. Gracias por compartir conmigo los buenos y los malos momentos. Juntos hemos compartido estos últimos años en los que tantas cosas hemos aprendido. Juntos hemos crecido un poco más. Y juntos empezamos una nueva etapa. Simplemente, gracias por todo.









Los viroides son pequeños RNAs circulares de cadena sencilla (246-401 nt) patógenos de plantas. A pesar de su pequeño tamaño y de no codificar proteínas, son capaces de replicarse autónomamente, moverse sistémicamente y, en la mayoría de los casos, provocar enfermedades en sus plantas huésped. La replicación de los viroides ocurre a través de un mecanismo de círculo rodante con intermediarios de RNA que consta de tres etapas: (1) transcripción RNA-RNA que origina RNAs oligoméricos de polaridad complementaria, (2) procesamiento de algunos de estos oligómeros a monómeros lineales, y (3) circularización de estos últimos. Y puesto que los viroides no codifican proteínas propias, su replicación depende de la interacción del RNA viroidal con factores del huésped.

En la presente Tesis Doctoral se ha pretendido profundizar en el conocimiento de la replicación de los viroides nucleares y cloroplásticos, y más concretamente en la etapa final del ciclo, la ligación de los intermediarios monoméricos lineales.

En el caso de los factores celulares implicados en la ligación de los RNAs monoméricos lineales de los viroides nucleares (familia *Pospiviroidae*), se ha identificado la DNA ligasa 1 como el factor probablemente implicado en dicha reacción. Respecto a los factores del huésped que pudieran estar implicados en la ligación de los intermediarios replicativos de los viroides cloroplásticos (familia *Avsunviroidae*), diferentes ensayos *in vitro* han puesto de manifiesto que la tRNA ligasa es muy probablemente el factor del huésped implicado en la última etapa de su replicación.