

DESCENDINT L'ESCALA BIOLÒGICA CAP A LA FRONTERA I L'ORIGEN DE LA VIDA: ELS VIROIDES

Escrit per:

Ricardo Flores Pedauyú

Institut de Biologia Molecular i Cel·lular de Plantes
Universitat Politècnica de València
Consell Superior d'Investigacions Científiques

Introducció: els límits de l'escala biològica

Els viroides són, en certa manera, l'esglaó més baix de l'escala biològica. Aquesta breu presentació suposo que serà suficient per atreure l'atenció de qualsevol interessat en les Ciències Biològiques (i probablement de qualsevol interessat "a seques"), ja que els límits de totes les escales desperten una particular atracció: l'interès pels dinosaures, l'extrem superior (al menys pel que fa a mida) de la història de la vida a la Terra, il·lustra bé el que vull dir. M'afanyo a matisar (ja ho he fet en incloure l'"en certa manera" a la primera frase) que col·locar als viroides i els dinosaures en ambdós extrems de l'escala biològica no és formalment correcte, atès que com més endavant es veurà, els viroides manquen de metabolisme propi, a diferència dels dinosaures, que sense cap dubte el tingueren. Però viroides i dinosaures comparteixen una propietat característica dels éssers vius: la capacitat de generar còpies de si mateixos en un entorn adequat, o en altres paraules, estar dotats de replicació o multiplicació autònoma. És aquest el marc en el qual els viroides representarien la frontera inferior coneguda de la vida (i és difícil que aquest límit descendeixi molt més; tornaré sobre aquest punt més endavant).

Al llarg de la segona meitat del segle XIX, els treballs de Koch i Pasteur assentaren les bases de la Microbiologia com a disciplina i en particular establiren la naturalesa bacteriana dels agents causals d'un seguit de malalties infeccioses. Tanmateix, cap al final de la seva vida, Pasteur fou incapaç d'aplicar amb èxit la metodologia que havia desenvolupat i que li havia permès cultivar i identificar nombrosos agents infecciosos, en el cas de l'agent de la ràbia. La raó d'aquest fracàs és que estava tractant amb el que avui anomenem un virus, un patògen de naturalesa radicalment distinta als descrits fins aleshores.

Per entendre millor el significat de les mides inferiors de l'escala biològica convé recordar que una cèl·lula procariota (és a dir sense nucli i per tant de les més simples) com la del bacteri *Escherichia coli* que es fa servir com a model en molts estudis de biologia bàsica, té aproximadament una mida de $1 \times 2 \mu\text{m}$ i



FIGURA 1. Síntomes induïts pel PSTVd en tubercles del seu hoste natural (patata, a dalt a l'esquerra) i en plantes del seu hoste experimental (tomàquet, a baix a l'esquerra). En ambdós casos els controls sans apareixen a la dreta (Cortesia de T.O. Diener).

un genoma d'àcid desoxirribonucleic (DNA) de 4×10^6 parells de bases. Una cèl·lula així és capaç de créixer en un medi mínim compost de sals minerals i sucre, cosa que indica que la seva simplicitat es només aparent ja que ha de posseir tota la maquinària necessària per, a partir d'aquest medi mínim, obtenir l'energia i amb ella sintetitzar els components químics que li permetin créixer i replicar-se. Si pensem ara en una cèl·lula encara més senzilla com la del *Mycoplasma genitalium*, que manca de paret i està separada del medi extern per només una membrana lipídica, el seu diàmetre es redueix a $0.3 \mu\text{m}$ i el seu genoma (també de DNA) a uns 5×10^5 parells de bases. Aquesta simplificació estructural comporta una major dependència del medi de cultiu, que és molt més complex (en alguns casos el desconeixement d'aquest medi ha impedit el cultiu *in vitro* de certs micoplasmes). Descendim un altre esglaó ara i entrem

en el món dels virus: ja no estem tractant amb cèl·lules atès que els virus no ho són i perquè la seva mida és notablement inferior al d'aquestes. Per exemple, un virus senzill com el que causa la malaltia del mosaic del tabac està format per partícules de 300x18 nm que contenen un àcid ribonucleic (RNA) d'aproximadament unes 6×10^3 bases recobert per múltiples còpies d'una proteïna que l'encapsida. Aquesta extremada simplificació estructural condueix paral·lelament a un increment de la complexitat del medi de cultiu, que en aquest cas està compost per les cèl·lules de l'hoste. Els virus són per tant paràsits intracel·lulars estrictes, és a dir que depenen per a la seva multiplicació del metabolisme de les cèl·lules que infecten. Aquests tres exemples, (bacteri, micoplasma, i virus), il·lustren un altre punt: que la replicació dels éns biològics requereix un cert nivell de complexitat del sistema format per ells mateixos i el seu entorn més immediat, de manera que si la complexitat d'un dels dos components del sistema descendeix, la de l'altre augmenta.

Virus i viroides

Els virus foren descoberts cap a finals del segle XIX, essent el primer d'ells el causant de la malaltia del mosaic del tabac. Així doncs, la Virologia, com la Genètica (per posar un altre exemple ben conegut) va néixer com una disciplina lligada al món de les plantes, que al llarg de la història ha estat una font de nous i interessantíssims descobriments (dic això perquè la investigació biològica pateix, o al menys a mi m'ho sembla, d'una excessiva focalització, sobretot en tot allò relacionat amb la Biomedicina).

L'estudi detallat dels virus va progressar al llarg de la primera meitat del segle XX (trobant-se que infectaven tot tipus de cèl·lules: vegetals, animals, així com fongs, bacteris i fins i tot micoplasmes), i va conduir al paradigma que eren els representants més senzills de l'escala biològica. Fou una gran sorpresa, que ara fa aproximadament 30-35 anys apareguessin les primeres proves

experimentals que indicaven la necessitat de modificar aquest paradigma ja que existien unes entitats biològiques, els viroides, encara més senzilles. No cal dir que assentar aquest nou paradigma no va ésser tasca fàcil ni d'un dia, sobretot quan les dades provenien d'una àrea de coneixement de "segona divisió" (la Biologia Vegetal, demano disculpes per la reincidència). Però com va dir Víctor Hugo: "Une invasion d'armées peut être résistée mais non pas une idée lorsque son temps est arrivé" (Una invasió d'exèrcits pot ésser resistida, però no una idea a la qual li ha arribat el seu moment).

Els viroides van ésser descoberts per T. O. Diener en tractar d'identificar l'agent causal d'una malaltia que inicialment es va suposar induïda per un virus: la malaltia del tubercle fusiforme de la patata (*potato spindle tuber*, PST) (Fig. 1-pàgina anterior). No obstant això, els experiments dirigits a concentrar les presumptes partícules virals (els virions) van conduir a resultats inesperats: després d'una prolongada ultracentrifugació, la major part del "principi infecció" romaní en el sobrenedant (mentre que virions típics utilitzats com a control sedimentaven) i després d'una centrifugació zonal en gradient de sacarosa, el citat principi migrava a regions del gradient que corresponien a entitats de mida considerablement inferior a virions convencionals. A més, observacions similars es van repetir després de pretractar els extractes amb un agent desproteïnitant, cosa que indicava que el "principi infecció" era un àcid nucleic nuu. Altres experiments fent servir l'electroforesi en gels de poliacrilamida (una tècnica per separar mesclures complexes d'àcids nucleics), van mostrar que el "principi infecció" era un àcid nucleic extremadament petit, un RNA per ésser més específics (atès que era resistent a la desoxirribonucleasa i sensible a la ribonucleasa), d'estructura probablement circular (ja que no es veia afectat per tractaments amb exonucleases, una classe d'enzims que catalitzen la degradació dels àcids nucleics a partir dels seus extrems). Convé ara explicar el que he vingut denominant "principi infecció". Un requeriment

clau en moltes branques de la ciència és disposar d'un sistema experimental amb el qual es pugui abordar una qüestió. Com més simple és el sistema i més ràpidament dona respostes, molt millor. Els experiments clàssics de genètica bacteriana són un bon exemple al respecte: les plaques es sembraven la nit anterior i els resultats es llegien el dia següent. Quan encara es desconeixia la naturalesa de l'agent causal de la malaltia PST, l'única manera de "seguir-li la pista" era per la seva infectivitat: es feia un extracte de teixit infectat, es sotmetia a un tractament (per exemple incubar-lo amb una nucleasa), i l'efecte es mesurava inoculant la preparació resultant en un bloc de plantes sanes per observar què havia succeït amb "el principi infecció" (si la seva infectivitat havia disminuït o romaní inalterada; en paral·lel s'efectuava un experiment control, en el qual una alíquota de l'extracte original, sense tractament, s'inoculava en un altre bloc de plantes sanes). Aviat es va descobrir que els bioassajos s'acceleraven notablement si en comptes de realitzar-los amb patata (l'hoste natural) s'efectuaven amb tomàquet (un hoste artificial), perquè el tomàquet mostrava símptomes en un temps relativament curt (12-14 dies) i era, a més, molt fàcil de cultivar en un hivernacle (Fig. 1). Tots els experiments descrits més amunt van ésser realitzats amb aquesta metodologia (bioassajos en tomàquet), que si bé només era semiquantitativa, va permetre notables progressos: el "principi infecció" de la malaltia PST era un petit RNA presumiblement circular i dotat de replicació autònoma, al qual Diener va denominar viroide. Era possible que aquest RNA fos un satèl·lit, una classe d'RNAs ja coneguts que són funcionalment dependents d'un virus auxiliar. Es diu en sentit figurat que són satèl·lits, perquè si bé el virus pot trobar-se sense l'RNA, aquest últim es troba sempre acompanyant al primer (un incís: aquests RNAs satèl·lits són paràsits dels seus virus auxiliars, i per tant existeix parasitisme per sota del nivell cel·lular). Tanmateix, els intents de trobar partícules virals en teixits afectats per la malaltia PST no van donar resultat i, a més, l'hipotètic virus auxiliar hauria de transmetre's molt eficientment a

través de la llavor (així es propaga el tomàquet), cosa que és inusual en virus vegetals, i hauria d'estar també present en altres hostes experimentals que ja es coneixien.

Seguim amb la història del descobriment dels viroides. En contra d'allò que pugui semblar a primera vista, les comunitats científiques són intrínsecament conservadores i tenen bones raons per ser-ho, ja que els ha costat molt assentar el conjunt de paradigmes compartits que formen el seu corpus doctrinal. Modificar significativament aquest corpus exigeix arguments de pes, tant més pes com més important sigui la modificació. Era difícil convèncer a la comunitat de viròlegs que existia quelcom més simple que els virus, a partir d'experiments basats exclusivament en una tecnologia "primitiva" com la dels bioassajos. En aquell temps, al voltant del 1970, les tècniques físico-químiques ja havien irromput en els estudis biològics com a eines més "fines". Una part dels viròlegs començaven a autodenominar-se "moleculars" per deixar clara la seva afiliació, i a aquests només era possible convèncer-los amb les seves pròpies armes. L'argument definitiu de l'existència dels viroides es va obtenir en identificar el "principi infeccios" de la malaltia PST amb una entitat física: la infectivitat de preparacions d'RNA separades per electroforesi en gels de poliàcrilamida estava estrictament associada amb una banda (detectable per una propietat física, la seva absorció en l'ultraviolat), que estava absent en controls sans. A més, quan aquesta banda purificada s'analitzà mitjançant microscòpia electrònica es va poder "visualitzar directament" un petit RNA amb les propietats de mesura predites (Fig. 2). A aquest RNA se'l va batejar, ara amb tota propietat, com el viroide del tubercle

fusiforme de la patata (*potato spindle tuber viroid*, PSTVd).

Aviat es va trobar un segon viroide, el que causa l'exocortis dels cítrics (*citrus exocortis viroid*, CEVd) i amb el temps uns altres més que actualment formen una llista d'aproximadament 30 membres (veure més avall). La majoria causen malalties que afecten a cultius d'interès econòmic, tant herbàcis (patata, tomàquet, cogombre, crisantem, i llúpol) com llenyosos (cítrics, palmera, vinya i diversos fruiters com avocat, pomera, pruner, presseguer i perer). Els seus efectes poden ésser devastadors, tal és el cas d'un viroide que ha ocasionat la mort de més de vint milions de palmeres a Àsia (principalment a les Filipines), mentre que altres viroides es repliquen en els seus hostes sense causar-los cap dany aparent.

Els viroides assoleixen l'estatus d'entitats singulars de ple dret

No he comentat fins ara què significa "petit", en atribuir aquest qualificatiu als viroides. Més amunt s'ha dit que l'RNA del virus del mosaic del tabac (*tobacco mosaic virus*, TMV) té aproximadament unes 6.000 bases. Les primeres estimacions van donar per a l'RNA del PSTVd una mida d'un 200-300 bases (no massa distant de la que després es va establir per seqüenciació); és a dir, unes 20-30 vegades inferior a l'RNA del TMV. Una diferència certament apreciable, però ¿suficient per establir una nova classe d'ens biològic? Un altre aspecte que crida l'atenció dels viroides és el caràcter circular del seu RNA, ja que l'RNA del TMV i de molts altres ribovirus (virus d'RNA) és lineal. Aquestes propietats estructurals

tan especials, ¿tenien implicacions funcionals també singulars? Aquesta era, sense cap dubte, la següent pregunta amb major interès. Tots els virus codifiquen en els seus genomes si més no una, i habitualment varies, proteïnes pròpies. Tornant al TMV, el seu RNA codifica la proteïna que forma la càpsida que el recobreix, a més d'altres, entre les quals destaca una subunitat de l'RNA polimerasa que catalitza la seva replicació, i una proteïna anomenada de moviment que li permet a l'RNA viral translocar-se de cèl·lula a cèl·lula. ¿Codifiquen els viroides alguna proteïna? Tots els experiments han conduït a la mateixa conclusió: no. Encara que aquesta conclusió (com qualsevol altra que estigui basada en resultats negatius) s'hagi de prendre amb reserves, les dades disponibles la sostenen sòlidament: 1) els intents fent servir sistemes *in vitro* i *in vivo*

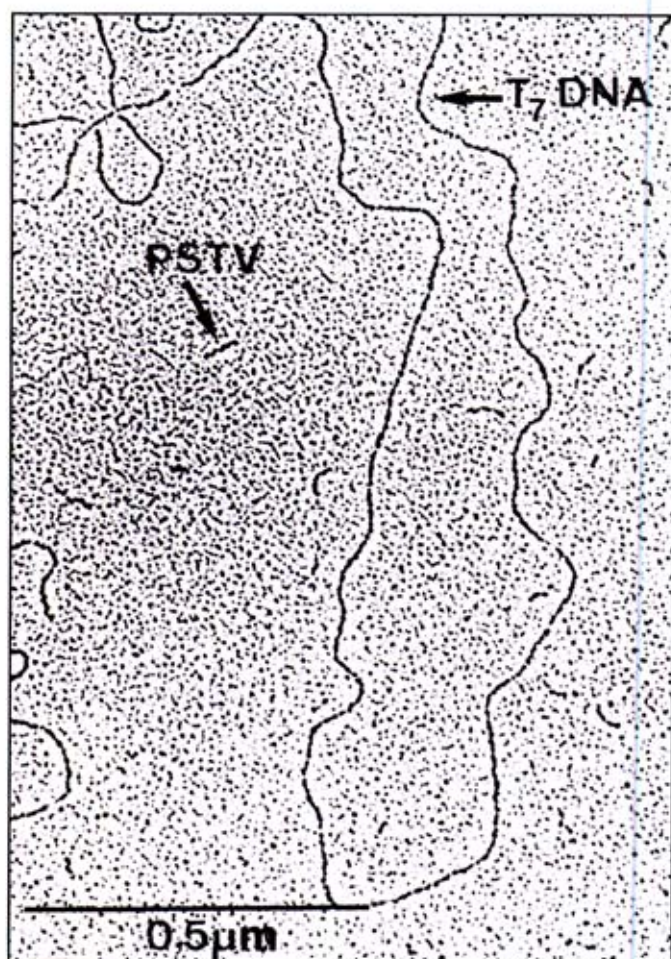


FIGURA 2. Micrografia electrònica d'una barreja de preparacions purificades de l'RNA del PSTVd i del DNA del colifag T7. La diferència entre les mides d'ambdós genomes i l'estructura en vareta de l'RNA viroidal s'observen clarament. (Micrografia original de J.M. Sogo i Th. Koller. Reproduïda amb permís de "Viroids and Viroid Diseases", T.O. Diener, John Wiley and Sons, Inc., 1979).

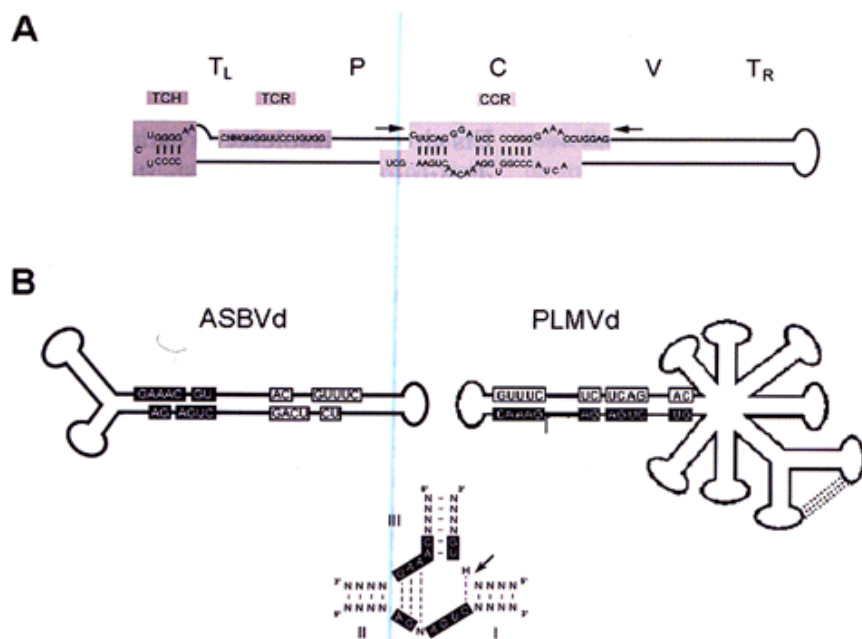


FIGURA 4. Models estructurals per als viroides. (A) Estructura en forma de vareta proposada per als membres de la família Pospiviroidae en la qual s'indica la situació aproximada de cinc dominis estructurals C (central), P (patogènic), V (variable), i T_L i T_R (terminal esquerra i dreta, respectivament). Dintre del domini C es troba la regió central conservada (CCR) (la que aquí es presenta és la del gènere *Pospiviroid*), i dins del domini T_L la regió terminal conservada (TCR) i la forqueta terminal conservada (TCH) que, alternativament, es presenten en els membres d'aquesta família. Les fletxes denoten seqüències flanquejants que junt amb les de la branca superior de la CCR formen una repetició invertida imperfecta. (B) A dalt, estructura quasi en vareta proposada per als viroides del tacat solar de l'avocat (*avocado sunblotch viroid*, ASBVd) i del mosaic latent del préssec (*peach latent mosaic viroid*, PLMVd), ambdós de la família *Apscaviroidae*, amb els nucleòtids conservats en totes les estructures de cap de martell dintre de caixes amb fons negre i blanc per les polaritats (+) i (-) respectivament. Les línies discontinües en PLMVd indiquen un pseudonús, un element d'estructura terciària. A baix, estructura de cap de martell consens amb els nucleòtids conservats en totes les estructures de cap de martell dintre de caixes amb fons negre i amb la fletxa assenyalant el punt d'autotall. H indica A, C o U, i N qualsevol nucleòtid. Les línies contínues i discontinües denoten parells de bases canònics (Watson-Crick) i no canònics, respectivament. El bucle central està flanquejat per tres hèlixs I, II i III.

per examinar si els viroides tenen activitat d'RNA missatgers (mRNAs) han donat resultats negatius, 2) encara que en plantes infectades per viroides s'ha detectat l'acumulació de certes proteïnes, aquestes són codificades per l'hoste i no per l'RNA viroidal, i 3) l'anàlisi de l'estructura primària de nombrosos viroides (es va començar a disposar d'aquestes dades a partir de 1978, quan es va seqüenciar el PSTVd) ha demostrat que manquen de codons d'iniciació típics AUG i de marcs de lectura oberta d'una certa longitud, que estiguin conservats entre membres pròximament relacionats del grup. Així doncs, virus i viroides no només són estructuralment diferents, sinó també funcionalment. De forma simplificada, podríem dir que mentre els virus són essencialment paràsits de la maquinària de traducció dels seus hosts, els viroides ho són de la de transcripció. Els viroides han de segrestar RNA

polimerases cel·lulars pre-existents i reprogramar-les perquè catalitzin la seva replicació. A més, els viroides han d'exercir el seu efecte patogènic per interacció directa del seu RNA (no mitjançada per proteïnes pròpies) amb factors de l'hoste.

"Res en biologia no té sentit si no és a la llum de l'evolució" (T. Dobzhanski). Apliquem aquesta clàssica norma al cas que ens ocupa. Tenint en compte les propietats estructurals i funcionals tan diferents entre virus i viroides, ¿es pot pensar que els viroides, en contra d'allò que el seu nom sembla suggerir, tenen un origen evolutiu independent dels virus? Convido el lector que ha tingut la paciència d'arribar fins aquí a que faci les seves conjetures. Si la seva paciència no està encara esgotada, trobarà la resposta (o millor, una resposta, encara que amb molt bona base), més endavant.

Estructura i classificació dels viroides

Ja he esmentat que la llista de viroides caracteritzats comprèn uns 30. Algú ha dit que "un és una excepció i dos quasi una generalitat", cosa que en altres paraules significa que el fet de disposar de més d'un membre d'un grup no només permet consolidar aquest grup (amb un sol component no existeix aquest tal grup), sinó també identificar els trets conservats que el caracteritzen i crear subdivisions en el mateix si és procedent; sense donar més tombos: establir una classificació, assumepte que certament ajuda a ordenar els coneixements però que resulta particularment espinós (i subjectiu) en Biologia, si considerem que es tracta de dividir un "continuum" en un seguit de seccions discretes. Per als viroides (i els virus) s'han adoptat recentment, no sense certa oposició, els criteris que es fan servir per classificar els organismes (amb categories taxonòmiques tals com família, gènere i espècie), i el Comitè Internacional de Taxonomia dels Virus, a través d'uns grups d'estudi formats per especialistes, proposa i actualitza periòdicament la classificació (i ocasionalment la modifica).

L'anàlisi comparada de l'estructura primària (la seqüència) i secundària (com es replega la cadena d'RNA per mitjà d'interaccions de Watson-Crick) ha revelat que la majoria dels viroides adopten una estructura secundària en vareta o quasi-vareta, amb regions de doble cadena separades per bucles de cadena senzilla, en la qual poden distingir-se cinc dominis (Fig. 3A) i tres motius conservats: 1) la regió central conservada (*central conserved region*, CCR), formada per dues sèries de residus oposats en la branca inferior i superior, 2) la regió terminal conservada (*terminal conserved region*, TCR), localitzada a la branca superior del domini terminal esquerre, i 3) la forqueta terminal conservada (*terminal conserved hairpin*, TCH), que també es troba en el domini terminal esquerre. La seqüència de la CCR, i la presència o absència de TCR i TCH (ambdós motius no co-existeixen simultàniament) ha servit per agrupar la

majoria dels viroides (espècies) en una primera família, *Pospiviroidae*, i aquesta en cinc gèneres (Fig. 4). Tanmateix, aquests tres motius conservats no existeixen en quatre viroides, que presenten l'extraordinària propietat que les seves cadenes d'ambdues polaritats són capaces d'autotallar-se per mitjà de ribozims de cap de martell (veure més endavant); a més, dos d'ells adopten estructures secundàries clarament ramificades (en comptes de les de vareta), i fins i tot elements d'estructura terciària (interaccions entre bucles terminals d'alguna de les branques) que ajuden a estabilitzar el plegament. En l'estructura terciària dels RNAs les interaccions ja no són només de Watson-Crick sinó d'altres classes variades, que vénen essent identificades al llarg dels darrers anys (Fig. 3B). Aquesta classificació té un important recolzament des d'una altra perspectiva. Els membres de la família *Pospiviroidae* es repliquen i s'acumulen en el nucli mentre que els de la família *Avsunviroidae* ho fan en el cloroplast (encara que això només ha estat estudiat en alguns membres de cada família, tot indica que es tracta d'una pauta general). Aquesta correlació entre propietats estructurals i funcionals (presència d'un o més motius conservats i replicació en un o altre orgànu) no és casual amb tota probabilitat. A més, com que ambdós orgànuls tenen una composició molt diferent, l'enzimologia de la replicació d'ambdues famílies viroidals ha de ésser molt diferent.

Com es multipliquen els viroides a l'interior de les cèl·lules que parasiten?

L'RNA viroidal infecciós (al qual, per conveni, se li assigna la polaritat positiva) en entrar en la cèl·lula hoste és capaç de fer servir una RNA polimerasa ja existent, atès que, com s'ha dit més amunt, els viroides no codifiquen proteïnes pròpies, per produir cadenes de polaritat complementària (o negativa). Aquesta RNA polimerasa, en ésser circular el motlle que transcriu, és capaç de "donar-li varies voltes", generant un transcrit multimèric que conté

vàries unitats en tàndem. Aquest RNA negatiu multimèric pot: 1) servir a la vegada com a motlle per a la síntesi d'un RNA multimèric positiu que és després processat a longitud unitària mitjançant una ribonucleasa (RNasa) i finalment circularitzat per una RNA lligasa donant lloc al producte de partida, o 2) ésser processat a longitud unitària i després circularitzat a monòmers negatius, que serveixen aleshores de motlle per a la síntesi d'RNAs multimèrics positius, que segueixen la ruta indicada en l'apartat immediatament anterior. En qualsevol

de les dues vies d'aquest mecanisme (de "cercle rodant" com molt expressivament se'l coneix), denominades asimètrica i simètrica respectivament, són requerides tres activitats enzimàtiques del tipus RNA polimerasa, RNasa i RNA lligasa. Passem-hi revista.

En principi s'havia que presumir que les tres eren proteïnes d'origen cel·lular ja que, una vegada més, els viroides manquen d'activitat d'mRNAs. A partir de resultats obtinguts fonamentalment amb inhibidors, es va comprovar que la

FIGURA 4. Classificació dels viroides. S'ha mantingut la terminologia anglesa en el nom dels viroides, de la qual deriven les sigles. En el text principal se n'ha traduït el nom d'alguns.

CLASIFICACIÓN DE LOS VIROIDES		
FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
POSPIVIROIDAE	POSPIVIROID	PSTVd (potato spindle tuber)
		TCDVd (tomato chlorotic dwarf)
		MPVd (mexican papita)
		TPMVd (tomato planta macho)
		CSVd (chrysanthemum stunt)
		CEVd (citrus exocortis)
		TASVd (tomato apical stunt)
		IrVd 1 (iresine 1)
POSPIVIROIDAE	HOSTUVIROID	CLVd (columnnea latent)
		HSVd (hop stunt)
	COCADVIROID	CCCVd (coconut cadang cadang)
		CTiVd (coconut tinangaja)
		HLVd (hop latent)
		CVd-IV (citrus IV)
	APSCAVIROID	ASSVd (apple scar skin)
		CDVd (citrus dwarfing)
		ADFVd (apple dimple fruit)
		GYSVd 1 (grapevine yellow speckle 1)
		GYSVd 2 (grapevine yellow speckle 2)
		CBLVd (citrus bent leaf)
AVSUNVIROIDAE	COLEVIROID	PBCVd (pear blister canker)
		AGVd (australian grapevine)
		CbVd 1 (coleus blumei 1)
	AVSUNVIROID	CbVd 2 (coleus blumei 2)
		CbVd 3 (coleus blumei 3)
	PELAMOVIROID	ASBVd (avocado sunblotch)
		PLMVd (peach latent mosaic)
	ELAVIROID	CChMVd (chrysanthemum chlorotic mottle)
		ELVd (eggplant latent)

síntesi de las cadenes del PSTVd i altres viroides de la família *Pospiviroidae* era bloquejada per les baixes concentracions d' α -amanitina (la toxina d'un grup de bolets verinosos) que característicament inhibeixen l'RNA polimerasa II nuclear que catalitza la transcripció dels precursors dels mRNAs (les altres RNA polimerases I i III catalitzen la transcripció dels precursors dels RNA ribosòmics i dels petits RNAs, respectivament). Experiments similars fent servir tagetitoxina suggereixen que una RNA polimerasa cloroplàstica específica (existeixen al menys dos en els cloroplasts) és la que intervé en la replicació del ASBVd. Ara bé, aquestes RNA polimerases han de transcriure cadenes d'RNA viroidal i aquí ens trobem amb un primer (i interessantíssim) problema: les RNA polimerases nuclears i cloroplàstiques transcriuen en condicions normals motlles de DNA. No queda més remei que acceptar que els viroides són capaços de "manipular-les" perquè acceptin un motlle estrany d'RNA. Com succeeix això és una de les qüestions més intrigants que queden per resoldre. Pel que fa a la tercera activitat enzimàtica (deixem momentàniament la segona), se sap poc de l'RNA lligasa perquè el coneixement general sobre aquests enzims és molt limitat (per exemple, no s'ha clonat fins ara el gen de cap RNA lligasa de plantes). En tot cas, sembla que RNA lligases de localització nuclear i cloroplàstica haurien d'actuar en la replicació dels viroides de la família *Pospiviroidae* i *Ausunviroidae*, respectivament. Tornem ara a la segona etapa del cicle replicatiu, el tall dels intermediaris multimèrics a RNAs de longitud unitària, catalitzat en principi per una RNasa (el lector perspicaç ja sospitarà que tinc bones raons per haver-me saltat l'ordre "lògic"). Així és. En els viroides de la segona família l'activitat RNasa no és un enzim convencional (és a dir una proteïna) sinó un ribozim (un enzim compost d'RNA), de la classe denominada cap de martell, que resideix en les pròpies cadenes viroidals. Aquest és un descobriment clau, amb profundes implicacions funcionals i evolutives pel que fa als viroides (com es veurà més endavant), i amb altres que els transcendeixen i que fins i tot afecten

a qüestions biotecnològiques (tota revolució conceptual en sol comportar una altra de caràcter tecnològic; això és una constant en la història de la ciència).

Pels que estudiem Bioquímica fa ja alguns anys, un dels "dogmes" més fermes, pedra angular d'aquesta disciplina, era: "Tots els enzims són proteïnes" (un dogma "canònic" requereix una declaració breu i contundent que el defineixi). Fou una grandíssima sorpresa que cap al 1980 es descobrí que alguns enzims estaven compostos d'RNA; tan gran que als descobridors dels ribozims, T. Cech i S. Altman, els van atorgar el Premi Nobel de Química en aquella mateixa dècada. No és aquest el lloc per a una exposició detallada de l'estructura i mecanisme d'acció dels ribozims, però sí que convé ressenyar que de les diverses classes que se'n coneixen, els ribozims de cap de martell descoberts en els viroides són els més senzills i els que han estat sotmesos a un estudi més detallat des de tots els punts de vista. La denominació de cap de martell prové del fet que la seva representació en dues dimensions recorda a la forma d'aquesta eina (l'figura 3), denominació que se segueix utilitzant malgrat que els estudis de cristal·lografia de raigs X mostren que la conformació tridimensional és ben diferent (ens agrada batejar les coses noves per analogia amb les conegudes, i una vegada batejades, resulta difícil canviar-ne el nom).

Patogènesi

Ja s'ha dit més amunt que els viroides causen un seguit de malalties en cultius d'importància econòmica, i que aquest va ésser el motiu que impulsà la investigació que va conduir al seu descobriment. La gamma d'hostes dels diferents viroides és molt variable: alguns infecten i causen malalties en un ampli espectre d'hostes, mentre que d'altres es restringeixen a una espècie o a uns pocs membres d'un gènere. Alguns viroides es transmeten a través de la llavor i el pol·len, i també hi ha un cas ben documentat de transmissió per àfids (família d'insectes hemípters fitòfags el representant més conegut de la qual és el pugó). Tanmateix, la difusió dels viroides deriva fonamentalment

de pràctiques agrícoles i, en particular, de la propagació vegetativa de material infectat i de l'ús d'eines de poda prèviament contaminades. Dintre de les plantes, els viroides, com els virus, es mouen de cèl·lula a cèl·lula pels plasmodesmes i a llarga distància a través del floema. També a semblança del que ocorre amb els virus, s'han descrit fenòmens de protecció creuada: quan una planta infectada per una soca suau d'un viroide és posteriorment inoculada amb una soca agressiva del mateix viroide o d'un altre viroide similar, els símptomes típics d'aquest darrer i el seu nivell d'acumulació s'atenueu per un cert temps. Aquests fenòmens, que recorden als d'immunitat en vertebrats i que presenten un potencial aplicat molt notable, tenen, no obstant això, una base molt diferent, els detalls mecànics de la qual disten molt d'ésser compresos perquè encara no entenem com els viroides causen malalties. Se sap que canvis al voltant de l'1% de la seqüència de l'RNA viroidal (3-4 nt) són suficients per transformar els símptomes induïts per membres d'ambdues famílies de suaus a agressius. Aquests canvis ocorren en certes regions de l'RNA, que han vingut a denominar-se regions moduladores de la patogenicitat o determinants de patogenicitat, i no comporten diferències en els nivells finals d'acumulació, cosa per la qual sembla que deuen afectar a la interacció del viroide amb factors de l'hoste (presumiblement proteïnes, encara que no poden descartar-se altres RNAs), que en ésser desviats de les seves funcions fisiològiques normals condueixen a alteracions que en darrera instància es manifesten en l'aparició de símptomes. La naturalesa d'aquests factors és pràcticament desconeguda i amb tota probabilitat constituïran una àrea d'investigació futura.

Ja que els virus infecten tot tipus de cèl·lules, ocorre el mateix amb els viroides? Recorro de nou a la perspicaçia del lector, que a aquestes alçades ja haurà imaginat que si els viroides infectessin cèl·lules animals (més encara si fossin humanes!) ja ho hagués esmentat (i els viroides serien molt més ben coneguts pel gran públic). Per tant, la resposta és que no, de moment. Tanmateix,

existeix un RNA, el del virus delta de l'hepatitis humana (*hepatitis delta virus*, HDV), que comparteix certes propietats amb els viroides: és circular, adopta una estructura secundària en forma de vareta i es replica a través d'un model de cercle rodant, en el qual el tall dels intermediaris oligomèrics és mitjançat per una classe especial de ribozims. No obstant això, a diferència dels viroides, l'HDV RNA és més gran (aproximadament 1.700 nt), codifica una proteïna en la seva polaritat complementària, i és funcionalment dependent d'un altre virus (el de l'hepatitis B). Cal remarcar que quan es van descobrir les propietats tan especials de l'HDV RNA, no es van trobar RNAs semblants en el món animal, mentre que certs RNAs del món de les plantes presentaven clares similituds. Els viroides van ésser així presos com a referència i per analogia amb ells es va presumir que l'HDV RNA es replicaria per un model de cercle rodant (cosa que posteriorment es va confirmar) i que, potser, podria contenir ribozims (cosa que també va resultar una predicció encertada, encara que els ribozims de l'HDV siguin molt diferents dels dels viroides). L'ensenyament que en treiem és que tot i que és obligat centrar-se en un tema d'investigació per aconseguir de progressar-hi, no convé perdre de vista les perspectives generals. Les divisions, en el cas que ens ocupa entre la virologia animal i vegetal, són en bona mesura arbitràries i els diferents camps d'estudi poden amagar relacions molt il·luminadores.

Una darrera reflexió en aquest mateix context. Durant algun temps es va considerar la possibilitat que les encefalopaties espongiformes que avui es creu que estan causades per prions, proteïnes anòmales que són capaces de propagar-se (en certa manera de "replicar-se"), poguessin ésser produïdes per viroides (per la qual cosa, algun laboratori de virologia vegetal es va omplir de hámsters, l'hoste experimental de certs prions). La base d'aquesta hipòtesi residia en què per experiments de fraccionament per mida i bioassajos s'havia inferit que l'agent etiològic d'aquestes malalties era molt petit i, a més, no van poder

trobar-s'hi virus. Què calia pensar en aquestes circumstàncies? Òbviament en els viroides, tot i que la hipòtesi no va poder verificar-se després. Els prions són agents molt més "heterodoxos" que els viroides (proteïnes infeccioses, això és el que vol dir el seu nom). Per tant, no hi ha un àcid nucleic com a suport de la informació genètica, o això admeten la majoria dels especialistes (avalats per un Premi Nobel, S. Prusiner, pel seu treball en aquest camp) i encara que un petit grup de recalcitrants es resisteixi a acceptar quelcom que mina un altre dels "dogmes" de la Biologia Molecular. En Ciència, com en moltes altres qüestions, ésser ortodox o heterodox també és qüestió de majories o minories (encara que això sí, força "movedisses") com a conseqüència d'allò que molt apropiadament s'anomenen revolucions científiques).

Evolució

Els dos tipus de macromolècules característiques de la vida tal i com avui la coneixem, àcids nucleics i proteïnes, són mútuament dependents. Els àcids nucleics, DNA i RNA, són capaços d'emmagatzemar la informació genètica i de transmetre-la mitjançant un procés de còpia (replicació), per la qual cosa una cadena serveix de motlle per a la síntesi d'una altra de polaritat complementària i aquesta última, a la seva vegada, torna a servir de motlle per a la síntesi de cadenes idèntiques a les inicials. Aquest procés necessita ésser catalitzat o accelerat per enzims, proteïnes que expressen les funcions codificades en els àcids nucleics però que no són capaces d'emmagatzemar i transmetre la informació genètica. Ara bé, si la síntesi d'àcids nucleics requereix proteïnes i la síntesi de proteïnes requereix a la seva vegada àcids nucleics, quina d'aquestes dues classes de molècules va aparèixer primer en la primitiva Terra? Hi ha dues maneres de resoldre aquesta paradoxa (segons S. Brenner, Premi Nobel de Medicina i Fisiologia en el 2002, "les paradoxes assenyalen exactament el punt on s'oculten les claus crucials"): acceptar que àcids nucleics i proteïnes van sorgir simultàniament, cosa que sembla molt

improbable, o bé que alguna de les dues va ésser capaç en algun moment d'acomplir ambdues funcions. El descobriment dels ribozims ens permet resoldre aquesta paradoxa evolutiva proposant que "en el principi fou l'RNA" a raó que aquesta molècula és capaç tant d'emmagatzemar informació com d'expressar-la en forma d'una activitat catalítica. Avui és una hipòtesi àmpliament acceptada el fet que en les primeres etapes de l'evolució de la vida en el nostre planeta va existir un "món d'RNA" anterior a l'actual basat en el DNA i les proteïnes (els fòssils cel·lulars més antics tenen una edat aproximada de 3500 milions d'anys). Amb posterioritat, el DNA va suplantat l'RNA com a suport de la informació genètica ja que el DNA és químicament molt més estable que l'RNA (que té un grup reactiu -OH extra per nucleòtid), una propietat important que permet l'emmagatzematge d'aquesta informació sense un excés d'errors. Així mateix les proteïnes, que al estar composades per vint aminoàcids diferents són químicament molt més versàtils que l'RNA, van suplantat com a catalitzadors a aquest últim (químicament molt més monòton al estar constituït per només quatre nucleòtids). Els ribozims que encara operen en el nostre món actual (com els que catalitzen la replicació d'alguns viroides) serien "fòssils moleculars" del món pre-cel·lular d'RNA, i per tant, tot i que el paper actual de l'RNA és en certa manera subsidiari entre el DNA i les proteïnes, això no implica que sempre fos així al llarg de l'evolució. No em resisteixo a comentar que, en un altre dels grans girs que fan tan atractiva la Ciència, s'ha descobert fa pocs anys que el component "noble" (catalític) del ribosoma, l'òrganul cel·lular on ocorre la formació de l'enllaç peptídic (la reacció probablement més important de la Bioquímica) és l'RNA, mentre que les proteïnes vénen a actuar de mer bastiment (just a l'inrevés del que es creia anteriorment). Com s'ha resumit de forma admirable: "the ribosome is a ribozyme" (el ribosoma és un ribozim).

Tornem als nostres modestos protagonistes que tan lluny ens han portat. Corol·lari de tot això anterior és que els viroides molt probablement

aparegueren en aquest món pre-cel·lular d'RNA i que, per tant, tenen un origen antiquíssim i independent del dels virus. Així doncs, resumint, els viroides són estructuralment, funcionalment i evolutivament diferents dels virus. Aquests petits RNAs posseeixen els senyals per infectar un hoste, manipular el seu metabolisme en benefici propi i, com a conseqüència, induir ocasionalment malalties (i alguns, a més, contenen ribozims), tot això condensat en una mida de tan sols 250-400 bases. Per això deia al començament d'aquest article que és difícil pensar que aquesta mida pugui encongir-se significativament.

L'estudi dels viroides il·lustra una vegada més com flueix la ciència. Partint d'una qüestió específica, i d'una importància aparentment limitada (la caracterització de l'agent causal

d'una malaltia de plantes), s'ha arribat a conclusions de caràcter general: la identificació d'una nova classe d'RNAs amb propietats insòlites que els fa candidats a ésser uns dels primers "pobladors" (sigui dit amb totes les reserves) del nostre planeta. També això instrueix sobre com d'inútil és l'èmfasi que es posa en dirigir la investigació científica a resoldre, sense voltes diletants, qüestions d'interès aplicat. De l'estudi dels viroides se n'ha derivat el descobriment dels ribozims de cap de martell, els més simples que es coneixen, amb importants aplicacions biotecnològiques impossibles de predir abans que es coneguessin. L'autèntic motor de la ciència, de l'art, i de qualsevol activitat creativa és la curiositat, qualitat aquesta que va fer descendir als nostres avantpassats dels arbres per explorar la "terra incògnita".

Bibliografia

Diener, T.O. (2001). "The viroid: biological oddity or evolutionary fossil?" *Advances in Virus Research* 57, 137-184.

Flores, R., Daròs, J.A. i Hernández, C. (2000). The *Avsunviroidae* family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Advances in Virus Research* 55: 271-323.

Hadidi, A., Flores, R. Randles, J. W. i Semancik, J.S. (eds.) (2003). Viroids. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.