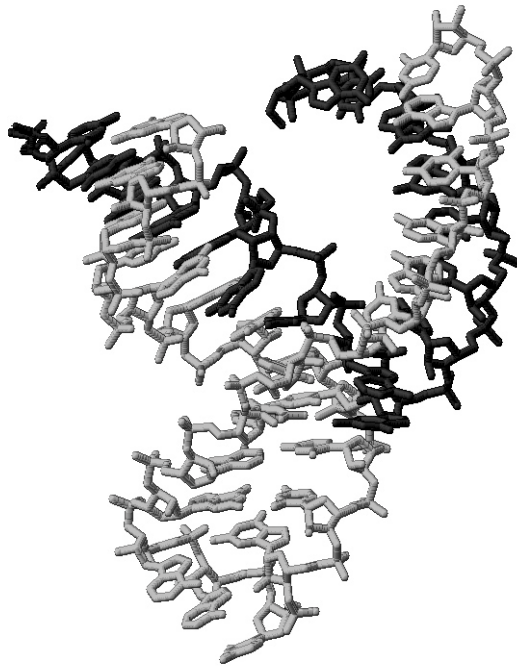


# Relaciones estructura-función en un viroide con ribozimas de cabeza de martillo



Memoria presentada por  
MARCOS DE LA PEÑA DEL RIVERO  
para optar al grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director  
DR. RICARDO FLORES PEDAUYÉ

Valencia, 2001





**Universidad Politécnica de Valencia**  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**  
INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS  
Avenida de los Naranjos, s/n  
Tel. 34 (9) 6 387 77 30 - Fax 34 (9) 6 387 78 59  
46022 Valencia España



Don Ricardo Flores Pedauy , Doctor en Ciencias Químicas, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Pol cnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia.

CERTIFICA:

que Don Marcos De la Peña Del Rivero ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título “Relaciones estructura-función en un viroide con ribozimas de cabeza de martillo”, presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, a 10 de Octubre de 2001.

Firmado: Ricardo Flores Pedauy 



*A JORDI*



## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>Introducción</b> .....  | 3  |
| 1. El mundo del RNA.....   | 3  |
| 2. El primer peldaño de la escala biológica: los RNAs de tipo viroidal.....  | 4  |
| 2.1. Viroides .....  | 4  |
| 2.1.1. ¿Cómo son los viroides? Algunas propiedades estructurales .....   | 6  |
| 2.1.2. ¿Dónde están los viroides? Detalles de su localización subcelular.....  | 10 |
| 2.1.3. ¿Cómo se replican los viroides? .....   | 10 |
| 2.1.3.1. Mecanismo del círculo rodante .....   | 10 |
| 2.1.3.2. Actividades enzimáticas y ribozimáticas implicadas en la replicación viroidal.....  | 11 |
| 2.1.4. ¿Qué efectos tienen los viroides sobre las plantas? .....   | 13 |
| 2.1.5. Fenómenos de protección cruzada e interferencia entre viroides .....  | 14 |
| 2.1.6. CChMVd: el agente causal del moteado clorótico del crisantemo .....   | 15 |
| 2.2. RNAs satélites de tipo viroidal.....  | 17 |
| 2.3. RNAs viroidales con un DNA homólogo: CarSV RNA, RNA satélite II de tritón, Sm $\alpha$ de <i>Schistosoma</i> y RNA VS de <i>Neurospora</i> .....              | 18 |
| 2.4. El RNA del virus $\delta$ de la hepatitis humana.....   | 19 |
| 2.5 Aspectos evolutivos relacionados con los RNAs de tipo viroidal.....  | 19 |
| 2.5.1. Evolución molecular de los genomas de RNA .....   | 19 |
| 2.5.2. ¿De dónde vienen los RNAs de tipo viroidal?.....  | 21 |
| 2.5.3. El árbol genealógico de los RNAs de tipo viroidal.....  | 22 |
| 2.5.4. Algunas características evolutivas de los viroides.....   | 22 |
| 3. Estructuras ribozimáticas presentes en los RNAs de tipo viroidal.....   | 24 |
| 3.1. Ribozima de cabeza de martillo.....   | 25 |
| 3.1.1. Modelos de estructura secundaria.....   | 25 |
| 3.1.2. La ribozima de cabeza de martillo actuando en <i>trans</i> .....  | 28 |
| 3.1.3. Análisis mutacional para la determinación de motivos de estructura y secuencia mínimos.....   | 29 |
| 3.1.4. Estructura terciaria y modelos tridimensionales .....   | 31 |
| 3.2. Otras ribozimas naturales .....   | 34 |
| 3.2.1. Ribozima de horquilla.....  | 34 |
| 3.2.2. Dominios ribozimáticos del HDV RNA .....  | 34 |
| 3.2.3. Ribozima del VS RNA de <i>Neurospora</i> .....  | 35 |
| <b>Objetivos</b> .....   | 39 |
| <b>Capítulo I.</b> Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: A tetraloop within the <i>in vivo</i> branched RNA conformation..... | 43 |

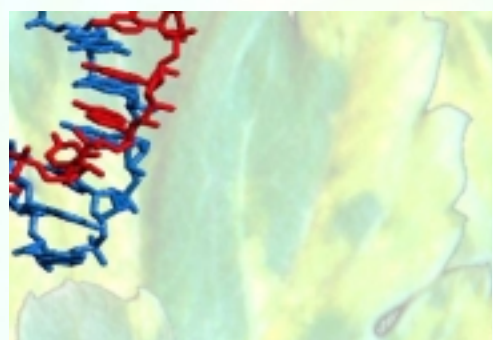
---

|   |     |
|---|-----|
| <b>Capítulo II.</b> Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid: Dissection of the Pathogenicity Determinant, Comparative Fitness of Symptomatic and Non Symptomatic Variants, and Characterization of a Long-distance Interaction in the in vivo RNA Conformation..... | 61  |
| <b>Capítulo III.</b> An Extra Nucleotide in the Consensus Catalytic Core of a Viroid Hammerhead Ribozyme: Implications for the Design of More Efficient Ribozymes .....   | 83  |
| <b>Discusión</b> .....  | 103 |
| 1. Los viroides: la biología vista desde su peldaño inferior .....  | 103 |
| 2. El caso particular del CChMVd dentro de la familia <i>Avsunviroidae</i> .....  | 104 |
| 3. Propiedades estructurales únicas del CChMVd.....   | 105 |
| 4. El determinante de patogenicidad del CChMVd se localiza en un tetrabucle del RNA viroidal.....   | 106 |
| 5. Requerimientos del determinante de patogenicidad del CChMVd .....  | 107 |
| 6. Papel dual de un nucleótido dentro del CChMVd: conformación del RNA viroidal vs. eficiencia catalítica de una de sus ribozimas .....   | 109 |
| 7. Una secuencia consenso más eficaz para la ribozima de cabeza de martillo .....   | 110 |
| <b>Resumen</b> .....  | 113 |
| <b>Bibliografía</b> .....   | 117 |
| <b>Agradecimientos</b> .....  | 139 |





## INTRODUCCIÓN





## 1. El mundo del RNA

El ácido ribonucleico (el ARN o, de aquí en adelante, RNA) puede considerarse como uno de los biopolímeros más versátiles conocidos, tanto desde el punto de vista estructural como funcional, versatilidad sólo comparable con la mostrada por algunos polímeros artificiales como los plásticos o los polioxometalatos. Sin embargo, al RNA se le asoció inicialmente un papel secundario de mensajero que, aunque crucial, no llegaba al de estrella protagonista que entonces se disputaban otros dos polímeros: el ácido desoxiribonucleico (el DNA) y el polipéptido (las proteínas). Posteriormente se descubrió que los RNAs hacían algo más, y mientras unos transportaban aminoácidos hasta el ribosoma, otros formaban parte de este último en lo que en principio parecía una función de mero esqueleto. Pero con el tiempo, en uno de los cambios de paradigma más llamativos ocurridos recientemente en Biología Molecular, se ha comprobado que es el rRNA, tras haber sido convenientemente madurado en un proceso mediado a su vez por otros pequeños RNAs, el que desempeña la función catalítica del ribosoma, pasando el papel de esqueleto a las proteínas ribosomales. “The ribosome is a ribozyme” como ha resumido brillantemente Cech (2000). Esta situación se ha ido extendiendo a diferentes complejos ribonucleoproteicos en los que el RNA y las cadenas polipeptídicas actúan coordinadamente, siendo el primero el que en última instancia desempeña la función. Un ejemplo extremo lo constituyen los pequeños RNAs catalíticos que ilustran que una simple sucesión de cuatro bases nitrogenadas relativamente inertes "colgando" de una cadena de fosfato y azúcar es capaz de actuar como una enzima (una ribozima), acelerando tanto de forma natural como artificial diferentes reacciones químicas. No hay duda: el papel del RNA es cada vez más el de estrella, y casi el de superestrella, considerando que todos los datos, en particular el descubrimiento de las ribozimas, sostienen la hipótesis de que en nuestro planeta existió “un mundo de RNA” previo al que conocemos basado en el DNA y las proteínas.

## 2. El primer peldaño de la escala biológica: los RNAs de tipo viroidal

Bajo el término de RNAs de tipo viroidal se agrupan dos conjuntos distintos de RNAs, los viroides y los RNA satélites de tipo viroidal, que comparten entre sí una serie de propiedades estructurales y funcionales. Están formados únicamente por una pequeña molécula de RNA circular de simple hebra que, aunque aparentemente no codifica proteína alguna (Diener, 1987, Francki, 1987), es capaz de replicarse *in vivo* a través de un mecanismo denominado de círculo rodante (Branch y Robertson, 1984). Además, un buen número presenta actividades ribozimáticas en sus cadenas de una o ambas polaridades cuyo papel parece crucial en su ciclo replicativo (Bruening, 1989; Symons, 1992 y 1997; Flores *et al.*, 2001), y muchos de ellos inducen enfermedades importantes en plantas. Existe sin embargo una diferencia fundamental entre viroides y RNAs satélite; mientras que los primeros poseen replicación autónoma y son RNAs desnudos, los segundos son funcionalmente dependientes de un virus auxiliar por cuya proteína de cubierta son encapsidados.

Se ha propuesto distinguir un tercer subgrupo dentro de los RNAs de tipo viroidal, y son aquellos que además existen como un DNA homólogo formando elementos de tipo retroviroidal. Un representante de estos RNAs lo tendríamos en una pequeña molécula caracterizada en clavel (Hernández *et al.*, 1992a; Daròs y Flores, 1995a) que comparte con el resto de RNAs de tipo viroidal su naturaleza circular y su capacidad ribozimática, aunque difiere de los mismos en carecer de infectividad y en presentar una forma de DNA homólogo. Existen también otros tres elementos retroviroidales, dos de ellos caracterizados en sistemas animales, el DNA satélite II del tritón y su transcrito (Epstein y Gall, 1987) y el DNA Sm $\alpha$  y su transcrito de *Schistosoma mansoni* (Ferbreyre *et al.*, 1998), mientras que el tercero, el VS RNA/DNA, ha sido descrito en mitocondrias de ciertas cepas de *Neurospora* (Saville y Collins, 1990).

Por último, también se ha llegado a incluir dentro del grupo de los RNAs viroidales al RNA del virus  $\delta$  de la hepatitis humana (“hepatitis delta virus RNA”, HDV RNA), ya que comparte con los anteriores muchas propiedades estructurales aunque a diferencia de éstos presenta la capacidad de codificar una proteína en su polaridad antígenómica (Lazinski y Taylor, 1994).

### 2.1. Viroides

Hasta 1971 los virus eran considerados como los sistemas genéticos más pequeños capaces de replicarse autónomamente en el interior de una célula huésped. Pero con la caracterización molecular del agente causal de la enfermedad del tubérculo fusiforme de la patata (Diener, 1971), surgió un nuevo tipo de replicón infeccioso con un tamaño aproximadamente diez veces inferior al del genoma de los virus de RNA más pequeños conocidos. Para estos nuevos patógenos se propuso el término de viroide.

|                      |   |  |                              |                               |
|----------------------|---|--|------------------------------|-------------------------------|
| <b>POSPIVIROIDAE</b> | <b>POSPIVIROIDE</b>   | <b>PSTVd</b> (Viroide del tubérculo fusiforme de la patata)  | 356, 359-360                 | Gross et al., 1978            |
|                      |   | <b>TCDVd</b> (Viroide del enanismo clorótico del tomate)     | 360                          | Singh et al., 1999            |
|                      |   | <b>TPMVd</b> (Viroide de la planta macho del tomate)         | 360                          | Kiefer et al., 1983           |
|                      |   | <b>MPVd</b> (Viroide de la papita mexicana)                  | 359-360                      | Martínez-Soriano et al., 1996 |
|                      |   | <b>CEVd</b> (Viroide de la exocortis de los cítricos)        | 370-375                      | Gross et al., 1982            |
|                      |   | <b>CSVd</b> (Viroide del enanismo del crisantemo)            | 354, 356                     | Haseloff y Symons, 1981       |
|                      |   | <b>TASVd</b> (Viroide del enanismo apical del tomate)        | 360, 363                     | Kiefer et al., 1983           |
|                      |   | <b>IrVd 1</b> (Viroide 1 de iresine)                         | 370                          | Spieker, 1996a                |
|                      | <b>HOSTUVIROIDE</b>   | <b>CLVd</b> (Viroide latente de columnnea)                   | 370, 372-373                 | Hammond et al., 1989          |
|                      |   | <b>HSVd</b> (Viroide del enanismo del lúpulo)                | 297-303                      | Ohno et al., 1983             |
|                      | <b>COCADVIROIDE</b>   | <b>CCCVd</b> (Viroide del cadang-cadang del cocotero)        | 246-247                      | Haseloff et al., 1982         |
|                      |   | <b>CtiVd</b> (Viroide del tinangaja del cocotero)            | 254                          | Keese et al., 1988            |
|                      |   | <b>HLVd</b> (Viroide latente del lúpulo)                     | 256                          | Puchta et al., 1988           |
|                      |   | <b>CVd-IV</b> (Viroide IV de los cítricos)                   | 284                          | Puchta et al., 1991           |
| <b>APSCAVIROIDE</b>  | <b>ASSVd</b> (Viroide de la piel cicatrizada de la manzana) | 329-330  | Hashimoto y Koganezawa, 1987 |                               |
|                      | <b>CVd-III</b> (Viroide III de los cítricos)                | 294, 297   | Rakowski et al., 1994        |                               |
|                      | <b>ADFVd</b> (Viroide del fruto picado del manzano)         | 306  | Di Serio et al., 1996        |                               |
|                      | <b>GYSVd-1</b> (Viroide 1 del moteado amarillo de la vid)   | 366-368  | Koltunow y Rezaian, 1988     |                               |
|                      | <b>GYSVd-2</b> (Viroide 2 del moteado amarillo de la vid)   | 363  | Koltunow et al., 1989        |                               |
|                      | <b>CBLVd</b> (Viroide de la hoja curvada de los cítricos)   | 318  | Ashulin et al., 1991         |                               |
|                      | <b>PBCVd</b> (Viroide de los chancros pustulosos del peral) | 315-316  | Hernández et al., 1992       |                               |
| <b>COLEVIROIDE</b>   | <b>AGVd</b> (Viroide australiano de la vid)                 | 369  | Rezaian, 1990                |                               |
|                      | <b>CbVd-1</b> (Viroide 1 del coleus blumei)                 | 248, 251   | Spieker et al., 1990         |                               |
|                      | <b>CbVd-2</b> (Viroide 2 del coleus blumei)                 | 301  | Spieker, 1996b               |                               |
| <b>AVSUNVIROIDAE</b> | <b>AVSUNVIROIDE</b>   | <b>CbVd-3</b> (Viroide 3 del coleus blumei)                  | 361-362, 364                 | Spieker et al., 1996          |
|                      |   | <b>ASBVd</b> (Viroide del manchado solar del aguacate)       | 246-250                      | Symons, 1981                  |
|                      | <b>PELAMOVIROIDE</b>  | <b>PLMVd</b> (Viroide del mosaico latente del melocotonero)  | 335-338                      | Hernández y Flores, 1992      |
|                      |   | <b>CChMVd</b> (Viroide del moteado clorótico del crisantemo) | 399-401                      | Navarro y Flores, 1997        |

**Fig. 1.** Clasificación de los viroides caracterizados molecularmente hasta la fecha (adaptado de Flores *et al.*, 2000). Éstos se agrupan en dos grandes familias, *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, que se dividen en cinco y dos géneros, respectivamente. Las especies tipo de cada género se destacan con fondo coloreado. Para cada una de las especies aparecen indicados la abreviatura junto con el nombre en castellano, el tamaño en nucleótidos y la referencia del trabajo en donde se describió.

Los viroides dependen del huésped en mayor medida que los virus. Al tratarse de moléculas de RNA no codificante, necesitan parasitar la maquinaria transcripcional de la célula para llevar a cabo su replicación. Toda la información necesaria para este fin se reduce por tanto a una serie de señales apropiadas, de estructura primaria o de orden superior, contenidas en el propio

RNA viroidal. Esta situación conlleva también que los efectos patogénicos inducidos en la planta deben de ser consecuencia de la interacción directa del RNA viroidal, o de uno de sus intermediarios replicativos, con una o más dianas celulares. A diferencia de lo que ocurre con los virus, que afectan a animales, plantas, hongos, bacterias e incluso micoplasmas, los viroides caracterizados hasta el momento se encuentran confinados al mundo vegetal.

Estas características tan peculiares de los viroides, junto con la presencia de estructuras ribozimáticas en algunos de ellos, han llevado a considerarlos como “fósiles moleculares” que tuvieron su origen en un ámbito precelular de RNA, cuya existencia se postula que fue anterior a la aparición de la vida celular actual basada en el DNA y las proteínas (Diener, 1989).

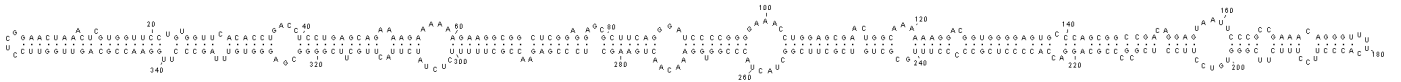
### 2.1.1. ¿Cómo son los viroides? Algunas propiedades estructurales

El tamaño de un viroide oscila entre 246 y 401 residuos de nucleótidos (nt) (Flores *et al.*, 2000). En la actualidad se han caracterizado biológica y molecularmente 28 especies distintas, así como numerosas variantes de secuencia de las mismas. El análisis de sus estructuras primarias ha permitido agruparlas en dos grandes familias (Fig. 1): *Pospiviroidae*, con el viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd, *Potato spindle tuber viroid*) como especie tipo, y *Avsunviroidae*, cuya especie tipo es el viroide del manchado solar del aguacate (ASBVd, *Avocado sunbloch viroid*). Los miembros de la primera familia se caracterizan por la presencia de una serie de motivos de secuencia y estructura conservados, destacando la presencia de una región central conservada (CCR, central conserved region), y la ausencia de dominios de autocorte ribozimático. Por el contrario, los miembros de la segunda familia no poseen CCR, pero sus RNAs de ambas polaridades se autocortan a través de estructuras ribozimáticas de cabeza de martillo.

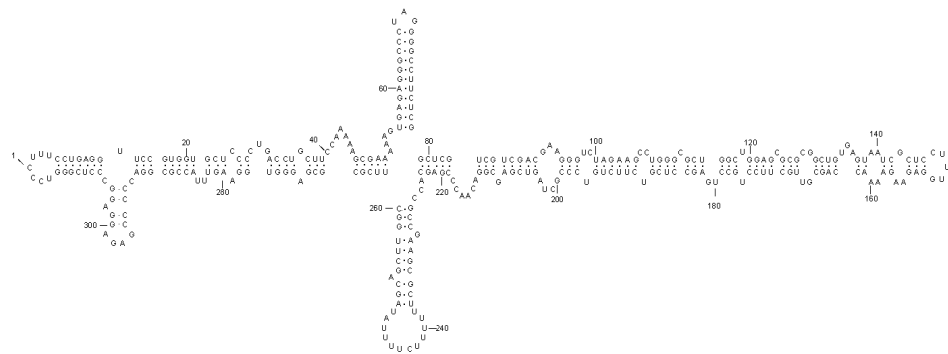
La aplicación de programas informáticos para el cálculo de las estructuras secundarias de mínima energía libre de los viroides ha permitido la obtención de una serie de conformaciones en forma de varilla o de cuasi-varilla, en las que regiones de apareamiento intramolecular se alternan con pequeños bucles de bases desapareadas (Fig. 2A y B). Sin embargo, a pesar de lo que se ha venido considerando, no todos los viroides adoptan este tipo de conformaciones. Las excepciones a esta norma las constituyen el viroide del mosaico latente del melocotonero (PLMVd, *Peach latent mosaic viroid*) y el viroide del moteado clorótico del crisantemo (CChMVd, *Chrysanthemum chlorotic motle viroid*), que presentan una estructura secundaria de mínima energía libre altamente ramificada (Fig. 2C). Hay que tener en cuenta que las conformaciones obtenidas con el empleo de esta aproximación *in silico* no tienen necesariamente que reflejar las que los viroides adoptan *in vitro* o *in vivo*. Sin embargo, existen datos experimentales que apoyan estas estructuras. Por ejemplo, en el caso del PSTVd se ha comprobado que la conformación *in vitro* obtenida por microscopía electrónica es de tipo varilla (Sogo *et al.*, 1973; Sanger *et al.*, 1976). Además, las repeticiones de secuencia observadas en otros dos miembros de la familia *Pospiviroidae*, CEVd y CCCVd, ocurren de tal forma que preservan sus estructuras secundarias de tipo varilla (Haseloff *et*

*al.*, 1982; Semancik *et al.*, 1994). Por otro lado, la presencia de determinadas mutaciones compensatorias en diferentes variantes de secuencia del CChMVd es consistente con que este viroide adopta una estructura ramificada *in vivo* muy similar a la obtenida *in silico* (Navarro y Flores, 1997).

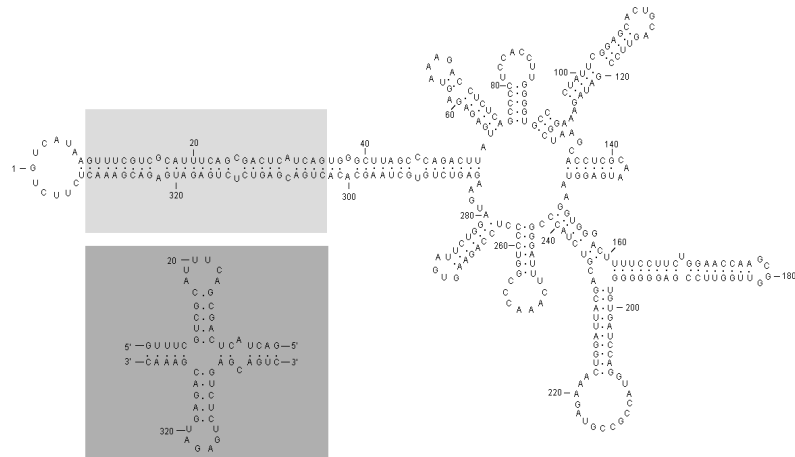
**A**



**B**



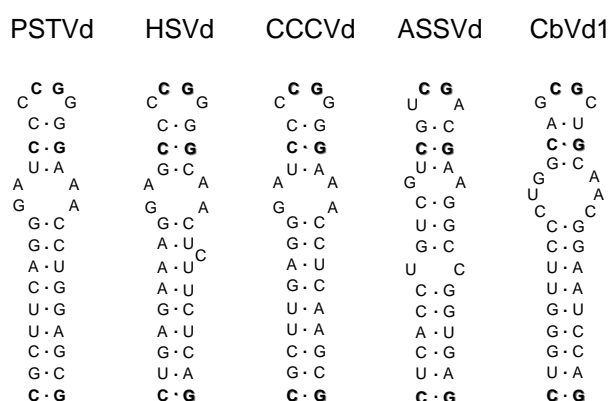
**C**



**Fig. 2.** Ejemplos de estructuras secundarias de mínima energía libre propuestas para los viroides. (A) Modelo de tipo varilla para el PSTVd. (B) Modelo de tipo cuasi-varilla para el PBCVd. (C) Conformación altamente ramificada predicha para el PLMVd. En los cuadros grises se destaca una región de este RNA para la que se han propuesto dos conformaciones distintas: tipo varilla (cuadro superior) y cruciforme (cuadro inferior).

Además de las conformaciones más estables, los viroides pueden adoptar estructuras secundarias metaestables que se forman, de manera transitoria, en procesos de desnaturalización térmica y que asimismo podrían formarse en la replicación o como consecuencia de la interacción

del RNA viroidal con factores celulares (Riesner, 1991). En el caso de los miembros de la familia *Pospiviroidae*, estas estructuras se caracterizan por la presencia de una serie de horquillas a alguna de las cuales se les ha asignado una función concreta (Riesner, 1990; Loss *et al.*, 1991; Qu *et al.*, 1993). Destacan la horquilla I, formada por la hebra superior de la región central conservada y las repeticiones invertidas que la flanquean (Fig. 3), que ha sido implicada en el procesamiento de los intermediarios oligoméricos generados en el proceso replicativo (Diener, 1986; Visvader *et al.*, 1985), así como la horquilla II, formada por las secuencias situadas en la hebra inferior de la estructura a ambos lados de la CCR y que se ha comprobado que es crítica para mantener la infectividad del PSTVd (Loss *et al.*, 1991; Qu *et al.*, 1993).



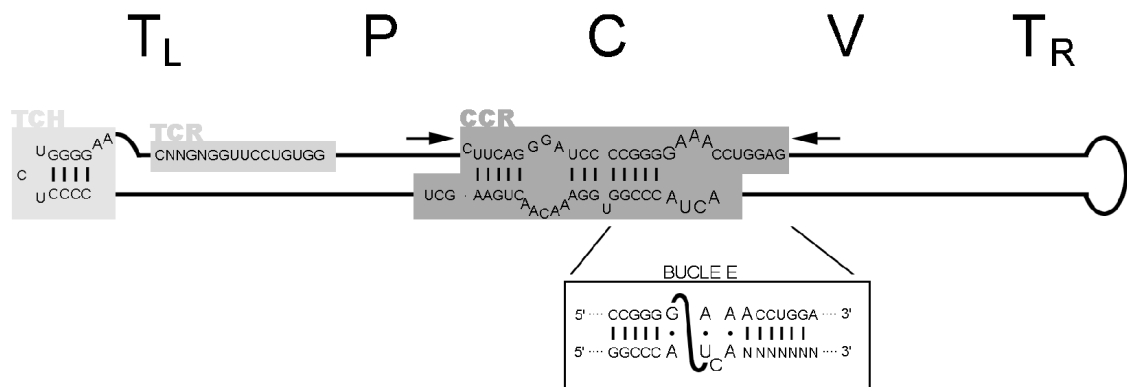
**Fig. 3.** Estructuras de la horquilla I de cada una de las cinco especies tipo pertenecientes a la familia *Pospiviroidae*. Las letras en negrita representan nucleótidos conservados en posiciones similares en todas las estructuras (tomado de Flores *et al.*, 1997).

También se han caracterizado elementos de estructura terciaria en miembros de la familia *Pospiviroidae*, siendo el más interesante el detectado en la CCR del PSTVd mediante radiación UV (Branch *et al.*, 1985) o modificación con dimetilsulfato (Fig. 4) (Gast *et al.*, 1996), del que se desconoce su posible función. En el caso de la familia *Avsunviroidae*, y más concretamente para los miembros del género *Pelamoviroidae*, se han propuesto elementos de estructura terciaria de tipo “kissing loops” en los que dos bucles interaccionan entre sí a través de interacciones canónicas entre los nucleótidos que los forman (Hermann y Patel, 1998). Por un lado, en el PLMVd, los estudios de variabilidad han mostrado una serie de covariaciones que son consistentes con una interacción de este tipo entre los nucleótidos 337 a 2 y 62 a 69 (también llamados bucles A y B respectivamente, Ambrós *et al.*, 1998 y 1999). Posteriormente, se han descrito interacciones similares entre diferentes regiones de este viroide tanto mediante estudios de digestión *in vitro* con nucleasas (Bussière *et al.*, 2000) como de variabilidad (Pelchat *et al.*, 2000). Se ha especulado que alguna de estas interacciones podría darse también entre regiones similares existentes en el CChMVd.

En 1985, Keese y Symons propusieron un modelo que dividía la conformación de tipo varilla de todos los viroides entonces conocidos, excepto el ASBVd, en cinco dominios estructurales. Como se muestra en la Figura 4, el dominio central (C) se encuentra flanqueado por



los dominios patogénico (P) y variable (V), quedando en los extremos de la estructura los dominios terminales derecho e izquierdo ( $T_R$  y  $T_L$ ). En un principio se asignó una función a cada dominio; por ejemplo, el dominio P se asoció con los efectos patogénicos en el PSTVd y otros viroides estrechamente relacionados con éste. Sin embargo, ahora se sabe que la situación es más compleja y que la expresión de síntomas parece estar controlada por determinantes discretos situados en los dominios  $T_L$ , P, V y  $T_R$  (Sano *et al.*, 1992). Además, ciertos determinantes de patogenicidad en el viroide del enanismo del lúpulo (HSVd) han sido localizados en el dominio V (Palacio, 1999; Reanwarakorn y Semancik, 1998).



**Fig. 4.** Representación esquemática de la estructura secundaria de tipo varilla propuesta para la mayoría de los miembros de la familia *Pospiviroidae*. En la parte superior de la figura se indica la localización de los dominios C (central), P (patogénico), V (variable) y  $T_L$  y  $T_R$  (terminal izquierdo y terminal derecho, respectivamente). Los nucleótidos que forman parte de las regiones conservadas CCR, TCR y TCH aparecen en cuadros grises. Las flechas que flanquean la rama superior de la CCR indican los nucleótidos que forman, junto con los estrictamente conservados, repeticiones invertidas imperfectas. En la parte inferior de la figura se muestra el denominado bucle E, elemento de estructura terciaria caracterizado en la CCR del PSTVd. Las letras N indican los nucleótidos no conservados, y las de mayor tamaño las bases características del bucle E.

Dentro de estos cinco dominios estructurales se han caracterizado una serie de motivos de secuencia conservados. El más importante es la ya mencionada CCR situada en el dominio C de la estructura secundaria en forma de varilla. Esta región está constituida por dos series de nucleótidos en las hebras superior e inferior flanqueados en el caso de la primera por dos repeticiones invertidas (Fig. 4). Otros motivos de secuencia son las denominadas región terminal conservada (TCR, terminal conserved region) (Koltunow y Rezaian, 1988) y horquilla terminal conservada (TCH, terminal conserved hairpin) (Putcha *et al.*, 1988; Flores *et al.*, 1997) (Fig. 4). Su estricta conservación en secuencia y localización sugieren una importante función aunque por el momento se desconoce cuál podría ser ésta.

Hay que destacar que la situación en los tres viroides que forman la familia *Avsunviroidae* es muy diferente ya que ASBVd, PLMVd o CChMVd presentan escasa similitud de secuencia entre sí con la excepción de los motivos conservados que participan en la formación de las estructuras ribozimáticas de cabeza de martillo. Sin embargo, recientemente se han caracterizado

en las dos polaridades del ASBVd unos motivos de secuencia adyacentes a los sitios de iniciación de la replicación de este viroide (Navarro y Flores, 2000), que presentan una cierta similitud con promotores de genes cloroplásticos, aunque hay que destacar que dominios similares no se han encontrado en los otros dos viroides de la misma familia.

### **2.1.2. ¿Dónde están los viroides? Detalles de su localización subcelular**

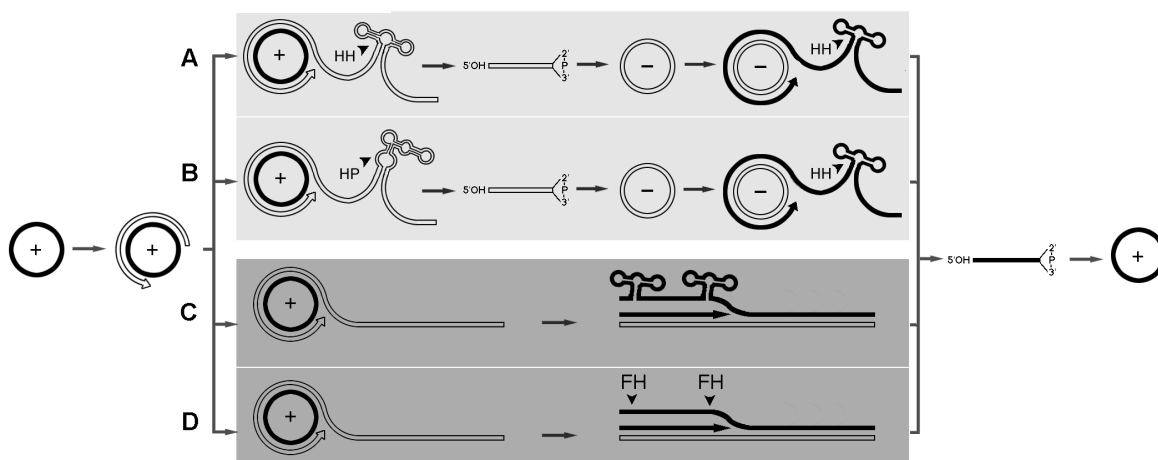
Los primeros estudios sobre la localización de los viroides se basaron en la obtención y análisis de fracciones subcelulares que permitieron asociar el PSTVd, el CEVd y el HSVd a las fracciones nucleares (Diener, 1971; Semancik *et al.*, 1976; Takahashi *et al.*, 1982). Investigaciones posteriores utilizando preparaciones de núcleos purificados en las que se combinó la hibridación *in situ* con la microscopía láser confocal de barrido, permitieron localizar el PSTVd específicamente en el nucleolo (Harders *et al.*, 1989). Resultados similares se han encontrado para otros viroides de la familia *Pospiviroidae*, lo que ha permitido concluir que el sitio de acumulación de éstos sería nuclear. Mediante técnicas similares se han ubicado a dos viroides miembros de la familia *Avsunviroidae*, el ASBVd y el PLMVd, en el cloroplasto (Bonfiglioli *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1994; Bussière *et al.*, 1999). La diferente localización subcelular del ASBVd, del PLMVd y, muy probablemente, del CChMVd con respecto a la de los miembros de la familia *Pospiviroidae* implica que las interacciones entre los componentes celulares y estos RNAs deben ser diferentes en ambas familias de viroides.

### **2.1.3. ¿Cómo se replican los viroides?**

#### **2.1.3.1. Mecanismo del círculo rodante**

Teniendo en cuenta la naturaleza circular de los RNAs de tipo viroidal se propuso para la replicación de estos agentes infecciosos un mecanismo de círculo rodante en el que sólo intervienen intermediarios de RNA (Grill y Semancik, 1978; Branch *et al.*, 1981, Branch y Robertson, 1984; Hutchins *et al.*, 1985; Ishikawa *et al.*, 1984). Además, dicho mecanismo podría seguir dos alternativas denominadas simétrica o asimétrica, atendiendo al tipo de molécula que se utiliza como molde en la segunda parte del ciclo (Fig. 5). En este modelo, el RNA circular monomérico infeccioso más abundante, al cual se le asigna arbitrariamente la polaridad positiva, es reconocido por una actividad RNA polimerasa que después de varios ciclos de elongación, da lugar a un oligómero de polaridad complementaria que puede seguir dos vías diferentes. Por un lado, en la variante asimétrica, este oligómero puede servir a su vez de molde para la síntesis de otros oligómeros de polaridad positiva, que son luego procesados a monómeros lineales y ligados a las correspondientes moléculas circulares maduras. Por otro lado, en la variante simétrica, es el oligómero de polaridad negativa el que es procesado y ligado dando lugar a moléculas circulares de la misma polaridad que sirven como molde en un segundo círculo rodante que es simétrico del

primero. La molécula clave que permite diferenciar cuál de las dos variantes es la que opera, es el monómero circular de polaridad negativa: su presencia indica que la replicación sigue la variante simétrica del modelo.



**Fig. 5.** Mecanismo de círculo rodante con intermediarios de RNA propuesto para la replicación de los RNAs de tipo viroidal (adaptado de Branch y Robertson, 1984; Symons, 1992; Flores *et al.*, 1997). En la parte superior de la figura se representa la variante simétrica del modelo en que los intermediarios oligoméricos se autocortan bien mediante ribozimas de cabeza de martillo en ambas polaridades (HH, en el caso de los miembros de la familia *Avsunviroidae* y dos RNAs satélites viroidales) (A), o bien mediante ribozimas de cabeza de martillo en una polaridad y de horquilla en la otra (HP, en el caso de las cadenas de polaridad negativa de los RNAs satélite de *Nepovirus*) (B), generándose RNAs lineales de longitud completa cuyos extremos son del tipo 5'-OH y 2'-3'-P cíclico. En la parte inferior se muestra la variante asimétrica donde sólo opera un círculo rodante y, posteriormente, una ribozima de cabeza de martillo en el caso de cuatro RNAs satélites viroidales (C), o un factor del huésped (FH) en el caso de los miembros de la familia *Pospiviroidae* (D), media el procesamiento de las moléculas oligoméricas para generar, muy probablemente, el mismo tipo de extremos en los productos resultantes.

Aunque es posible que el monómero circular de polaridad negativa del PSTVd inicie la infección viroidal en plantas transgénicas expresando constitutivamente RNAs de esta polaridad (Feldstein *et al.*, 1998), nunca se ha llegado a detectar este tipo de molécula en plantas infectadas de forma natural, lo que ha llevado a concluir que este viroide, y por extensión los de su familia, se replica por la variante asimétrica del modelo (Branch *et al.*, 1988b). Por el contrario, en los miembros de la familia *Avsunviroidae*, la detección en el tejido infectado de los monómeros circulares de polaridad negativa (Daròs *et al.*, 1994; Bussière *et al.*, 1999; Navarro y Flores, 1997) así como la observación de que los RNAs de ambas polaridades son capaces de autocortarse *in vitro* (Hutchins *et al.*, 1986; Hernández y Flores, 1992; Navarro y Flores, 1997), sugiere que estos viroides se replican siguiendo la variante simétrica del modelo.

### 2.1.3.2. Actividades enzimáticas y ribozimáticas implicadas en la replicación viroidal

La replicación de un viroide no tienen necesariamente que darse en el mismo compartimento subcelular en el que se acumula mayoritariamente, ya que podría ser sintetizado en

un lugar y posteriormente ser trascolados a otro. Sin embargo, de la detección de una serie de intermediarios replicativos del PSTVd en el núcleo (Spiesmacher *et al.*, 1983) y del ASBVd en el cloroplasto (Navarro *et al.*, 1999), se ha concluido que tanto la replicación como la acumulación de los viroides de la familia *Pospiviroidae* tiene lugar en el núcleo mientras que los viroides de la familia *Avsunviroidae* se replican y acumulan en el cloroplasto.

Para investigar qué RNA polimerasa nuclear se encuentra implicada en la replicación de los viroides de la familia *Pospiviroidae* se han realizado estudios de inhibición *in vivo* e *in vitro* con  $\alpha$ -amanitina, un octapéptido fúngico capaz de inhibir a la RNA polimerasa II, e incluso a la III a altas concentraciones, pero no así a la polimerasa I (Roeder, 1976; Marzluff y Huang, 1984; Cox y Golberg, 1988). Se ha comprobado que para el PSTVd (Schindler y Mühlbach, 1992) es la RNA polimerasa II el enzima implicado. Resultados similares se han obtenido con el CEVd (Flores y Semancik, 1982; Flores, 1989; Rivera-Bustamante y Semancik, 1989) y el HSVd (Mühlbach y Sängler, 1979; Yoshikawa y Takahashi, 1986), lo que ha llevado a concluir que muy probablemente suceda lo mismo en el resto de los miembros de la familia *Pospiviroidae*. Sin embargo, el tipo de RNA polimerasa implicada en la replicación del ASBVd es insensible a altos niveles de  $\alpha$ -amanitina (Marcos y Flores, 1992), por lo que debe tratarse de una actividad diferente de la RNA polimerasa II y III. Estudios recientes (Navarro *et al.*, 2000) sugieren que es la RNA polimerasa cloroplástica codificada en el núcleo (NEP, de “nuclear-encoded polymerase”) la requerida en la replicación de este viroide, y por extensión, es posible que también en la de los otros dos viroides de la familia *Avsunviroidae*.

Una segunda actividad enzimática requerida en el proceso replicativo es una RNasa capaz de procesar las moléculas oligoméricas para generar las formas monoméricas lineales. En el caso de los miembros de la familia *Avsunviroidae*, la actividad que interviene en esta etapa está contenida en las propias cadenas de RNA, o dicho de otra forma, se trata de una ribozima (Hutchins *et al.*, 1986; Hernández y Flores, 1992; Daròs *et al.*, 1994; Navarro y Flores, 1997). Para los viroides de la familia *Pospiviroidae* se ha propuesto la existencia de una estructura específica del oligómero viroidal que sería reconocida por una RNasa nuclear que determinaría un corte específico sobre el mismo (Tsagris *et al.*, 1987; Tsagris *et al.*, 1991; Baumstark y Riesner, 1995; Baumstark *et al.*, 1997). No obstante, para el caso del CCCVd de la familia *Pospiviroidae*, se ha propuesto que esta reacción de procesamiento también está catalizada por una nueva ribozima aún por identificar (Liu y Symons, 1998).

La última actividad enzimática implicada en la replicación sería una RNA ligasa encargada de circularizar los monómeros lineales. En el caso del PSTVd se ha conseguido el procesamiento a monómeros circulares de un transcrito con una repetición corta de la hebra superior de la CCR, por medio de su incubación con un extracto nuclear de células de patata (Baumstark *et al.*, 1997), que debe contener por lo tanto las dos últimas actividades del ciclo replicativo. La correspondiente RNA ligasa podría tener propiedades similares a la actividad caracterizada en extractos de germen

de trigo (Konarska *et al.*, 1981), que es capaz de circularizar *in vitro* moléculas lineales monoméricas del PSTVd aisladas de tejido infectado (Branch *et al.*, 1982) y que además requiere extremos 5'-OH y 2'-3'-fosfato cíclico consistentes con los generados por la mayoría de las RNAsas. Como los extremos producidos durante una reacción de autocorte mediada por las ribozimas de cabeza de martillo de los miembros de la familia *Avsunviroidae* son de esta misma naturaleza, puede presumirse que para su circularización sea necesaria la participación de una RNA ligasa de características semejantes a la de germen de trigo, aunque de localización cloroplástica.

Por otro lado, se ha comprobado que formas lineales de los RNAs monoméricos del PSTVd y del PLMVd obtenidos *in vitro* son capaces de autoligarse *in vitro* en ausencia total de proteínas (Baumstark *et al.*, 1997; Lafontaine *et al.*, 1995). Además, cuando en el caso del PLMVd se analizó el tipo de enlace fosfodiéster producido se comprobó que éste era mayoritariamente del tipo 2'-5' y no el 3'-5' que se halla de forma natural en la práctica totalidad de los RNAs (Côté y Perrault, 1997). Posteriormente, un análisis del enlace existente en los RNA circulares de este viroide aislados de tejido infectado ha mostrado que cerca del 90% de los mismos son 2'-5' (Côté *et al.*, 2001), lo que ha llevado a los autores a proponer que el mecanismo de circularización que actuaría *in vivo* para el PLMVd sería autocatalítico. Estos resultados, sin embargo, requieren confirmación adicional.

#### 2.1.4. ¿Qué efectos tienen los viroides sobre las plantas?

Desde un punto de vista sintomatológico las enfermedades viroidales son prácticamente indistinguibles de las producidas por virus. La variedad de síntomas es muy amplia e incluye epinastia, manchas necróticas y/o cloróticas en las hojas y deformaciones de tallos y frutos. Algunos viroides producen efectos letales y devastadores como el CCCVd en las plantaciones de cocoteros de Filipinas (Hanold y Randles, 1991), mientras que otros son completamente asintomáticos como el CLVd (Hammond *et al.*, 1989a). También existen importantes diferencias en cuanto a la gama de huéspedes. Un caso extremo lo constituyen los viroides de la familia *Avsunviroidae* cuyo espectro se restringe a una sola o a un grupo reducido de especies próximas, mientras que otros viroides como el HSVd colonizan multitud de especies distintas, produciendo tanto enfermedades como infecciones latentes (Shikata, 1990; Astruc *et al.*, 1996).

A nivel molecular, los primeros estudios del efecto de la patogénesis viroidal sobre el huésped permitieron observar la acumulación en las plantas afectadas de varias proteínas de bajo peso molecular denominadas PRs (de "pathogenesis related") (Conejero y Semancik, 1977; Conejero *et al.*, 1979). Estas proteínas han sido el foco de atención de estudios posteriores, en donde se han caracterizado un buen número de las mismas (Vera y Conejero, 1988, 1989; Vera *et al.*, 1989 y 1993) entre las que se incluyen quitinasas (García-Breijo *et al.*, 1990), glucanasas (Domingo *et al.*, 1994), así como otras potencialmente implicadas en mecanismos generales de

respuesta, y en algún caso de defensa, como peroxidasas, inhibidores de proteasas, proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y proteasas del tipo subtilisina (Torneró *et al.*, 1997). En lo referido a la localización dentro de la propia molécula viroidal del determinante o determinantes responsables de la patogenicidad, estudios iniciales llevados a cabo con el PSTVd (Gross *et al.*, 1981) así como con el CEVd (Visvader y Symons, 1986), mostraron que mutaciones puntuales en el dominio patogénico (Fig. 4) provocaban efectos drásticos en la patogénesis viroidal (Gross *et al.*, 1981). Estudios posteriores indican también la participación de otros dominios adicionales como el T<sub>L</sub>, V y T<sub>R</sub> en el proceso patogénico (Sano *et al.*, 1992). Se ha propuesto así que la patogénesis viroidal de los viroides de la familia *Pospiviroidae* dependería de la conformación global de la región P junto con otras posibles alteraciones que afectarían a la unión RNA-proteína (Owens *et al.*, 1996). Sin embargo, para viroides pertenecientes a la familia *Avsunviroidae* como el PLMVd, a pesar de haberse descrito variantes naturales con distinta patogenicidad, no ha podido encontrarse una relación clara entre patogénesis y determinados motivos de secuencia o estructura viroidal (Ambrós *et al.*, 1998)

### 2.1.5. Fenómenos de protección cruzada e interferencia entre viroides

De forma paralela a la situación descrita en el caso de los virus, en los viroides también existen fenómenos de protección cruzada aunque con una base molecular probablemente muy distinta. Entre viroides, estos fenómenos se pusieron de manifiesto por primera vez en experimentos llevados a cabo por Fernow (1967) para la detección de cepas suaves del PSTVd, en los que se mostró que la preinoculación de tomate con una cepa suave del viroide bloqueaba o retardaba la inducción de síntomas por una segunda cepa agresiva del mismo viroide inoculada posteriormente. Otras observaciones confirmaron estas interacciones entre aislados patogénicamente distintos de un mismo viroide (Khoury *et al.*, 1988; Branch *et al.*, 1988a; Durán Vila y Semancik, 1990) y las extendieron al caso de parejas de viroides de la familia *Pospiviroidae* con una alta similitud de secuencia (Niblett *et al.*, 1978; Branch *et al.*, 1988a; Pallás y Flores, 1989). Observaciones adicionales han demostrado que en general hay una buena correlación entre el retraso en la aparición de los síntomas producidos por el viroide más agresivo y la disminución en su acumulación (Khoury *et al.*, 1988; Branch *et al.*, 1988a; Pallás y Flores, 1989; Durán-Vila y Semancik, 1990). Estos datos podrían explicarse a nivel molecular por la existencia de un factor celular limitante, requerido para la replicación, transporte o acumulación viroidal, por el que competirían con distinta afinidad los viroides que coinfectan el mismo huésped.

Fenómenos de protección cruzada también han sido descritos para miembros de la familia *Avsunviroidae* como el CChMVd (Horst, 1975) y el PLMVd (Desvignes, 1976) antes incluso de que se reconociera la naturaleza viroidal de dichos agentes. Teniendo en cuenta no sólo las diferencias estructurales y funcionales entre ambas familias sino también su distinta localización

subcelular, se ha postulado que posiblemente exista más de un mecanismo molecular de protección cruzada entre viroides (Flores *et al.*, 1997).

### 2.1.6. CChMVd: el agente causal del moteado clorótico del crisantemo

La enfermedad del moteado clorótico del crisantemo (“chrysanthemum chlorotic mottle”, CChM) fue descrita por primera vez a finales de los años 60 en plantas de crisantemo cultivadas en invernadero en el sur de EE.UU. (Dimock y Geissinger, 1969). Las plantas afectadas por esta enfermedad exhiben en estadios tempranos de la infección un moteado clorótico en las hojas que finalmente da lugar a una clorosis que llega a cubrir toda la superficie foliar (Dimock *et al.*, 1971) (Fig. 6). Otros síntomas asociados son retrasos en el desarrollo floral así como el enanismo de la planta (Dimock *et al.*, 1971; Horst *et al.*, 1977). Para que se produzca la expresión de los síntomas es necesario que se den altas intensidades de luz así como temperaturas elevadas (entre 24-30°C) de forma que con intensidades de luz inferiores a 5380 lx o temperaturas menores de 21°C no se llega a detectar la aparición de los síntomas (Horst y Kryczynski, 1971; Horst, 1975).



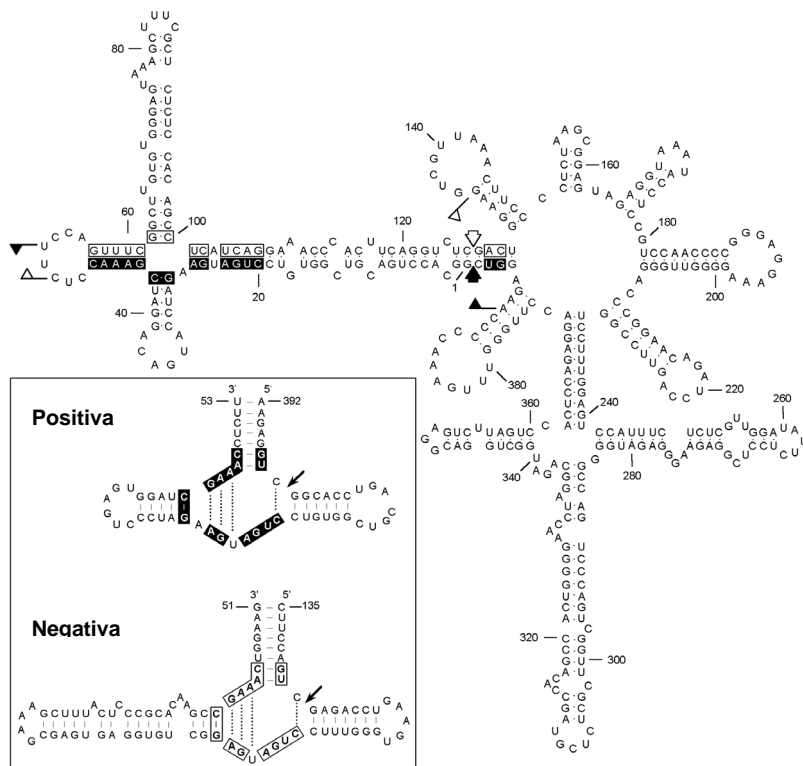
**Fig. 6.** Plantas de crisantemo sana (A) e infectada con CChMVd mostrando los síntomas del moteado clorótico característicos de dicho agente (B).

Inicialmente se propuso una etiología viral para el moteado clorótico del crisantemo puesto que el agente causal se pudo transmitir mecánicamente y no se encontraron bacterias ni hongos asociados con la enfermedad (Dimock *et al.*, 1971). Sin embargo por microscopía electrónica no fue posible identificar las hipotéticas partículas virales. Posteriormente, con la formulación y asentamiento del concepto de viroide (Diener, 1971), se sugirió la posible naturaleza viroidal del agente (Romaine y Horst, 1975). Observaciones indirectas en favor de esta hipótesis incluían la anulación de la infectividad de extractos de ácidos nucleicos totales en presencia de RNasa pero no de DNasa (Horst *et al.*, 1974), y la mejora de la transmisión mecánica en aquellas condiciones que inhiben las RNasas celulares (Kryczynski *et al.*, 1971; Horst *et al.*, 1974). Aunque éstas y otras observaciones en la misma línea (Romaine y Horst, 1975) sugerían que el agente infeccioso era un viroide, existían otros argumentos antagónicos al respecto como su alta inestabilidad en extractos de ácidos nucleicos totales, su restringida gama de huéspedes y, sobre todo, su insolubilidad en LiCl 2 M, al contrario de lo que sucedía con el resto de viroides conocidos (Kawamoto *et al.*,

1985). El comportamiento de los RNAs en LiCl 2 M depende esencialmente de su estructura de orden superior puesto que tanto los RNAs de doble hebra como los que presentan alto grado de autoapareamiento son solubles en LiCl 2 M, mientras que los RNAs de simple hebra con poco contenido en estructura secundaria, y los RNAs con regiones de doble y de simple hebra son insolubles en las mismas condiciones (Baltimore *et al.*, 1966; Sanger *et al.*, 1976).

Los intentos dirigidos a identificar el agente causal de la enfermedad del moteado clorótico del crisantemo como una entidad fısica fueron infructuosos durante bastante tiempo (Kawamoto *et al.*, 1985), lo que incluso llev a algunos autores a considerar la posibilidad de que el mismo fuese un nuevo tipo de pat6geno subviral diferente de los viroides (Palukaitis *et al.*, 1991). No fue hasta finales de los a˜nos 90 cuando, mediante el análisis comparado de extractos de tejido sano e infectado en geles de poliacrilamida de alta resoluci3n, se identific3 un RNA asociado con la enfermedad del CChM (Navarro y Flores, 1997). Mediante retrotranscripci3n de dicho RNA con hexanucle3tidos al azar (Navarro *et al.*, 1996) se determin3 una porci3n de la secuencia del agente causal que permiti3 dise˜nar una pareja de cebadores adyacentes con los que se obtuvo la secuencia completa del RNA. Se trataba de una mol3cula circular de 399 nucle3tidos con un contenido en G+C del 55,4%. En sus cadenas de ambas polaridades se observaron los residuos conservados y los elementos estructurales tıpicos de las ribozimas de cabeza de martillo lo que permiti3 agrupar a este viroide con el ASBVd y el PLMVd dentro de la familia *Avsunviroidae*.

La estructura secundaria de mınima energıa libre propuesta para este viroide es altamente ramificada (Fig. 7) y, a pesar de que existe escasa similitud de secuencia entre el mismo y el PLMVd, sus estructuras globales resultan muy similares.



**Fig. 7.** Estructura secundaria de mınima energıa libre propuesta para el CChMVd (variante CM5, Navarro y Flores, 1997). En el recuadro inferior izquierdo aparecen las estructuras ribozimáticas propuestas para las cadenas positiva y negativa de esta misma variante. Las banderas delimitan los dominios ribozimáticos de ambas polaridades, y en ellos se destacan mediante cajas los nucle3tidos conservados en la mayorıa de las ribozimas de cabeza de martillo naturales. Las flechas indican los sitios de autocorte. Los sımbolos rellenos en negro y blanco indican polaridad positiva y negativa respectivamente.



Ya en el momento de la descripción del CChMVd se detectaron algunas peculiaridades en los dominios ribozimáticos de cabeza de martillo de ambas polaridades (Navarro y Flores, 1997). Por un lado, en la ribozima de polaridad positiva se observó la existencia de un nucleótido extra, una A, en el centro catalítico del mismo (ver más adelante), situación no descrita previamente en otras ribozimas de cabeza de martillo naturales o artificiales. Por otro lado, la ribozima de polaridad negativa presentaba una peculiar hélice II excepcionalmente larga, situación similar a la descrita en otras ribozimas de cabeza de martillo naturales como la del RNA satélite del virus del enanismo amarillento de los cereales (sCYDV-RPV) pero no en un viroide.

En cuanto a las propiedades biológicas, estudios de coinoculación mostraron que miembros de un grupo de viroides que incluía al CSVd, CEVd y dos cepas de PSTVd, pero no al agente del CChM, presentaban protección cruzada al ser inoculados en múltiples combinaciones. Este resultado sugirió que estos viroides afectan a procesos biológicos comunes diferentes de los afectados por el agente del CChM (Niblett *et al.*, 1978). Por otra parte, y también sobre estudios de protección cruzada, en 1975 se postuló la existencia de un aislado no sintomático del agente del CChM, ya que ciertas plantas de algunas variedades de crisantemo no desarrollaron los síntomas de la enfermedad al ser inoculadas con preparaciones de ácidos nucleicos procedentes de plantas mostrando los síntomas de la misma. Se supuso que las primeras plantas estaban infectadas por una cepa no sintomática del agente del CChM que las protegía frente a la segunda infección con una cepa agresiva del mismo agente (Horst, 1975).

## 2.2. RNAs satélites de tipo viroidal

Estos RNAs comparten propiedades estructurales comunes con los viroides, como circularidad, pequeño tamaño, ausencia de capacidad codificante y presencia de dominios ribozimáticos (Keese y Symons, 1987). Sin embargo, no están dotados de replicación autónoma, sino que necesitan para su propagación la presencia de un virus de RNA auxiliar por cuya proteína de cubierta quedan encapsidados.

**Tabla 1.** RNAs satélites de tipo viroidal (adaptada con modificaciones de Bruening *et al.*, 1991)

| Abreviatura | Nombre  | Tamaño (nt) | Virus auxiliar | Referencia                    |
|-------------|---|-------------|----------------|-------------------------------|
| sTRSV       | Satélite del virus de las manchas anulares del tabaco       | 359         | Nepovirus      | Buzayan <i>et al.</i> , 1986a |
| sArMV       | Satélite del virus del mosaico del <i>Arabidopsis</i>       | 300         | Nepovirus      | Kaper <i>et al.</i> , 1988    |
| sChYMoV     | Satélite del virus del moteado amarillo de la achicoria     | 457         | Nepovirus      | Rubino <i>et al.</i> , 1990   |
| sSNMoV      | Satélite del virus del moteado de <i>Solanum nodiflorum</i> | 377         | Sobemovirus    | Haseloff y Symons, 1982       |
| sVTMoV      | Satélite del virus del moteado del tabaco aterciopelado     | 366         | Sobemovirus    | Haseloff y Symons, 1982       |
| sLTSV       | Satélite del virus del rayado transitorio de la alfalfa     | 324         | Sobemovirus    | Keese <i>et al.</i> , 1983    |
| sSCMoV      | Satélite del virus del moteado del trébol subterráneo       | 332, 388    | Sobemovirus    | Davies <i>et al.</i> , 1990   |
| sRYMoV      | Satélite del virus del moteado amarillento del arroz        | 220         | Sobemovirus    | Collins <i>et al.</i> , 1998  |
| sCYDV-RPV   | Satélite del virus del enanismo amarillento de los cereales | 322         | Luteovirus     | Miller <i>et al.</i> , 1991   |

Carecen de homología de secuencia significativa con el genoma de sus virus auxiliares, los cuales a su vez no requieren la presencia del RNA satélite para ninguna de sus funciones (Bruening *et al.*, 1991; Roossinck *et al.*, 1992). Únicamente se han encontrado RNAs satélites viroidales asociados a tres tipos de virus auxiliares: nepovirus, luteovirus y sobemovirus (Tabla 1). Los RNAs satélites de tipo viroidal pueden alterar los niveles de acumulación de sus virus auxiliares así como la intensidad de los síntomas inducidos por éstos.

### **2.3. RNAs viroidales con un DNA homólogo: CarSV RNA, RNA satélite II de tritón, Sm $\alpha$ de *Schistosoma* y RNA VS de *Neurospora***

Dentro de los RNAs de tipo viroidal se ha descrito un subgrupo formado por aquellas moléculas que además presentan un DNA homólogo. Entre éstos tenemos el CarSV RNA (de “carnation small viroid-like RNA”) encontrado en algunas variedades de clavel, que es un RNA circular de 275 nt que tiene similitudes estructurales con los RNAs de tipo viroidal como son su naturaleza circular, pequeño tamaño y la presencia de ribozimas de cabeza de martillo en sus cadenas de ambas polaridades (Hernández *et al.*, 1992a). Inicialmente se sugirió que podría ser un viroide o un RNA satélite de tipo viroidal (Palukaitis *et al.*, 1991), aunque estudios posteriores demostraron que carecía de infectividad (Hernández *et al.*, 1992a). Finalmente se encontró que este RNA se encuentra asociado a un DNA homólogo (CarSV DNA) constituido por un conjunto de copias en tándem fusionadas con secuencias derivadas de un pararetrovirus, el virus de los anillos grabados del clavel (CERV), formando un elemento extracromosómico (Daròs y Flores, 1995a). Además del CarSV RNA de 275 nucleótidos, existen otras formas circulares de este RNA con eliminaciones y repeticiones que probablemente surgen de procesos de recombinación (Daròs y Flores, 1995b, Vera *et al.*, 2001).

Por otra parte, los transcritos correspondientes al DNA satélite II (secuencias de 330 nt repetidas en tándem) del tritón (*Notophthalmus viridescens*), contienen estructuras ribozimáticas de tipo cabeza de martillo funcionales *in vitro* y probablemente también *in vivo*, muy similares a las existentes en los RNAs viroidales de plantas (Epstein y Gall, 1987; Epstein y Coats, 1991). Se ha comprobado que los transcritos de longitud monomérica de este DNA se encuentran formando parte de un complejo ribonucleoproteico en los oocitos del tritón, donde podrían mediar el procesamiento *in trans* de algunos RNAs celulares (Luzi *et al.*, 1997). Una situación similar observada en otro sistema animal es el transcrito del DNA satélite Sm $\alpha$  de ciertos esquistosomas (*Schistosoma mansoni*). Estos RNAs contienen estructuras de cabeza de martillo que permiten su procesamiento tanto *in vitro* como *in vivo* y que presentan una gran similitud con las detectadas en los transcritos del DNA satélite II del tritón (ver más adelante) (Ferbeyre *et al.*, 1998).

Por último, el RNA VS de *Neurospora*, que tiene un tamaño de 881 nt, es transcrito a partir del plásmido mitocondrial VS que se encuentra en algunos aislados naturales de este hongo. La replicación del RNA VS depende de una transcriptasa reversa codificada por otro plásmido

distinto al VS DNA (Kennell *et al.*, 1995). Saville y Collins (1991) demostraron que los VS RNAs multiméricos sintetizados *in vitro* se autocortan y se ligan en ausencia total de proteínas. Esta observación indica que la reacción está mediada por una ribozima, aunque su análisis estructural sugiere que ésta debe de haber evolucionado independientemente de las otras descritas en el resto de los RNAs catalíticos.

#### **2.4. El RNA del virus $\delta$ de la hepatitis humana (HDV)**

Se trata de un virus satélite del virus B de la hepatitis humana, del cual depende para su transmisión. Su genoma está constituido por una molécula de RNA circular de simple cadena de 1,7 Kb que presenta un alto grado de autoapareamiento, lo que le permite adoptar una estructura secundaria de tipo varilla similar a la que presentan la mayoría de los RNAs de tipo viroidal. En el RNA del HDV pueden distinguirse dos dominios: uno de tipo viroidal, donde se localizan los motivos ribozimáticos, y otro codificante que en la polaridad complementaria contiene el mensaje para la síntesis de una fosfoproteína, el denominado antígeno  $\delta$ , requerida para la replicación (Ryu *et al.*, 1993, Lazinski y Taylor, 1994; Taylor, 1999).

En lo referido al posible origen del HDV RNA, se ha sugerido que éste podría haberse derivado de la fusión de un RNA de tipo viroidal de “vida libre” con el mRNA de un gen celular homólogo al antígeno  $\delta$  que codifica la proteína DIPA (de “delta interacting protein”) (Brazas y Ganem, 1996). El RNA resultante conservaría por un lado la capacidad de replicarse del RNA viroidal y, por otro, la capacidad de codificar proteínas del mRNA (Robertson, 1996).

#### **2.5 Aspectos evolutivos relacionados con los RNAs de tipo viroidal**

##### **2.5.1. Evolución molecular de los genomas de RNA**

Los genomas de RNA presentan la capacidad de variar y evolucionar mucho más rápidamente que los de DNA (Holland *et al.*, 1982). La diferencia principal entre ambos sistemas radica tanto en el mayor número de generaciones que por unidad de tiempo experimentan los genomas de RNA, como, sobre todo, en la alta tasa de mutación durante la replicación de los mismos en comparación con los de DNA. Las primeras tasas de mutación de genomas de RNA se calcularon experimentalmente empleando el bacteriófago Q $\beta$  como sistema modelo, obteniéndose valores del orden de  $10^{-4}$  sustituciones por nucleótido incorporado y ronda de replicación (Domingo *et al.*, 1976; Domingo *et al.*, 1978). Dicha tasa puede considerarse como representativa ya que valores similares fueron estimados posteriormente para otros replicones de RNA (Holland *et al.*, 1982; Drake, 1993; Domingo y Holland, 1994). Es de destacar que las tasas de mutación durante la replicación del DNA cromosómico son del orden de  $10^3$ - $10^7$  veces inferiores, debido a la

existencia en estos sistemas de una actividad correctora de errores así como de mecanismos postreplicativos de reparación (Domingo y Holland, 1994).

Observaciones experimentales posteriores demostraron que al menos dos virus de RNA, el de la estomatitis vesicular y el de la poliomielitis, se replicaban con tasas de mutación muy elevadas que los situaban cerca de una tasa máxima de error compatible con el mantenimiento de su información genética (Holland *et al.*, 1990). Utilizando diferentes tipos de agentes mutágenos se demostró que las tasas de mutación de ambos virus sólo se podían incrementar 2.5 veces con respecto a las tasas de los virus de referencia, ya que al traspasar estos valores se disminuía considerablemente la viabilidad de sus genomas (Holland *et al.*, 1990). Esto indica una característica habitual dentro del mundo de los virus de RNA, a los que se considera que “viven al filo del caos” (Kauffman, 1993), de forma que cuando ocasionalmente la fidelidad de copia cruza el denominado *umbral de error* se produce la pérdida de la información contenida en ese genoma en un proceso conocido como *catástrofe de error* que provoca su extinción.

La variabilidad genética que se genera en los virus de RNA como consecuencia de las altas tasas de mutación mencionadas forma parte de la estrategia evolutiva de los mismos y es un factor clave en la patogénesis viral. El hecho de que toda población de virus de RNA presente una composición especialmente heterogénea compuesta por un gran número de moléculas diferentes, introdujo un concepto nuevo en la virología: el de *cuasiespecies* (Domingo *et al.*, 1985; Domingo y Holland, 1994). Esta idea había sido apuntada con anterioridad en un contexto teórico por M. Eigen (1971), para explicar la posible estructura y dinámica poblacional de los primitivos replicones que aparecieron en el comienzo de la vida sobre nuestro planeta. Estudios experimentales han demostrado que la distribución de secuencias presente en las poblaciones reales de genomas de RNA no es arbitraria, sino que se centra en torno a una (o más) *secuencia maestra* definida como la de mayor eficacia biológica, aunque puede ser minoritaria en la población. La llamada *secuencia consenso*, definida estadísticamente, es la secuencia promedio que en cada posición tiene el nucleótido más frecuente en el espectro de mutantes. La secuencia maestra y la consenso pueden ser sustituidas rápidamente a causa de las perturbaciones a las que se ven sometidas las poblaciones virales en condiciones naturales (cambios ambientales y sucesos de deriva génica), o bien permanecer en equilibrio y mostrar estasis evolutiva durante largos períodos de tiempo, lo que ocurre cuando las cuasiespecies están altamente adaptadas a un ambiente. El mantenimiento de una secuencia consenso invariable indica que no todos los mutantes generados *de novo* en cada nueva ronda de replicación permanecen en la población de variantes, y que son sus distintas eficacias biológicas las que determinan que sean eliminados o retenidos en un ambiente determinado. La existencia de un amplio espectro de mutantes indica una tolerancia amplia a las mutaciones neutrales o casi neutrales que no afectan la eficacia biológica del virus en estos sistemas.

Bajo una perspectiva más teórica los límites en los que se mueve una cuasiespecie constituyen un *espacio de secuencias* puntuado, determinado tanto por las relaciones entre las mismas dentro de la población como por las restricciones que limitan la funcionalidad del genoma considerado (Eigen, 1992). La adaptabilidad de los sistemas de RNA se alcanza ocupando una fracción muy pequeña del espacio de secuencias en un momento dado. Dicho espacio suele mostrar una condensación de variantes de secuencia en determinados puntos correspondientes a una alta eficacia biológica (picos adaptativos), que están separados por regiones de baja eficacia biológica (valles adaptativos). Una terminología similar a ésta ha sido utilizada en genética de poblaciones en el marco de la evolución por equilibrio balanceado descrita por Wright (1967).

En este contexto resulta interesante observar cómo afectan a la estructura de una cuasiespecie viral las situaciones que conducen al rápido deterioro genético de un virus a través de la acumulación gradual de mutaciones, es decir, que le conducen a un valle adaptativo. La pérdida de eficacia biológica de un virus se puede estudiar experimentalmente mediante pases de virus clonado de placa a placa, lo que se denomina cuellos de botella genéticos o poblacionales, un efecto que se conoce como actuación del *trinquete de Muller* (“Muller’s ratchet”) (Muller, 1964). Así, por ejemplo, se ha demostrado que pases seriados de placa a placa tanto de fagos (Chao, 1990; De la Peña *et al.*, 2000) como de virus animales (Duarte *et al.*, 1992), dan lugar a poblaciones virales con eficacia competitiva menor. Estos sucesos de cuellos de botella poblacionales ocurren continuamente en la naturaleza cuando un virus inicia un proceso de infección en un nuevo huésped susceptible, o cuando se transmite de un sitio a otro dentro de un mismo huésped infectado. El comportamiento biológico final del virus dependerá de las variantes de secuencia que se han muestreado al azar y del tamaño poblacional transmitido. Este fenómeno, que tiene implicaciones importantes en la evolución natural de los virus, constituye la base de la atenuación viral que ha sido muy utilizada para prevenir enfermedades infecciosas a través de la administración a los huéspedes potenciales de vacunas consistentes en virus atenuados.

### **2.5.2. ¿De dónde vienen los RNAs de tipo viroidal?**

Se han sugerido varias hipótesis para el explicar el posible origen de estos RNAs. Por un lado, podrían haberse originado a partir de elementos genéticos transponibles o provirus retrovirales (Kiefer *et al.*, 1983), teniendo en cuenta las similitudes de secuencia halladas entre las CCRs de algunos miembros de la familia *Pospiviroidae* y los extremos de determinados elementos transponibles, así como la presencia en los viroides de una región polipurínica similar a la secuencia viral que reconoce la transcriptasa reversa. Otra propuesta consideró que los RNAs de tipo viroidal podrían ser “intrones escapados” (Diener, 1981), de acuerdo con ciertas semejanzas estructurales y de secuencia existentes entre los mismos, como su pequeño tamaño o sus propiedades de autoprosesamiento mediante ribozimas. Sin embargo, las diferencias entre los

mecanismos ribozimáticos de ambos RNAs, así como la ausencia de un DNA homólogo en el caso de los viroides, hizo desestimar esta hipótesis.

El descubrimiento de la actividad catalítica de algunos RNAs (Kruger *et al.*, 1982; Guerrier-Takada *et al.*, 1983) es consistente con la idea de que previamente al mundo celular actual, basado en el DNA y las proteínas, pudo existir un mundo de RNA (“RNA world”) en el que las moléculas que almacenaban y expresaban la información genética eran de RNA. A partir de esta idea se ha llegado a sugerir que tanto los viroides como los RNAs satélites de tipo viroidal podrían ser reliquias evolutivas de este mundo de RNA (Diener, 1989 y 1996). Entre los argumentos que sostienen esta hipótesis destaca la presencia en tres viroides y en todos los RNAs satélites de tipo viroidal, de ribozimas con actividad de RNAsa y en algunos casos de RNA ligasa. La simplicidad estructural de estas ribozimas sugiere que pudieron estar implicadas en la replicación del RNA durante las etapas tempranas de la evolución de la vida en nuestro planeta. Con posterioridad, los viroides habrían adquirido evolutivamente una dependencia del huésped y, los RNAs satélites del virus auxiliar y del huésped, convirtiéndose así en parásitos intracelulares y quedando la actividad catalítica de los mismos como un vestigio de su pasado evolutivo (Diener, 1989 y 1996).

### **2.5.3. El árbol genealógico de los RNAs de tipo viroidal**

A partir de las secuencias de los RNAs de tipo viroidal, análisis filogenéticos han permitido obtener un árbol consenso que sugiere un origen monofilético para todos ellos (Elena *et al.*, 1991 y 2001; Hernández y Flores, 1992; Navarro, 1997). Dichas reconstrucciones filogenéticas permiten distinguir tres grandes grupos diferenciados: por un lado, los RNAs satélites (con actividad ribozimática pero sin replicación autónoma), por otro los miembros de la familia *Pospiviroidae* (sin actividad autocatalítica pero dotados de replicación autónoma) y entre ambos los miembros de la familia *Avsunviroidae* cuya posición intermedia sería coherente con sus propiedades, ya que se replican autónomamente como los viroides y poseen dominios ribozimáticos como los RNAs satélites de tipo viroidal. Los análisis filogenéticos entre los propios viroides apoyan las clasificaciones basadas en la presencia de CCR y en su capacidad de autocortarse a través de ribozimas de cabeza de martillo, características ambas que se han utilizado para dividir a los mismos en las dos grandes familias (Flores *et al.*, 2000). Además, dentro de la familia *Pospiviroidae* los grupos filogenéticos son consistentes con los géneros propuestos atendiendo al tipo de CCR y a la existencia o no de otras regiones conservadas.

### **2.5.4. Algunas características evolutivas de los viroides**

Para el caso particular de los viroides, de forma similar a lo que sucede en genomas virales de RNA, es habitual encontrar una alta heterogeneidad de secuencia en los aislados naturales,

habiéndose observado poblaciones de variantes de secuencia para la práctica totalidad de ellos, así como variantes de patogenicidad diferencial que coexisten en un mismo aislado.

La gran capacidad de las secuencias viroidales para ser flexibles a los cambios mutacionales y adaptarse a ellos con rapidez, ha sido demostrada en los últimos años a través de diversos estudios de infectividad realizados con mutantes del PSTVd sintetizados *in vitro*. Aunque no se dispone de datos cuantitativos sobre las tasas de mutación viroidales, los resultados obtenidos sugieren que estos sistemas evolucionan muy rápidamente. Experimentos iniciales de mutagénesis dirigida sobre la región central conservada del PSTVd mostraron la pérdida de infectividad de los cDNAs viroidales bioensayados (Owens *et al.*, 1986) y, ocasionalmente, una rápida reversión a la secuencia salvaje (Owens *et al.*, 1991). El estudio de mutantes del PSTVd que tenían afectada la formación de la horquilla II, una estructura termodinámicamente metaestable que parece esencial para la infectividad de este viroide, mostró que algunos mutantes se mantenían en la población de una forma estable, mientras que otros revertían rápidamente a la secuencia salvaje (Loss *et al.*, 1991; Qu *et al.*, 1993). Resultados similares se obtuvieron cuando las mutaciones se introducían en otros dominios estructurales de la molécula del PSTVd, observándose en algunos casos cambios compensatorios que restauraban la estructura en forma de varilla (Wassenegger *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 1996 y 1997), o la generación de mutaciones espontáneas diferentes a las presentes en la secuencia parental (Owens *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1996). Estudios más recientes se han centrado en la evolución molecular de variantes naturales del PSTVd inoculadas como secuencias únicas en un huésped experimental (Góra-Sochacka *et al.*, 1997), mostrando que algunas secuencias parentales eran genéticamente estables mientras que otras generaban poblaciones heterogéneas *in vivo* independientemente de su patogenicidad inicial.

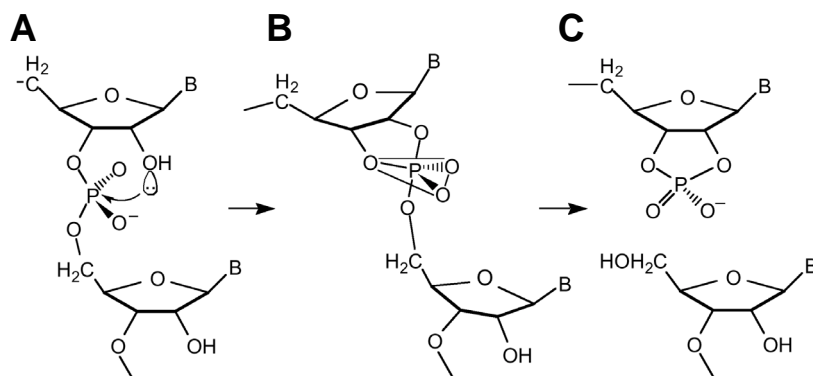
La plasticidad de las secuencias viroidales a la admisión de mutaciones puede ser en parte debida a la falta de una función codificante que actúe restringiendo la variabilidad. Sin embargo, otras restricciones deben limitar la heterogeneidad en estos sistemas, ya que en viroides de la familia *Pospiviroidae* ésta se encuentra prácticamente excluida de dominios estructurales de la molécula viroidal que contienen secuencias conservadas como la CCR o la TCR, a las que se ha implicado en funciones clave. En el PSTVd se ha demostrado que el mantenimiento de una estructura secundaria de tipo varilla en el RNA monomérico circular producto final del ciclo replicativo, así como de determinadas estructuras en horquilla en los intermediarios replicativos, es esencial para su viabilidad (Qu *et al.*, 1993; Wassenegger *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 1996 y 1997). Restricciones estructurales similares operan muy probablemente en los otros viroides de la misma familia que el PSTVd.

Los estudios sobre los miembros de la familia *Avsunviroidae* son más escasos. En el ASBVd se ha observado que la variabilidad está restringida a los bucles terminales de la molécula (Pallás *et al.*, 1988; Rakowsky y Symons, 1989; Semancik y Szychowsky, 1994). Para el caso del PLMVd se ha descrito que, a pesar de la elevada heterogeneidad de secuencia encontrada en

aislados naturales, existen determinadas restricciones que la limitan como son la estabilidad de las estructuras ribozimáticas, la formación de una interacción de larga distancia o la estructura secundaria global de tipo ramificada (Ambrós *et al.*, 1998; Bussièrè *et al.*, 1999). El caso del tercer viroide de la familia, el CChMVd, es particularmente notorio. La heterogeneidad de secuencia descrita en aislados naturales del mismo no es tan elevada como la observada con el otro miembro de su género, el PLMVd, y además, ésta ha mostrado que existe una elevada presión selectiva a nivel de la estructura secundaria del CChMVd ya que toda la variabilidad descrita siempre ha sido compatible con el mantenimiento dicha estructura secundaria (Navarro y Flores, 1997).

### 3. Estructuras ribozimáticas presentes en los RNAs de tipo viroidal

El descubrimiento de que los RNAs son capaces de catalizar reacciones bioquímicas tuvo su inicio en los experimentos del grupo de Cech (Cech *et al.*, 1981; Kruger *et al.*, 1982) que demostraron el autoprosesamiento no enzimático del intrón del RNA ribosomal de *Tetrahymena*. Sin embargo, la primera prueba de la actividad catalítica de una verdadera ribozima, capaz de mediar el corte en *trans* de otros RNAs, mantenerse invariable al final de la reacción y presentar por tanto capacidad de recambio, se obtuvo con el componente de RNA de la RNasa P bacteriana (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Posteriormente se encontraron ribozimas en las secuencias de ciertos RNAs de tipo viroidal (Prody *et al.*, 1986; Hutchins *et al.*, 1986; Foster y Symons, 1987; Buzayan *et al.*, 1986a), las cuales catalizaban una reacción de transesterificación, teóricamente reversible, en la que se produce el ataque nucleofílico de un grupo 2'-OH al fósforo del enlace fosfodiéster adyacente. Los productos liberados tras la reacción tienen extremos 5'-OH y 2'-3'-P cíclico (Fig. 8). Estos RNAs pueden ser considerados verdaderos enzimas ya que, aunque en condiciones naturales median reacciones de autocorte intramolecular (actúan en *cis*), pueden ser modificados mediante una simple división de la molécula original en dos moléculas distintas, una que actuaría como sustrato (S) y otra como ribozima propiamente dicho (R), actuando catalíticamente en *trans* y mostrando un recambio múltiple del sustrato.



**Fig. 8.** La reacción de corte ribozimático comienza (A) con el ataque del oxígeno en 2' sobre el fosfato que conduce a la salida del oxígeno en 5' en un mecanismo  $S_N2$ . El estado de transición (B) de la reacción es una bipirámide trigonal y los productos (C) contienen un fosfato cíclico 2'-3' y un hidroxilo 5'.



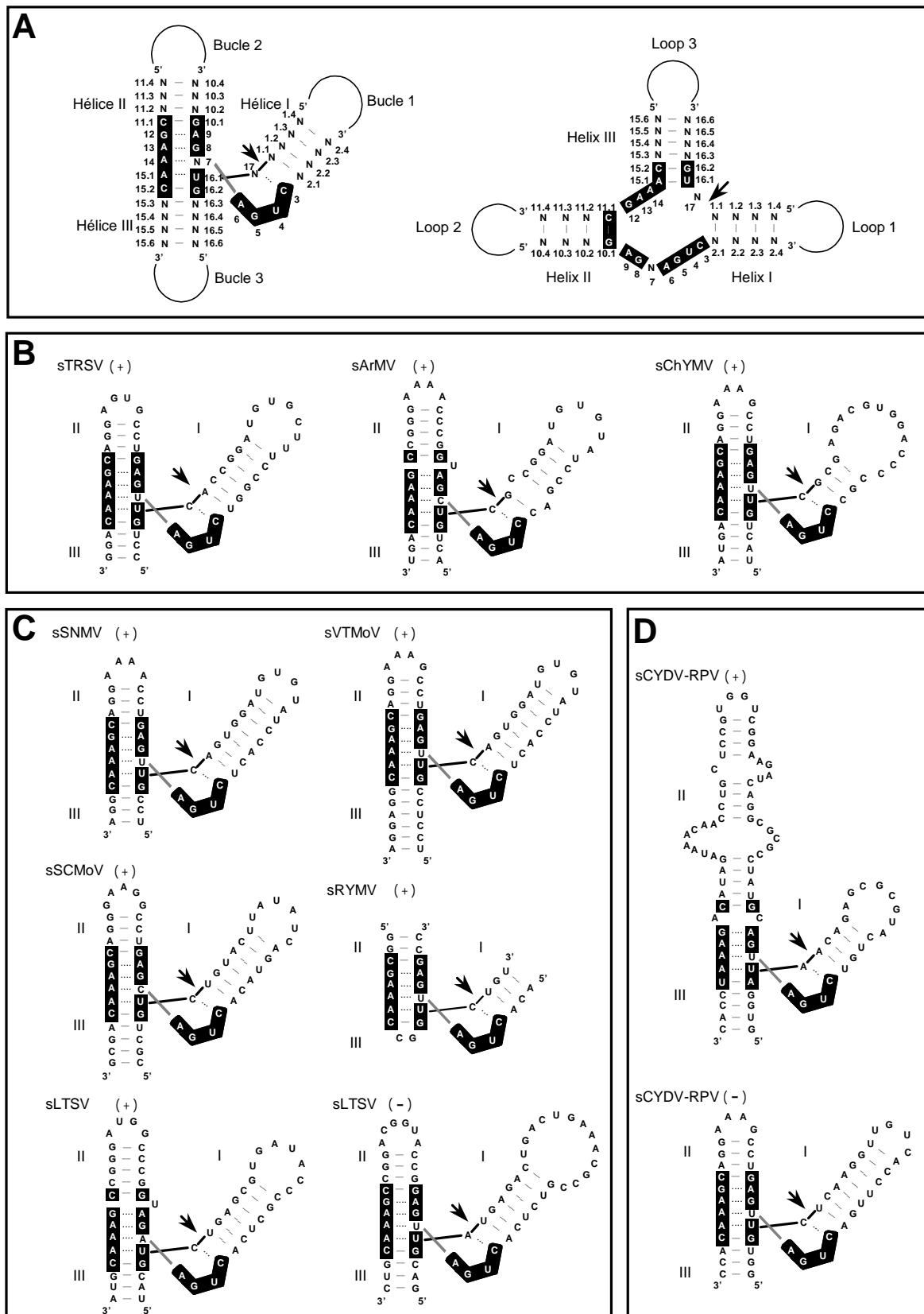
Atendiendo a los modelos estructurales presentes en los dominios ribozimáticos de los RNAs de tipo viroidal se distinguen cuatro tipos de ribozimas, siendo la más común y sencilla la de cabeza de martillo (“hammerhead”). Otras estructuras que representan soluciones evolutivas diferentes para la misma función se encuentran en las cadenas de polaridad negativa de los RNAs satélites de los nepovirus (ribozima de horquilla, denominado en inglés “hairpin” o “paperclip”), en las cadenas de ambas polaridades del RNA del virus  $\delta$  de la hepatitis humana, y en el RNA VS de *Neurospora*.

### 3.1. Ribozima de cabeza de martillo

Es una de las ribozimas estructuralmente más simples que se conoce, conteniendo en pocas de veinte nucleótidos la información necesaria y suficiente para actuar catalíticamente de forma específica. Estas estructuras se encuentran presentes en las cadenas de ambas polaridades de tres viroides ASBVd, PLMVd y CChMVd, (Hutchins *et al.*, 1986; Hernández y Flores, 1992; Navarro y Flores, 1997), de dos RNAs satélites de tipo viroidal, sLTSV y sRPV, (Forster y Symons, 1987; Miller *et al.*, 1991), de un RNA circular de cerezo (Di Serio *et al.*, 1997), y del RNA de un elemento retroviroidal de clavel (Daròs y Flores, 1995a), así como en las cadenas de polaridad positiva de siete RNAs satélites de tipo viroidal, sTRV, sArMV, sCYMoV, sSNMV, sSCMoV, sVTMoV y sRYMV (Bruening, 1989; Symons 1992 y 1997; Collins *et al.*, 1998) y en dos RNAs de origen animal, el transcrito del DNA satélite II del tritón (Epstein y Gall, 1987) y el transcrito del DNA satélite Sm $\alpha$  de *Schistosoma mansoni* (Ferbeyre *et al.*, 1998) (Fig. 9).

#### 3.1.1. Modelos de estructura secundaria

Los primeros datos *in vitro* de una actividad ribozimática en RNAs de tipo viroidal se obtuvieron con el sTobRV (Prody *et al.*, 1986) y el ASBVd (Hutchins *et al.*, 1986), cuando se observó el procesamiento específico de sus RNAs oligoméricos purificados en ausencia total de proteínas. Estudios posteriores demostraron el autocorte *in vitro* de otros RNAs lo que permitió proponer un modelo de estructura bidimensional para los mismos (Forster y Symons, 1987). Esta estructura se denominó de cabeza de martillo por la forma que adopta en el plano, estando constituida por tres hélices, I, II y III, que pueden estar cerradas por bucles terminales pequeños (que en tal caso se llaman 1, 2 y 3), dispuestas alrededor de una región central donde se sitúan un conjunto de nucleótidos de secuencia altamente conservada que forman el bolsillo catalítico de la ribozima (Fig. 9). Dicho bolsillo catalítico está formado por 15 bases que aparecen en la mayoría de las ribozimas de cabeza de martillo naturales conocidas.



**Fig. 9.** Estructuras de cabeza de martillo naturales conocidas (adaptado de Flores *et al.*, 2001). (A) Estructura consenso de la ribozima de cabeza de martillo representada de acuerdo con los datos de cristalografía de rayos-X (izquierda), y tal y como fue originalmente propuesta (derecha) con el sistema de numeración de Hertel *et al.* (1992). Las cajas negras destacan los nucleótidos conservados en la mayoría de las ribozimas naturales. Las flechas indican el punto de autocorte. Las interacciones canónicas y no canónicas se representan por líneas continuas y punteadas, respectivamente. En los apartados (B), (C) y (D) se indican las ribozimas de los RNAs satélite de nepovirus, sobemovirus y luteovirus, respectivamente. Las estructuras de cabeza de martillo correspondientes a los viroides (E), al pequeño RNA circular de cerezo, cscRNA1 (F), a los transcritos del satélite II del tritón y del satélite de *Schistosoma mansoni* (G) y al CarSV RNA (H), se muestran en la página siguiente

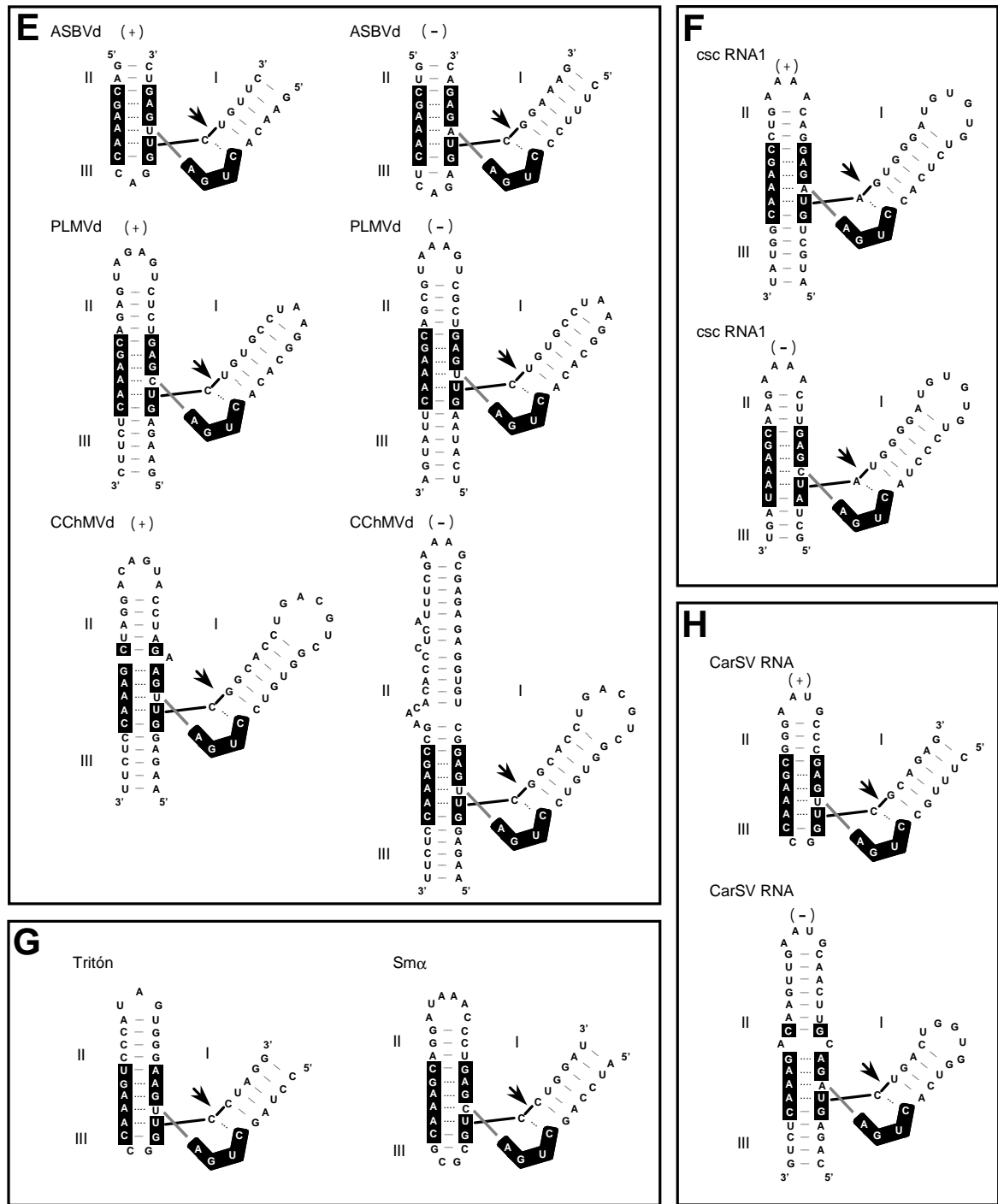


Fig. 9. (Continuación)

Existen sin embargo ciertas excepciones al consenso como son los casos de los RNAs de polaridad positiva del sCYDV-RPV (Miller *et al.*, 1991) y de polaridad negativa del csc RNA1 (Di Serio *et al.*, 1997), en los que el segundo par de bases de la hélice III (C<sub>15.2</sub>-G<sub>16.2</sub>) es sustituido por un par U-A. Otra excepción se encuentra en el caso de la ribozima del tritón, donde el par de bases G<sub>10.1</sub>-C<sub>11.1</sub> de la hélice II es un par A-U. Excepciones adicionales localizadas en esta misma región de la ribozima se han encontrado para la polaridad positiva del sCYDV-RPV y la negativa del CarSV RNA, donde existe la inserción de una C entre las posiciones A9 y G10.1 así como una A

entre las posiciones C11.1 y G12. Por último, otra excepción descrita para el centro catalítico consenso de la ribozima de cabeza de martillo consiste en la inserción de un nucleótido entre las posiciones A<sub>9</sub> y G<sub>10.1</sub> que puede ser una U (caso de las polaridades positivas del sArMV y del sLTSV) o una A (polaridad positiva del CChMVd), lo que indica una cierta flexibilidad en esta región de la ribozima.

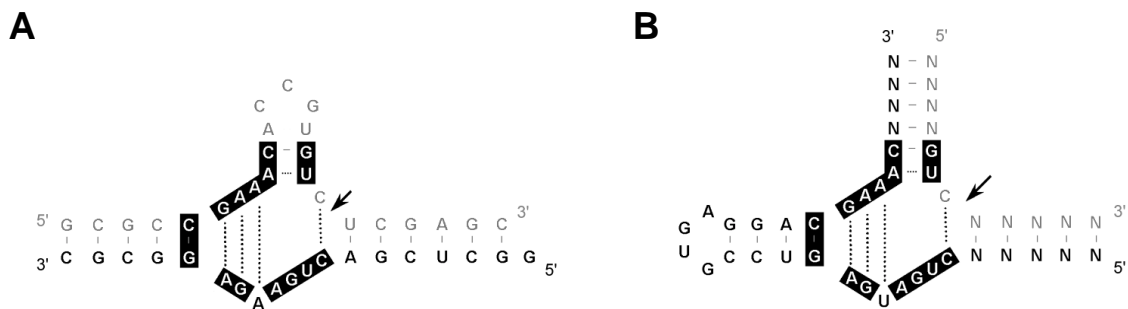
El nucleótido en posición 5' con respecto al punto de autocorte es comúnmente una C y ocasionalmente una A (como en los RNAs de polaridad positiva del sBYDV-RPV, de polaridad negativa del sLTSV, de polaridad negativa de una variante de secuencia del ASBVd, y de polaridad positiva y negativa del csc RNA1), pero nunca U o G (aunque experimentalmente, la existencia del primero es compatible con un corte ribozimático relativamente eficiente, ver más adelante). Una posible explicación es que se requiera un nucleótido desapareado en esta posición, ya que si existiera una U podría aparearse con la última A de la secuencia conservada GAAAC extendiendo así la hélice III, y si fuera una G lo haría a su vez con la C de la secuencia CUGA generando una hélice I más larga. El nucleótido situado entre las secuencias conservadas CUGA y GA experimentalmente puede ser cualquiera sin que esto afecte de forma notable a las propiedades catalíticas de la ribozima (ver más adelante); sin embargo, de forma natural nunca se ha encontrado una G, siendo lo más común una U o una C.

En la mayoría de las estructuras ribozimáticas las hélices son estables termodinámicamente aunque éste no es el caso de las cadenas de ambas polaridades del ASBVd y de las cadenas de polaridad positiva del CarSV RNA, del sRYMV y del transcrito del tritón (Fig. 9). En estos sistemas la hélice III consta de tan sólo dos o tres pares de bases y está cerrada por un bucle de dos o tres nucleótidos, y para ellos se ha propuesto que el autocorte ocurre eficazmente a través de la adopción de una estructura de doble cabeza de martillo mucho más estable que se puede formar en moléculas dimericas cuando las hélices III de dos ribozimas simples se combinan generando una hélice III más larga y estable (Forster *et al.*, 1988; Daròs y Flores, 1995a; Collins *et al.*, 1998). Para el caso de las ribozimas de polaridad positiva del CarSV RNA, del sRYMV y del transcrito del tritón se ha demostrado que la ribozima simple también es funcional aunque mucho menos eficiente que la de doble cabeza de martillo. Este sistema de doble cabeza de martillo también se ha comprobado que actúa *in vitro*, y muy probablemente *in vivo*, para el caso de la ribozima de polaridad positiva del sCYDV-RPV (Song *et al.*, 1999), que aunque no presenta una hélice III corta como en los casos anteriores, contiene una hélice II muy particular que interacciona con la hélice I a través de un pseudonudo (Miller *et al.*, 1991).

### 3.1.2. La ribozima de cabeza de martillo actuando en *trans*

El primer experimento *in vitro* que se realizó en *trans* con una ribozima de cabeza de martillo fue llevado a cabo por Uhlenbeck (1987) y en el mismo se demostró la acción catalítica de

una ribozima (R) de 19-nt sobre un sustrato (S) de 24-nt, ambos con secuencias derivadas de la cadena de polaridad negativa del ASBVd (Fig. 10A). Haseloff y Gerlach (1988) extendieron estos resultados al procesamiento específico *in vitro* de un mRNA utilizando una estructura ribozimática en *trans* con una secuencia derivada de la cadena de polaridad positiva del sTBRV. El formato de la ribozima diseñada por Haseloff y Gerlach (Fig. 10B) se constituyó en un modelo para el diseño de ribozimas actuando en *trans* en el que al sustrato sólo se le exige como condición presentar en su secuencia los residuos conservados del triplete que precede el sitio de autocorte (escogiéndose habitualmente el GUC al ser el más eficiente, aunque existe cierta flexibilidad), y mantener un apareamiento suficientemente estable con la hebras de la ribozima que es lo que le da la especificidad a esta última.



**Fig. 10.** Estructuras ribozimáticas de cabeza de martillo actuando en *trans*. En A se muestra el formato derivado de la cadena de polaridad negativa del ASBVd (formato I/II, Uhlenbeck, 1987) y en B el formato I/III propuesto por Haseloff y Gerlach (1988). Las cadenas de RNA que constituyen la ribozima aparecen con letras negras mientras que el sustrato se muestra con letras grises. Los nucleótidos conservados en la mayoría de las ribozimas naturales están encuadrados y las flechas indican los sitios de autocorte. Los pares de bases de tipo canónico y no canónico se indican mediante líneas continuas y discontinuas respectivamente

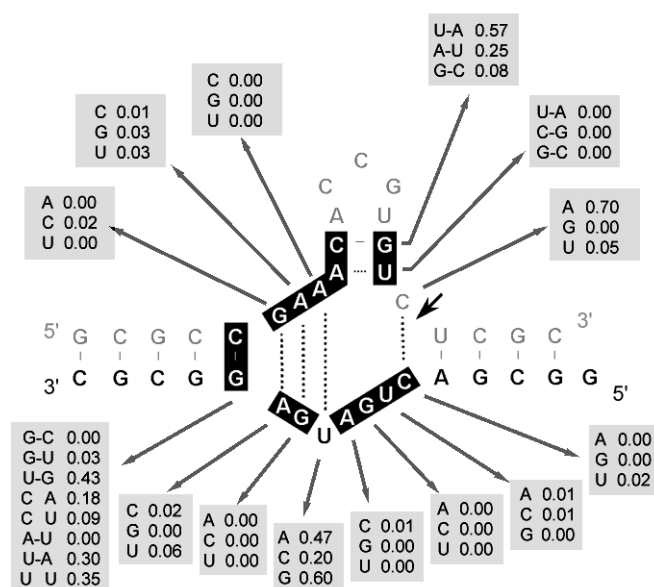
A partir de este conjunto de resultados, las ribozimas de cabeza de martillo despertaron un gran interés debido a su potencial aplicación biotecnológica *in vivo*. Multitud de estudios se han llevado a cabo para su utilización como agentes terapéuticos en el tratamiento de determinados cánceres y enfermedades infecciosas como las causadas por el virus del SIDA y el de la hepatitis C. (Barinaga, 1993; Sullenger y Cech, 1993; Ohkawa *et al.*, 1995; Bertrand y Rossi, 1996; Heindenreich y Eckstein, 1997; Birikh *et al.*, 1997).

### 3.1.3. Análisis mutacional para la determinación de motivos de estructura y secuencia mínimos

Los análisis utilizando inicialmente un sistema formado por una sola molécula (en *cis*) o, sobre todo, por dos (en *trans*), permitieron establecer la estructura invariable mínima de la ribozima de cabeza de martillo así como el grado de flexibilidad compatible con su actividad. Un primer análisis mutacional fue llevado a cabo con una ribozima de 58-nt derivada del RNA de polaridad positiva del sLTSV actuando en *cis* (Sheldon y Symons, 1989). Se analizaron 11 mutaciones afectando tanto a residuos del bucle central como de las regiones adyacentes. Los

resultados mostraron que mientras que muchas de las mutaciones puntuales ensayadas reducían la extensión final de autocorte pero sin eliminarla, había algunas que anulaban completamente la actividad de la ribozima.

Posteriormente, Ruffner *et al.*, (1990), analizaron detalladamente las cinéticas de corte en *trans* combinando 21 sustratos y 24 ribozimas conteniendo diversas mutaciones. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto aquellos nucleótidos que resultaban imprescindibles en el mecanismo ribozimático así como aquellos otros en los que existía una flexibilidad compatible con niveles importantes de corte. Con estos datos se comprobó que sólo son 11 los residuos conservados que forman parte del bucle central de la ribozima cuya modificación por cualquier otro nucleótido conlleva la reducción de la constante catalítica a valores inferiores al 1% de la correspondiente a la ribozima salvaje. El resto de posiciones analizadas permitía una cierta flexibilidad (como el caso de N7 o H17, ver Fig. 9A para numeración) aunque esto implicara un cierto descenso en el valor de la constante catalítica. Para el caso de las hélices II y III, las posiciones G10.1-C11.1 y C15.2-G16.2 permitían igualmente cierta flexibilidad aunque también a costa de un mayor o menor descenso del valor de dicha constante (Fig. 11)



**Fig. 11.** Mutagénesis de los nucleótidos implicados en el centro catalítico de un ribozima de cabeza de martillo formado por dos cadenas de RNA: la ribozima (nucleótidos en negro) y el sustrato (nucleótidos en gris). Cada uno de los residuos o pares de residuos señalados fue sustituido separadamente con las combinaciones indicadas en los cuadros grises, donde también se muestran los valores de las constantes catalíticas de la ribozima conteniendo la correspondiente mutación con respecto a la constante catalítica de la ribozima salvaje. Los nucleótidos conservados en la mayoría de las ribozimas naturales aparecen destacados sobre cuadros negros. El sitio de corte se indica con una flecha negra (adaptado con modificaciones de Ruffner *et al.*, 1990).

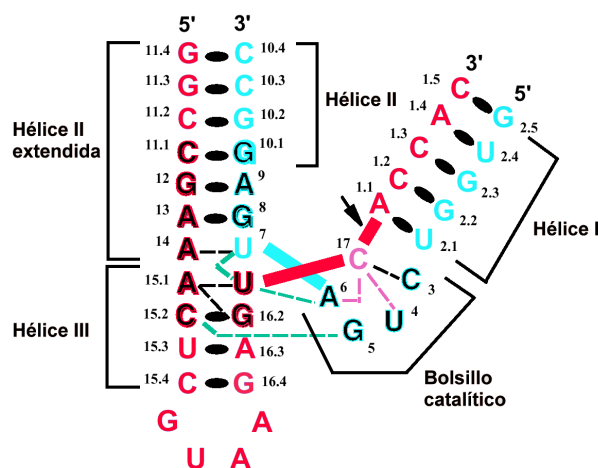
En lo referido al requerimiento estructural mínimo para la región que engloba la hélice II y el bucle 2, Tuschl y Eckstein (1993) comprobaron que eran necesarios al menos dos pares de bases y que debía de existir el par G10.1-C11.1. Este mismo dominio formado por la hélice II y el bucle 2 también fue estudiado por Long y Uhlenbeck (1994) que generaron una familia de ribozimas que únicamente contenían seis nucleótidos mutagenizados al azar en dicha región. Posteriormente seleccionaron aquellas ribozimas que eran activas *in vitro* comprobando que ribozimas con hélices II-bucles 2 cortos eran catalíticamente eficientes aunque el número y la secuencia de nucleótidos de esta región tenía efectos importantes en la actividad ribozimática. Por ejemplo, todas las ribozimas activas presentaban una pirimidina en la posición 11.1, lo que indicaba un requerimiento

de base en esta posición en acuerdo con lo observado en experimentos previos de mutagénesis dirigida (Forster y Symons, 1987; Ruffner *et al.*, 1990). Entre muchos de los trabajos posteriores dirigidos a estudiar esta región destacan los realizados con “minizimas”, que son ribozimas modificadas en las que el dominio hélice II-bucle 2 se ha sustituido por un adaptador de pequeño tamaño en el que no existen pares de base Watson-Crick. Así, se ha demostrado que minizimas que sólo contienen cuatro residuos de pirimidina (Hendry *et al.*, 1995) son activas aunque menos que las ribozimas completas, lo que ha llevado a concluir que el papel de la hélice II sería el de estabilizar la conformación activa de la ribozima. También se ha encontrado una flexibilidad relativa en esta región ribozimática a las inserciones de base, ya que experimentos de selección *in vitro* en los que la secuencia conservada GAA (situada entre las posiciones 11.1 y 15.1 de las hélices II y III) se sustituyó por NGAA mostraron que las ribozimas activas presentaban la secuencia HGAA (siendo H: A, C o U), lo que sugiere que el nucleótido extra fue acomodado como un residuo desapareado en la hélice II (Thomson *et al.*, 1996). Curiosamente, y a pesar de existir ribozimas naturales conteniendo inserciones entre las posiciones A9 y G10.1 no se ha realizado estudio alguno de la influencia de inserciones en dicha posición en la actividad ribozimática.

Otros datos experimentales sobre cuáles son los residuos cuya conservación es relevante en las ribozimas de cabeza de martillo, han sido aportados por estudios de mutagénesis y selección *in vitro* de los nucleótidos conservados del bucle central y regiones adyacentes de la estructura ribozimática. De esta forma se demostró que las ribozimas seleccionadas como más activas en la población final, contenían en sus estructuras las mismas secuencias que las consenso descritas a partir del análisis de las ribozimas naturales, lo que indica que éstas últimas han sido seleccionadas evolutivamente por su eficiencia catalítica (Ishizaka *et al.*, 1995; Tang y Breaker, 1997).

### 3.1.4. Estructura terciaria y modelos tridimensionales

Se han determinado mediante cristalografía de rayos X las estructuras de diversas ribozimas de cabeza de martillo (Pley *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1995, Murray *et al.*, 2000a) encontrándose que, a pesar de haberse utilizado distintas condiciones de cristalización e incluso distintos complejos moleculares (DNA-RNA en un caso o RNA únicamente en los otros), los resultados conducen a un plegamiento terciario y un modelo conformacional muy similar. Este parecido entre las estructuras refuerza su validez y sugiere que la conformación propuesta puede ser una aproximación cercana a la estructura que adoptan estas ribozimas en solución. De estos estudios se derivan unas interacciones específicas para cada uno de los 11 residuos conservados del bucle central que serían críticas para mantener la estructura propuesta y que explicarían su invariabilidad en todas las ribozimas de cabeza de martillo naturales.



**Fig 12.** Representación esquemática de la estructura tridimensional en forma de  $\gamma$ , mostrando la disposición espacial aproximada de las distintas bases, que adoptaría el complejo ribozimático. La ribozima está formado por 16 nt (azul) y el sustrato por 25 nt (rojo). Los nucleótidos altamente conservados aparecen en negro. La flecha indica el punto de corte. Los enlaces Watson-Crick y Hogsteen reversos están señalados con óvalos mientras que los puentes de hidrógeno que no son del tipo Watson-Crick se señalan con líneas punteadas negras. Los puentes de hidrógeno simples entre bases y ribosas del esqueleto se indican con líneas punteadas azules mientras que las interacciones entre el nucleótido C17 y el giro de la uridina del bolsillo catalítico se indican con líneas punteadas rosas (adaptado con modificaciones de Scott *et al.* 1996).

En el modelo tridimensional propuesto (Fig. 12) la ribozima adquiere un plegamiento en el que las hélices I y II constituyen los brazos superiores y la hélice III la base de una estructura en forma de  $\gamma$ . Las tres hélices son del tipo A pero mientras que entre la I y la II existe un pequeño ángulo, la II y la III se mantienen prácticamente colineales. El bucle central de la ribozima presenta dos dominios estructurales. El primero de ellos, constituido por los residuos C3 a A6, se denomina dominio 1 y el tipo de interacciones que lo estabilizan le permiten un giro definido del esqueleto azúcar-fosfato para poder conectar la hélice I con las otras dos hélices. El dominio 2 contiene los residuos U7 a A9 que junto con G12 a A14 forman una hélice de tres apareamientos no canónicos que alarga la hélice II y genera de este modo una hélice II extendida (Fig. 12).

La secuencia CUGA del dominio 1 recibe también el nombre de “giro de la uridina” (“U turn”) debido a que es un motivo idéntico en conformación al descrito previamente en el bucle del anticodón del tRNA<sup>Phe</sup> (Quigley y Rich, 1976). Se encuentra estabilizado por un conjunto interno de interacciones terciarias del tipo puente de hidrógeno que se mantienen en la estructura consenso propuesta para el giro de la uridina, UNR, donde N indica cualquier base y R una purina, siendo en este caso UNR la secuencia U4G5A6. Estas interacciones, junto con otra de tipo puente de hidrógeno que G5 establece con C15.2, permiten una conformación muy especial de este motivo y determinan que el esqueleto de grupos fosfato y residuos de ribosa gire y conecte (a través del enlace entre A6 y U7) la hélice I con la hélice II extendida así como con la hélice III. Por otra parte, los cuatro nucleótidos que constituyen este giro de uridina se disponen espacialmente rodeando el nucleótido C17 que precede el sitio de autocorte (también denominado sitio activo) formando así el bolsillo catalítico de la ribozima de cabeza de martillo. La conformación de dicho bolsillo se encuentra estabilizada por una interacción de tipo puente de hidrógeno entre C17 y C3 así como por la existencia de dos interacciones de tipo aromático entre C17 y los nucleótidos U4 y A6. Estas últimas interacciones adquieren relevancia no sólo porque pueden estabilizar el residuo presente en el sitio activo antes de la reacción de autocorte, sino porque también permiten cierta flexibilidad para estabilizar el ajuste conformacional que C17 puede sufrir en el estado de transición. En resumen, la conformación especial propuesta para el motivo CUGA, así como el



conjunto de interacciones en las que participan los nucleótidos que lo forman, explica por qué éstos se encuentran absolutamente conservados en el bolsillo catalítico de todas las ribozimas de cabeza de martillo naturales. No obstante, excepcionalmente se ha encontrado en poblaciones naturales de PLMVd una mutación afectando a este motivo (CUGA→ CCGA) que da lugar a un RNA viroidal capaz de replicarse en su huésped y cuya ribozima de cabeza de martillo presenta niveles aceptables de autocorte lo que indica una cierta flexibilidad en esta región (Ambrós *et al.*, 1998). El dominio 2 propuesto en la estructura tridimensional está formado por una hélice de tipo A con tres pares de base no canónicos, que extienden la hélice II existente y parecen formar una especie de cesta para coordinar el ión metálico que se requiere en la reacción. Los tres apareamientos que se establecen entre las bases del dominio 2 consisten en dos pares GA Hoogsteen-inversos (G12-A9 y A13-G8) y un par AU (A14-U7). Esta hélice II extendida conecta con la hélice III, generando una única hélice que fuerza al residuo C17 hacia afuera y lo sitúa cerca del bolsillo catalítico de la ribozima. Sin embargo, existe cierta discordancia entre éstos y otros datos cristalográficos con los obtenidos a partir de estudios cinéticos y bioquímicos (McKay, 1996). De estos últimos se ha establecido que el mecanismo de la reacción de autocorte consiste en un ataque nucleofílico del oxígeno del grupo 2'-OH de la ribosa del residuo que precede al sitio activo, al fósforo del enlace 3'-5'-fosfodiéster adyacente dando como productos de la reacción un fosfato 2'-3'-cíclico y un grupo 5'-OH (Hutchins *et al.*, 1986; Uhlenbeck, 1987). Asimismo, diferentes estudios llevados a cabo *in vitro* con estas ribozimas muestran la necesidad de uno o más cationes divalentes en el medio ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y en menor medida  $Sr^{2+}$  y  $Ba^{2+}$ ), que actúan como cofactores de la reacción (Dahm y Uhlenbeck, 1991). También se ha sugerido, basándose en la dependencia de la actividad catalítica con el pH, que un hidróxido del metal divalente es el que actuaría como aceptor del protón del grupo 2'-OH en la reacción de autocorte (Dahm *et al.*, 1993), así como también la posibilidad de que sean dos iones no hidroxilados y no uno los que actuarían en el mecanismo de reacción (Pontius *et al.*, 1997). Todos estos datos cinéticos indican la necesidad de que los grupos funcionales implicados en el mecanismo de reacción se encuentren espacialmente próximos en la conformación activa de la ribozima en la que, además, deben existir uno o más sitios de unión para el ión divalente. A pesar de que en las estructuras cristalográficas estudiadas se han propuesto varios sitios de unión para un catión divalente, ninguno de ellos se encuentra en el bolsillo catalítico. Pero la mayor discordancia entre ambos tipos de datos deriva del hecho de que el grupo 2'-OH implicado en la interacción inicial no se encuentra, en ninguna de las dos estructuras cristalizadas, en una conformación que permita el ataque directo al enlace fosfodiéster adyacente. En la conformación tridimensional propuesta estos grupos se encuentran espacialmente separados, lo que indica que la ribozima debería sufrir un cambio conformacional para adquirir el plegamiento catalíticamente activo. Basándose en experimentos bioquímicos, Wang *et al.* (1999) han propuesto que la estructura de la ribozima de cabeza de martillo catalíticamente activa presentaría la coordinación de un mismo ion  $Mg^{2+}$  a los grupos fosfato del sitio de corte y de la posición A9, posiciones que se encuentran a más de 20 Å en la estructura tridimensional obtenida por difracción

de rayos X. A pesar de que los datos aportados apoyan claramente esta hipótesis, este modelo estructural se contradice con otras evidencias bioquímicas y estéricas (Murray y Scott, 2000). Además, cada vez parece más plausible la posibilidad de que los iones divalentes no tengan una participación directa en el mecanismo de reacción de estas ribozimas, sino que su función estaría limitada al aporte de las cargas positivas necesarias para el correcto plegamiento del RNA, función que ha podido ser sustituida por altas concentraciones de iones monovalentes como  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  o  $\text{NH}_4^+$  (Murray *et al.*, 1998b; O'Rear *et al.*, 2001; Curtis y Bartel, 2001). Está por tanto aún por resolver una vía capaz de integrar todos los grupos de datos en el mecanismo de la reacción, bien sea resolviendo nuevas estructuras que representen la conformación activa o intermediarios de la reacción, como por ejemplo el propuesto por Murray *et al.*, (1998a), o analizando ribozimas con modificaciones que alteren su actividad catalítica o su conformación global.

## 3.2. Otras ribozimas naturales

### 3.2.1. Ribozima de horquilla

Este tipo de estructura ribozimática sólo se ha descrito en las cadenas de polaridad negativa de tres RNAs satélites de nepovirus: el sTRSV, el sARMV y el sCYMV, para las que se ha demostrado su actividad catalítica *in vitro* (Bruening, 1989; Etscheid *et al.*, 1995; Deyoung *et al.*, 1995; Hisamatsu *et al.*, 1997). En contra de lo que ocurre con la ribozima de cabeza de martillo, ésta parece catalizar con alta eficiencia una reacción de autocorte reversible, actuando tanto como RNasa como RNA ligasa (Buzayan *et al.*, 1986b). El dominio catalítico mínimo de la ribozima de horquilla consta de unos 50 nucleótidos que adoptan una estructura secundaria muy peculiar denominada “horquilla” (de “hairpin” o también “paperclip”) (Fig. 13B) que consiste en cuatro hélices separadas por dos bucles internos en los que se ha determinado la existencia de un conjunto de elementos estructurales y residuos esenciales para el autocorte (Feldstein *et al.*, 1989; Hampel *et al.*, 1990; Berzal-Herranz *et al.*, 1993; Butcher y Burke, 1994; Burke *et al.*, 1995; Tinoco *et al.*, 1995). Experimentos de selección *in vitro*, de diseño de ribozimas en *trans*, así como de entrecruzamiento con luz UV y cristalografía de rayos X, han permitido dilucidar un modelo de estructura tridimensional que incluye tres dominios, habiéndose propuesto un conjunto de interacciones de larga distancia entre los residuos que los componen (Butcher y Burke, 1995; Butcher *et al.*, 1995; Shippy *et al.*, 1998; Siwkowski *et al.*, 1997 y 1998; Earnshaw *et al.*, 1997; Rupert y Ferré-D'Amaré, 2001)

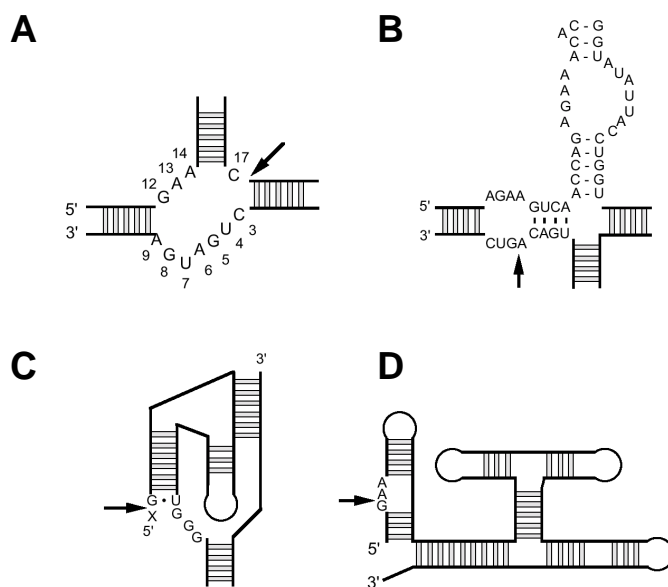
### 3.2.2. Dominios ribozimáticos del HDV RNA

Los dominios de autocorte de ambas polaridades del HDV RNA forman unas estructuras ribozimáticas únicas que son funcionales *in vitro* y muy probablemente *in vivo* (Kuo *et al.*, 1988). Los estudios de mutagénesis y delección terminal han permitido conocer la secuencia mínima

requerida para el autocorte, siendo ésta de un residuo en el lado 5' y de menos de 71 en el lado 3' del sitio de corte, respectivamente (Perrota y Been, 1991; Thill *et al.*, 1991). El modelo de estructura secundaria más consistente con los datos disponibles incluye la formación en las ribozimas de ambas polaridades de cuatro hélices (Rosenstein y Been, 1991) que se pliegan adoptando una conformación en la que existe una interacción de tipo pseudonudo (Perrota y Been, 1991) (Fig. 13C). Este modelo ha servido de base para proponer una estructura tridimensional detallada (Tanner *et al.*, 1994). Estudios con sistemas en *trans* han permitido segmentar la ribozima HDV en varios subdominios que se asocian para catalizar el corte específico (Lai *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 1997). Mediante la cristalización de esta ribozima se ha comprobado que la arquitectura de la misma esta basada en una compleja estructura basada en dos pseudonudos creando una hendidura donde tiene lugar la reacción de transesterificación (Ferré-D'Amaré *et al.*, 1998).

### 3.2.3. Ribozima del VS RNA de *Neurospora*

El transcrito del plásmido VS mitocondrial de algunas cepas naturales de *Neurospora* se autocorta *in vitro* a través de una estructura ribozimática diferente a las anteriores (Saville y Collins, 1990 y 1991). La ribozima mínima requiere tan sólo un nucleótido en la región 5' del punto de autocorte así como la presencia de una hélice rica en pares G:C en la región en 3' del mismo (Guo *et al.*, 1993). El modelo de estructura secundaria propuesto para la ribozima del VS RNA consta de seis hélices (Beattie *et al.*, 1995) (Fig. 13D) e implica múltiples interacciones así como un elemento de tipo pseudonudo (Rastogi *et al.*, 1996). También se ha descrito un nuevo elemento estructural en la ribozima de este RNA cuya formación puede atenuar su autocorte *in vitro* y también podría ser un elemento regulador importante *in vivo* (Beattie y Collins, 1997). Todos estos datos sugieren que la complejidad estructural de la ribozima del VS RNA es superior a la del resto de ribozimas.



**Fig. 13.** Comparación esquemática de los cuatro ribozimas descritos en los RNAs de tipo viroidal. (A) Cabeza de martillo, (B) horquilla, (C) HDV RNA y (D) VS RNA. Las flechas indican el sitio específico de corte ribozimático



## OBJETIVOS



## **Objetivos**

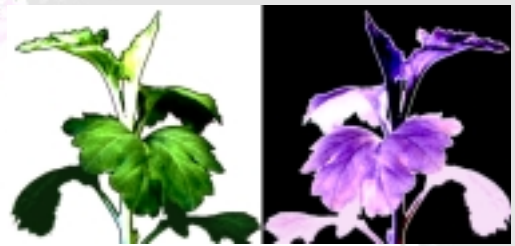
En la presente tesis se han realizado un conjunto de trabajos encaminados a profundizar en el estudio de algunos aspectos estructurales y funcionales del CChMVd, especie perteneciente a la familia de viroides con ribozimas de cabeza de martillo. Concretamente, los objetivos planteados han sido:

- i) Obtener y caracterizar molecularmente clones de cDNA procedentes de una cepa asintomática del CChMVd así como cartografiar el posible determinante de patogenicidad del mismo.
- ii) Profundizar en el estudio del determinante de patogenicidad del CChMVd mediante experimentos de mutagénesis dirigida, seguidos de bioensayos y caracterización de las poblaciones viroidales resultantes.
- iii) Analizar el papel que desempeña, tanto en el proceso infeccioso del viroide como en la catálisis ribozimática, una A extra localizada en la secuencia consenso de la ribozima de cabeza de martillo de polaridad positiva del CChMVd.





# CAPÍTULO I





## Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: A tetraloop within the *in vivo* branched RNA conformation<sup>1</sup>

MARCOS DE LA PEÑA, BEATRIZ NAVARRO AND RICARDO FLORES

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC). Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera 14, 46022 Valencia, Spain.*

### ABSTRACT

**Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd) is an RNA of 398-399 nt that can adopt hammerhead structures in both polarity strands. We have identified by Northern-blot hybridization a non symptomatic strain (CChMVd-NS) that protects against challenge inoculation with the severe strain (CChMVd-S). Analysis of CChMVd-NS cDNA clones has revealed a size and sequence very similar to those of the CChMVd-S strain. Some of the mutations observed in CChMVd-NS molecular variants were previously identified in CChMVd-S RNA, but others were never found in this RNA. When bioassayed in chrysanthemum, cDNA clones containing the CChMVd-NS specific mutations were infectious, but non symptomatic. Site-directed mutagenesis showed that one of the CChMVd-NS specific mutations, a UUUC to GAAA substitution, was sufficient to change the symptomatic phenotype into the non symptomatic one without altering the final accumulation level of the viroid RNA. The pathogenicity determinant, the first of this class identified in a hammerhead viroid, is located in a tetraloop of the computer-predicted branched conformation for CChMVd RNA. Analysis of the sequence heterogeneity found in CChMVd-S and NS variants strongly supports the existence of such a conformation *in vivo*, showing that the rod-like or quasi-rod-like secondary structure is not a universal paradigm for viroids.**

<sup>1</sup> Published in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9960-9965 (1999)

## INTRODUCTION

Viroids, the smallest pathogenic RNAs endowed with autonomous replication, can induce a series of diseases in their host plants (1). Their minimal genomic size (between 247 and 399 nucleotides) (2), lack of messenger RNA activity implying direct RNA-cell component interactions in viroid replication and pathogenesis (1), and the presence in some members of the group of ribozymatic domains (3, 4), make them unique and very attractive systems for the study of RNA structure-function relationships.

The causal agent of chrysanthemum chlorotic mottle (CChM) disease has recently been identified and characterized as a new viroid of 398-399 nt (CChMVd), the largest one described so far excluding those with sequence duplications (5). CChMVd RNA does not contain the central conserved region characteristic of the viroid genera that form the *Pospiviroidae* family (2). However, plus and minus CChMVd strands do contain the conserved sequences and structural elements characteristic of the hammerhead structures and self-cleave *in vitro*, and at least the plus strand also *in vivo*, as predicted by these ribozymatic domains. Hammerhead structures have also been found in two other viroids, avocado sunblotch viroid (ASBVd) (6) and peach latent mosaic viroid (PLMVd) (7), that with CChMVd form the second viroid family, *Avsunviroidae* (2). ASBVd replicates through a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing (8, 9), as probably do PLMVd and CChMVd. The branched secondary structure of lowest free energy proposed for CChMVd differs remarkably from the rod-like or quasi-rod like models proposed for most other viroids (10, 11), with the exception of PLMVd, whose most stable folding is also branched (7).

The existence of an infectious but non symptomatic strain of the CChM disease agent was previously postulated to explain why some plants of a chrysanthemum cultivar sensitive to the disease were unable to develop the characteristic symptoms when inoculated with extracts from symptomatic leaves (12). This observation was assumed to result from a cross-protection phenomenon: plants infected with a latent or non symptomatic strain would be protected against the challenge inoculation by a severe strain of the same or very similar agent. In fact, using cross-protection assays, the existence of a transmissible agent that protected against CChM disease was shown (12), but direct physical evidence in support of this contention has remained elusive for more than 20 years. We reasoned that the identification and characterization of this putative RNA could provide some insight into the molecular determinants of pathogenicity of a member of the *Avsunviroidae* family, in which structure-function relationships are poorly understood.

We report here on the sequence of an RNA with the predicted properties which we shall term CChMVd-NS (hereafter the suffixes NS and S will refer to the non symptomatic and symptomatic CChMVd RNAs respectively). From sequence analyses between CChMVd-S and -NS variants, bioassays with individual CChMVd-NS cDNA clones, and site-directed mutagenesis, we have

identified a tetraloop in the most stable branched conformation as the determinant of the different pathogenic effects induced by CChMVd-S and -NS strains. Moreover, the sequence heterogeneity observed in variants from both strains strongly supports a branched conformation for CCMVd RNA *in vivo*.

## MATERIALS AND METHODS

***CChMVd Strains and Extraction of Viroid RNA.*** The CChMVd-S strain was that initially described (13) and sequenced recently (5), and the CChMVd-NS strain was obtained from a chrysanthemum clone of the cultivar "Yellow Delaware". Preparations enriched in viroid RNA were generated by extraction of leaves with buffer-saturated phenol, fractionation with 2 M LiCl (recovering the insoluble RNAs) and removal of polysaccharides with methoxyethanol (5). They were used for bioassay and for RNA analysis by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Northern-blot hybridization (5). For dot-blot hybridization, RNAs from chrysanthemum leaves (2 g) were extracted with buffer-saturated phenol and fractionated on non ionic cellulose (CF11, Whatman), that was washed with STE (50 mM Tris-HCl/100 mM NaCl/1mM EDTA, pH 7.2) containing 35% ethanol and then with STE (14).

***Cross-Protection and Infectivity Bioassays.*** Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelez, cv. "Bonnie Jean"), was propagated in growth chambers (5). For cross-protection bioassays, plants were mechanically inoculated with an RNA preparation from the CChMVd-NS strain; one month later part were challenge-inoculated with an RNA preparation from the CChMVd-S strain, and the rest with a similar preparation from healthy plants. For bioassay of CChMVd-NS variants, recombinant plasmids with head-to-tail dimeric cDNA inserts were mechanically inoculated (2 µg of plasmid per plant).

***RNA Analysis.*** Nucleic acids from CChMVd-infected plants, enriched in RNAs of 300-400 nt, were obtained by cutting a section from a non denaturing 5% polyacrylamide gels delimited by appropriate markers. These RNAs, and parallel preparations from healthy plants, were examined in 5% polyacrylamide gels containing 8 M urea and 1 X TBE (89 mM Tris/89 mM boric acid/2.5 mM EDTA, pH 8.3). Following ethidium bromide staining, RNAs were electroblotted to nylon membranes (Hybond N+, Amersham) and UV-fixed with a Stratalinker (Stratagene). For dot-blot hybridization, 5 µl of the extracts and 1/10 dilutions were applied onto membranes that were UV-irradiated. Pre-hybridization, hybridization (at 70°C in 50% formamide) and washing were as reported (15). The probe, a radioactive full-length RNA complementary to the CChMVd-S variant CM 20, was transcribed with T7 RNA polymerase from a linearized recombinant pBluescript II KS+ plasmid (Stratagene). Membranes were scanned with a bioimage analyzer (Fuji BAS1500).

**RT-PCR Amplification, Cloning and Sequencing.** Viroid circular forms of the CChMVd-NS strain, purified by two consecutive PAGE steps (16), were reverse transcribed and PCR-amplified with two pairs of adjacent primers derived from the CM 20 sequence of CChMVd-S strain (5). Primer PI complementary to nt 294-269 was used with primer PII homologous to nt 295-320, and primer PIII complementary to nt 133-108 was used with primer PIV homologous to nt 134-159 (Fig. 3). Reverse transcription, PCR amplification (with *Pfu* DNA polymerase) and cloning, were as before (5). Inserts were sequenced automatically with an ABI PRISM DNA sequencer (Perkin Elmer).

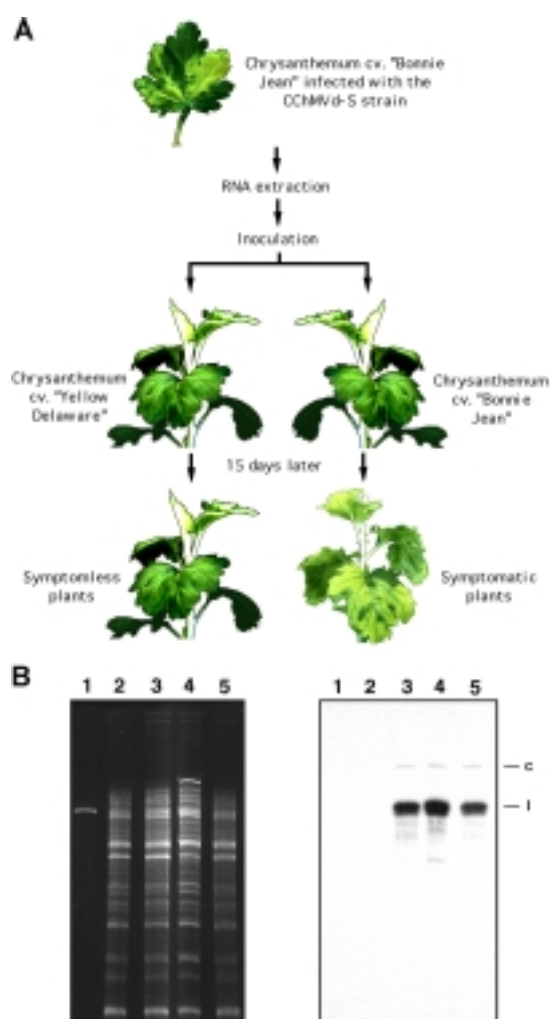
**RNA Self-Cleavage During in Vitro Transcription.** The *EcoRI-BamHI* fragments from recombinant pUC18 plasmids with full-length CChMVd-NS cDNA inserts, were subcloned in pBluescript II KS+ and radioactive transcripts of both polarities were obtained with T3 and T7 RNA polymerases (17). Primary transcripts and their self-cleavage products, were separated by PAGE in 5% gels containing 8 M urea and 40% formamide that were quantitatively scanned with a bioimage analyzer.

**Site-Directed Mutagenesis.** A PCR-based protocol (18) was followed with minor modifications. 5 ng of plasmid pCM20 (5) were amplified with 250 ng each of the phosphorylated primers PV (5'-TCGCTTTACTCCCGCACAAGCCGAAAC-3') complementary to nt 57-83 and PVI (5'-AAGCTCTCTCCACAGCCTCATCAGGAAAC-3') homologous to nt 84-112 of the CM 20 sequence (Fig. 3), except in the residues in bold introduced to change UUUC82-85 into GAAA. Plasmid pCM20 was also amplified with the phosphorylated primers PVII (5'-GGGTTTCCTGACGAGGCTGTGGAGAG-3') complementary to nt 11-35 and PVIII (5'-ACTTCAGGTCTCGACTGGAAGGTC-3') homologous to nt 36-59 of the CM 20 sequence (Fig. 3), except in the residue of PVII in bold introduced to change A103 into a G. The PCR cycling profile, designed to amplify the complete plasmid with *Pfu* DNA polymerase, consisted of a hot start of 95°C for 2 min, four cycles of 95°C for 40 s, 50°C for 30 s and 72°C for 4 min, and 25 cycles of 95°C for 40 s, 65°C for 30 s and 72°C for 4 min, with a final extension at 72°C for 10 min. After electrophoresis in agarose gels PCR products of plasmid length were eluted, circularized with T4 DNA ligase and used for transformation. Sequencing confirmed that the new plasmids contained only the expected mutations.

**Computer Analysis.** CChMVd sequences were aligned by the PILEUP program (Genetics Computer Group, Madison, WI, 9.1). RNA secondary structures of lowest free energy at 37°C were determined by the the circular version of the MFOLD program from the same package.

## RESULTS

**Detection of a Non Symptomatic Strain of CChMVd.** To study the symptoms induced by the severe CChMVd-S strain in a chrysanthemum cultivar different to “Bonnie Jean”, which was used in the initial characterization of this viroid (5), apparently healthy plants of the cultivar “Yellow Delaware” were inoculated with extracts of “Bonnie Jean” leaves expressing the CChMVd-S symptoms. 30 days after inoculation, the “Yellow Delaware” plants remained symptomless, in contrast to “Bonnie Jean” controls inoculated with the same extract that showed the typical chlorosis 10-15 days post-inoculation (Fig. 1A). Since cultivar “Yellow Delaware” is sensitive to the CChM disease (19), we suspected that the lack of symptoms might result from a previous



**Fig. 1.** Identification of a non symptomatic CChMVd RNA. **(A)** Differential response of two chrysanthemum cultivars after inoculation with a nucleic acid preparation of the severe CChMVd-S strain. **(B)** Analysis of chrysanthemum RNAs by denaturing PAGE and ethidium bromide staining (left) or Northern-blot hybridization with a probe complementary to CChMVd-S RNA (right). Lane 1, DNA marker of 392 nt. Lanes 2 and 3, RNAs from healthy and symptomatic “Bonnie Jean” plants, respectively. Lanes 4 and 5, RNAs from symptomless “Yellow Delaware” plants non inoculated and inoculated with a CChMVd-S RNA preparation, respectively. The migration of the circular (c) and linear (l) viroid forms is indicated at the right.

infection with a CChMVd non symptomatic strain (CChMVd-NS), whose existence had been postulated before CChMVd was recognized as a viroid, on the basis of similar experiments (12).

To test this hypothesis, RNAs within a size window of 300-400 nt from “Yellow Delaware” and “Bonnie Jean” plants non inoculated and inoculated with the CChMVd-S strain, were analyzed by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with a probe complementary to CChMVd-S RNA. Hybridization signals in the same position and with similar intensity as those produced in

"Bonnie Jean" by CChMVd-S RNA, were observed in the inoculated and non inoculated "Yellow Delaware" plants, whereas no signal was detected in the non inoculated "Bonnie Jean" plants (Fig. 1B). These results showed that the "Yellow Delaware" chrysanthemums used in our experiments were infected with a CChMVd-NS strain, very similar in sequence to CChMVd-S, that presumably prevented the appearance of the symptoms incited by the latter.

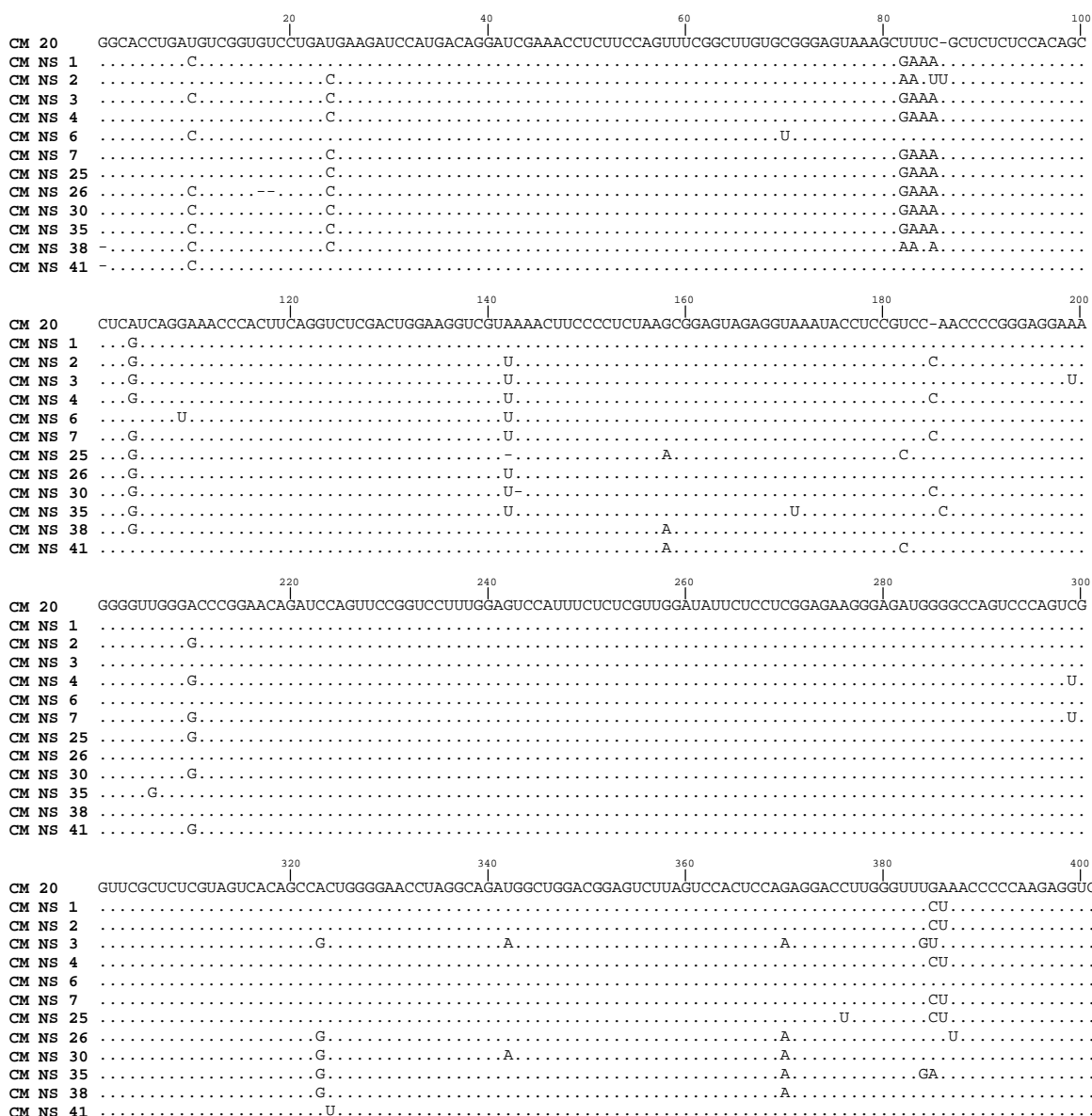
**Cross-Protection Bioassays.** To corroborate that the newly identified CChMVd-NS strain was infectious and non pathogenic, "Bonnie Jean" plants were inoculated with extracts from CChMVd-NS-infected "Yellow Delaware" chrysanthemums. The "Bonnie Jean" plants remained symptomless, although Northern-blot analysis with a probe specific for CChMVd-S RNA revealed a signal in the position of the viroid RNA (data not shown) indicating, therefore, that they were infected by the CChMVd-NS strain. When cuttings of these plants, as well as parallel control plants of the same cultivar not exposed to CChMVd-NS, were inoculated with CChMVd-S RNA, symptoms of the CChM disease appeared only in the control plants. This confirmed the ability of CChMVd-NS RNA to replicate in "Bonnie Jean" and to induce a cross-protection effect against the CChMVd-S strain.

**Molecular Characterization of CChMVd-NS RNA.** Sequence alignment of 12 randomly chosen CChMVd-NS cDNA clones with the CM 20 cDNA clone of the CChMVd-S strain (5), revealed that variants from CChMVd-NS and -S strains were very similar in size and sequence (Fig. 2). Part of the CChMVd-NS polymorphism was previously observed in CChMVd-S variants (5, data not shown) but other changes were never found before in CChMVd-S variants. Among the latter, those affecting positions 24 (U to C), 82 to 85 (UUUC to GAAA) and 104 (A to G) in the alignment, were the most frequent, appearing in 73%, 64% and 82% of the sequences, respectively (Fig. 2).

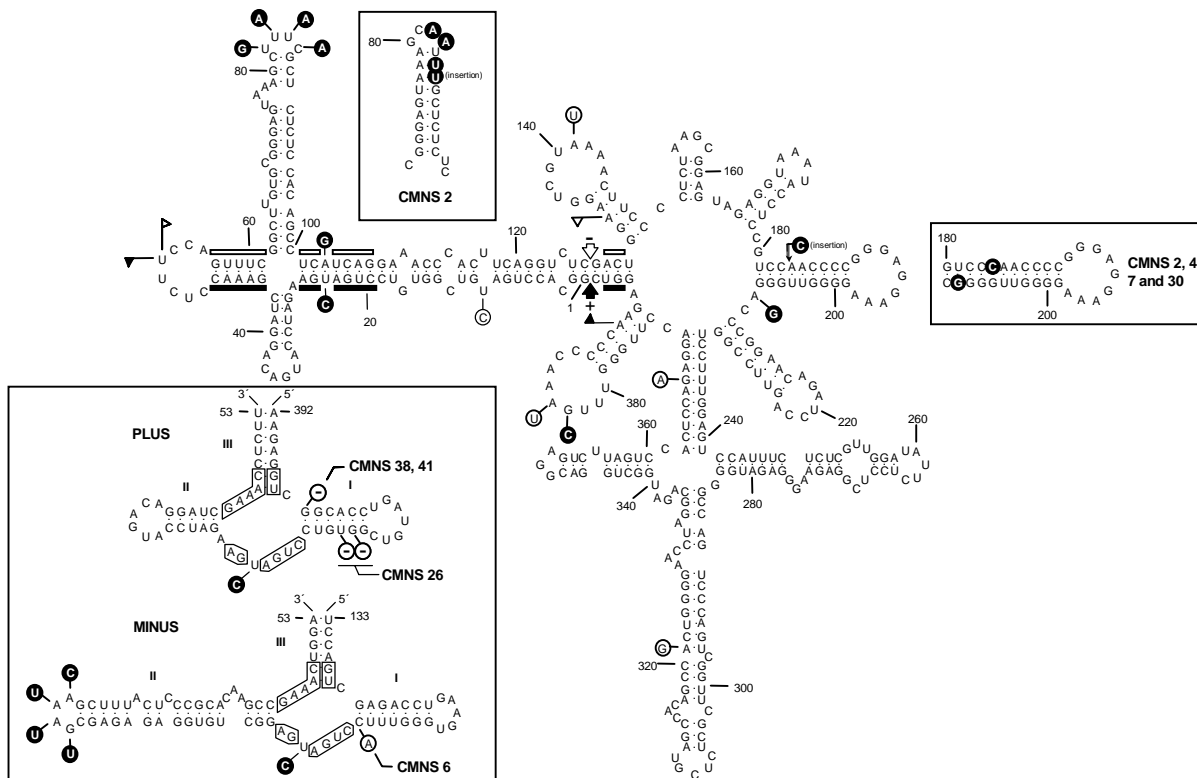
The most stable secondary structure of the CM 20 RNA (5), was unaffected by most of the mutations found in CChMVd-NS variants (Fig. 3). In CMNS 2 variant, a slightly different hairpin was formed in the region delimited by positions 70 to 93 in the reference sequence (Fig. 3, upper inset). A similar situation was observed in variants CMNS 2, 4, 7 and 30 in which a rearranged hairpin was formed in the region between positions 180 to 209 in the reference sequence (Fig. 3, right inset). The substitution G to U in position 109 (CMNS 6) and deletions in positions 1 (CMNS 38 and 41) and 15 and 16 (CMNS 26) in the alignment, are probably artefactual (see below).



**Hammerhead Ribozymes and *in Vitro* Self-Cleavage of CChMVd-NS RNAs.** The three most frequent changes found in CChMVd-NS variants (positions 24, 82-85 and 104 in the alignment), are located in the hammerhead structures but their stability remain unaltered. Interestingly, those affecting residues 24 and 104 map at position 7 according to the standard numbering for hammerhead structures (20), placed between the conserved CUGA and GA of the plus and minus hammerhead structures, respectively (Fig. 3, lower inset). Similar U to C transitions in this position 7 have been observed between variants of PLMVd (7, 21). The third mutation affecting positions 82-85 is located in loop 2 (7) of the minus hammerhead structure (Fig.



**Fig. 2.** Sequence alignment of twelve molecular variants from “Bonnie Jean” plants inoculated with the CChMVd-NS strain. For comparative purposes the sequence of the symptomatic CM 20 variant is shown on the top. Dots indicate residues identical to the CM 20 sequence and dashes denote gaps. Variants CMNS 1, 6, 25, 26, 30, 35, 38 and 41 were synthesized with primers PI and PII, and the rest with PIII and PIV.



**Fig. 3.** Secondary structure of lowest free energy of the symptomatic CM 20 variant. Numbering does not coincide exactly with that of the alignment due to the introduced gaps. The structure of the region between positions 70 and 93 is slightly different from that reported previously (5), because an updated version of the MFOLD program has been used. The most frequent mutations detected in CChMVd-NS variants are shown; those on a black background have never been found in CChMVd-S variants, whereas those on a white background were previously found in CChMVd-S variants. Sequences forming plus and minus hammerhead structures are indicated by flags, nucleotides conserved in most natural hammerhead structures by bars, and self-cleavage sites by arrows. Solid and open symbols refer to plus and minus polarities, respectively. (Upper inset) Most stable secondary structure of the hairpin delimited by positions 70 to 94 in variant CMNS 2. (Right inset) Most stable secondary structure of the hairpin delimited by positions 180 to 210 in variants CMNS 2, 4, 7 and 30. (Lower inset) Hammerhead structures of plus and minus strands of the CM 20 variant. The most frequent mutations found in CChMVd-NS variants are on a black background and do not alter the stability of the hammerhead structures. Less frequent mutations of other CChMVd-NS variants, which affect the stability of their hammerhead structures, are on a white background with deletions indicated by the symbol -. Nucleotides conserved in most natural hammerhead structures are boxed and self-cleavage sites are shown by arrows. The same numbering is used in both polarities and does not coincide exactly with numbering of the alignment because of the introduced gaps.

3, lower inset). The extent of self-cleavage during *in vitro* transcription of the RNAs with all or part of these mutations (CMNS 1, 25, 30 and 35; CMNS 2 has a different mutation in positions 82-85) was comparable to that of the CM 20 RNA (Fig. 4), as anticipated from the stability of their hammerhead structures. On the other hand, changes in variants CMNS 6, 26, 38 and 41, decreased the stability of their hammerhead structures by disrupting the first base pair of helix I of the plus (CMNS 38 and 41) and minus (CMNS 6) ribozymes, or by shortening the length of helix I of the plus hammerhead structure (CMNS 26) (Fig. 3, lower inset). Accordingly, the self-cleavage of these RNAs was considerably reduced (Fig. 4).

| Variant | Hybridization signal | Infected plants | Self-cleavage |    |
|---------|----------------------|-----------------|---------------|----|
|         |                      |                 | +             | -  |
| CMNS 1  |                      | 4/4             | 59            | 48 |
| CMNS 2  |                      | 4/4             | 53            | 44 |
| CMNS 6  |                      | 0/4             | 54            | 14 |
| CMNS 25 |                      | 3/4             | 57            | 52 |
| CMNS 26 |                      | 0/4             | 0             | 50 |
| CMNS 30 |                      | 4/4             | 32            | 39 |
| CMNS 35 |                      | 4/4             | 38            | 41 |
| CMNS 38 |                      | 0/4             | 7             | 64 |
| CMNS 41 |                      | 0/4             | 18            | 58 |
| CM 20-1 |                      | 4/4             | 57            | 46 |
| CM 20   |                      | 4/4             | 52            | 53 |

**Fig. 4.** Infectivity of some representative CChMVd-NS variants and self-cleavage of their monomeric plus (+) and minus (-) RNAs. Dot-blot hybridization signals correspond to undiluted extracts and 1/10 dilutions (left and right spot columns, respectively). The extension of self-cleavage is expressed as the fraction (%) of the primary transcript that self-cleaved during *in vitro* transcription. The non symptomatic CM 20-1 variant was obtained from the symptomatic CM 20 variant by introducing the change UUUC82-85 to GAAA.

**Biological Properties of CChMVd-NS Variants.** The presence of specific changes in most CChMVd-NS sequences, suggested that they might determine the symptomless phenotype induced by the CChMVd-NS strain. To establish a cause-effect relationship, plasmids containing dimeric head-to-tail cDNA inserts of CChMVd-NS variants CMNS 1, 2, 6, 25, 26, 30, 35, 38 and 41, were inoculated into "Bonnie Jean" plants. Previous experiments had shown that plasmids with CChMVd-S cDNA dimeric inserts are infectious (5). Variants CMNS 4 and 7 on the one hand, and CMNS 3 on the other, were not bioassayed due to their close similarity to CMNS 25 and CMNS 35, respectively (Fig. 2). Although all the inoculated plants remained symptomless, in contrast with those inoculated with the CM 20 variant of the CChMVd-S strain that displayed the typical symptoms, dot-blot analysis showed that variants CMNS 1, 2, 25, 30 and 35 were highly infectious (Fig. 4). The lack of infectivity of CChMVd-NS variants CMNS 6, 26, 38 and 41, was consistent with the reduced self-cleavage of their hammerhead structures (Fig. 4).

**Identification of a Pathogenicity Determinant in CChMVd.** As inferred from bioassays, only changes affecting positions 82-85 and 104 in the alignment were common to the infectious CChMVd-NS cDNA clones. The third most frequent substitution in CChMVd-NS variants, U24 to C, was discarded as a determinant of pathogenicity because CMNS 1 (infectious but non symptomatic) has a U at this position, as have symptomatic variants of the CChMVd-S strain. To provide more precise and direct evidence of the role of substitutions UUUC82-85 to GAAA and A104 to G in pathogenicity, they were independently introduced by site-directed mutagenesis into a plasmid with the CM 20 insert of the CChMVd-S strain to generate plasmids pCM20-1 and pCM20-2, respectively. Plasmids with the corresponding dimeric head-to-tail inserts, pCM20-1d

and pCM20-2d, respectively, were bioassayed in "Bonnie Jean" chrysanthemum. All plants inoculated with pCM20-2d developed symptoms within 15 days, as opposed to those inoculated with pCM20-1d in which no symptoms were observed, although dot-blot hybridization revealed that they were infected (Fig. 4). These results demonstrated that a symptomatic variant can be converted in a non symptomatic one by introducing the substitution UUUC to GAAA in positions 82 to 85 which, therefore, delimit this pathogenic determinant.

## DISCUSSION

Understanding structure-function relationships the *Avsunviroidae* family, which differs in fundamental aspects from the better known *Pospiviroidae* family (2), has been hampered by lack of appropriate experimental systems. The recent characterization of CChMVd (5), whose natural host chrysanthemum is also a convenient experimental host because of the short time (12-15 days) which elapses between inoculation and onset of symptoms (13), allows to tackle the study of functional determinants in CChMVd. Among them, those responsible for pathogenesis are particularly intriguing. The observation that plants of the chrysanthemum cultivar "Yellow Delaware" remained symptomless after inoculation with the severe CChMVd-S strain, suggested to us the possibility that these were infected with a non symptomatic strain of the same agent (CChMVd-NS), which protected them against a CChMVd-S challenge inoculation. Additional support for such a cross-protection effect was obtained by experimentally reproducing the same result in the "Bonnie Jean" cultivar. Northern-blot hybridization provided the first direct proof for the existence of a CChMVd-NS RNA in the "Yellow Delaware" plants. Interestingly, the intensity of the hybridization signals generated by CChMVd-S and -NS RNAs was similar, indicating that their associated phenotypes were not the consequence of different accumulation levels in the infected tissue.

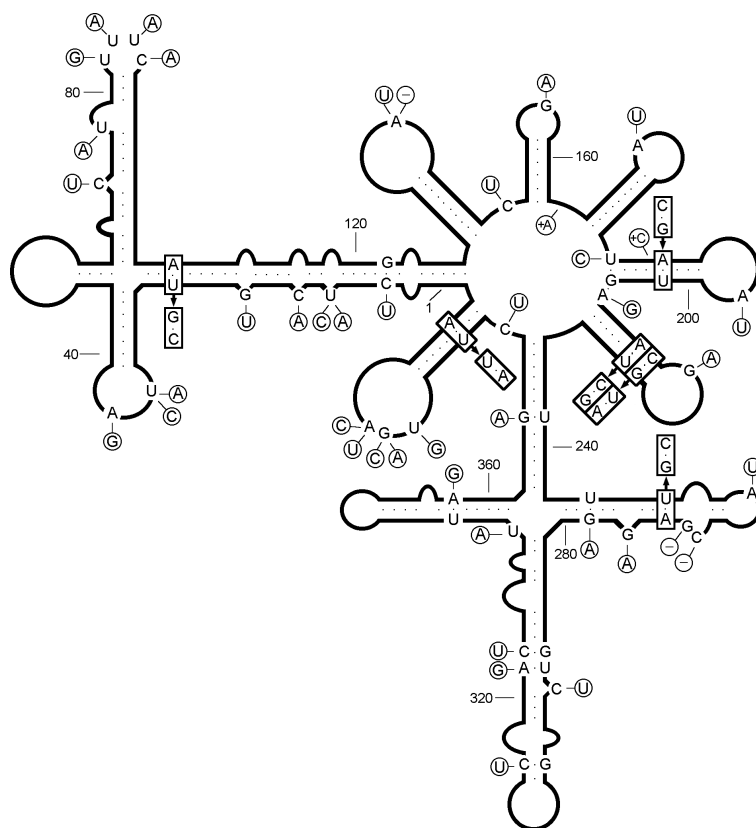
Sequence analysis of a series of CChMVd-NS cDNA clones showed, as in the CChMVd-S strain (5), a distribution of closely related variants forming a quasi-species (22). Distributions of this kind have been found in other members of both families including potato spindle tuber viroid (PSTVd) (23), citrus exocortis viroid (CEVd) (24), ASBVd (25), and PLMVd (7, 21). Mutations observed in CChMVd-NS variants were not randomly scattered along the RNA molecule. This, together with the observation in several clones of the same changes was a solid indication that they were present in the viroid RNA population.

CChMVd-NS cDNA clones of variants CMNS 6, 26, 38 and 41 were not infectious, probably because the deficient self-cleavage activity of their RNAs (Fig. 4) impaired replication. In particular, deletion of the residue located 3' to the self-cleavage site of the plus hammerhead structure (as in CMNS 38 and 41), has been reported in PLMVd variants with a much reduced RNA self-cleavage and infectivity (21). We assume this deletion is a cloning artifact introduced by

the reverse transcriptase because of the extra 2'-phosphate at the nucleotide preceding the self-cleavage/ligation site, as was the case with a viroid-like satellite RNA (26). Variants CMNS 1, 2, 25, 30 and 35, containing the mutations specific to the CChMVd-NS strain, caused symptomless infections. When the contribution of each mutation to the non symptomatic phenotype was assessed, only the tetranucleotide change at positions 82-85 was found to be directly involved. Indeed, introduction of the change UUUC82-85 to GAAA in the symptomatic variant CM 20 by site-directed mutagenesis, led to a symptomless infection without detectable alterations of the accumulation level of the viroid progeny.

The CChMVd-NS strain appears therefore to be composed essentially of two types of variants: a minor fraction with the UUUC82-85 sequence characteristic of the severe CChMVd-S strain (5), and a major fraction with the GAAA82-85 motif that confers the non symptomatic phenotype. The co-existence of sequence variants with different pathogenicity within a viroid isolate has also been reported in PLMVd (21) and in some members of the *Pospiviroidae* family such as PSTVd and CEVd (23, 24). Taking advantage that in the cDNA the residues UU82-83 form part of a *Hind* III site (AAGCUU78-83), we explored with restriction analysis 28 and 32 additional cDNA clones from two other RT-PCR amplifications of CChMVd-NS RNA preparations of “Bonnie Jean” and “Yellow Delaware” plants, respectively. The 60 clones were resistant to digestion, and complete sequencing of 12 confirmed the presence of the GAAA82-85 motif (data not shown), indicating a clear predominance, if not a total dominance, of the non pathogenic variants in these two CChMVd-NS populations.

Looking at the mechanism linking the tetranucleotide change in CChMVd with the phenotypic effect, it is interesting to consider what is known in this respect in the *Pospiviroidae* family. Mutations of 3-4 nucleotides having dramatic effects on pathogenicity (27) have been mapped in PSTVd at a “virulence modulating (VM) region” that overlaps a premelting (PM) region within a domain of the rod-like structure (reviewed in ref. 28). A similar situation was observed in CEVd (29) and, accordingly, this was termed the pathogenic domain (30), although more recent data indicate the participation of additional domains in symptom expression (31). Moreover, pathogenicity of HSVd is regulated by specific changes in another domain of the rod-like structure (32). For some PSTVd strains an inverse correlation between the thermodynamic stability of the PM region and virulence in tomato was found (33), but other data obtained with this viroid (34) and with CEVd (24), do not support this correlation. Taking into account bending of RNA helices, an alternative picture that emerges from comparison of the most stable secondary structure of PSTVd variants of different pathogenicity points to major differences in the geometry of their VM regions which, together with concomitant alterations in RNA-protein interactions, may be the primary cause of viroid pathogenicity (34, 35).



**Fig. 5.** Effects of the sequence heterogeneity found in variants characterized so far from CChMVd-S and -NS strains on the secondary structure predicted for CChMVd RNA. Mutations of variants CMNS 6, 26, 38 and 41, which are presumably artefactual for the reasons stated in the text, are not included. Insertions and deletions are denoted by symbols + and - respectively. For other details of the CChMVd reference variant see Fig. 3.

The situation with CChMVd, however, appears very different because this viroid, together with PLMVd, does not adopt a rod-like secondary structure of minimum free energy but a highly branched conformation that is supported by studies of solubility in 2 M LiCl (5, 7, 21). In CChMVd particularly, the sequence heterogeneity detected in the variants from the S and NS strains characterized so far (5, this work and unpublished data), provides strong support for the biological significance of the proposed branched conformation, either because the changes are found in loops or because when affecting a base pair the substitutions are compensatory (Fig. 5). This is for example the case of the very stable hairpins delimited by positions 181-207, 210-230 and 374-394 in which, additionally, the co-variations are generally double transversions. The existence of the first of these hairpins is further supported by the change CC182-183 to CCC and the substitution A208 to G found in CMNS variants 2, 4, 7 and 30, that lead to an extension and rearrangement of the basal portion of the stem (Fig. 3 and 5). Other mutations in double-stranded regions of CChMVd not affecting the computer-predicted secondary structure are the co-variations U251 to C and A271 to G, and A103 to G and U24 to C, as well as other point mutations converting canonical pairs into G-U wobble pairs or the opposite (G279 to A, A321 to G, C322 to U, A357 to G, and G368 to A) (Fig. 5). Since co-variations or compensatory mutations are considered as the most powerful approach for testing computer-predicted structures in RNA (36), our results show that the rod-like or quasi-rod-like secondary structure is not a universal property of viroid RNAs because some of them, as illustrated by CChMVd, present a clearly branched conformation *in vivo*.

The substitution UUUC82-85 to GAAA responsible for changing the induced phenotype from symptomatic to non symptomatic, forms a tetraloop capping the stem of a hairpin (Fig. 3). The GAAA hairpin loop belongs to the GNRA tetraloop family (where R stands for a purine and N for any base) found frequently in different RNAs (37) and endowed with an unusual high thermodynamic stability resulting from a network of heterogeneous hydrogen bonds (38). It has been proposed that these tetraloops play an important function in RNA folding (39), in RNA-RNA tertiary interactions (40) and as protein binding sites (41). A GAAA tetraloop has also been implicated in processing of PSTVd (42) but a similar role for the CChMVd tetraloop at positions 82-85 can be dismissed because processing in this viroid is mediated by hammerhead ribozymes and does not occur in this region (5). That the CChMVd mutation UUUC82-85 to GAAA indeed maps at a tetraloop is not only supported by the concurrent change of four consecutive nucleotides but also by the observation that in variant CMNS 2 the UUUC82-85 mutates into AAUUU, that leads in the most stable secondary structure to a rearrangement of the hairpin and to a new GCAA tetraloop of the same GNRA family (Fig. 3, upper inset).

The finding that some chrysanthemum plants are resistant to a severe CChMVd strain because they are infected with a closely related non symptomatic CChMVd strain, along with parallel results in PLMVd (21), extends to the *Avsunviroidae* family the cross-protection phenomena reported previously in the *Pospiviroidae* family (reviewed in ref. 3). Considering the very different properties of the two viroid families, distinct underlying mechanisms must necessarily be involved in the repeated appearance of phenomena of this class in the interactions between plants and these subviral pathogens.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Ahuir for technical assistance, Drs C. Hernández and J.A. Daròs for reading the manuscript and D. Donnellan for English revision. M.D. and B.N. were recipients of predoctoral fellowships from the Ministerio de Educación y Cultura. This work was supported by grant PB95-0139 (to R.F.) from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica.

## REFERENCES

1. Diener, T. O. (1987) *The Viroids* (Plenum Press, New York, NY).
2. Flores, R., Randles, J. W., Bar-Joseph, M. & Diener, T. O. (1998) *Arch. Virol.* **143**, 623-629.
3. Flores, R., Di Serio, F. & Hernández, C. (1997) *Semin. Virol.* **8**, 65-73.
4. Symons, R. H. (1997) *Nucleic Acids Res.* **20**, 2683-2689.

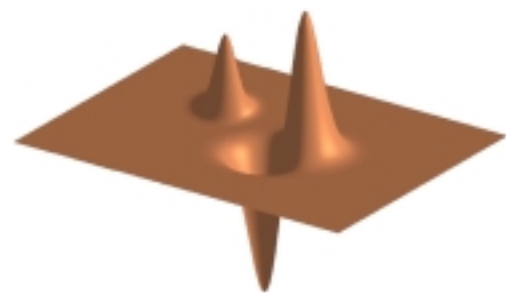
5. Navarro, B. & Flores, R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11262-11267.
6. Hutchins, C. J., Rathjen, P. D., Forster, A. C. & Symons, R. H. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**, 3627-3640.
7. Hernández, C. & Flores, R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3711-3715.
8. Daròs, J. A., Marcos, J. F., Hernández, C. & Flores, R. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12813-12817.
9. Hutchins, C. J., Keese, P., Visvader, J. E., Rathjen, P. D., Mc Innes, J. L. & Symons, R. H. (1985) *Plant Mol. Biol.* **4**, 293-304.
10. Gross, H. J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H. & Sänger, H. L. (1978) *Nature* **273**, 203-208.
11. Gast, F. U, Kempe, D., Spieker, R. L. & Sänger, H. L (1996) *J. Mol. Biol.* **263**, 652-670.
12. Horst, R. K. (1975) *Phytopathology* **65**, 1000-1003.
13. Romaine, C. P. & Horst, R. K. (1975) *Virology* **64**, 86-95.
14. Pallás, V., Navarro, A. & Flores, R. (1987) *J. Gen. Virol.* **68**, 2095-2102.
15. Flores, R. (1986) *J. Virol. Methods* **13**, 161-169.
16. Flores, R., Durán-Vila, N., Pallás, V. & Semancik, J. S. (1985) *J. Gen. Virol.* **66**, 2095-2102.
17. Forster, A. C., Davies, C., Hutchins, C. J. & Symons, R.H. (1990) *Methods Enzymol.* **181**, 583-607.
18. Byrappa, S., Gavin, D. K. & Gupta, K. C. (1995) *PCR Methods Applic.* **5**, 404-407.
19. Dimock, A. W., Geissinger, C. M. & Horst, R. K. (1971) *Phytopathology* **61**, 415-419.
20. Hertel, K. J., Pardi, A., Uhlenbeck, O. C., Koizumi, M., Ohtsuka, E., Uesugi, S., Cedergren, R., Eckstein, F., Gerlach, W. L., Hodgson, R. & Symons, R. H. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 3252.
21. Ambrós, S., Hernández, C., Desvignes, J. C. & Flores, R. (1998) *J. Virol.* **72**, 7397-7406.
22. Domingo, E., Holland, J., Biebricher, C. & Eigen, M. (1995) in *Molecular Basis of Virus Evolution*, eds. Gibbs, A., Calisher, C. H. & García-Arenal, F. (Cambridge University Press, Cambridge, UK), pp. 181-191.
23. Góra, A., Candresse, T. & Zagorski, W. (1994) *Arch. Virol.* **138**, 223-245.
24. Visvader, J. E. & Symons, R. H. (1985) *Nucleic Acids Res.* **5**, 2907-2920.
25. Rakowski, A. G. & Symons, R. H. (1989) *Virology* **173**, 352-356.
26. Kiberstis, P. A., Haseloff, J. & Zimmern, D. (1985). *EMBO J.* **4**, 817-822.
27. Gross, H. J., Liebl, U., Alberty, H., Krupp, G., Domdey, H., Ramm, K. & Sänger, H. L. (1981) *Biosci. Rep.* **1**, 235-241.
28. Riesner, D. (1990) *Semin. Virol.* **1**, 83-99.
29. Visvader, J. E. & Symons, R. H. (1986) *EMBO, J.* **13**, 2051-2055.



30. Keese, P. & Symons, R. H. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4582-4586.
31. Sano, T., Candresse, T., Hammond, R. W., Diener, T. O. & Owens, R. A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10104-10108.
32. Reanwarakorn, K. & Semancik, J. S. (1998) *J. Gen. Virol.* **79**, 3163-3171.
33. Schnölzer, M., Haas, B., Ramm, K., Hofmann, H. & Sängler, H. L. (1985) *EMBO J.* **4**, 2181-2190.
34. Owens, R. A., Steger, G., Hu, Y., Fels, A., Hammond, R.W. & Riesner, D. (1996) *Virology* **222**, 144-158.
35. Schmitz, A. & Riesner, D. (1998) *RNA* **4**, 1295-1303.
36. Gutell, R. R., Larsen, N. & Woese, C. R. (1994) *Microbiol. Rev.* **58**, 10-26.
37. Woese, C. R., Winker, S. & Gutell, R.R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8467-8471.
38. Jucker, F. N., Heus, H. A., Yip, P. F., Moors, E. H. M. & Pardi, A. (1996) *J. Mol. Biol.* **264**, 968-980.
39. Uhlenbeck, O. C. (1990) *Nature* **346**, 613-614.
40. Pley, H., Flaherty, K. M. & McKay, D. B. (1994) *Nature* **372**, 111-113.
41. Gluck, A., Endo, Y. & Wool, I. G. (1992) *J. Mol. Biol.* **226**, 411-424.
42. Baumstark, T., Schröder, A. R. W. & Riesner, D. (1997) *EMBO J.* **16**, 599-610.



## CAPÍTULO II





# **Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid: Dissection of the Pathogenicity Determinant, Comparative Fitness of Symptomatic and Non-Symptomatic Variants, and Characterization of a Kissing-Loop Interaction in the in vivo RNA Conformation <sup>1</sup>**

**MARCOS DE LA PEÑA, AND RICARDO FLORES**

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Avenida de los Naranjos s/n, Valencia 46022, Spain*

## **ABSTRACT**

**Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd) is a small RNA (398-401 nt) with hammerhead ribozymes in both polarity strands that mediate self-cleavage of the oligomeric RNA intermediates generated in a rolling-circle mechanism of replication. Within the in vivo branched RNA conformation of CChMVd, a tetraloop has been identified as a major determinant of pathogenicity. Here we report a detailed study of this tetraloop by site-directed mutagenesis, bioassay of the CChMV-cDNA clones and analysis of the resulting progenies. None of the changes introduced in the tetraloop, including its substitution by a triloop or a pentaloop, abolished infectivity. In contrast to the situation observed for other RNAs, the stable GAAA tetraloop characteristic of non-symptomatic CChMVd-NS strains was not functionally interchangeable for other stable tetraloops of the UNCG family, suggesting that the sequence, rather than the structure, is the major factor governing conservation of this motif. In most cases, the introduced changes led initially to symptomless infections, which eventually evolved to symptomatic concurrently with the prevalence in the progeny of the UUUC tetraloop characteristic of symptomatic CChMVd-S strains. Only in one case the GAAA tetraloop emerged and eventually dominated the progeny in infected plants that were non-symptomatic. These results revealed the existence of two major fitness peaks in the tetraloop (UUUC and GAAA), whose adjacent stem is also under strong selection pressure. Co-inoculations with CChMVd-S and -NS variants showed that only when the latter was in a 100- or 1000-fold excess the infected plants remained symptomless, confirming the higher biological fitness of the S variant and explaining the lack of symptom expression observed previously in cross-protection experiments. The sequence heterogeneity found in CChMVd-S and -NS variants strongly supports the biological significance of a pseudoknot-like interaction that, by comparison with the situation found in PLMVd, has been proposed between two loops of the CChMVd branched conformation. Preservation of this kissing-loop interaction in two viroids with an overall low sequence similarity stabilizes their globular foldings and suggests that it may play a key functional role.**

<sup>1</sup> To be submitted

## INTRODUCTION

Viroids, small single-stranded circular RNAs (between 246 and 401 nt) able to infect certain plants and to incite in most cases pathological alterations, are currently the lowest step of the biological scale (Diener, 1999; Flores *et al.*, 2000a). As a consequence of their minimal genomic size, viroids are very appropriate systems for the study of RNA structure–function relationships and, specifically, of those involved in pathogenesis. Moreover, since the available evidence indicates that viroids do not code for any protein (Davies *et al.*, 1974; Hall *et al.*, 1974; Semancik *et al.*, 1977), their pathogenic effects must result from direct interaction of the viroid RNA itself, or of some of its replicative intermediates, with one or more host components. Therefore, viroids also offer unique opportunities to understand how the cellular metabolism can be subverted by a small non-coding RNA.

The 28 viroid species sequenced so far have been grouped within two families. Members of family *Pospiviroidae*, whose type species is *Potato spindle tuber viroid* (Diener, 1972; Gross *et al.*, 1978), are characterized for the presence of a central conserved region (CCR) and the lack of hammerhead ribozymes, whereas members of family *Avsunviroidae*, whose type species is *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) (Symons, 1981; Hutchins *et al.*, 1986), lack a CCR but can form hammerhead structures in their both polarity strands and to self-cleave *in vitro* and *in vivo* accordingly (Flores *et al.*, 2000a and 2000b). Additionally, there is increasing evidence supporting a third demarcating property: whereas the nucleus is the replication and accumulation site of viroids of family *Pospiviroidae* (Diener, 1971; Spiesmacher *et al.*, 1983; Harders *et al.*, 1989; Bonfiglioli *et al.*, 1996; Woo *et al.*, 1999), these processes occur in the chloroplast in the case of members of family *Avsunviroidae* (Bonfiglioli *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1994; Bussière *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 1999).

Most studies on sequence or structural determinants of pathogenicity have been carried out with PSTVd and other members of family *Pospiviroidae*, because they were the first discovered and characterized viroids, and also because they usually have herbaceous experimental hosts that make bioassays amenable within a short time interval (Schnölzer *et al.*, 1984; Visvader and Symons, 1986; Owens *et al.*, 1996; Reanwarakorn and Semancik, 1998; Schmitz and Riesner 1998). Studies of this kind have been more limited in family *Avsunviroidae*, which in addition to ASBVd is composed by *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) (Hernández and Flores, 1992) and *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) (Navarro and Flores, 1997). On the basis of a series of properties that include base composition, overall secondary structure and architecture of the hammerhead ribozymes, PLMVd and CChMVd are more related to each other than to ASBVd and have been grouped in genus *Pelamoviroid* (Navarro and Flores, 1997; Flores *et al.*, 2000a and 2000b). The three members of family *Avsunviroidae* are host-specific and have been

experimentally transmitted only to other species closely related to their respective natural hosts (Flores *et al.*, 2000b). Establishing a direct relationship between ASBVd sequence variants and the distinct symptomatology to which they have been associated (Semancik and Szychowski, 1994), is not feasible because of the difficulties in achieving successful mechanical inoculations in avocado and the long assay period (approximately one year) required to observe the symptoms. On the other hand, attempts at mapping the pathogenicity determinant(s) of PLMVd have been hampered by the high variability of this viroid as well as by the need to use a woody bioassay host, GF 305 peach seedlings, that still demand a relatively long post-inoculation period of 2-3 months for symptom expression (Ambrós *et al.*, 1998).

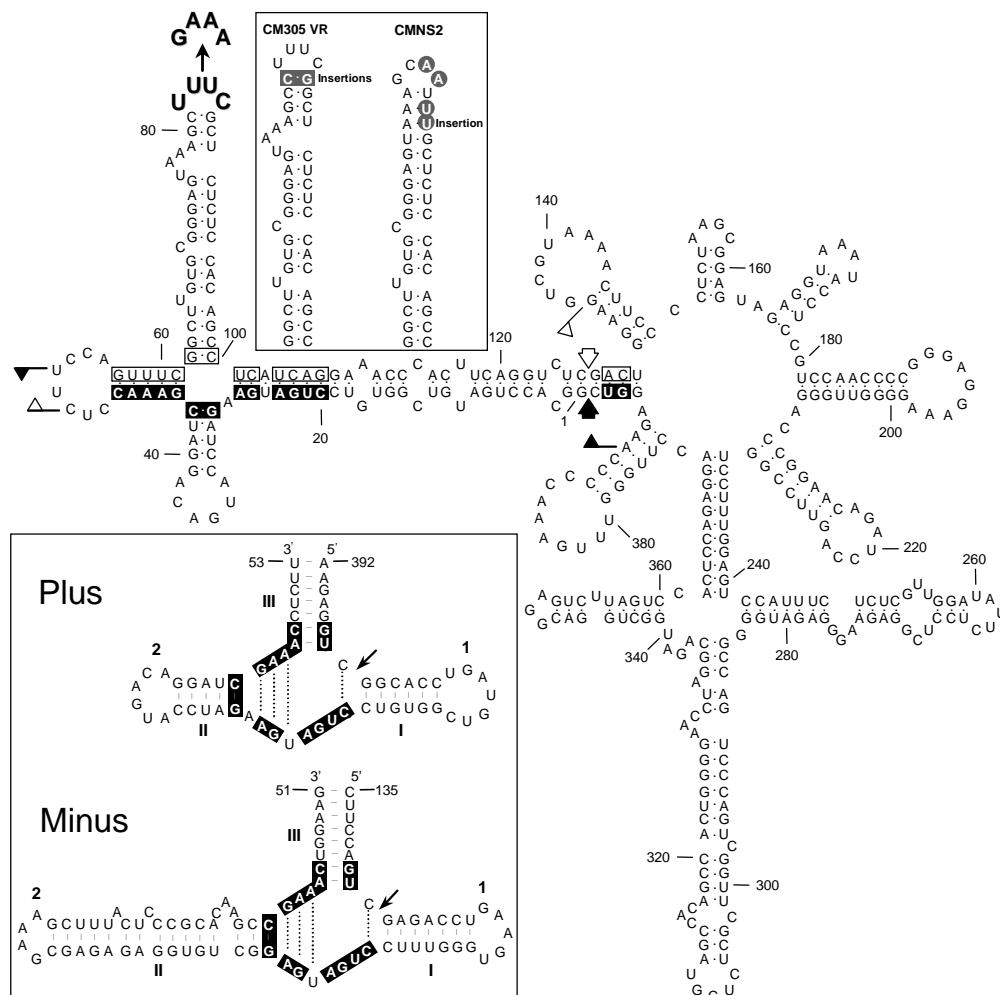
CChMVd offers a much more convenient alternative to this class of studies because its natural host, chrysanthemum, is also a suitable experimental host easy to propagate and with a short elapsing time between inoculation and onset of symptoms (8-10 days). Moreover, in addition to the severe strains of CChMVd (CChMVd-S), which induces the characteristic chlorotic mottle (Romaine and Horst, 1975; Horst, 1987; Navarro and Flores, 1997), the existence of an infectious but non-symptomatic strain of the agent was postulated on the basis of cross-protection studies (Horst, 1975). Direct proof supporting this contention has been recently provided by cloning and sequencing a CChMVd non-symptomatic strain (CChMVd-NS) (De la Peña *et al.*, 1999). By comparative analysis of CChMVd-S and -NS sequence variants and bioassays with natural and site-directed mutagenized CChMVd-cDNA clones, a tetraloop in the most stable branched conformation of CChMVd has been identified as a major determinant of pathogenicity. Furthermore, examination of the sequence heterogeneity found in CChMVd-S and -NS variants strongly supports the *in vivo* existence of such a branched conformation (De la Peña *et al.*, 1999).

Here we report a detailed molecular dissection of this tetraloop by site-directed mutagenesis followed by bioassay of the CChMV-cDNA clones and sequence analysis of the resulting progenies. This sort of *in vivo* evolution experiments are a powerful tool to study RNA structure-function relationships (Olsthoorn *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1999). We have also performed a series of *in vivo* competition studies between representative CChMVd-S and -NS variants, using distinct proportions of both competitors in order to determine their relative biological fitness. Finally, the analysis of numerous CChMVd-S and -NS natural variants has allowed a refinement of the *in vivo* branched conformation of this viroid and, more specifically, has provided experimental evidence supporting the existence of a long-distance interaction proposed previously (Bussière *et al.*, 2000).

## RESULTS

### The stable GAAA tetraloop characteristic of CChMVd-NS strains is not functionally interchangeable for stable tetraloops of the UNCG family

A major determinant of pathogenicity for the CChMVd has been previously mapped in the tetraloop formed by residues 82 to 85 (De la Peña *et al.*, 1999). This tetraloop is capping a large stem with a particular secondary structure conserved in the approximately 100 CChMVd variants we have sequenced so far with only two exceptions: CMNS2 (De la Peña *et al.*, 1999; this work), in which a partially different and more stable hairpin can be formed, and CM305VR in which two compensatory insertions extend this stem preserving the rest of its proposed secondary structure (Fig. 1).



**Fig. 1.** Predicted secondary structure of minimal free energy of the symptomatic CM20 variant. Plus and minus self-cleavage domains are delimited by flags, residues conserved in most natural hammerhead structures are within boxes, and the self-cleavage sites are indicated by arrows. Black and white backgrounds in flags, boxes and arrows refer to plus and minus polarities, respectively. The changes in the tetraloop delimited by positions 82-85 (UUUC→GAAA) that convert a symptomatic variant into non-symptomatic are shown with higher fonts. (*Upper inset*) Characterized variants with changes in the stem-loop structure containing the tetraloop that determines CChMVd pathogenicity. Nucleotide substitutions are indicated in gray background. (*Lower inset*) Hammerhead structures corresponding to the plus and minus polarities of the CChMVd RNA. Helices and loops are named according to the adopted convention (Hertel *et al.*, 1992). Continuous and broken lines between bases denote Watson-Crick and non-canonical pairs, respectively.

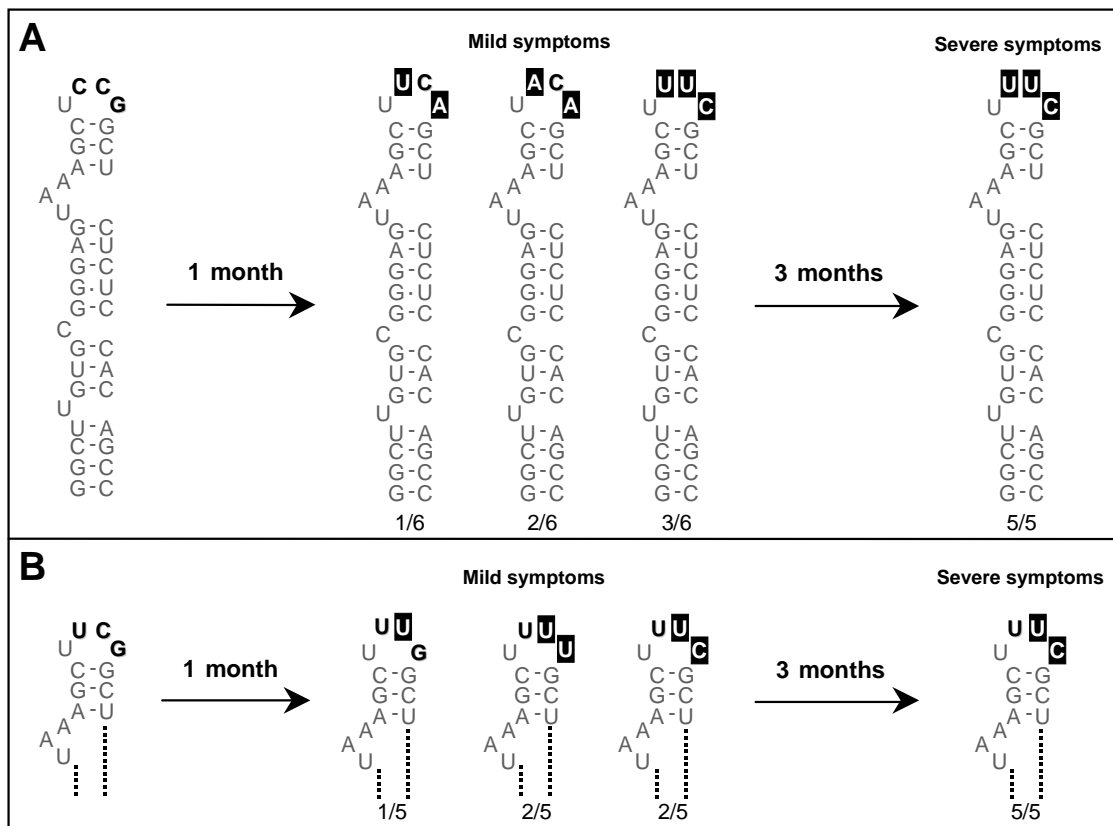


The sequence of the apical tetraloop between positions 82 and 85 is UUUC for variants obtained from symptomatic strains, as well as UUUU in a few cases (see below), whereas in variants from non-symptomatic strains the sequence of the tetraloop is GAAA, which belongs to the GNRA family of tetraloops (where N is any nucleotide and R a purine residue) (Heus and Pardi, 1991). Site-directed mutagenesis experiments on the symptomatic CChMVd variant CM20 indicated that the UUUC→GAAA change (generating variant CM20-1), was responsible for viroid pathogenicity (De la Peña *et al.*, 1999). Analysis of 10 clones of the progeny resulting from inoculations with CM20-1 revealed that the introduced change and the accompanying non-symptomatic phenotype were stable after three months. In a parallel control experiment in which the symptomatic CM20 variant was inoculated, the phenotype also remained stable after three months and no changes in the corresponding tetraloop were observed in the 20 clones sequenced (data not shown).

To gain a deeper insight into the relationships between the 82-85 tetraloop and CChMVd pathogenicity, the effect of site-directed mutations in this tetraloop were studied. In a first attempt, two different tetraloops of the UNCG family (UCCG and UUCG) were introduced into the reference symptomatic clone CM20 to generate recombinant plasmids pCM20-UCCG and pCM20-UUCG. The rationale for this approach was the previously reported functional interchangeability between GNRA and UNCG loops, which have a very stable and similar three-dimensional structure, are over-represented in natural RNAs, and have been implicated in many biological functions (Woese *et al.*, 1990; Selinger *et al.*, 1993).

When plasmids with the corresponding dimeric head-to-tail inserts pCM20-UCCGd and pCM20-UUCGd were bioassayed in chrysanthemum, no symptoms appeared 15-20 days post-inoculation (when in a parallel control experiment with pCM20d symptoms were observed in most inoculated plants), although dot-blot analysis revealed that plants were infected (data not shown). Therefore, both tetraloop changes entailed a reversion of the phenotype from symptomatic to non-symptomatic. However, a first analysis of the resulting viroid progeny 30 days post-inoculation revealed a high instability of the tetraloop sequences (Fig. 2). In none of the obtained cDNA clones was recovered the parental tetraloops but similar ones. Interestingly, some of the sequences that resulted from the infecting clone with the UCCG tetraloop showed the characteristic UUUC signature of symptomatic variants, involving at least three mutations (two C→U and one G→C). The rest of the cDNA clones of this progeny had the tetraloop UACA, in which the changes C→A and G→A might indicate an ongoing evolution to a loop similar to that typical of non-symptomatic variants (GAAA). In the case of the sequences derived from the infecting clone with the UUCG tetraloop, some presented the changes C→U and G→U, giving rise to sequences similar to the typical UUUC tetraloop of symptomatic variants (Fig. 2). In fact, the tetraloop of one variant of

this progeny (UUUU), was also occasionally found in the progeny of an infectious and symptomatic clone containing the UUUC tetraloop (see below).



**Fig. 2.** Progeny RNAs from plants inoculated with plasmids containing dimeric CChMVd-cDNA inserts of variants derived from CM20 by site-directed mutagenesis in which the tetraloop at positions 82-85 is UCCG (A) or UUCG (B) (left panels; only the hairpin capped with the 82-85 tetraloop is represented). The sequences of the resulting progenies, their relative frequency (indicated by the fractions at the bottom), and the symptoms expressed by the infected plants 1 and 3 months after inoculation are presented in the central and right panels, respectively. Bold letters show the changes introduced with respect to the characteristic UUUC symptomatic tetraloop, and white letters on a black background denote spontaneous mutations found in the progenies during the *in vivo* evolution experiments. Other details as in the legend to Fig. 1.

Between two and three months after inoculation with pCM20-UCCGd and pCM20-UUCGd, plants showed symptoms of chlorotic mottle. Analysis of the progenies from both parental clones revealed that the tetraloop had reverted to the UUUC characteristic of symptomatic variants, indicating that this is the most abundant tetraloop, if not the only, in the resulting viroid populations. Altogether these results showed that the stable GAAA tetraloop characteristic of CChMVd-NS strains is not functionally interchangeable for stable tetraloops of the UNCG family, suggesting that selection pressure acts on the sequence and not on the structure.

### **Effects of substituting the stable GAAA tetraloop characteristic of CChMVd-NS strains by other tetraloops and by a triloop and a pentaloop**

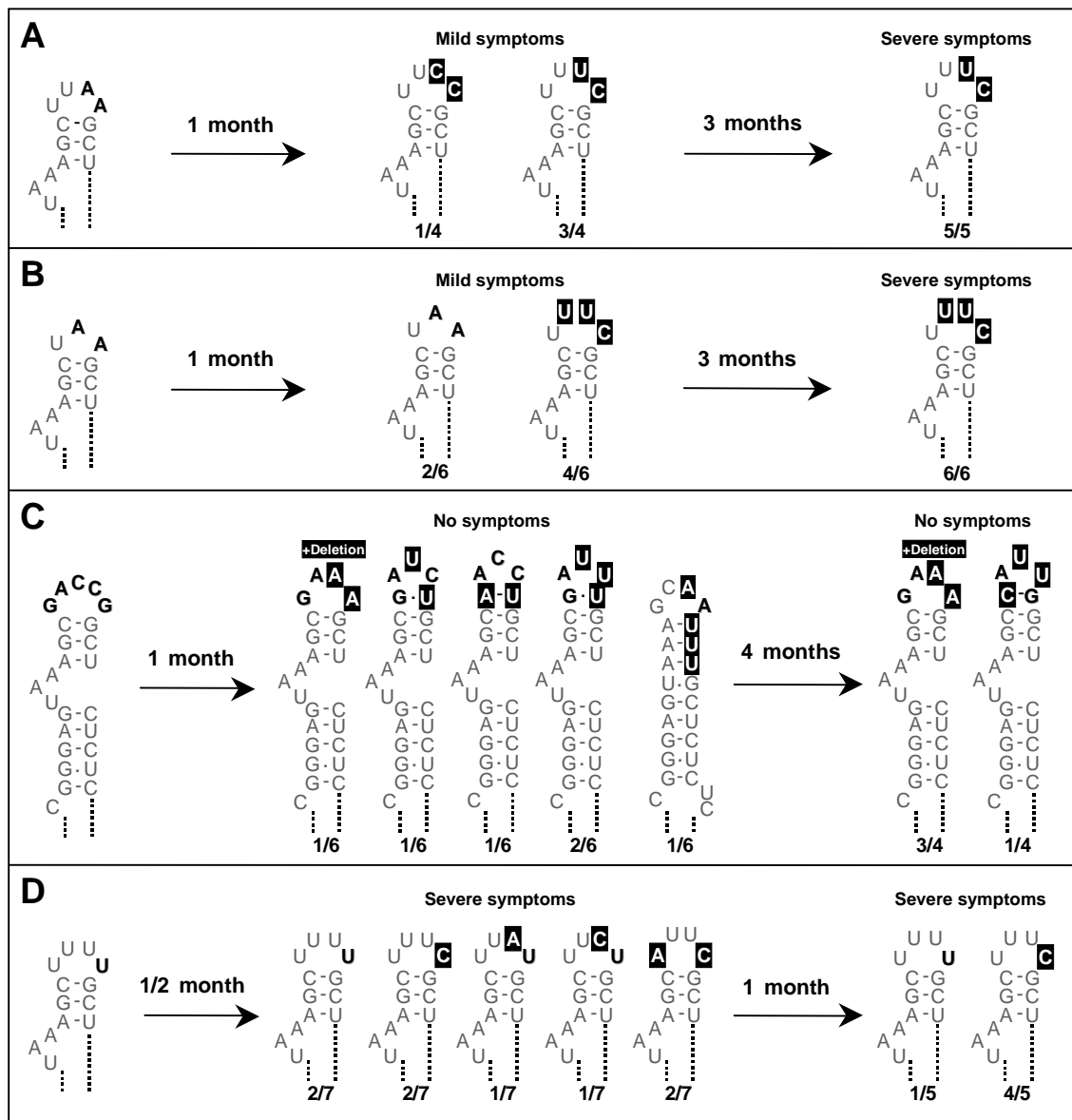
To explore in more detail the sequence and size requirements of the tetraloop that determines CChMVd pathogenicity, a set of additional changes were introduced by site-directed mutagenesis at this tetraloop, and the recombinant plasmids with the corresponding dimeric head-to-tail inserts were bioassayed in chrysanthemum. As a first step, the effect of introducing the “hybrid” tetraloop UUAA (a combination of the UUUC and GAAA tetraloops characteristic of CChMVd-S and -NS strains, respectively) was studied. One month after inoculation, the viroid progeny showed changes in only the 3'-half of the tetraloop, with most of the sequences reverting to the typical symptomatic UUUC tetraloop, an observation consistent with the appearance of mild symptoms in the infected plants (Fig. 3A). Three months after inoculation these symptoms had evolved to severe and, concurrently, only variants with the UUUC tetraloop were recovered from the progeny (Fig. 3A).

An analogous situation was found when bioassays were performed with dimeric constructs containing the UAA triloop. The inoculated plants displayed mild symptoms one month after inoculation and in the resulting progeny were detected only two types of sequences: the parental UAA and, predominating, the UUUC characteristic of the symptomatic strain (Fig. 3B). Three months after inoculation all plants expressed severe symptoms and, again, only variants with the UUUC tetraloop were recovered from the progeny (Fig. 3B).

In a third experiment, a pentaloop with the sequence GACCG was introduced. The two 5'-terminal nucleotides were identical to those in similar positions in the characteristic non-symptomatic GAAA tetraloop, whereas the 3'-moiety had neither resemblance to this nor to the UUUC tetraloop typical of the symptomatic strain. One month after inoculation with the corresponding dimeric construct, dot-blot analysis revealed that all plants were infected, although without expressing symptoms. The original pentaloop was not preserved in any of the variants from the resulting progeny, but one of them had the characteristic non-symptomatic GAAA tetraloop, another could form a hairpin identical to that of the natural variant CMNS2 previously obtained from a non-symptomatic isolate (De la Peña *et al.*, 1999), and others presented changes allowing the formation of a triloop (Fig. 3C). The infected plants remained symptomless after four months, and a limited analysis of the progeny at this time showed the existence of only two types of variants: three had the characteristic non-symptomatic GAAA tetraloop, and one presented a new sequence (CAUUG) that in the most stable secondary structure could form a triloop closed by a C-G pair (Fig. 3C).

In a last experiment of this series, the UUUC tetraloop typical of the symptomatic strain was changed into the closely related UUUU previously found in the progeny of CChMVd variant CM1 (Navarro and Flores, 1997 and data not shown). As soon as 15 days post-inoculation all plants

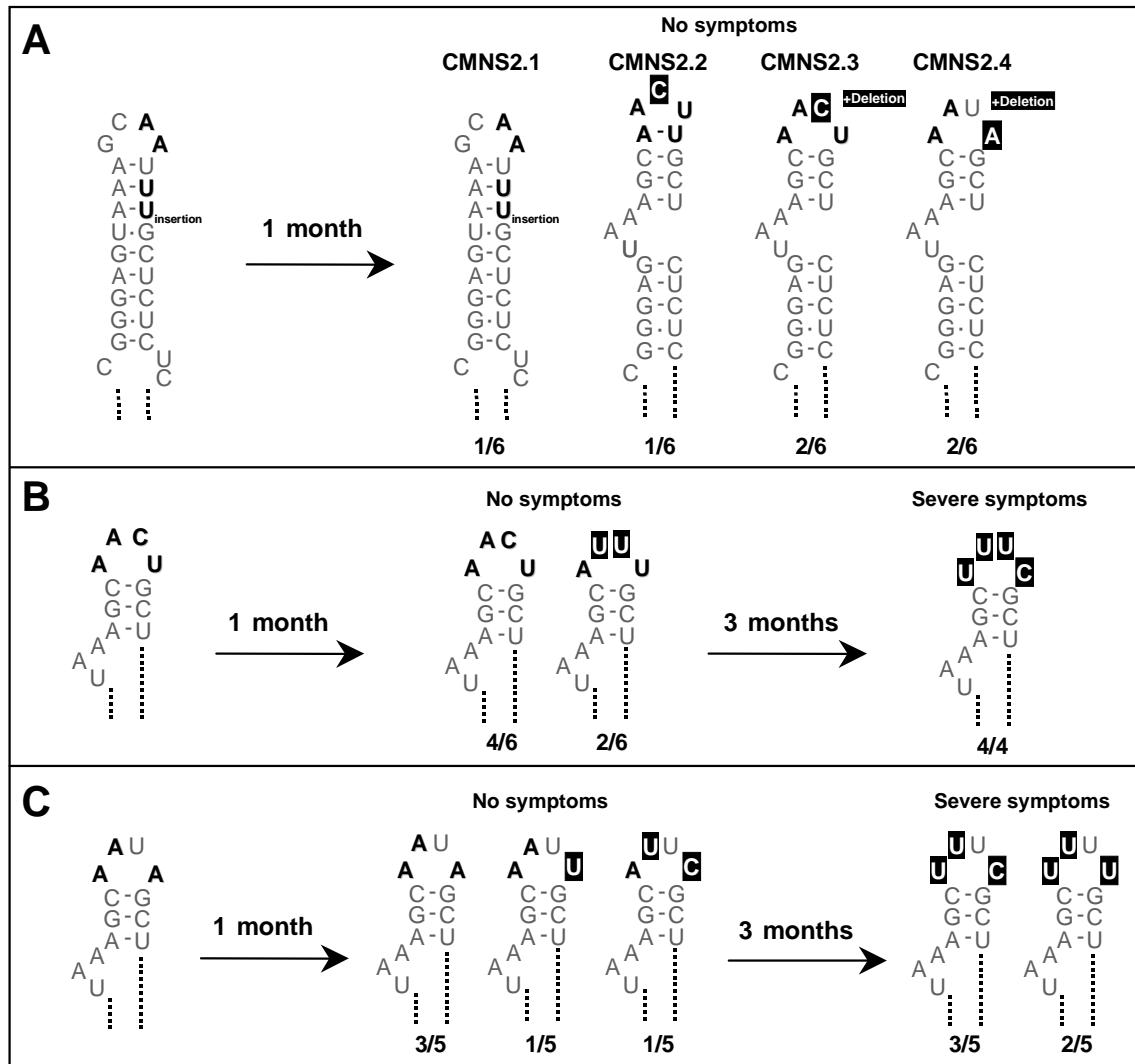
showed severe symptoms, indicating an infectivity and pathogenicity similar to that of variant with the UUUC tetraloop. Analysis of the resulting progeny showed a predominance of variants with the parental UUUU and the symptomatic UUUC tetraloops (Fig. 3D). One month after inoculation, these plants remained symptomatic but the progeny showed a clear prevalence of variants with the UUUC tetraloop (Fig. 3D). In all, these results corroborated the high selection pressure existing at this region that favors the prevalence of two tetraloops (UUUC and to a lesser extent UUUU).



**Fig. 3.** Progeny RNAs from plants inoculated with plasmids containing dimeric CChMVd-cDNA inserts of variants derived from CM20 by site-directed mutagenesis in which the tetraloop at positions 82-85 has been substituted by UUAA (A), UAA (B), GACCG (C) and UUUU (D) (left panels; only the hairpin capped with the 82-85 tetraloop is represented). The sequences of the resulting progenies, their relative frequency (indicated by the fractions at the bottom), and the symptoms expressed by the infected plants at two different times after inoculation are presented in the central and right panels, respectively. Bold letters show the changes introduced with respect to the characteristic UUUC symptomatic tetraloop, and white letters on a black background denote spontaneous mutations found in the progenies during the *in vivo* evolution experiments. Other details as in the legend to Fig. 1.

**Genetic stability of a natural non-symptomatic CChMVd variant with an atypical stem-tetraloop in the region involved in pathogenicity**

In the course of the characterization of a CChMVd-NS strain, a variant (CMNS2) with some peculiarities in the region containing the tetraloop that determines CChMVd pathogenicity was found (De la Peña *et al.*, 1999). This variant presented four distinct mutations between positions 80 and 86, but distributed in such a way that they allowed the adoption of a hairpin stem of nine uninterrupted base pairs capped with a different tetraloop (GCAA) of the GNRA family (Fig. 4A).



**Fig. 4.** Progeny RNAs from plants inoculated with plasmids containing dimeric CChMVd-cDNA inserts of natural variants CMNS 2 (A), 2.3 NS (B) and 2.4 NS (C). The sequences of the resulting progenies, their relative frequency (indicated by the fractions at the bottom), and the symptoms expressed by the infected plants at different times after inoculation are presented in the central and right panels, respectively. Bold letters show the changes with respect to the characteristic UUUC symptomatic tetraloop, and white letters on a black background denote spontaneous mutations found in the progenies during the *in vivo* evolution experiments. Other details as in the legend to Fig. 1.

Interestingly, a variant with the same stem-tetraloop hairpin was characterized in the progeny resulting from the infection with the construct containing the GACCG pentaloop (Fig. 3C). To assess the genetic stability of the CMNS2 variant, a recombinant plasmid with the corresponding dimeric insert was bioassayed in chrysanthemum. One month after inoculation, dot-blot analysis revealed that all plants were infected but without symptoms, and analysis of the progeny showed a high variability in the region encompassing the tetraloop. Only one of the six recovered variants had the parental hairpin preserved, whereas the others presented different mutations that restored the common hairpin stem with three bulged residues (data not shown).

Two of the variants from the CMNS2 progeny had the tetraloops AACU and AAUA in the region that determines CChMVd pathogenicity. To study whether these tetraloops evolved in similar or different directions, recombinant plasmids with dimeric cDNA inserts of both variants were independently bioassayed. One month after the inoculation with the variant containing the AACU tetraloop all plants were infected but symptomless, and the viroid progeny was composed by a mixture of two tetraloop sequences: the parental and another with the change AACU→AUUU (Fig. 4B). However, three months after inoculation some plants expressed severe symptoms and an analysis of the viroid population showed a reversion to the typical symptomatic UUUC tetraloop (Fig. 4B). In a parallel way, one month after inoculation with the variant containing the AAUA tetraloop all plants were infected but symptomless, and the viroid progeny was composed by a mixture of tetraloop sequences in which the parental was predominant (Fig. 4C). Three months after inoculation a fraction of the plants expressed severe symptoms and the viroid population was composed by variants with the symptomatic UUUC and UUUU tetraloops (Fig. 4C). Collectively, these results indicated that a strong selection pressure exists not only over the tetraloop but also over the structure of the adjacent stem, and that the symptomatic and non-symptomatic variants have a differential biological fitness (with the first being more efficient than the second).

### **Co-inoculation experiments of CChMVd variants show a relationship between pathogenicity and biological fitness**

To provide additional support for the higher fitness of the symptomatic variant, gel-purified monomeric RNAs, resulting from self-cleavage during *in vitro* transcription of plasmids with dimeric symptomatic and non-symptomatic CChMVd-cDNA inserts, were co-inoculated at different proportions in chrysanthemum plants. In a first experiment, the symptomatic variant CM20 (UUUC, positions 82-85) and its non-symptomatic derivative CM20-1 (UUUC→GAAA), were chosen for the competition assays. Taking advantage of the fact that residues at positions 82-83 in the symptomatic cDNA clones form part of a *Hind* III site (AAGCTT, positions 78-83), the proportion of both competitors in the progeny could be easily determined by restriction analysis

(De la Peña *et al.*, 1999). Control inoculations with one or the other variant confirmed the genetic stability of both UUUC and GAAA tetraloops, and of their associated phenotypes in the resulting progenies (Table 1). When equimolecular amounts of both competitors were co-inoculated, variants with the UUUC tetraloop predominated in the progeny over those with the GAAA tetraloop (in a ratio 3:1), and plants displayed a mild symptomatology. When the symptomatic variant was in a 10-fold excess in the inoculum, only the UUUC tetraloop was detected in the progeny and plants displayed severe symptoms. In contrast, when the non-symptomatic variant was 10-fold more abundant in the inoculum than the symptomatic one, half of the plants exhibited a mild phenotype and one third of the recovered clones had the UUUC tetraloop; the other half had no symptoms and the GAAA tetraloop was prevalent in the progeny (in a ratio 8:1). These results showed that the observed symptomatology could be directly related with the proportion of both types of variants in the progeny, and that the biological fitness of the symptomatic variant was significantly higher than that of its non-symptomatic counterpart.

**Table 1.** Effects co-inoculations with CChMVd symptomatic (S) and (NS) variants on viroid progeny and symptom expression of chrysanthemum plants.

| Ratio of S to NS variants in inocula <sup>1</sup> | S and NS variants in the progeny (15 days p.i.) | Symptoms (15 days p.i.) |
|---|---|-------------------------|
| 1:1   | 9 and 3 <sup>2</sup>                            | Mild (4/4) <sup>3</sup> |
| 10:1  | 10 and 0  | Severe (4/4)            |
| 1:10  | 8 and 4   | Mild (2/4)              |
|   | 1 and 8   | None (2/4)              |
| Control (only S variant)                          | 6 and 0   | Severe (4/4)            |
| Control (only NS variant)                         | 0 and 8   | None <sup>4</sup>       |
| Buffer  | None  | None                    |

<sup>1</sup>S and NS refer to the symptomatic (CM20) and non-symptomatic (CM20-1) variants, respectively

<sup>2</sup>Number of variants in the progeny from one of the infected plants with the tetraloops characteristic of symptomatic and non-symptomatic variants, respectively

<sup>3</sup>Number of plants with symptoms with respect to those inoculated

<sup>4</sup>All inoculated plants were infected as revealed by dot-blot analysis

In a second competition experiment, the symptomatic variant was the same as in the first experiment but the non-symptomatic was CMNS35, a natural variant in which the UUUC→GAAA change is accompanied by other mutations outside the tetraloop (De la Peña *et al.*, 1999). When the co-inoculations were performed with mixtures of monomeric RNAs from both variants in the proportions 1:1, 10:1 and 1:10, the symptom expression pattern in the infected plants 15-20 days post-inoculation was very similar to that observed in the previous experiment (data not shown). Only in co-inoculations in which the non-symptomatic variant was in a 100- or 1000-fold excess, all plants remained symptomless two months after inoculation (although dot-blot analysis showed

that they were infected). These results confirmed the higher biological fitness of the symptomatic variant, and explain the lack of symptom expression observed in plants inoculated in a cross-protection format (Horst, 1975; De la Peña *et al.*, 1999; see also Discussion).

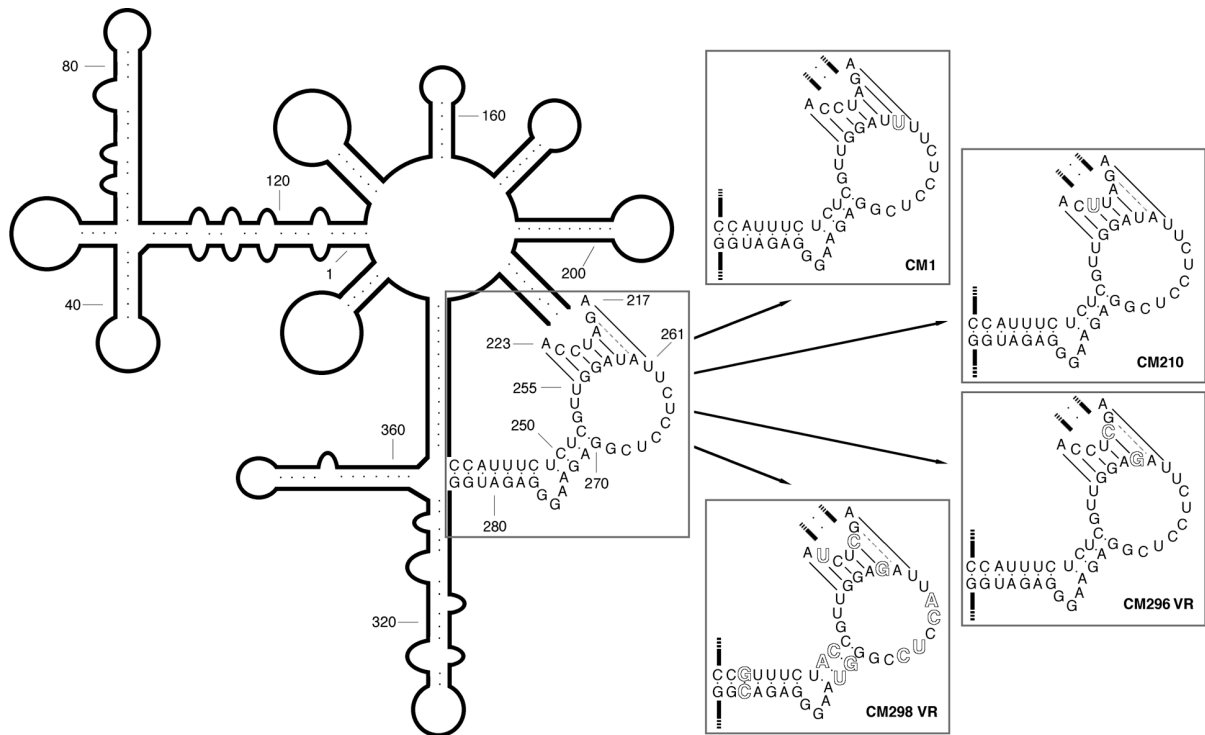
### **Co-variations and compensatory mutations found in natural variants support the existence *in vivo* of a kissing-loop interaction in CChMVd RNA**

The computer-predicted branched conformation of CChMVd RNA obtained by minimizing its free energy (the so-called *in silico* secondary structure), is supported by physical and biological data indicating that this, or a closely related conformation, also exists *in vitro* and *in vivo*. The insolubility of CChMVd in 2 M LiCl is consistent with an spatial folding different from the rod-like or quasi rod-like structure proposed for most viroids that are soluble in these high salt conditions (Navarro and Flores, 1997), and a collection of co-variations and compensatory mutations observed in natural variants of CChMVd also supports the proposed branched conformation of CChMVd (Navarro and Flores, 1997, De la Peña *et al.*, 1999; this work). The only other viroid with a similar secondary structure is PLMVd, the type species of genus *Pelamoviroid* to which CChMVd belongs (Flores *et al.*, 2000a and b). PLMVd is also insoluble in 2 M LiCl (Navarro and Flores, 1997) and has a computer-predicted branched conformation in which the observed sequence variability can be accommodated (Ambrós *et al.*, 1997). Additional credence for such a secondary structure of PLMVd has been recently obtained by *in vitro* chemical and enzymatic probing (Bussière *et al.*, 2000). Moreover, these results also indicate the likely existence of a pseudoknot-like interaction between two hairpin loops of the proposed branched conformation. From a comparative analysis of PLMVd and CChMVd structures the possibility that a similar interaction could exist between the CChMVd regions 217-223 and 255-261, has been advanced (Bussière *et al.*, 2000). By analyzing the sequence variability of these regions in a high number of natural CChMVd-S and -NS variants we have obtained evidence supporting the *in vivo* existence of such an element of tertiary structure in CChMVd.

As depicted in Fig. 5, a total of five different mutations were located in the CChMVd nucleotides directly involved in such a long-distance interaction. Two of them consist in C→U changes (positions 221 and 222) that are compensatory because they can form wobble interactions with the two Gs at positions 257 and 256, respectively. The change A→U (position 260) would convert a possible non-canonical interaction between G218 and A260 into a wobble pair between G218 and U260. Most interestingly, the changes A→C (position 219) and U→G (position 259), which have been concurrently observed in a number of CChMVd natural variants, are co-variations that convert the base pair between A219 and U259 into the pair between C219 and G259. Furthermore, additional co-variations were found affecting the residues forming one of the stems



immediately adjacent to the kissing loops: in some variants the base pair between U251 and A271 was substituted by an alternative C-G pair, and the base pair between C250 and G272 was substituted by an A-U pair, and in some others the base pair between A244 and U281 was substituted by a G-C pair (Fig. 5). These data, together with the co-variations previously reported in the other stem immediately adjacent to the kissing loops (Navarro and Flores, 1997; De la Peña *et al.*, 1999), provide strong support to the *in vivo* existence of the proposed pseudoknot-like interaction.



**Fig. 5.** Scheme of the CChMVd RNA conformation (variant CM20) showing in detail the proposed kissing-loop interaction between nucleotides 217-223 and 255-261. Canonical and wobble base-pairs are denoted by continuous lines and a possible G-A base-pair by a broken line. (*Insets*) Other CChMVd variants in which co-variations or compensatory mutations (indicated by outlined fonts) support the proposed long-distance interaction. Only the CChMVd regions involved in this interaction are presented. Other details as in the legend to Fig. 1.

## DISCUSSION

Within family *Avsunviroidae*, CChMVd represents the best choice for reverse genetics studies on structural-functional relationships because chrysanthemum is easily propagated by cuttings in the greenhouse, and reacts to infection with plasmids containing dimeric cDNA inserts of the viroid with diagnostic symptoms in a relative short time. Using this system, we have shown that the CChMVd pathogenicity determinant maps to a tetraloop in the branched conformation of the viroid (De la Peña *et al.*, 1999), and that the plus hammerhead ribozyme of CChMVd deviates from the consensus catalytic core due to the involvement of an extra residue in critical function(s) other than self-cleavage (De la Peña and Flores, 2001). Here we have focused our attention on the tetraloop

that determines pathogenicity in an attempt to get a deeper insight into it and into the mechanism underlying cross-protection phenomena in CChMVd.

One striking observation of our experiments is that none of the changes introduced by site-directed mutagenesis in the tetraloop involved in CChMVd pathogenicity abolished infectivity, even in those cases in which the tetraloop was substituted by a triloop or a pentaloop. This is not a general situation in CChMVd because we have reported previously that deletion of a single residue (A27 in the CChMVd reference sequence) annuls infectivity (De la Peña and Flores, 2001), indicating that selection pressures of very different intensity operate in distinct regions of the viroid molecule. A second observation is that in contrast with what has been reported for other RNAs (Selinger *et al.*, 1993) but in line with what has been observed for the RNA of potato virus X (Miller *et al.*, 1998), the stable GAAA tetraloop characteristic of CChMVd-NS strains is not functionally interchangeable for other stable tetraloops of the UNCG family, suggesting that it is the sequence, rather than the structure, the major factor governing the preservation of this motif. In most cases, the changes introduced in this tetraloop led initially to symptomless infections, that eventually evolved to symptomatic concurrently with the appearance and prevalence in the resulting progeny of the UUUC tetraloop characteristic of CChMVd-S strains (Fig. 2 and 3). This was also the case of the two bottleneck experiments in which two variants from the CMNS2 progeny (Fig. 4B and C). Therefore, the symptomatic phenotype is associated with one or a very reduced number of sequences (UUUU would be the second and less important example) in this region of the viroid molecule. Only in the case in which the infecting variant had the GACCG pentaloop, with the same two 5'-terminal nucleotides as the GAAA tetraloop characteristic of CChMVd-NS strains, this latter tetraloop emerged and eventually dominated in the progeny. This clearly shows that the adaptative landscape of CChMVd has two major fitness peaks in the region delimited by positions 82-85 that correspond to variants with UUUC and GAAA tetraloops.

The secondary structure of the stem capped by these tetraloops is also under strong selection pressure, as revealed by bioassays with the non-symptomatic variant CMNS2. Only one month after inoculation, the infecting variant was almost outcompeted by new ones in which the CMNS2 hairpin stem of nine uninterrupted base pairs was substituted by the characteristic stem with three bulged residues (Fig. 4). These results indicate that despite of the existence in progenies from natural (CMNS2) and artificial variants (those with the GACCG pentaloop) of sequences with an alternative conformation for the hairpin stem-loop between positions 71 and 93, they are not maintained and rapidly evolved to the standard type by accumulation of point mutations and deletions in the AAUUU region. Also in this context it should be noted that an additional selection pressure could operate as a consequence of the fact that the tetraloop that determines CChMVd pathogenicity and its adjacent stem, form loop 2 and helix II of the minus hammerhead structure, respectively (Fig. 1). Although loop 2, due to the length of helix II, would appear as located far

away from the catalytic core of the ribozyme, bending of helix II caused by its bulged residues might facilitate the interaction of loop 2 with other structural elements of the ribozyme, particularly with loop 1. Such an interaction could influence the catalytic activity in a way resembling that reported for the plus hammerhead ribozyme of the satellite RNA of cereal yellow dwarf virus-RPV (sCYDV-RPV), which also has an atypical long helix II (Miller *et al.*, 1991).

The co-inoculation experiments using typical CChMVd-S and -NS variants at different proportions confirmed the higher biological fitness of the symptomatic variant. Only when the non-symptomatic variant was in a 10-fold excess in the inoculum, a fraction of the plants remained temporarily symptomless although, eventually, they developed symptoms (Table 1), whereas when the excess was 100- or 1000-fold, all plants, although infected, did not express symptoms. These results are consistent with the protection afforded by CChMVd-NS strains against their S counterparts when inoculated in a cross-protection format (Horst, 1975; De la Peña *et al.*, 1999).

We have previously shown that the analysis of the sequence heterogeneity found in CChMVd-S and -NS variants strongly supports the biological significance of the computer-predicted branched conformation of this viroid, either because the changes are found in loops or because when affecting a base pair, the substitutions are compensatory (Navarro and Flores, 1997; De la Peña *et al.*, 1999). Here we have extended this analysis to assess the reliability of a pseudoknot-like interaction that by comparison with the situation found in PLMVd, has been proposed in CChMVd between loops delimited by positions 217-223 and 255-261 (Bussière *et al.*, 2000). The co-variations and other point mutations found in these loops and in their adjacent stems, provide strong support for the *in vivo* significance of this kissing-loop interaction in CChMVd (Fig. 5) and, indirectly, in PLMVd. This element of tertiary structure stabilizes a more compact folding of both RNAs and perhaps contributes to their insolubility in 2 M LiCl, a property that differentiates PLMVd and CChMVd from ASBVd and typical members of family *Pospiviroidae* (Navarro and Flores, 1997). Moreover, the conservation of the kissing-loop interaction in two viroids with an overall low sequence similarity suggests that it may determine an important functional role, the nature of which remains to be elucidated.

## MATERIALS AND METHODS

### Viroid strains and extraction of viroid RNA

Most variants were obtained of the CChMVd-S and -NS strains characterized previously in the chrysanthemum cultivars “Bonnie Jean” and “Yellow Delaware”, respectively (Navarro and Flores, 1997; De la Peña *et al.*, 1999). A minor fraction of the variants were obtained from a CChMVd-S strain infecting the cultivar “Velvet Ridge” (they include the letters VR in their names). Preparations enriched in viroid RNA were generated by extraction of leaves with buffer-saturated

phenol, fractionation with 2 M LiCl (recovering the insoluble RNAs), and removal of polysaccharides with methoxyethanol. These preparations were used for bioassay and for PAGE and Northern-blot RNA analyses. For dot-blot hybridization, RNAs from chrysanthemum leaves (2 g) were extracted with buffer-saturated phenol and fractionated on non-ionic cellulose (CF11, Whatman), which was washed with STE (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.2) containing 35% ethanol and then with STE (Pallás *et al.*, 1987).

### **Infectivity bioassays and detection of viroid RNA**

Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelez, cv. “Bonnie Jean”) was propagated in growth chambers (Navarro and Flores, 1997). Plants were mechanically inoculated with recombinant plasmids containing dimeric head-to-tail CChMVd-cDNA inserts (2 µg of plasmid per plant), or with their corresponding monomeric CChMVd RNAs resulting from self-cleavage during *in vitro* transcription. CChMVd infection was assessed by dot-blot hybridization.

### **Co-inoculation experiments**

The recombinant plasmids pCM20d, pCM20.1d and pCM35NSd, containing the head-to-tail dimeric cDNA inserts of CChMVd variants CM20, CM20.1 and CM35NS respectively, were linearized with *EcoRI* and *in vitro* transcribed with T7 RNA polymerase (Forster *et al.*, 1990). The primary transcripts of (+) polarity and their self-cleavage products were separated by PAGE in 5% gels containing 8 M urea and the RNAs of monomeric length were eluted and quantified. Co-inoculations were performed by mixing appropriate amounts of monomeric RNAs of the symptomatic and non-symptomatic variants to obtain 1:1, 1:10, 1:100 and 1:1000 ratios; each plant was mechanically inoculated with approximately 4 µg of total RNA.

### **Progeny analysis by RT-PCR amplification, cloning, and sequencing**

Viroid circular form purified by two consecutive PAGE steps, were reverse-transcribed and PCR-amplified with the pair of adjacent primers PIII (complementary to nucleotides 133–108) and PIV (homologous to nucleotides 134–159) of the CM20 variant obtained from CChMVd-S strain (see Fig. 1). Reverse transcription, PCR amplification (with *Pfu* DNA polymerase, Stratagene, endowed with proof-reading activity), and cloning were performed as described (De la Peña *et al.*, 1999). Inserts were sequenced automatically with an ABI Prism DNA sequencer (Perkin–Elmer).

### Site-directed mutagenesis

A PCR-based protocol (Byrappa *et al.*, 1995) was followed with minor modifications. Plasmid pCM20 (5 ng) was amplified with 250 ng each of pairs of adjacent and phosphorylated primers complementary and homologous to nucleotides 57-83 and 84-112 of the CM20 variant respectively, with the exception of the first two 5' positions of each primer in which appropriate changes were introduced to obtain different tetra- tri- and pentaloops (GAAA, UUCG, UCCG, AAAA, UAA, and GACCG) in the region delimited by positions 82-85 (Fig. 1). The PCR cycling profile, designed to amplify the complete plasmids with *Pfu* DNA polymerase, was the same reported previously (De la Peña *et al.*, 1999). After electrophoresis in agarose gels, PCR products of plasmid length were eluted, circularized with T4 DNA ligase, and used for transformation. Sequencing confirmed that the new plasmids contained solely the expected mutations.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to A. Ahuir for taking care of the plants and for technical assistance. This work was partially supported by grant PB98-0500 from the DGES to R. F. M. D. P. was the recipient of a pre-doctoral fellowship from the Ministerio de Ciencia y Tecnología de España.

### REFERENCES

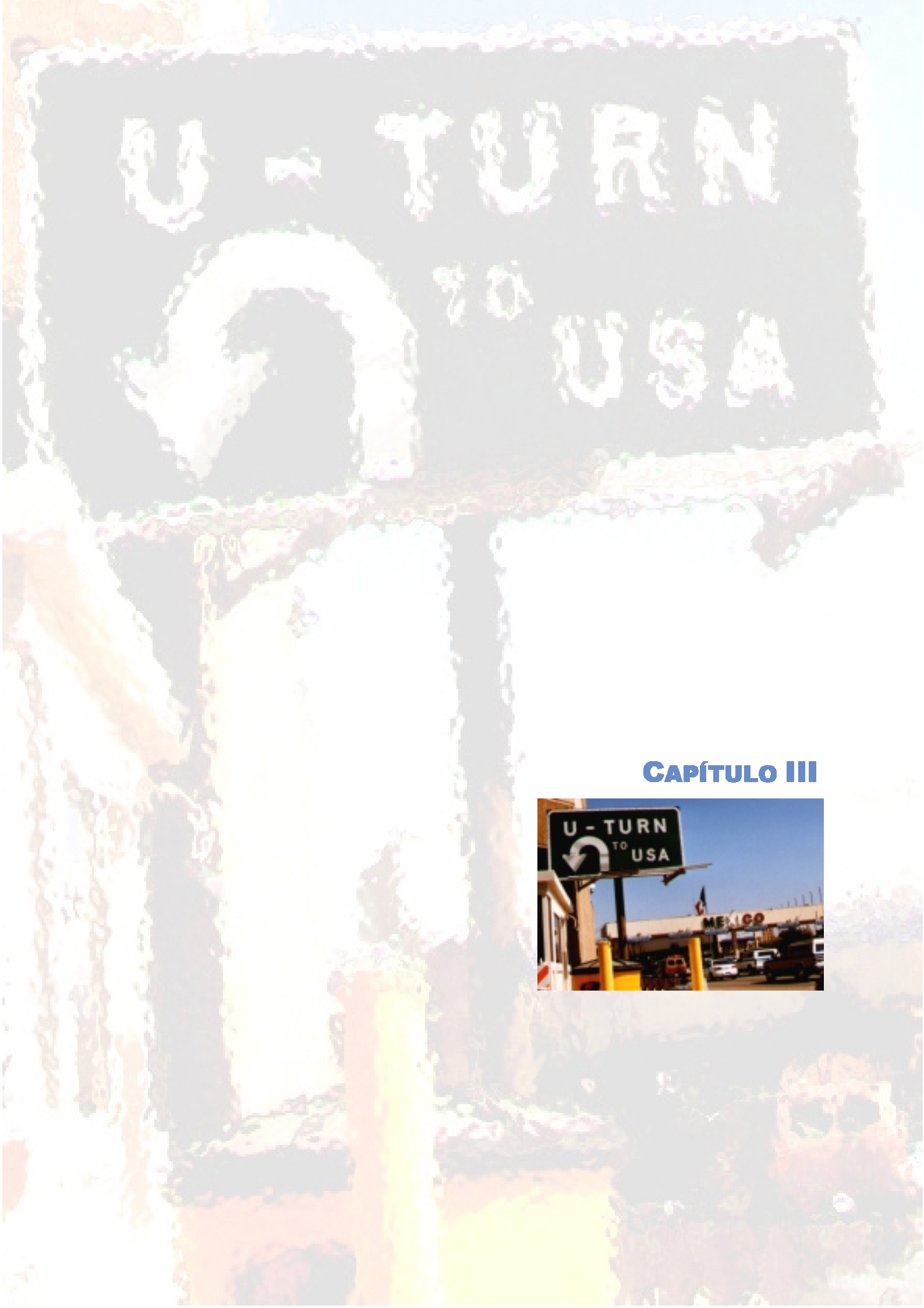
- Ambrós, S., Hernández, C., Desvignes, J. C. & Flores, R. (1998). Genomic structure of three phenotypically different isolates of peach latent mosaic viroid: implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasi-species. *J. Virol.* **72**, 7397-7406.
- Bonfiglioli, R. G., McFadden, G. I. & 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. & Symons, R. H. (1996). Tissue and intra-cellular 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.
- Bussière, F., Lehoux, J., Thompson, D. A., Skrzeczkowski, L. J. & Perreault, J. P. (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., Côté, F., Lévesque, D. & 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.

- Byrappa, S., Gavin, D. K. & Gupta, K. C. (1995). A highly efficient procedure for site-specific mutagenesis of full-length plasmids using *Vent* DNA polymerase. *PCR Methods Applic.* **5**, 404-407.
- Davies, J. W., Kaesberg, P. & 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. & Flores, R. (1999). Mapping the molecular determinat of pathogenicity in a hammerhead viroid: A tetraloop within the *in vivo* branched RNA conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9960-9965.
- De la Peña, M. & Flores, R. (2001). An extra nucleotide in the consensus catalytic core of a viroid hammerhead ribozyme: Implications for the design of more efficient ribozymes. *J. Biol. Chem.* (in press).
- Diener, T. O. (1971). Potato spindle tuber "virus": A plant virus with properties of a free nucleic acid. III. Subcellular location of PSTV-RNA and the question of whether virions exist in extracts or *in situ*. *Virology*, **43**, 75-89.
- Diener, T. O. (1972). Potato spindle tuber viroid VIII. Correlation of infectivity with a UV-absorbing component and thermal denaturation properties of the RNA. *Virology* **50**, 606-609.
- Diener, T. O. (1999). Viroids and the nature of viroid diseases. *Arch. Virol. [Suppl]* **15**, 203-220.
- Flores, R., Randles, J. W., Bar-Joseph, M. & Diener, T. O. (2000a) Viroids. In *Virus Taxonomy, 7th Rep. Intern. Com. Taxon. Viruses* (van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. & Wickner, R. B., eds) pp. 1009-1024, Academic Press, San Diego.
- Flores, R., Daròs, J. A., & Hernández. C. (2000b). The *Avsunviroidae* family: Viroids with hammerhead ribozymes. *Adv. Virus Res.* **55**, 271-323.
- Forster, A. C., Davies, C., Hutchins, C. J. & Symons, R. H. (1990). Characterization of self-cleavage of viroids and virusoid RNAs. *Methods Enzymol.* **181**, 583-607.
- Gross, H. J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H. & Sängner, H. L. (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* **273**, 203-208.
- Hall, T. C., Wepprich, R. K., Davies, J. W., Weathers, L. G., & 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.
- Harders, J., Lukacs, N., Robert-Nicoud, M., Jovin, J. M. & 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.
- Hernández, C. & Flores, R. (1992). Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3711-3715.

- Hertel, K. J., Pardi, A., Uhlenbeck, O. K., Koizumi, M., Ohtsuka, E., Uesugi, S., Cedergren, R., Eckstein, F., Gerlach, W. L., Hodgson, R. & Symons, R. H. (1992). Numbering system for the hammerhead. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3252.
- Heus, H. A. & Pardi, A. (1991). Structural features that give rise to the unusual stability of RNA hairpins containing GNRA loops. *Science* **253**, 191-194.
- Horst, R. K. (1975). Detection of a latent infectious agent that protects against infection by chrysanthemum chlorotic mottle viroid. *Phytopathology* **65**, 1000-1003.
- Horst, R. K. (1987). Chrysanthemum chlorotic mottle. In *The Viroids* (Diener, T. O. ed.), pp. 291-295, Plenum, New York.
- Hutchins, C., Rathjen, P. D., Forster, A. C., & Symons, R. H. (1986). Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res.* **14**, 3627-3640.
- Lima, M. I., Fonseca, M. E. N., Flores, R. & Kitajima, E. W. (1994). Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by *in situ* hybridization. *Arch. Virol.* **138**, 385-390.
- Miller, W. A., Hercus, T., Waterhouse, P. M. & Gerlach, W. L. (1991). A satellite RNA of barley yellow dwarf virus contains a novel hammerhead structure in self-cleavage domain. *Virology* **183**, 711-720.
- Miller, E. D., Plante, C. A., Kim, K.-H., Brown, J. W. & Hemenway, C. (1999). Stem-loop structure in the 5' region of potato virus X genome required for plus strand RNA accumulation. *J. Mol. Biol.* **284**, 591-608.
- Miller, E. D., Kim, K.-H., & Hemenway, C. (1999). Restoration of a stem-loop structure required for potato virus X accumulation indicates selection for a mismatch and a GNRA tetraloop. *Virology* **260**, 342-353.
- Navarro, B. & Flores, R. (1997). Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: Unusual structural properties of a subgroup of viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11262-11267.
- Navarro, J. A., Daròs, J. A. & Flores, R. (1999). Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: Identification in chloroplasts and characterization. *Virology* **253**, 77-85.
- Olsthoorn, R. C. L., Licitis, N. & Van Duin, J. (1994). Leeway and constraints in the forced evolution of a regulatory RNA helix. *EMBO J.* **13**, 2660-2668.
- Owens, R. A., Steger, G., Hu, Y., Fels, A., Hammond, R. W., & Riesner, D. (1996). RNA structural features responsible for potato spindle tuber viroid pathogenicity. *Virology* **222**, 144-158.
- Pallás, V., Navarro, A. & Flores, R. (1987). Isolation of a viroid-like RNA from hop different from hop stunt viroid. *J. Gen. Virol.* **68**, 2095-2102.
- Reanwarakorn, K. & Semancik, J. S. (1998). Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. *J. Gen. Virol.* **79**, 3163-3171.
- Romaine, C. P. & Horst, R. K. (1975). Suggested viroid etiology for chrysanthemum chlorotic mottle disease. *Virology* **64**, 86-95.
- Schmitz, A. & Riesner, D. (1998). Correlation between bending of the VM region and pathogenicity of different potato spindle tuber viroid strains. *RNA* **4**, 1295-1303.

- Schnölzer, M., Haas, B., Ramm, K., Hofmann, H. & Sänger, H. L. (1985). Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTV). *EMBO J.* **4**, 2181-2190.
- Selinger, D., Xiubei, L. & Wise, J. A. (1993). Functional interchangeability of the structurally similar tetranucleotide loops GAAA and UUCG in fission yeast signal recognition particle RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5409-5413.
- Semancik, J. S. & Szychowski, J. A. (1994). Avocado sunblotch disease: A persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *J. Gen. Virol.* **75**, 1543-1549.
- Semancik, J. S., Conejero, V., & Gerhart, J. (1977). Citrus exocortis viroid: Survey of protein synthesis in *Xenopus laevis* oocytes following addition of viroid RNA. *Virology* **80**, 218-221.
- Spiesmacher, E., Mühlbach, H. P., Schnolzer, M., Haas, B. & Sänger, H. L. (1983). Oligomeric forms of potato spindle tuber viroid (PSTV) and of its complementary RNA are present in nuclei isolated from viroid-infected potato cells. *Biosci. Rep.* **3**, 767-774.
- Symons, R. H. (1981). Avocado sunblotch viroid: Primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Res.* **9**, 6527-6537.
- Visvader, J. E. & Symons, R. H. (1986). Replication of *in vitro* constructed viroid mutants: Location of the pathogenicity-modulating domain in citrus exocortis viroid. *EMBO, J.* **13**, 2051-2055.
- Woese, C. R., Winker, S. & Gutell, R. R. (1990). Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra- loops". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8467-8471.
- Woo, Y.-M., Itaya, A., Owens, R. A., Tang, L., Hammons, R. W., Chou, H.-C., Lai, M. M. C. & Ding, B. (1999). Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *Plant J.* **17**, 627-635.





## CAPÍTULO III





## An Extra Nucleotide in the Consensus Catalytic Core of a Viroid Hammerhead Ribozyme: Implications for the Design of More Efficient Ribozymes<sup>1</sup>

MARCOS DE LA PEÑA, AND RICARDO FLORES

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Avenida de los Naranjos s/n, Valencia 46022, Spain*

### ABSTRACT

Hammerhead ribozymes catalyze self-cleavage of oligomeric RNAs generated in replication of certain viroid and viroid-like RNAs. Previous studies have defined a catalytic core conserved in most natural hammerheads, but why some present deviations from the consensus, is unknown. We have addressed this issue in chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd), whose (+) hammerhead has an extra A (A10) between the conserved A9 and the quasi-conserved G10.1. Effects of insertions at this position on hammerhead kinetics have not hitherto been examined. A10 caused a moderate decrease of the *trans*-cleaving rate constant with respect to the CChMVd (+) hammerhead without this residue, whereas A10→C and A10→G substitutions had major detrimental effects, likely because they favor catalytically inactive foldings. By contrast, A10→U substitution induced a 3-4-fold increase of the rate constant, providing an explanation for the extra U10 present in two natural hammerheads. Because A10 also occupies a singular and indispensable position in the global CChMVd conformation, as revealed by bioassays, these results show that some hammerheads deviate from the consensus due to the involvement of certain residues in critical function(s) other than self-cleavage. Incorporation of the extra U10 into a model hammerhead also caused a similar increase in the rate constant, providing data for a deeper understanding of the hammerhead structural requirements and for designing more efficient ribozymes.

<sup>1</sup> Published in *J. Biol. Chem.*, **276**, 34586-34593 (2001)

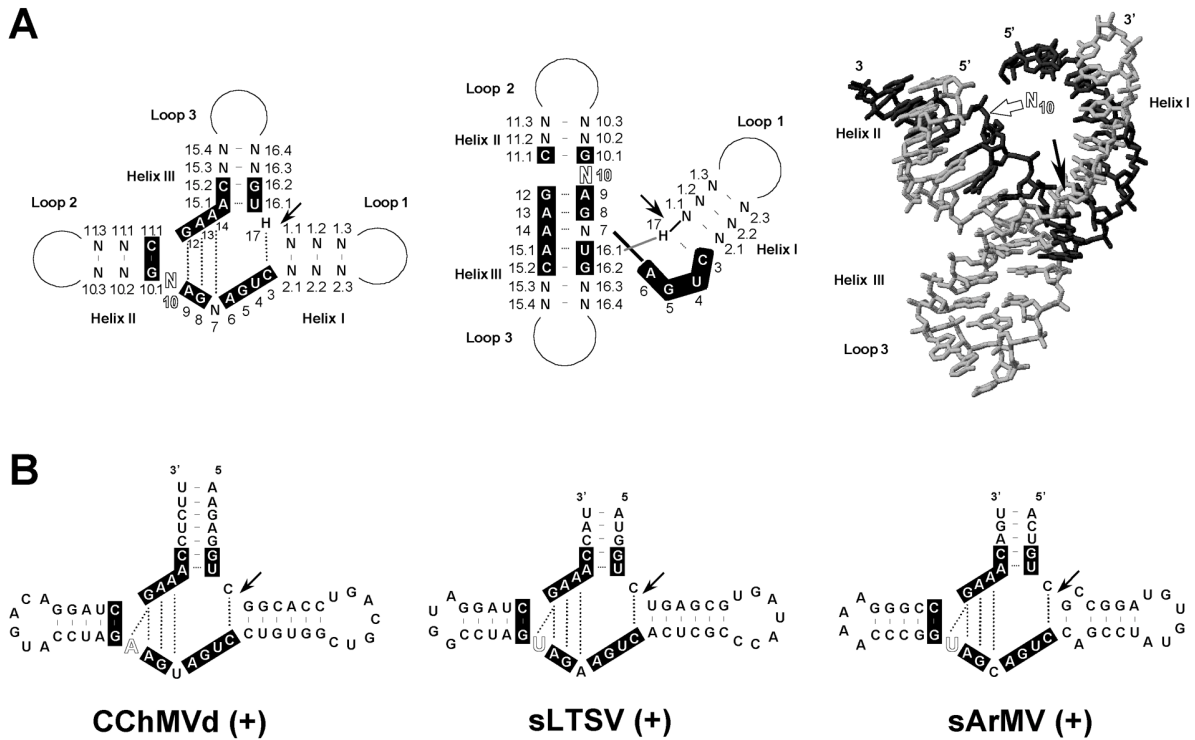
## INTRODUCTION

Viroids, subviral circular RNAs of 247-401 nucleotides, are the smallest autonomous replicons (1, 2). This minimal size imposes severe restrictions onto viroid genomes to accommodate a series of functions critical to their life cycle which include host selection, long distance and cell-to-cell movement, and targeting to specific subcellular organelles –nuclei or chloroplasts– where they replicate and accumulate. All these functions must result from the direct interaction of the viroid RNA, or some of its replicative intermediates, with cellular factors because the available evidence indicates that viroids do not code for proteins (3, 4, 5). Genetic information, therefore, must be extremely compressed and even overlapping in viroids.

Viroids replicate through a rolling-circle mechanism in which the infecting most abundant monomeric circular RNA, assumed by convention to have the (+) polarity, is successively transcribed into oligomeric (-) and (+) strands that are then excised into the linear monomeric forms and circularized to produce the progeny (6, 7). This is an RNA-based mechanism (8), and depending on whether or not the (-) oligomeric intermediates are cleaved and ligated to their corresponding monomeric circular counterparts, which then serve as the initial template for the second half of the cycle, the mechanism is considered to be symmetric or asymmetric, respectively (9). Due to the lack of messenger activity of viroid RNAs, the whole replication process should be in principle catalyzed by host enzymes. However, in *Avocado sunblotch viroid*, ASBVd (10, 11), *Peach latent mosaic viroid*, PLMVd (12) and *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, CChMVd (13), which together form the family *Avsunviroidae* (14), the cleavage step is autocatalytic and mediated by hammerhead structures that can be adopted by the strands of both polarities. Consequently, these three viroids are considered to replicate following the symmetric rolling-circle mechanism. In line with this view, the monomeric (-) circular RNA has been identified in ASBVd-infected avocado (15, 16, 17) and in PLMVd-infected peach (18). The rest of 25 viroid species, which make up the family *Pospiviroidae* (2), are assumed to follow the asymmetric rolling-circle mechanism because the oligomeric forms are the predominant (-) strands accumulating in tissues infected by representative members of this family, whereas the monomeric (-) circular RNA has not been identified (9, 19, 20). Cleavage of the oligomeric (+) RNA intermediates in family *Pospiviroidae* is generally believed to require a host ribonuclease (21, 22), although the possibility that the cleavage step is RNA-catalyzed in all cases has been also advanced (23).

The hammerhead ribozyme is a small RNA motif able to self-cleave at a specific phosphodiester bond in the presence of a divalent metal ion, generally  $Mg^{2+}$ , and under mild temperature and pH conditions, producing 2',3' cyclic phosphate and 5' hydroxyl termini (11, 24, 25). Structural dissection of the 23 natural hammerhead structures reported so far (see for a review 26), shows a central core composed of 11 strictly conserved nucleotides flanked by three double-helix regions (I, II and III) with loose sequence requirements except positions 10.1 and 11.1, which

in most cases form a G-C pair, and positions 15.2 and 16.2, which in most cases form a C-G pair (Fig. 1A). Site-directed mutagenesis has revealed that the conserved residues play a critical role in determining the rate constant of cleavage (27), and analysis by X-ray crystallography has uncovered a complex array of non canonical interactions between the residues forming the central core (28, 29), prominent among which are three non Watson-Crick pairs (involving A9 and G12, G8 and A13, and U7 and A14) that extend helix II (Fig. 1A).



**Fig. 1. Representations of the hammerhead structure.** A, Schematic illustration showing the strictly or highly conserved residues in natural hammerheads in a black background (H = A, U or C, and N = any residue). Numbering is based on the standard criterion for the consensus hammerhead (54) with the exception of the position between the highly conserved residues A9 and G10.1, which was not previously considered and is referred here as number 10 (outlined font). Canonical and non canonical pairs are indicated by continuous and broken lines, respectively (left). An alternative schematic representation based on the three-dimensional structure derived from X-ray crystallography (28, 29) (center). A more detailed spatial view of the complex of a hammerhead ribozyme (black) and its substrate (gray) in the I/II format (29) (right). B, Structure of three natural hammerhead structures containing an extra residue at position 10 that is an A in the CChMVd (+) RNA (left), and a U in the sLTSV and sArMV (+) RNAs (center and right, respectively). The alternative interactions that the extra residue could potentially form with G12 are indicated. Arrows indicate self-cleavage sites.

However, deviations from the consensus hammerhead core have been observed in some natural hammerhead structures. This is the case of the CChMVd (+) hammerhead structure which is peculiar in having an extra A inserted between the strictly conserved A9 and the highly conserved G10.1 residues (13). These two residues are contiguous in all known natural hammerhead structures except in those of (+) strands of satellite RNAs of *Lucerne transient streak virus* (sLTSV) (25) and *Arabis mosaic virus* (sArMV) (30), in which an extra U exists at the same

position (Fig. 1B), and in those of (+) strand of satellite RNA of *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (sCYDV-RPV) (31, 32) and (-) strand of the *Carnation small viroid-like RNA* (CarSV) (33), in which the extra residue is a C. In the two latter hammerhead structures the extra C is accompanied by an extra A inserted between the highly conserved C11.1 and the strictly conserved G12 residues.

The observation that natural selection has allowed an extra residue between positions A9 and G10.1 in a significant number of natural hammerhead structures is intriguing and raises the question of whether this could provide some adaptative advantage to the corresponding RNAs. A plausible explanation is that the extra residue might be also involved in determining a functional property other than self-cleavage and, on this basis, be preserved. Here we have put this hypothesis to the test using the CChMVd/chrysanthemum system, which is very suitable for this purpose because recombinant plasmids containing dimeric head-to-tail viroid cDNA inserts, or *in vitro* transcripts thereof, are infectious and incite symptoms in a relatively short time (12-15 days) (13). Moreover, although an extra residue between positions 9 and 10.1 is compatible with extensive self-cleavage during *in vitro* transcription and after purification (13, 25, 34), a kinetic analysis of the effects of mutations in this particular position on the corresponding rate constants of cleavage is lacking, in spite of the ample biochemical and biophysical analyses to which the hammerhead ribozyme has been subjected (35, 36). We have addressed this second issue with a *trans*-acting hammerhead structure derived from the CChMVd (+) RNA and then by extending the analysis to a well-known model hammerhead structure. Our results show that the nature of the extra residue between positions A9 and G10.1 has profound effects on viroid infectivity and on hammerhead-mediated RNA cleavage, leading in some cases to a significant increase in the catalytic efficiency of the ribozyme.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

***cDNA synthesis, Cloning and Sequencing.*** Circular forms of the CChMVd, purified by two consecutive PAGE steps, were reverse transcribed and PCR-amplified with primers RF-146, complementary to nt 133-108, and RF-147 homologous to nt 134-159 of the CM5 reference sequence of CChMVd (37; see also Fig. 2). Reverse transcription, PCR amplification and cloning were as before (13). Inserts were sequenced with an ABI PRISM DNA apparatus (Perkin Elmer).

***Site-directed Mutagenesis of CChMVd.*** The protocol reported previously (38) was followed with minor modifications. The recombinant plasmid pCM5 (5 ng), containing a monomeric insert of the CChMVd reference sequence (13), was PCR-amplified with *Pfu* DNA polymerase and 500 ng each of the phosphorylated primers RF-142 (5'-CATGGATC**V**TCATCAGGACACACCGAC-3'), complementary to nucleotides 11 to 35 of the CM5 sequence (except the residue in bold that was degenerated to change the A27, corresponding to A10 in the CChMVd plus hammerhead, into

C, G or U), and RF-134 (5'-ACAGGATCGAAACCTCTTCCAGTT-3'), homologous to nucleotides 36 to 59 (Fig. 2). Plasmid pCM5 was also PCR-amplified with the phosphorylated primers RF-133 (5'-CATGGATCTCATCAGGACACACCGAC-3'), complementary to nucleotides 11 to 35 of the CM5 sequence (except in the position corresponding to A27 that was deleted) and RF-134. The PCR products were electrophoretically separated in 1% agarose gels and those of plasmid length were eluted and circularized with T4 DNA ligase. After transformation, the inserts of the new plasmids pCM5-C10, pCM5-G10, pCM5-U10 and pCM5- $\Delta$ 10, were sequenced to confirm that only the expected mutations had been introduced. From these constructs, plasmids pCM5d, pCM5d-C10, pCM5d-G10, pCM5d-U10 and pCM5d- $\Delta$ 10, containing the corresponding head-to-tail dimeric inserts, were generated following standard protocols.

***Infectivity Bioassays and Detection of Viroid RNA.*** Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelez, cv. "Bonnie Jean") was propagated in growth chambers (13). Plants were mechanically inoculated either with the recombinant plasmids pCM5d, pCM5d-C10, pCM5d-G10, pCM5d-U10 and pCM5d- $\Delta$ 10 (2  $\mu$ g of plasmid per plant), or with their monomeric CChMVd RNAs (0.1  $\mu$ g of RNA per plant) resulting from self-cleavage during *in vitro* transcription. CChMVd replication in the inoculated plants was analyzed by dot-blot hybridization following extraction of leaves with buffer-saturated phenol and chromatography on non ionic cellulose (CF11, Whatman) (37).

***Self-cleavage During in Vitro Transcription of CChMVd RNAs.*** The recombinant plasmids pCM5, pCM5-C10, pCM5-G10, pCM5-U10 and pCM5- $\Delta$ 10, were linearized with *Bam*HI and *in vitro* transcribed with T3 RNA polymerase (39). The primary transcripts and their self-cleavage products were separated by PAGE in 5% gels containing 8 M urea and 40% formamide that were quantitatively scanned with a bioimage analyzer (Fuji BAS1500).

***Synthesis of Ribozymes and Substrates.*** Ribozymes with the sequence of the CChMVd (+) hammerhead from positions 14 to 53 of the CM5 reference sequence (Fig. 2) and mutants thereof at position 27, which corresponds to position A10 of the hammerhead (Fig. 4), were synthesized by *in vitro* transcription of *Xba*I-linearized plasmids containing these sequences immediately preceded and followed by the T7 promotor and the *Xba*I site, respectively. Transcription reactions (50  $\mu$ l) contained: 40 mM Tris-HCl, pH 8, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermine, 10 mM dithiothreitol, 2 mM each of ATP, CTP, GTP and UTP, 2 U/ $\mu$ l of human placental ribonuclease inhibitor, 20 ng/ $\mu$ l of plasmid DNA and 4 U/ $\mu$ l of T7 RNA polymerase. After incubation at 37° C for 1 h, transcription products were separated by PAGE in 15% denaturing gels and those with the expected length were eluted, recovered by ethanol precipitation and resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. The model hammerhead ribozyme HH8 (Fig. 6) and its mutants at position 10 of the hammerhead were also prepared by *in vitro* transcription following the same protocol. Substrate RNAs (5'-

AAGAGGUCGGCACC-3') and (5'-GAAUGUCGGUCG-3') for the CChMVd (+) and the HH8 hammerheads, respectively (Fig. 4 and 6), were obtained by chemical synthesis using 2'-orthoester protection (Dharmacon Research, Boulder, CO) and sequentially deprotected with 0.2 M acetic acid and Tris-HCl, pH 8.7. After purification by PAGE in 20% denaturing gels, the substrate RNAs were eluted and labelled at their 5' termini using [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP (Amersham, 3000 Ci/mmol) and T4 polynucleotide kinase (40).

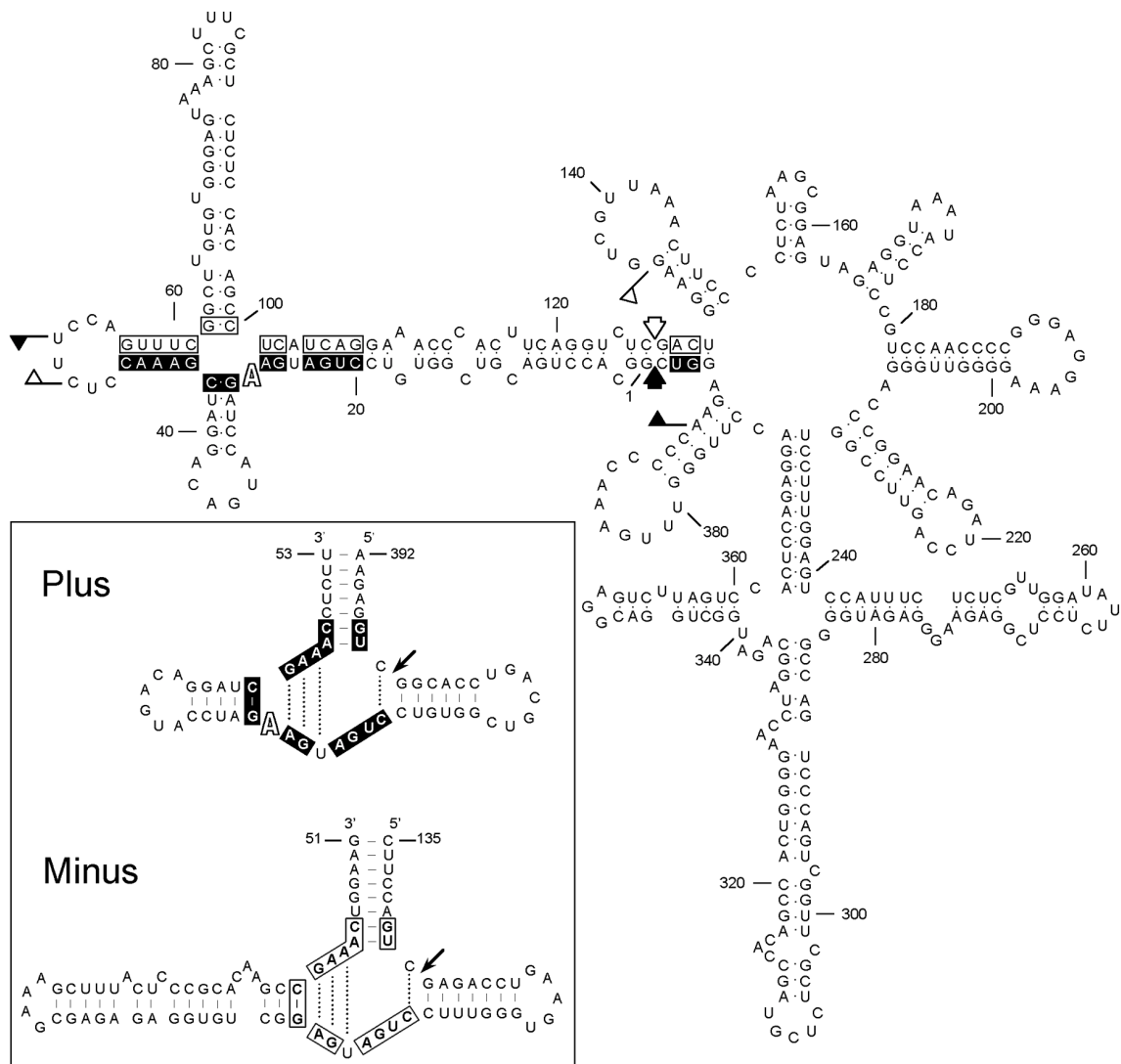
**Cleavage Kinetics.** Single turnover experiments with excess ribozyme (covering a range from 100 to 1000 nM in different experiments in order to assure saturating conditions) and trace  $^{32}$ P-labelled substrate (less than 1 nM) were used to determine the rate constant of cleavage (41). Cleavage reactions were carried out in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> at 25°C as described previously (42). The ribozyme and substrate were firstly annealed in Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, by heating at 95°C for 1 min and slowly cooling down to 25°C for 15 min. Reactions were initiated by adding MgCl<sub>2</sub> to a final concentration of 10 mM. Aliquots were removed at appropriate time intervals and quenched with a 5-fold excess of stop solution (8 M urea, 50% formamide, 50 mM EDTA, 0.1% xylene cyanol and bromphenol blue dyes) at 0°C. Substrate and product from each time point were separated by PAGE in 20% denaturing gels. The fraction of product at different times  $F$  was determined by radioactivity quantitation of the corresponding gel bands with a bioimage analyzer and fitted to the equation  $F = F_{\infty} (1 - e^{-kt})$ , where  $F_{\infty}$  is the fraction of product at the endpoint of the reaction and  $k$  the first order rate constant of cleavage ( $k_{\text{cat}}$ ). In the case of the HH8 hammerhead, cleavage rates were also measured under multiple turnover conditions (43) using at least six different substrate concentrations, ranging from 50 to 1000 nM, in excess over those of the ribozyme (from 10 to 40 nM depending on the catalytic activity of the ribozyme). Reactions were initiated by mixing at 25°C the ribozyme (15  $\mu$ l) and the substrate (15  $\mu$ l) previously heated at 95°C for 1 min in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Aliquots were removed as before and data were fitted to Eadie-Hofstee plots to obtain the values for  $k_{\text{cat}}$  and  $K_m$ . The errors reported for kinetic parameters were obtained from triplicate experiments with different preparations of RNA.

## RESULTS

**The Role in Infectivity of the Extra Residue Found in the Catalytic Core of the CChMVd (+) Hammerhead Structure.** Hereafter, we will refer to the position occupied by the extra A in the CChMVd (+) hammerhead structure, and by any other residue in this or in other hammerhead structures, as position number 10 considering that it is located between the strictly conserved A9 and the highly conserved G10.1 in the consensus hammerhead structure (Fig. 1 and 2). The extra A10 of the CChMVd (+) hammerhead structure also holds a special place in the branched



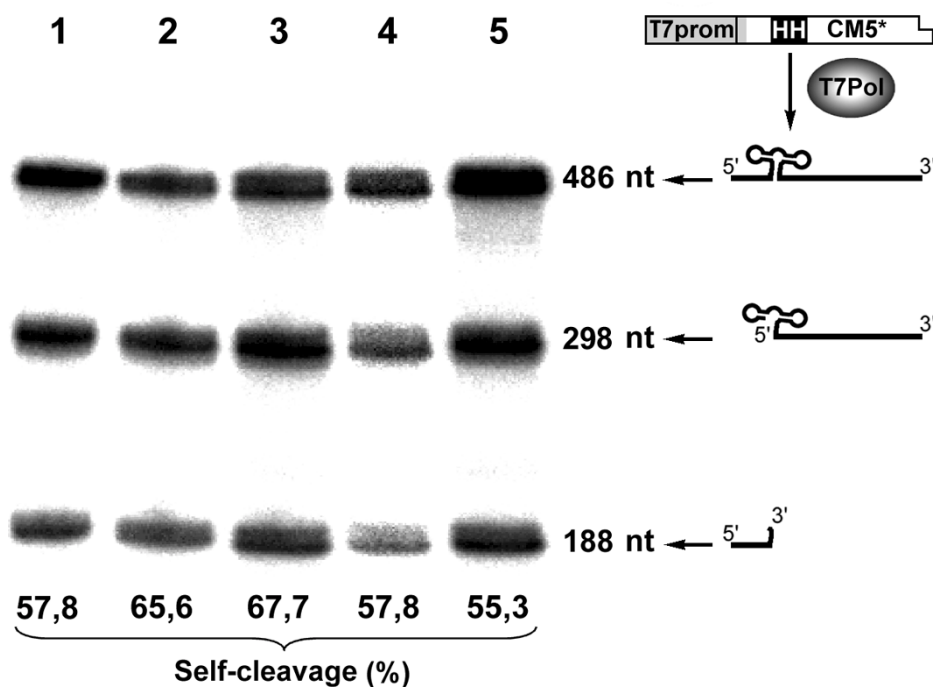
secondary structure of lowest free energy predicted for the (+) strand of this viroid (position A27 in the genomic reference sequence of CChMVd), connecting two helices of a cruciform domain (Fig. 2). It is worth noting that the *in vivo* significance of this proposed branched conformation, which is inactive for self-cleavage, is strongly supported by the analysis of the sequence heterogeneity found in more than 100 natural CChMVd variants, because the observed changes are located in loops or when affecting a base pair the substitutions are compensatory, and also because no variability has been observed at this particular position A27 (13; 37, our unpublished data). In the interest of simplicity and to avoid any confusion that would result from referring to the same residue with two numbers, 10 in the CChMVd (+) hammerhead and 27 in the genomic reference sequence, we will only use the first number.



**Fig. 2. Predicted secondary structure of lowest free energy of the CChMVd plus RNA** (reference variant CM5, adapted from 13 with minor modifications). The existence of a pseudoknot between the residues around positions 220 and 260 has been suggested by comparison with the situation found in PLMVd (55). Plus and minus self-cleavage domains are delimited by flags, residues conserved in most natural hammerhead structures are within boxes, and the self-cleavage sites are indicated by arrows. Black and white backgrounds in flags, boxes and arrows refer to plus and minus polarities, respectively. *Inset*, Hammerhead structures of the plus and minus strands of CChMVd. Residues conserved in most natural hammerhead structures are on black and white backgrounds in the plus and minus polarities, respectively, and the self-cleavage sites are denoted by arrows. Outlined fonts indicate the position of the extra A in the CChMVd secondary structure and in its plus hammerhead structure. Other details as in the legend to Fig. 1.

To determine whether the extra A10 plays any role in infectivity, chrysanthemum plants were inoculated with recombinant plasmids containing dimeric tandem inserts of CChMVd cDNA with all possible mutations at this position introduced by site-directed mutagenesis. Ten days later only those control plants inoculated with the plasmid containing the wild-type CChMVd cDNA (pCM5d-A10) developed the characteristic symptoms of the chlorotic mottle disease. All plants inoculated with plasmids containing the substitutions A10→C and A10→U (pCM5d-C10 and pCM5d-U10, respectively) showed symptoms 15-20 days post inoculation, but only two of the four plants inoculated with pCM5d-G10, containing the substitution A10→G, displayed the typical symptoms 25 days post inoculation. Interestingly, none of the plants inoculated with the plasmid not containing A10 (pCM5d-Δ10) developed symptoms during the observation period (up to three months). Analysis by dot-blot hybridization confirmed that the inoculated plants showing symptoms were indeed infected, whereas no signal was observed in those remaining symptomless (data not shown). These experiments were repeated twice with similar results. When the inoculations were performed with the monomeric CChMVd RNAs resulting from self-cleavage during *in vitro* transcription of the dimeric cDNA inserts, symptoms induced by RNAs with the substitutions A10→C, A10→U and A10→G, appeared with only a short delay (1-2 days) with respect to those induced by the wild-type RNA, but again none of the plants inoculated with the RNA without A10 developed symptoms and dot-blot hybridization confirmed that they had not been infected. RT-PCR amplifications of viroid progenies from the infected chrysanthemum plants and sequencing of the resulting full-length clones (from 5 to 9 for each construct) revealed that the three substitutions at position 10 had reverted to the original A10 in all cases. Altogether, these results demonstrate that the A10 residue is indispensable for infectivity. CChMVd sequences with substitutions at this position are less infectious most likely because they have to revert to the wild-type, whereas the reversion does not occur when this residue is deleted. The higher infectivity of CChMVd RNAs when compared with their cDNAs is not surprising considering that the latter must be recognized and transcribed by a host RNA polymerase before entering into the standard RNA-RNA replication cycle.

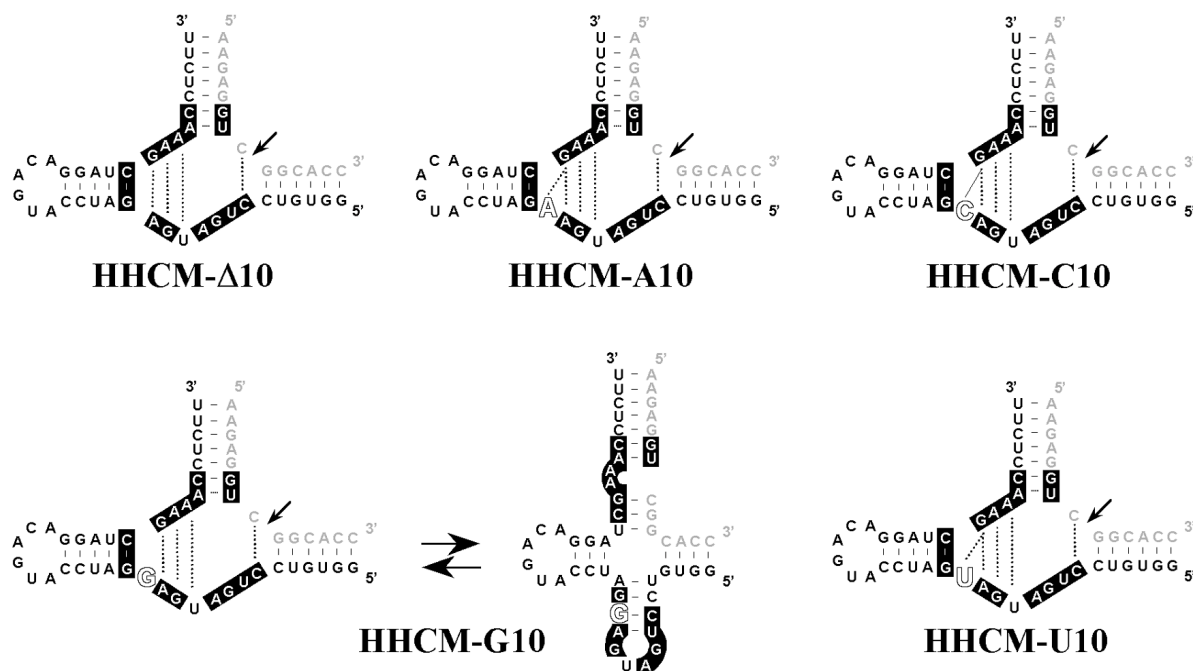
**In Vitro Self-cleavage of the Monomeric CChMVd (+) RNA and of its Four Mutants at Position A10.** To initially assess the effect of the extra A10 residue on the catalytic activity of the CChMVd (+) hammerhead structure, we determined the extent of self-cleavage of CChMVd (+) RNAs transcribed from five recombinant plasmids containing monomeric inserts with the wild-type CChMVd sequence (pCM5-A10), with the three possible substitutions at this position (pCM5-C10, pCM5-G10 and pCM5-U10) and with the A10 deleted (pCM5-Δ10). The extent to which the five RNAs self-cleaved during transcription ranged from approximately 55% (the wild-type RNA and those with the changes A10→U and A10→G) to 65% (the A10→C and A10→Δ RNAs) (Fig. 3).



**Fig. 3. Self-cleavage during *in vitro* transcription of CChMVd (+) RNAs.** *Left*, Analysis by denaturing PAGE (6%) of the wild-type containing an extra A10 in the hammerhead structure (lane 1), and of the mutant RNAs with this extra residue deleted (lane 2), and substituted by C, G or U (lanes 3 to 5, respectively). The extension of self-cleavage was quantitated with a bioimage analyzer and is indicated below each lane. *Right*, it is shown a schematic representation of the recombinant plasmids serving as templates, and of the primary transcripts and the self-cleavage fragments resulting thereof with their size in nucleotides (in the case of lane 2 the primary transcript and the 3' fragment are one residue shorter than indicated).

When the uncleaved monomeric transcripts were purified and incubated under standard self-cleavage conditions (39), the differences were even smaller with the extent of self-cleavage varying between 65 and 70% (data not shown). Although these experiments seemed to suggest that the extra A10 does not play a major role in the catalytic efficiency of the CChMVd (+) hammerhead structure, the extent of self-cleavage measured using full-length CChMVd (+) transcripts and only one reaction time was probably too rough an estimate for this aim. Therefore, we decided to re-examine this question using a more accurate approach.

**Trans-cleavage Kinetics of the Minimal CChMVd (+) Hammerhead Structure and of its Four Mutants at Position 10.** Since the observed self-cleavage could be influenced by either vector or viroid sequences external to the hammerhead structure, or even by the cloning site of the viroid cDNA and by some of the components present in the *in vitro* transcription reaction, a kinetic analysis under protein-free conditions of the minimal CChMVd (+) hammerhead structure in the well-known I/III *trans* format (35) (Fig. 4), was performed. The substrate was the same in all cases, whereas the ribozyme contained the wild-type sequence of CChMVd (+) hammerhead structure and the mutants A10→Δ, A10→C, A10→G and A10→U. The cleavage rate constants for these



**Fig. 4. Ribozyme and substrate complexes derived from the CChMVd (+) hammerhead structure.** Ribozymes and substrates are in black and gray letters, respectively. Residues conserved in most natural hammerhead structures are on a black background and the self-cleavage sites are denoted by arrows. HHCM-10 refers to the wild-type hammerhead structure containing an extra A10 (outlined font), and HHCM-10, HHCM-C10, HHCM-G10 and HHCM-U10 refer to the mutant forms with the extra A10 deleted and substituted by a C, G or U residue (outlined fonts), respectively. The extra A10, C10 and U10 residues could potentially interact with G12, distort the catalytic core and reduce the corresponding rate constants. In the case of HHCM-G10, an alternative catalytically inactive complex is also presented. Other details as in the legend to Fig. 1.

hammerheads were determined under standard conditions (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, at 25°C), using trace concentrations of substrate (<1nM) and concentrations of ribozyme between 100 and 1000 nM (single turnover kinetics).

The value obtained for the rate constant of the hammerhead ribozyme with the consensus core sequence (A10→Δ) was approximately 1 min<sup>-1</sup> (Fig. 5), in full agreement with those reported under the same conditions for other hammerhead ribozymes with the same consensus core sequence (35). The wild-type ribozyme with the extra A10 exhibited a slightly decreased rate constant, whereas those of the ribozymes with the changes A10→C and A10→G were considerably reduced (Fig. 5). These comparatively low values could result from the extra C10 forming a Watson-Crick pair with the conserved G12, impeding the non canonical interaction formed by this residue with the conserved A9 in the active catalytic folding (28, 29), and the extra G10 favouring the adoption of an alternative (catalytically inactive) ribozyme-substrate complex involving the conserved or quasi-conserved residues at positions 4 to 9 of the consensus hammerhead structure (Fig. 4). Unexpectedly, the ribozyme with the A10→U substitution showed a rate constant approximately 3-fold higher than that corresponding to the hammerhead ribozyme with the consensus core sequence

(Fig. 5), indicating that this substitution not only does not affect negatively self-cleavage but even favors it.

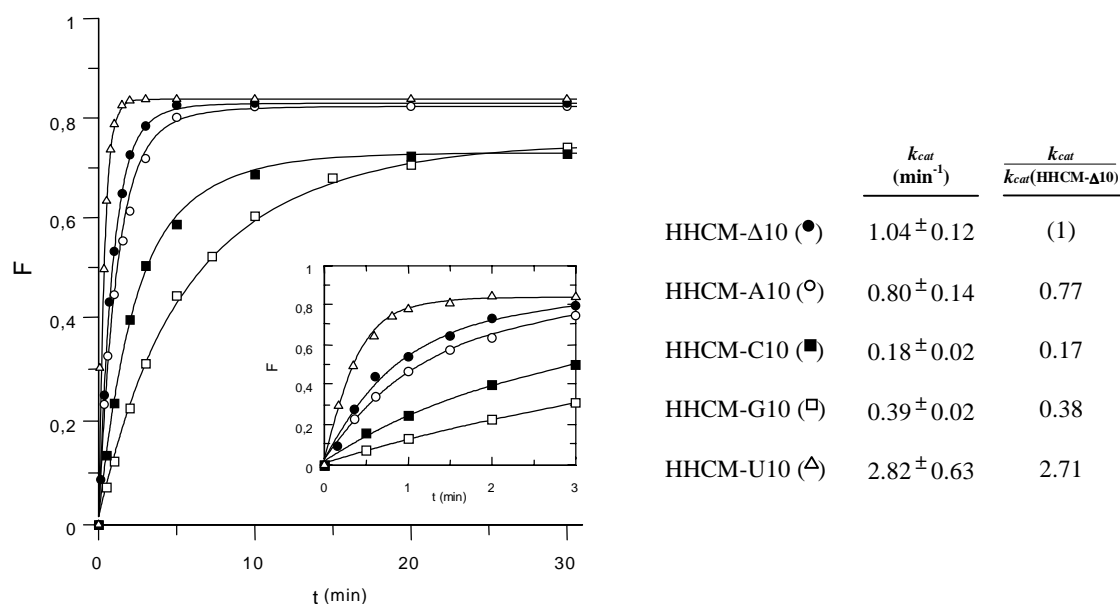
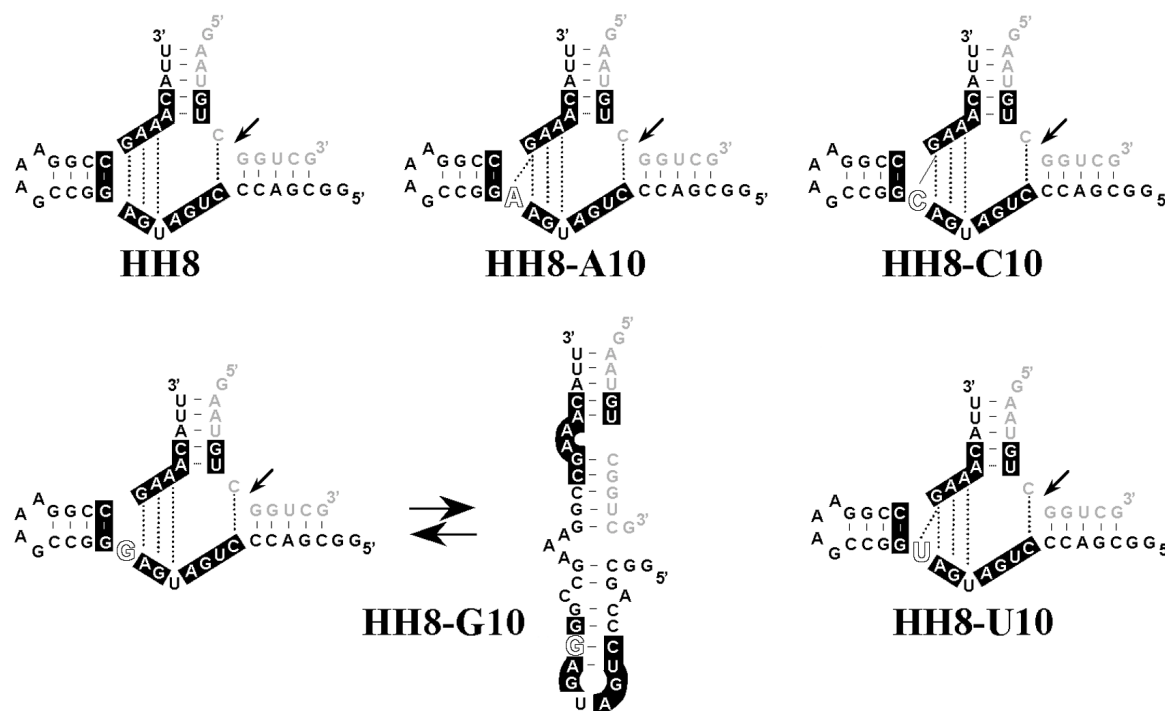


Fig. 5. **Representative cleavage kinetics experiments using the hammerhead ribozymes derived from the CChMVd (+) hammerhead structure.** The experiments were performed under single turnover conditions with a large excess of ribozyme (1000 nM) and trace amounts of substrate (less than 1 nM). HHCM-A10 refers to the wild-type hammerhead structure (containing an extra A10), and HHCM- $\Delta$ 10, HHCM-C10, HHCM-G10 and HHCM-U10 refer to the mutant forms with the extra A10 deleted and substituted by a C, G or U residue, respectively. The fraction of product at different times (F) was determined by radioactivity quantitation of the corresponding gel bands with a bioimage analyzer and fitted to the equation  $F = F_{\infty} (1 - e^{-kt})$ , where  $F_{\infty}$  is the fraction of product at the endpoint of the reaction and  $k$  the first order rate constant of cleavage ( $k_{cat}$ ). The *inset* displays the first 3 min for each experiment. The mean values obtained for the rate constants of the five hammerheads and the normalized values with respect to that of the HHCM- $\Delta$ 10 hammerhead are shown at the right.

**Effects of an Extra Residue at Position 10 on the Trans-cleavage Kinetics of a Model Hammerhead Ribozyme.** There is the possibility that the results observed for the minimal CChMVd (+) hammerhead structure and its mutants, particularly the increase in the rate constant of the variant with the substitution A10 $\rightarrow$ U, could be a peculiarity of this specific ribozyme. To address this question, the *trans*-cleavage rate constants were determined again but using a model hammerhead structure (HH8, format I/III) (Fig. 6), which earlier analyses have shown to exhibit a canonical kinetic behavior (35 and references therein). Moreover, the HH8 hammerhead has helices I and II shorter than those of the CChMVd (+) hammerhead. The cleavage rate constants were determined under the same standard conditions indicated in the previous section and also with an excess of the ribozyme over the substrate (single turnover kinetics). The rate constant obtained for the HH8 ribozyme with the consensus core sequence (without an extra residue at position 10), was  $1.5 \text{ min}^{-1}$  (Fig. 7), in consonance with the  $1.4 \text{ min}^{-1}$  value reported previously for this same hammerhead (42). The rate constant of the HH8 ribozyme with an extra A10 was slightly lower,

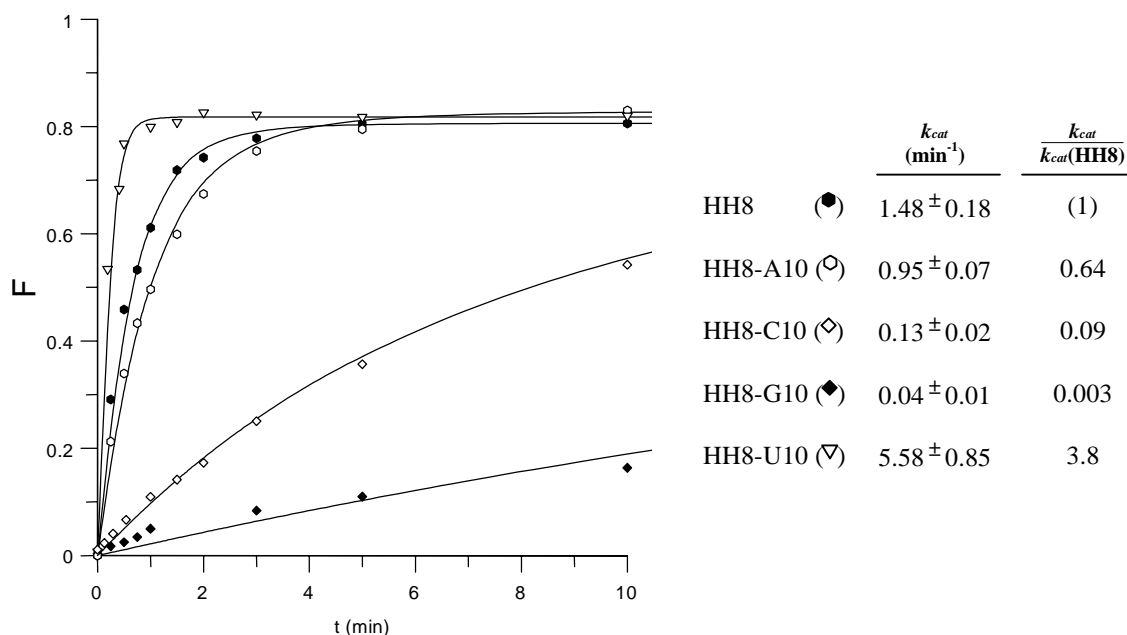
whereas the reduction observed in the corresponding values for the HH8 ribozymes with an extra C10 or G10 was considerably more pronounced, specially in this latter case which displayed some anomalous kinetic behaviour (Fig. 7). Interestingly, the rate constant of the HH8 ribozyme containing an extra U10 was almost 4-fold higher than its HH8 counterpart with the consensus core sequence. Collectively, the results confirmed those obtained with the CChMVd (+) hammerhead structure and showed that an extra U10 has a clear beneficial effect on the catalytic efficiency of the hammerhead ribozyme.



**Fig. 6. Ribozyme and substrate complexes derived from the HH8 hammerhead structure.** Ribozymes and substrates are in black and gray letters, respectively. Residues conserved in most natural hammerhead structures are on a black background and the self-cleavage sites are denoted by arrows. HH8 refers to the consensus hammerhead structure (without a residue at position 10), and HH8-A10, HH8-C10, HH8-G10 and HH8-U10 refer to the mutant forms with an extra A10, C10, G10 and U10 residues (outlined fonts), respectively. The extra A10, C10 and U10 residues could potentially interact with G12, distort the catalytic core and reduce the corresponding rate constants. In the case of HH8-G10 an alternative catalytically inactive complex is also presented. Other details as in the legend to Fig. 1.

To provide further support in this direction, the experiments were also performed under multiple turnover conditions. Once again, the rate constant obtained for the HH8 ribozyme with the consensus core sequence (Table I) agreed well with the value reported previously for this ribozyme (43). On the other hand, the rate constants of the four HH8 ribozyme mutants at position 10 paralleled those obtained under single turnover conditions (Table I). Differences in the  $K_m$  values were small between the HH8 ribozyme with the consensus core sequence and its mutants with an extra A10 or U10, whereas the ribozymes with an extra C10 and, particularly with an extra G10, displayed higher  $K_m$  values (Table I). However, the  $K_m$  differences were smaller than those

observed between the corresponding rate constants that, therefore, determine primarily the catalytic efficiency ( $k_{cat}/K_m$ ).



**Fig. 7. Representative cleavage kinetics experiments using the hammerhead ribozymes derived from the HH8 hammerhead structure.** The experiments were performed under single turnover conditions with a large excess of ribozyme (1000 nM) and trace amounts of substrate (less than 1 nM). HH8 refers to the consensus hammerhead structure (without a residue at position 10), and HH8-A10, HH8-C10, HH8-G10 and HH8-U10 refer to the mutant forms with an extra A10, C10, G10 and U10 residues, respectively (see Fig. 6). The fraction of product at different times ( $F$ ) was determined by radioactivity quantitation of the corresponding gel bands with a bioimage analyzer and fitted to the equation  $F = F_{\infty} (1 - e^{-kt})$ , where  $F_{\infty}$  is the fraction of product at the endpoint of the reaction and  $k$  the first order rate constant of cleavage ( $k_{cat}$ ). The extent of cleavage for the HH8-C10 hammerhead ribozyme eventually reached a value of 70%, whereas  $F_{\infty}$  for the HH8-G10 hammerhead ribozyme was about 30%. The mean values obtained for the rate constants of the five hammerheads and the normalized values with respect to that of the HH8 hammerhead are shown at the right.

## DISCUSSION

The extremely small size of viroids, which within a genomic RNA of 246-401 nt have to embody signals for the multiple functions they need to complete their replicative cycle, entails that these RNAs have been forced through evolution to explore a very limited sequence space to find economic solutions –in terms of nucleotides– to support such diverse functions. As a consequence of this high informational density, the involvement of certain regions within the viroid molecule in determining more than one function can be reasonably presumed. A situation of this kind is illustrated by CChMVd, in which a specific region (of only 1 nt residue) appears to be committed to more than one function. The (+) hammerhead structure of this viroid is exceptional in having an extra A (A10) inserted between the central core residues A9 and G10.1 (13). Because this extra

residue is absent in most other natural hammerhead structures (26), and because there is direct evidence that the CChMVd (+) hammerhead structure is involved not only in the *in vitro* but also in the *in vivo* self-cleavage (13), the extra A10 can be presumed to be dispensable for self-cleavage but essential for another key function. Here we show that this particular region of the hammerhead structure tolerates some flexibility, an aspect relevant for the design of more efficient ribozymes.

TABLE I.

*Kinetic parameters for cleavage under multiple turnover conditions of the consensus HH8 ribozyme and its four derived forms at position 10.*

Reactions were performed at 25°C in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM Mg<sup>2+</sup> and a range of substrate concentrations in excess over the ribozyme.

| hammerhead       | k <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> ) | Km (nM)  | k <sub>cat</sub> /Km (min <sup>-1</sup> nM <sup>-1</sup> ) |
|------------------|---------------------------------------|----------|--|
| HH8              | 1.54 ± 0.07                           | 54 ± 6   | 2.9 × 10 <sup>-2</sup>                                     |
| HH8 <sup>a</sup> | 1.0                                   | 41       | 2.4 × 10 <sup>-2</sup>                                     |
| HH8-A10          | 0.81 ± 0.14                           | 69 ± 16  | 1.2 × 10 <sup>-2</sup>                                     |
| HH8-C10          | 0.11 ± 0.02                           | 139 ± 8  | 7.9 × 10 <sup>-4</sup>                                     |
| HH8-G10          | 0.08 ± 0.02                           | 261 ± 54 | 3.1 × 10 <sup>-4</sup>                                     |
| HH8-U10          | 4.65 ± 0.98                           | 57 ± 15  | 8.2 × 10 <sup>-2</sup>                                     |

<sup>a</sup> Fedor and Uhlenbeck. 1990.

Results from site-directed mutagenesis combined with bioassays in chrysanthemum showed a strict requirement for the presence of a residue at position 10 of the CChMV (+) hammerhead structure, corresponding to position 27 in the genomic reference sequence of CChMVd (Fig. 1 and 2). Infectivity was abolished when this residue was deleted whereas the three possible substitutions at such a position resulted in infectious viroid RNAs, although plants showed a delay in symptoms appearance and the resulting viroid progeny reverted to the wild-type A10. Why the preference for an A at position 10?

Crystallographic (28, 44) and biochemical (45) studies of the hammerhead ribozyme have identified a metal-binding site (P9 site) between the N<sub>7</sub> atom of G10.1 and the pro-R oxygen of the A9 phosphate (Fig. 1A). Such a P9 metal-binding site, in spite of being located 20 Å away from the scissile phosphodiester bond, has been directly implicated in catalysis (27, 45, 46), although a convincing mechanism is still lacking (36, 47, 48). In the absence of crystallographic information for a hammerhead with an extra residue at position 10, the existence of the P9 metal-binding can be assumed, although probably rearranged to preserve the catalytic activity. On the other hand, the two non canonical interactions between G8 and A13, and A9 and G12, particularly the conformational switch of their sugar moieties that depends on the nature of the residues located 5' to G8 and G12 (49), also play a crucial role in hammerhead catalysis (27). In principle, this conformational switch is not expected to be influenced by an extra A10 or U10, which are probably



accommodated as a bulging residue not affecting the stacking of the adjacent base pairs formed by A9 and G12, and G10.1 and C11.1. However, this bulging residue could cause a bending of helix II and modify the angle between this helix with helix I and, as a consequence, the rate constant of cleavage. In contrast, the substitutions A10→C and A10→G have a marked deleterious effect on the cleavage rate constant (Fig. 5), most likely because they favor alternative conformations, involving conserved or quasi-conserved residues of the catalytic core, which are inactive for cleavage (Fig. 4). Therefore, from a strictly catalytic standpoint the A10 and U10 alternatives seem permissible and their C10 and G10 counterparts unfavored.

The A10, in addition to forming part of the CChMVd (+) hammerhead, holds a unique location at the center of a cruciform domain within the CChMVd branched conformation (Fig. 2). This unpaired residue, which does not occur in a similar cruciform domain proposed in PLMVd (50), seems therefore peculiar to CChMVd and should force a distortion of the domain. If it is assumed that this distortion confers structural constraints determining critical interactions with other RNA regions and/or with host factors –needed for CChMVd replication, transport or accumulation– it can be speculated that deletion of the extra A10 or substitution by a U, which has a smaller size and different chemical properties, would impair the interactions. A10, therefore, would appear as a compromise to cope with two distinct crucial functions. This interpretation is compounded by the structure of the two other natural hammerheads, those of the sLTSV (+) and sArMV (+) RNAs (25, 30), which also deviate from the consensus hammerhead in having only one extra residue at position 10. Interestingly, this extra residue is a U in both cases, as anticipated for an optimized self-cleavage assuming that the extra U does not cause detrimental side effect on any other critical function of the two RNAs. Furthermore, in the (+) and (-) hammerhead structures of sCYDV-RPV (31, 32) and CarSV RNA (33), respectively, which contain an extra C10, this residue is accompanied by an extra A inserted between the highly conserved C11.1 and the strictly conserved G12. This may be regarded as an indication of the existence of a non canonical interaction between the two extra residues, which would preclude the catalytic inactive conformation that the extra C10 by itself promotes, extending the helix formed by the base pair between G10.1 and C11.1, and the three non Watson-Crick pairs involving A9 and G12, G8 and A13, and U7 and A14. These arguments, however, are based on extrapolating the situation observed *in vitro* (with a *trans*-acting ribozyme in protein-free conditions and high concentration of magnesium ions) to that *in vivo* (with a *cis*-acting ribozyme in an intracellular milieu with a low concentration of magnesium ions) and, therefore, should be considered with care. For example, maximum self-cleavage must not necessarily be the preferred alternative for the replication of a viroid or viroid-like RNA, because certain amounts of the circular forms are needed as templates.

In conclusion, the present results are pertinent to a better understanding of the structural requirements of the hammerhead ribozyme, which due to its simplicity has aroused much interest

both as a model for the study of the reaction mechanisms operating in these catalysts and also as a biotechnological tool with great potential (see 51 for a series of reviews). Our data show that the region of the hammerhead ribozyme comprising the basis of helix II and the adjacent segment of the central core, gives some flexibility which may be exploited to improve the catalytic efficiency. Previous experiments by *in vitro* selection have explored the sequence requirements in the part of this region between the G10.1 and C11.1 pair and the residues G12, A13, and A14 (52, 53), but not in the part between the G10.1 and C11.1 pair and residues A9 and G8. The results reported here show that the insertion of an extra U10 between A9 and G10.1 significantly increases (3-4-fold) the cleavage rate constant without affecting the  $K_m$ . Moreover, this increase is due to the extra U10 and not to other unknown peculiarities of the CChMVd hammerhead that might affect its catalytic properties, because a detailed kinetic analysis of the model hammerhead HH8 with the four possible insertions at position 10 revealed a behavior similar to that of their corresponding CChMVd counterparts. Therefore, insertion of a U10 offers a simple and general alternative to improve the catalytic efficiency of the hammerhead ribozyme.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Ahuir for excellent technical assistance, Dr. C. Hernández for critical reading and suggestions, and Barraclough-Donnellan for English revision.

#### REFERENCES

1. Diener, T. O. (1991) *FASEB J.* **5**, 2808-2813.
2. Flores, R., Randles, J. W., Bar-Joseph, M., and Diener, T. O. (2000) in *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., and Wickner, R. B. (eds) pp. 1009-1024, Academic Press, San Diego, CA
3. Davies, J. W., Kaesberg, P., and Diener, T. O. (1974) *Virology* **61**, 281-286.
4. Hall, T. C., Wepprich, R. K., Davies, J. W., Weathers, L. G., and Semancik, J. S. (1974) *Virology* **61**, 486-492.
5. Gross, H. J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H., and Sänger, H. L. (1978) *Nature*, **273**, 203-208.
6. Branch, A. D., and Robertson, H. D. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6381-6385.
7. Owens, R. A., and Diener, T. O. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 113-117.
8. Grill, L. K., and Semancik, J. S. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 896-900.
9. Branch, A. D., and Robertson, H. D. (1984) *Science* **223**, 450-454.

10. Symons, R. H. (1981) *Nucleic Acids Res.* **9**, 6527-6537.
11. Hutchins, C. J., Rathjen, P. D., Forster, A. C., and Symons, R. H. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**, 3627-3640.
12. Hernández, C., and Flores, R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3711-3715.
13. Navarro, B., and Flores, R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11262-11267.
14. Flores, R., Daròs, J. A., and Hernández, C. (2000) *Adv. Virus Res.* **55**, 271-323.
15. Hutchins, C. J., Keese, P., Visvader, J. E., Rathjen, P. D., McInnes, J. L., and Symons, R. H. (1985) *Plant Mol. Biol.* **4**, 293-304.
16. Daròs, J. A., Marcos, J. F., Hernández, C., and Flores, R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12813-12817.
17. Navarro, J. A., Daròs, J. A., and Flores, R. (1999) *Virology* **253**, 77-85.
18. Bussière, F., Lehoux, J., Thompson, D. A., Skrzeczkowski, L. J., and Perreault, J. P. (1999) *J. Virol.* **73**, 6353-6360.
19. Branch, A. D., Benenfeld, B. J., and Robertson, H. D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9128-9132.
20. Feldstein, P. A., Hu, Y., and Owens, R., A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6560-6565.
21. Tsagris, M., Tabler, M., Mühlbach, H. P., and Sängler, H. L. (1987) *EMBO J.* **6**, 2173-2183.
22. Baumstark, T., Schröder, A. R. W., and Riesner, D. (1997) *EMBO J.* **16**, 599-610.
23. Liu, Y.-H., and Symons, R. H. (1998) *RNA* **4**, 418-429.
24. Prody, G. A., Bakos, J. T., Buzayan, J. M., Schneider, I. R., and Bruening, G. (1986) *Science* **231**, 1577-1580.
25. Forster, A. C., and Symons, R. H. (1987) *Cell* **49**, 211-220.
26. Flores, R., Hernández, C., De la Peña, M., Vera, A., and Daròs, J. A. (2001) *Methods Enzymol.* **341**, 540-552.
27. Ruffner, D. E., Stormo, G. D., and Uhlenbeck, O. C. (1990) *Biochemistry* **29**, 10695-10702.
28. Pley, H., Flaherty, K. M., and McKay, D. B. (1994) *Nature* **372**, 68-74.
29. Scott, W. G., Finch, J. T., and Klug, A. (1995) *Cell* **81**, 991-1002.
30. Kaper, J. M., Tousignant, M. E., and Steger, G. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **154**, 318-325.
31. Miller, W. A., Hercus, T., Waterhouse, P. M., and Gerlach, W. L. (1991) *Virology* **183**, 711-720.
32. Song, S. I., Silver, S. L., Aulik, M. A., Rasochova, L., Mohan, B. R., and Miller, W. A. (1999) *J. Mol. Biol.* **293**, 781-793.
33. Hernández, C., Daròs, J. A., Elena, S. F., Moya, A., and Flores, R. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 6323-6329.

34. Sheldon, C. C., and Symons, R. H. (1989) *Nucleic Acid Res.* **17**, 5679-5685
35. Stage-Zimmermann, T. K., and Uhlenbeck, O. C. (1998) *RNA* **4**, 875-889.
36. Murray, J. B., and Scott, W. G. (2000) *J. Mol. Biol.* **296**, 33-41.
37. De la Peña, M., Navarro, B., and Flores, R. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9960-9965.
38. Byrappa, S., Gavin, D. K., and Gupta, K. C. (1995) *PCR Methods Appl.* **5**, 404-407.
39. Forster, A. C., Davies, C., Hutchins, C. J., and Symons, R. H. (1990) *Methods Enzymol.* **181**, 583-607.
40. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
41. Hertel, K. J., Herschlag, D., and Uhlenbeck, O. K. (1994) *Biochemistry* **33**, 3374-3385.
42. Fedor, M. J., and Uhlenbeck, O. C. (1992) *Biochemistry* **31**, 12042-12054.
43. Fedor, M. J., and Uhlenbeck, O. C. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1668-1672.
44. Murray, J. B., Szöke, H., Szöke, A., and Scott, W. G. (2000) *Mol. Cell* **5**, 279-287.
45. Peracchi, A., Beigelman, L., Scott, E. C., Uhlenbeck, O. C., and Herschlag, D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26822-26826.
46. Tuschl, T., and Eckstein, F. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6991-6994.
47. Wang, S., Karbstein, K., Peracchi, A., Beigelman, L., and Herschlag, D. (1999) *Biochemistry* **38**, 14363-14378.
48. Suzumura, K., Warashina, M., Yoshinari, K., Tanaka, Y., Kuwabara, T., Orita, M., and Taira, K. (2000) *FEBS Lett.* **473**, 106-112.
49. Heus, H. A., Wijmenga, S. S., Hoppe, H., and Hilbers, C. W. (1997). *J. Mol. Biol.* **271**, 147-158.
50. Ambrós, S., Hernández, C., Desvignes, J. C., and Flores, R. (1998) *J. Virol.* **72**, 7397-7406.
51. Rossi, J. J., and Couture, L. A. (1999). *Intracellular Ribozyme Applications: Principles and Protocols*, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK
52. Long, D. M., and Uhlenbeck, O. C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6977-6981.
53. Thomson, J. B., Sigurdsson, S. Th., Zeuch, A., and Eckstein, F. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 4401-4406.
54. Hertel, K. J., Pardi, A., Uhlenbeck, O. K., Koizumi, M., Ohtsuka, E., Uesugi, S., Cedergren, R., Eckstein, F., Gerlach, W. L., Hodgson, R., and Symons, R. H. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 3252
55. Bussière, F., Ouellet, J., Côté, F., Lévesque, D., and Perreault, J. P. (2000) *J. Virol.* **74**, 2647-2654.

## **DISCUSIÓN**





### **1. Los viroides: la biología vista desde su peldaño inferior**

Desde su descubrimiento hace más de 30 años los viroides han sido profusamente estudiados, no sólo por sus implicaciones agrícolas sino, sobre todo, por el atractivo que su simplicidad genómica y estructural despierta. Sin embargo, esta aparente simplicidad esconde en realidad un amplio abanico de funciones que incluyen la replicación, el transporte y la acumulación del RNA viroidal utilizando para ello la maquinaria celular del huésped que parasita, llegando a desencadenar en muchos casos procesos patogénicos en el mismo. Como estos RNAs carecen de capacidad codificante, toda la información necesaria para interactuar con determinados componentes del huésped hay que buscarla en la propia molécula de RNA viroidal, o en alguno de sus intermediarios replicativos, pudiendo residir en elementos de estructura primaria, secundaria o terciaria, así como en una interacción más compleja entre varios de éstos. Los primeros estudios dirigidos a establecer las relaciones estructura-función en los viroides de la familia *Pospiviroidae* permitieron definir cinco dominios estructurales relacionados con distintas funciones (Keese y Symons, 1985), aunque posteriormente se comprobó que son interacciones entre distintos dominios las que modulan una o más funciones (Sano *et al.*, 1992; Reanwarakorn y Semancick, 1998; Škori *et al.*, 2001). Los estudios sobre la relación estructura-función son mucho más limitados para el caso de la familia *Avsunviroidae*, no sólo por el menor número de miembros de dicha familia sino también por la dificultad de abordar experimentalmente estos estudios, especialmente con miembros como el ASBVd y el PLMVd de bioensayos largos y complicados. Sin embargo, con el descubrimiento del tercer miembro de esta familia, el CChMVd, se ha encontrado un buen sistema modelo que ha permitido (y permitirá) profundizar más en el conocimiento de las propiedades biológicas de esta familia viroidal.

Pero la utilidad de estos “sencillos” sistemas biológicos que son los viroides no empieza y acaba en su propio estudio, sino que también han proporcionado datos de carácter más general sobre el funcionamiento de las plantas que parasitan. Por ejemplo, viroides como el PSTVd han facilitado el avance en campos como es el transporte de moléculas de RNA en la planta a nivel sistémico (Zhu *et al.*, 2001), de célula a célula (Ding *et al.*, 1997) e incluso intracelularmente (Zhao *et al.*, 2001). También parece que resultará útil su utilización en el estudio de nuevas áreas como el silenciamiento génico post-transcripcional (Papaefthimiou *et al.*, 2001; Itaya *et al.*, 2001). Por otro lado, investigaciones en el campo de la biología estructural del RNA (Gulyaev *et al.*, 1998; Shapiro *et al.*, 2001), de las ribozimas (Ambrós *et al.*, 1998) o de la evolución de las poblaciones de RNA (Góra-Sochacka *et al.*, 1997, Ambrós *et al.*, 1999) han avanzado en muchas ocasiones gracias al estudio de estos patógenos. Esta tesis aporta ejemplos adicionales de la utilidad demostrada por estos sistemas en el conocimiento del mundo del RNA.

## **2. El caso particular del CChMVd dentro de la familia *Avsunviroidae***

Entre las características distintivas de los miembros pertenecientes a la familia *Avsunviroidae* destaca su estrecha gama de huéspedes, restringiéndose éstos únicamente a sus huéspedes naturales o a especies muy próximas. En el caso del ASBVd y PLMVd, sus huéspedes son plantas leñosas cuya inoculación es dificultosa y en donde los tiempos de aparición de los síntomas suelen ser muy largos, yendo de los 2 o 3 meses para el PLMVd a incluso 1 o 2 años para el ABSVd. Por el contrario, el sistema constituido por el CChMVd y su huésped natural, el crisantemo, constituye un excelente sistema experimental en donde la fácil inoculación mecánica, la posibilidad de crecimiento de las plantas bajo condiciones controladas en fitotrones y la rápida aparición de síntomas (entre 10 y 15 días), permite la fácil realización de estudios de genética inversa. No obstante, este sistema también presenta ciertos inconvenientes, entre los que destaca los bajos niveles de acumulación del RNA viroidal, lo que conlleva la imposibilidad de observar este último como una banda diferencial en geles teñidos con bromuro de etidio o incluso con plata, y hace necesaria la utilización constante de patrones de tamaño similar para poder seguir la localización aproximada del RNA durante su aislamiento y purificación. En esta tesis se puso a punto un método rápido de extracción y fraccionamiento de RNAs que requiere tan sólo 2 g de material vegetal, pudiéndose realizar un análisis del CChMVd por hibridación puntual (dot-blot) o RT-PCR, consumiendo así únicamente unas pocas hojas de una misma planta y no toda ella, lo que permitió por ejemplo llevar a cabo un seguimiento de la evolución de la población viroidal con el tiempo.



### 3. Propiedades estructurales únicas del CChMVd

La caracterización molecular de multitud de variantes distintas del CChMVd, obtenidas tanto a partir de cepas naturales como de infecciones realizadas en laboratorio con clones individuales, ha revelado la existencia de una alta heterogeneidad de secuencia en las poblaciones de este viroide, de forma similar a lo descrito en otros patógenos de RNA (Holland, 1992; Domingo y Holland, 1994) y, más concretamente, en otros viroides (Visvader y Symons, 1985; Herold *et al.*, 1992; Polivka *et al.*, 1996; Góra-Sochacka *et al.*, 1997; Ambrós *et al.*, 1998). No obstante, a diferencia de lo observado en poblaciones viroidales del PLMVd (Ambrós *et al.*, 1998, 1999), grado de heterogeneidad detectado no resultó tan elevado en el caso del CChMVd. Así, tras el análisis de más de 100 variantes del CChMVd, aproximadamente sólo una de cada siete posiciones es polimórfica lo que supone un 15% del genoma viroidal frente a casi el 25% descrito en el PLMVd (Ambrós, 1998). Por otro lado, la distribución de la práctica totalidad de estas mutaciones refuerza el significado biológico de la estructura secundaria de mínima energía libre propuesta, bien sea por tratarse de mutaciones compensatorias (pares G-U A-U o G-C G-U) o covariaciones (bases apareadas en la estructura secundaria son reemplazadas simultáneamente por otro par de bases distinto), lo que indica la existencia de una alta presión selectiva sobre dicha estructura (capítulos 1 y 2). Además, tanto la estabilidad genética como la capacidad infecciosa de la mayoría de las variantes naturales caracterizadas es elevada, ya que tras ser inoculadas como clones individuales son capaces de provocar la infección de la planta y permanecen de manera estable en la población (esta tesis y datos no mostrados). Estos resultados indican que las variantes recuperadas de la población viroidal están muy depuradas, lo que sugiere que la presión selectiva que actúa sobre el viroide dentro de la planta impide la subsistencia de variantes de baja eficacia. Esta situación difiere notablemente del PLMVd, el otro viroide del género *Pelamoviroide*, en el que se ha descrito una elevadísima inestabilidad genética en multitud de variantes naturales debido, probablemente, a la menor presión selectiva existente sobre la estructura secundaria del mismo (Ambrós, 1998).

Por otro lado, la variabilidad encontrada en las estructuras ribozimáticas del CChMVd, aunque inferior a la detectada en las del PLMVd (Ambrós *et al.*, 1998), no altera la estructura secundaria de las mismas y es consistente con su funcionamiento *in vivo* (Navarro y Flores, 1997; capítulo 1). No obstante, en determinados casos se han rescatado de las poblaciones viroidales del CChMVd variantes que presentan mutaciones puntuales en sus dominios ribozimáticos que anulan su actividad y, en consecuencia, la infectividad de estas variantes (capítulo 1). Dichas mutaciones consisten fundamentalmente en una pérdida del nucleótido 1 del genoma viroidal (posición 1.1 en la ribozima de polaridad positiva según la numeración de Hertel *et al.*, 1992), algo que ya había sido observado previamente en los RNAs del sCYDV-RPV, sLTSV y PLMVd (Miller *et al.*, 1991, Sheldon y Symons, 1993; Ambrós *et al.*, 1998). Se ha sugerido que la presencia de un grupo fosfato esterificando el 2'OH del nucleótido que precede el sitio de autocorte, tal y como se ha

descrito en las formas circulares del sSNMV (Kibertis *et al.*, 1985), podría inducir un salto en la retrotranscriptasa durante los experimentos de RT-PCR provocando así la alteración detectada. Otra posibilidad para explicar la pérdida de este nucleótido deriva de estudios realizados con el PLMVd que proponen que el enlace en el sitio de ligación (que coincide con el de autocorte) es de tipo 2'-5' (Côté y Perrault, 1998, Côté *et al.*, 2001), lo que también podría provocar el salto de la retrotranscriptasa. La naturaleza atípica de este enlace requiere, sin embargo, confirmación adicional.

Se ha detectado también una tercera restricción estructural en el CChMVd que limita la variabilidad de las poblaciones de este viroide. Se trata de la conservación de un elemento de estructura terciaria de tipo pseudonudo entre los bucles delimitados por las posiciones 217-223 y 255-261, respectivamente (capítulo 2). Dicho pseudonudo fue propuesto de forma teórica para el CChMVd por Bussière *et al.* (1999) tomando como referencia el pseudonudo encontrado mediante digestión con nucleasas de RNAs del PLMVd obtenidos por transcripción *in vitro*. En esta tesis, mediante el aislamiento y caracterización molecular de variantes del CChMVd, se ha comprobado que toda la variabilidad encontrada en esta zona confirma la existencia *in vivo* de dicha interacción.

#### **4. El determinante de patogenicidad del CChMVd se localiza en un tetrabucle del RNA viroidal**

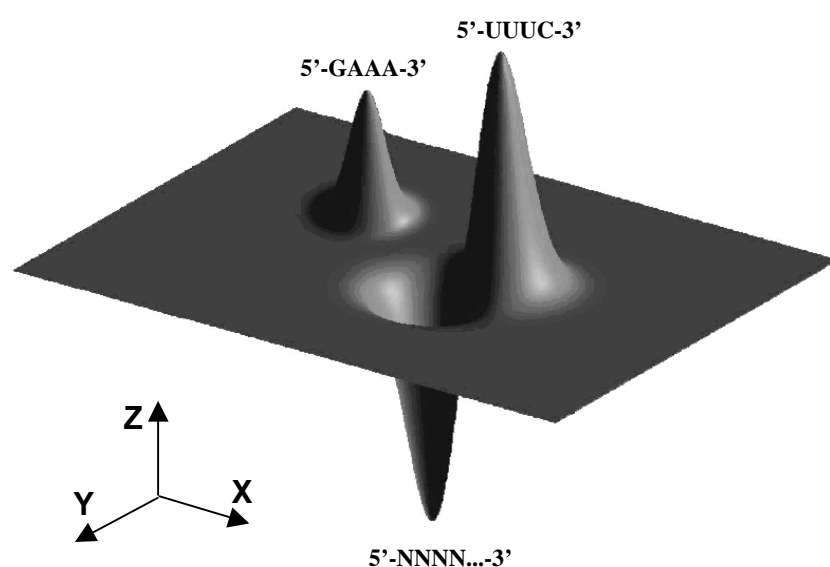
Dentro de la familia *Avsunviroidae*, más concretamente en el caso del PLMVd, ya se había detectado la existencia de cepas latentes. Sin embargo, la extrema complejidad de las poblaciones de dicho agente han impedido hasta la fecha cartografiar en la molécula del RNA el dominio o dominios responsables de la patogénesis viroidal. Por otro lado, y mucho antes de haber sido caracterizado el agente causal de la enfermedad del moteado clorótico del crisantemo, ya se conocía la existencia de cepas latentes del mismo (Horst, 1975). Una vez se clonaron cepas agresivas y latentes del CChMVd tan sólo se detectaron algunas diferencias específicas entre las secuencias de ambas. Mediante bioensayos con una variante patogénica de referencia, en la que se introdujeron los cambios susceptibles de estar implicados en la patogénesis, se logró localizar el determinante responsable en el tetrabucle formado por los nucleótidos 82 a 85 de este RNA, que corresponden al bucle 2 de la ribozima de cabeza de martillo de la polaridad negativa. Así, mientras que las variantes patogénicas se caracterizaban por presentar un tetrabucle de secuencia UUUC, las variantes no sintomáticas presentaban para el mismo la secuencia GAAA. Es interesante señalar que este último bucle pertenece a la familia de tetrabucles ultraestables GNRA (donde N es cualquier nucleótido y R una purina) ampliamente distribuidos en la naturaleza y que han sido implicados en múltiples funciones biológicas (ver más adelante). Entre los posibles papeles que podrían atribuirse a este determinante de patogenicidad tendríamos: i) la posibilidad de una interacción diferencial de las variantes patogénicas y no patogénicas con una proteína, un RNA u otro factor del huésped, ii) la alteración de la actividad catalítica de la ribozima de cabeza de

martillo de polaridad negativa de manera similar a lo descrito para la de polaridad positiva del sCYDV-RPV (Miller y Silver, 1991; Song *et al.*, 1999), y iii) la modificación en el plegamiento tridimensional de la propia molécula de RNA viroidal debido a la existencia de interacciones diferenciales de tipo terciario.

### 5. Requerimientos del determinante de patogenicidad del CChMVd

Con objeto de profundizar en el estudio del determinante molecular de patogenicidad previamente localizado en un tetrabucle del RNA viroidal, se llevó a cabo una serie de experimentos de mutagénesis dirigida sobre el CChMVd-cDNA, seguidos de su inoculación a crisantemo y posterior análisis de las progenies resultantes tras la infección (capítulo 2). En una primera aproximación se estudió el efecto que podría tener la sustitución de este tetrabucle (de secuencia UUUC en las variantes sintomáticas y GAAA en las no sintomáticas) por tetrabucles del tipo UNCG. Tanto la familia de tetrabucles ultraestables GNRA como la UNCG tienen una estructura tridimensional muy similar, habiendo sido implicados en distintas funciones como el reconocimiento RNA-proteína, RNA-RNA o el plegamiento correcto del RNA. El objetivo de nuestro estudio fue comprobar la posibilidad de intercambiar funcionalmente el tetrabucle del tipo GNRA característico de la cepa no sintomática del CChMVd, por tetrabucles del tipo UNCG tal y como se ha observado previamente en otros RNAs naturales (Selinger *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos mostraron que, a pesar de que en un primer momento dicho cambio parecía provocar una infección asintomática, realmente sólo se provocaba un retraso en la aparición de los síntomas. Además, al analizar la progenie viroidal se observó una elevada inestabilidad de los bucles introducidos, que acumulaban mutaciones rápidamente. Estas plantas desarrollaron con el tiempo los síntomas acusados propios de la enfermedad del moteado clorótico del crisantemo, encontrándose fundamentalmente en las progenies viroidales una reversión al tetrabucle sintomático UUUC. Estos datos indican que, muy probablemente, los requerimientos que existen para este tetrabucle son de secuencia más que de estructura, de manera similar a lo encontrado en un tetrabucle GAAA del RNA del virus X de la patata (Miller *et al.*, 1999). Situaciones similares se observaron al inocular variantes con bucles de secuencia intermedia entre la sintomática y la no sintomática (UUAA, UAA o UUUU) en los que las poblaciones viroidales terminaron revertiendo fundamentalmente a la secuencia patogénica UUUC. Sólo en un caso, al inocular la variante con el pentabucle GACCG, se logró una infección asintomática, recuperándose en la progenie viroidal el tetrabucle GAAA característico de la cepa no sintomática. Así pues, la facilidad de reversión observada hacia la secuencia sintomática UUUC indica una ventaja adaptativa de aquellas variantes que la contienen frente a las que contienen el tetrabucle no sintomático GAAA, que sólo apareció espontáneamente en un caso. Debido a que nuestro estudio solo contempló un número muy limitado de posibles bucles dentro del espacio de secuencias, existía la posibilidad de que la facilidad de reversión observada a UUUC se debiera a razones distintas a diferencias en la eficacia

biológica. Sin embargo, tanto los experimentos de competencia entre variantes sintomáticas y no sintomáticas, como la reversión de una variante atípica de una cepa asintomática para dar lugar a variantes sintomáticas, confirmaron la clara ventaja adaptativa que presentan las secuencias con el tetrabucle UUUC frente a las que contienen el GAAA. Esta situación podría representarse gráficamente como se muestra en la figura 1, en donde, dentro del concepto de paisaje adaptativo definido por Wright (1967), se distinguen picos de eficacia biológica correspondientes a las secuencias viroidales conteniendo los tetrabucles UUUC (pico de máxima eficacia) o GAAA (de eficacia inferior). En pozos de eficacia como el mostrado tendríamos aquellas secuencias viroidales con tetrabucles muy distintos, que rápidamente acumulan las mutaciones que les dotan de una mayor eficacia (que corresponderían a secuencias viroidales localizadas en las laderas de los valles y picos) hasta alcanzar y estabilizarse en los máximos de eficacia más cercanos.



**Fig. 1.** Representación esquemática del paisaje adaptativo del CChMVd. Cada punto del plano XY representaría una secuencia viroidal determinada, mientras que la tercera dimensión, Z, indicaría la eficacia biológica de cada una de estas. El pico de máxima eficacia vendría dado por la secuencia conteniendo el tetrabucle sintomático UUUC, mientras que el pico menor correspondería a dicha secuencia conteniendo el tetrabucle GAAA. En valles similares al indicado en la figura se encontrarían las secuencias viroidales con bucles artificiales como los bioensayos (secuencia NNNN...), que debido a su baja eficacia biológica, acumulan mutaciones con facilidad y son sustituidas rápidamente por secuencias de mayor eficacia.

## 6. Papel dual de un nucleótido dentro del CChMVd: conformación del RNA viroidal vs. eficiencia catalítica de una de sus ribozimas

Tras la identificación y caracterización molecular del CChMVd en nuestro laboratorio, se destacó la existencia de una peculiaridad en el centro catalítico de la ribozima de cabeza de martillo de polaridad positiva (Navarro y Flores, 1997). Dicha peculiaridad consiste en la inserción de una A entre la posición estrictamente conservada A9 y la altamente conservada G10.1 (posición que hemos denominado como número 10), que no existe en ninguna de las otras ribozimas de cabeza de martillo naturales descritas en la naturaleza hasta el momento. Existen sin embargo excepciones similares como son la inserción de una U en esta misma posición 10 de las ribozimas de polaridad positiva del sLTSV (Forster et al., 1987) y del sArMV (Kaper et al., 1988), así como de una C en la ribozima de polaridad positiva del sCYDV-RPV (Miller *et al.*, 1991) y en la negativa del CarSV RNA (Hernández *et al.*, 1992a), aunque en estos dos últimos casos dicha inserción viene acompañada por una A extra entre la posición altamente conservada C11.1 y la

estrictamente conservada G12 (capítulo 3, Fig. 1). A pesar de que la sencillez y el interés biotecnológico de la ribozima de cabeza de martillo la ha convertido desde su descubrimiento en objeto de múltiples estudios especializados, la existencia de excepciones en el centro catalítico de ribozimas naturales no ha sido especialmente analizada hasta la fecha. Además, en el caso del CChMVd, esta A extra presenta una localización muy especial dentro de la estructura secundaria viroidal, ocupando una posición desapareada que conecta dos hélices de un dominio cruciforme (capítulo 3, Fig. 2). Esta posición extra desempeña un papel crucial en el proceso infeccioso del viroide ya que su eliminación dio lugar a un RNA no infeccioso, mientras que su substitución por cualquiera de los otros tres posibles nucleótidos (C, G o U) condujo a RNAs infecciosos, aunque las plantas inoculadas mostraron retrasos en la aparición de síntomas. Además, el estudio de las progenies resultantes de dichas infecciones reveló en todos los casos una reversión de dicha posición a la A original, lo que pone de manifiesto su importancia. Como esta inserción se localiza también en el centro catalítico de la ribozima de cabeza de martillo de polaridad positiva, quedaba por resolver la cuestión de su papel en la catálisis. Ribozimas conteniendo esta A extra no mostraron especialmente afectada su capacidad catalítica con respecto a la misma ribozima sin inserción alguna. Por tanto, el efecto tan drástico provocado en la infectividad viroidal por la eliminación de esta A extra no puede explicarse por su influencia sobre la catálisis ribozimática. Además, la inserción de una C o una G, que sí provoca una disminución importante en la constante catalítica, no causa la pérdida de la infectividad viroidal, lo que indica que muy probablemente este nucleótido extra tiene un doble papel; por un lado permitiría a la molécula de RNA viroidal adoptar la estructura secundaria (o quizás de orden superior) con capacidad infecciosa, y, por otro, afectaría moderadamente a la eficiencia catalítica de la ribozima, manteniéndose su constante catalítica dentro de los niveles descritos para las ribozimas con el centro catalítico consenso (en torno a  $1 \text{ min}^{-1}$ ) (Stage-Zimmermann y Uhlenbeck, 1998). Una observación inesperada fue el efecto provocado por la inserción de una U en la posición 10 del centro catalítico consenso de la ribozima de cabeza de martillo, que se tradujo en un aumento de la constante catalítica de entre tres y cuatro veces. Sin embargo, variantes del CChMVd conteniendo dicho nucleótido, aunque resultaron infecciosas, no se mantuvieron de manera estable en la progenie viroidal y reversionaron a la A original. Estos resultados indican de nuevo que, muy probablemente, la presión selectiva que favorece la existencia de una A en esta posición debe de estar actuando principalmente a nivel de la estructura global del viroide y no tanto a nivel de la catálisis ribozimática. En todo caso, no puede descartarse la posibilidad de que el viroide necesitara una regulación más estricta de la velocidad de catálisis y que, por tanto, una ribozima especialmente eficiente pudiera representar un inconveniente en el ciclo infeccioso (por ejemplo, una mayor eficiencia de la reacción ribozimática podría favorecer un autocorte excesivo de la molécula viroidal ya circularizada, y en consecuencia su degradación).

### **7. Una secuencia consenso más eficaz para la ribozima de cabeza de martillo**

La inserción de una U en la posición 10 del centro catalítico de la ribozima de cabeza de martillo provocó un aumento considerable en su constante catalítica, lo que permite definir una nueva secuencia consenso más eficaz para dicha ribozima sin afectar a otras propiedades catalíticas como la unión al sustrato. La amplia variedad de utilidades biotecnológicas mostradas por éstas y otras ribozimas, entre las que destaca su utilidad farmacológica (ver Introducción), implica que una observación de carácter general como esta puede tener un elevado interés no sólo científico sino también industrial. Un incremento en la relativamente baja constante de velocidad de estas ribozimas (varios órdenes de magnitud inferiores a las de la catálisis proteica) como el encontrado mediante una simple modificación en el centro catalítico supone una mejora significativa. Estos resultados ponen también de manifiesto la gran utilidad que el estudio de las versiones naturales de las ribozimas de cabeza de martillo puede tener para clarificar su posible mecanismo de reacción.

RESUMEN





## Resumen

Se ha identificado mediante hibridación “Northern” una cepa no sintomática (CChMVd-NS) del viroide del moteado clorótico del crisantemo. El análisis de clones de cDNA procedentes de dicha cepa ha mostrado que presentan un tamaño y una secuencia muy similar a los obtenidos de cepas CChMVd-S. Algunas de las mutaciones observadas en las variantes CChMVd-NS ya habían sido previamente identificadas en variantes de la cepa CChMVd-S, aunque otras eran completamente nuevas. Bioensayos en crisantemo mostraron que cDNAs de CChMVd-NS eran infecciosos y no sintomáticos. Mediante mutagénesis dirigida se comprobó que una de las mutaciones específicas de CChMVd-NS, la sustitución UUUC por GAAA, era suficiente para provocar el cambio de fenotipo sintomático a no sintomático. Este determinante de patogenicidad, el primero de esta clase identificado en un viroide con ribozimas de cabeza de martillo, se localiza en un tetrabucle dentro de la conformación ramificada predicha para el RNA del CChMVd. Además, el análisis de la heterogeneidad de secuencia encontrada en variantes de CChMVd-S y NS apoya la existencia de dicha conformación *in vivo*, lo que demuestra que la estructura secundaria de tipo varilla (o casi de tipo varilla) no es un paradigma universal para los viroides.

También se realizó un estudio detallado del tetrabucle responsable de la patogenicidad viroidal mediante mutagénesis dirigida, bioensayos de los clones de cDNA y análisis de la progenie resultante, comprobándose que ninguno de los cambios introducidos abolía la infectividad. A diferencia de lo observado en otros RNAs, el tetrabucle GAAA característico de cepas CChMVd-NS no fue funcionalmente intercambiable por otros tetrabucles similares de la familia UNCG, lo que sugiere que este motivo está conservado más por razones de secuencia que de estructura. En muchos casos, los cambios introducidos dieron lugar inicialmente a una infección no sintomática, que evolucionó a sintomática junto con la aparición en la progenie viroidal de secuencias conteniendo el tetrabucle UUUC característico de la cepa CChMVd-S. Sólo en un caso apareció el tetrabucle GAAA de forma mayoritaria en la progenie de las plantas infectadas que además mostraron un fenotipo asintomático. Estos resultados revelan la existencia de dos picos de eficacia para el tetrabucle (UUUC y GAAA) cuyo tallo adyacente se comprobó que está también bajo una fuerte presión selectiva. Co-inoculaciones con variantes de cepas CChMVd-S y NS mostraron que sólo cuando ésta última se encuentra en un exceso de 100 o 1000 veces las plantas permanecen asintomáticas, confirmando la mayor eficacia biológica de la variante sintomática y explicando la ausencia de expresión de síntomas observada previamente en experimentos de protección cruzada. La heterogeneidad de secuencia encontrada en variantes CChMVd-S y NS apoya la existencia *in vivo* de una interacción de tipo pseudonudo que ha sido propuesta entre dos bucles de este viroide por comparación con la situación encontrada en el PLMVd. La conservación de esta interacción de tipo “kissing-loop” en dos viroides que presentan una baja similitud de secuencia estabiliza su plegamiento globular y sugiere que podría desempeñar un papel funcional clave.

Por último, aunque estudios previos han definido un centro catalítico conservado en la mayoría de las ribozimas de cabeza de martillo naturales, se desconoce el por qué algunas presentan ciertas desviaciones respecto al consenso. Se ha estudiado esta cuestión valiéndose del CChMVd, cuya ribozima de cabeza de martillo de polaridad positiva presenta una A extra (A10) entre la posición conservada A9 y la casi conservada G10.1. Hasta la fecha, no se ha examinado el efecto de inserciones en esta posición sobre la cinética de la ribozima de cabeza de martillo. Se comprobó que A10 causa un descenso moderado en la constante de velocidad de corte en *trans* respecto la ribozima de cabeza de martillo (+) del CChMVd sin dicho residuo, mientras que las substituciones A10→C10 y A10→G10 tuvieron efectos negativos importantes, probablemente debido a que favorecen plegamientos catalíticamente inactivos. Por el contrario, la sustitución A10→U10 indujo un aumento de la constante de velocidad de entre 3 y 4 veces, lo que permitiría explicar la existencia de una U10 extra en dos ribozimas de cabeza de martillo naturales. Como A10 ocupa un lugar singular e indispensable en la conformación global del CChMVd tal y como se reveló mediante bioensayos, estos resultados sugieren que algunas ribozimas se desvían del consenso debido a que ciertos residuos están implicados en funciones distintas a la del autocorte. La incorporación de U10 en una ribozima de cabeza de martillo modelo también causó un incremento similar en la constante de velocidad, aportando información para una comprensión más profunda de los requerimientos estructurales de la ribozima de cabeza de martillo así como para el diseño de ribozimas más eficientes.

# Med

## **BIBLIOGRAFÍA**

**Pub****Med**

National  
Library  
of Medicine 



- AMBRÓS, S. (1998). Variabilidad genética y evolución del viroide del mosaico latente del melocotonero. Universidad de Valencia (Tesis doctoral).
- AMBRÓS, S. Y FLORES, R. (1998). *In vitro* and *in vivo* self-cleavage of a viroid RNA with a mutation in the hammerhead catalytic pocket. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1877-1833.
- AMBRÓS, S., HERNÁNDEZ, C. Y FLORES, R. (1998). Genomic structure of three phenotypically different isolates of Peach latent mosaic viroid: implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasispecies. *J. Virol.* **72**, 7397-7406.
- 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.
- ASTRUC, N., MARCOS, J. F., MACQUAIRE, G., CANDRESSE, T. Y PALLÁS, V. (1996). Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. *Eur. J. Plant Path.* **102**, 837-846.
- BALTIMORE, D. Y GIRARD, M. (1966). An intermediate in the synthesis of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**, 741-746.
- BARINAGA, M. (1993). Ribozymes: killing the messenger. *Science* **262**, 1512-1514.
- BAUMSTARK, R. Y RIESNER, D. (1995). Only one of four possible secondary structures of the central conserved region of the potato spindle tuber viroid is a substrate for processing in a potato nuclear extract. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4246-4254.
- BAUMSTARK, R., SCHRÖDER, A. R. W. Y RIESNER, D. (1997). Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.* **16**, 599-610.
- BEATTIE, T. L. Y COLLINS, R. A. (1997). Identification of functional domains in the self-cleaving *Neurospora* VS ribozyme using damage selection. *J. Mol. Biol.* **267**, 830-840.
- BEATTIE, T. L., OLIVE, J. E. Y COLLINS, R. A. (1995). A secondary structure model for the self-cleaving region of *Neurospora* VS RNA. *Biochemistry* **92**, 4686-4690.
- BERTRAND, E. Y ROSSI, J. (1996). Anti-HIV therapeutic hammerhead ribozymes: targeting strategies and optimization of intracellular function. *Nucleic Acids Mol. Biol.* **10**, 301-314.
- BERZAL-HERRANZ, A., JOSEPH, S., CHOWRIRA, B. M., BUTCHER, S. E. Y BURKE, J. M. (1993). Essential nucleotide sequences and secondary structure elements of the hairpin ribozyme. *EMBO J.* **12**, 2567-2574.
- BIRIKH, K. R., HEATON, P. A. Y ECKSTEIN, F. (1997). The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *Eur. J. Biochem.* **245**, 1-16.

- BONFIGLIOLI, R. G., MCFADDEN, 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.
- BRANCH, A. D., BENENFELD, B. J., FRANCK, E. R., SHAW, J. F., VARBAN, M. L., WILLIS, K. K., ROSEN, D. L. Y ROBERTSON, H. D. (1988a). Interference between coinoculated viroids. *Virology* **163**, 538-546.
- BRANCH, A. D., BENENFELD, B. J. Y ROBERTSON, H. D. (1988b). Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9128-9132.
- BRANCH, A. D., BENENFELD, B. J. Y ROBERTSON, H. D. (1985). Ultraviolet light-induced crosslinking reveals a unique region of tertiary structure in potato spindle tuber viroid and HeLa 5S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6590-6594.
- BRANCH, A. D., LEVINE, B. J. Y POLASKOVA, J. A. (1995). An RNA tertiary structure of the hepatitis delta agent contains UV-sensitive bases U-712 and U-865 and can form in a bimolecular complex. *Nucleic Acids Res.* **23**, 491-499.
- BRANCH, A. D. Y ROBERTSON, H. D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* **223**, 450-455.
- BRANCH, A. D., ROBERTSON, H. D. Y DICKSON, E. (1981). Longer than unit length viroid minus strands are present in RNA from infected plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6381-6385.
- BRANCH, A. D., ROBERTSON, H. D., GREER, C., GEGENHEIMER, P., PEEBLES, G. Y ABELSON, J. (1982). Cell-free circularization of viroid progeny RNA by an RNA ligase from wheat germ. *Science* **217**, 1147-1149.
- BRAZAS, R. Y GANEM, D. (1996). A cellular homolog of hepatitis delta antigen: implications for viral replication and evolution. *Science* **274**, 90-93.
- BRUENING, G. (1989). Compilation of self-cleaving sequences from plant virus satellite RNAs and other sources. *Methods Enzymol.* **180**, 546-558.
- BRUENING, G., FELDSTEIN, P.A., BUZAYAN, J. M., VAN TOL H., DEBEAR, J., GOUGH, G. R., GILHAM, P. T. Y ECKSTEIN, F. (1991). Satellite tobacco ringspot virus RNA: self-cleavage and ligation reactions in replication. *En: Viroids and Satellites, Molecular Parasites in the Frontiers of Life* (K. Maramorosch, Ed.), pp. 141-158. CRC Press, Boca Raton.
- BURKE, J. M., BUTCHER, S. E., SARGUEIL, B. Y HECKMAN, J. E. (1995). Hairpin ribozyme-surprising complexity in a small RNA enzyme. *FASEB J.* **9**, A1391.

- BUSSIÈRE, F., OUELLET, J, CÔTÉ, F., LÉVESQUE, 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
- BUTCHER, S. E. Y BURKE, J. M. (1994). A photo-cross-linkable tertiary structure motif found in functionally distinct RNA molecules is essential for catalytic function of hairpin ribozyme. *Biochemistry* **33**, 992-999.
- BUTCHER, S. E. Y BURKE, J. M. (1995). Interdomain tertiary interactions in the hairpin ribozyme. *J. Cell Biochem.* **S19A**, 214.
- BUTCHER, S. E., HECKMAN, J. E. Y BURKE, J. M. (1995). Reconstitution of hairpin ribozyme activity following separation of functional domains. *J. Biol. Chem.* **270**, 29648-29651.
- BUZAYAN, J. M., GERLACH, W. L., BRUENING, G., KEESE, P. Y GOULD, A. R. (1986a). Nucleotide sequence of satellite tobacco ringspot virus RNA and its relationship to multimeric forms. *Virology* **151**, 186-199.
- BUZAYAN, J. M., GERLACH, W. L. Y BRUENING, G. (1986b). Non-enzymatic cleavage and ligation of RNAs with sequences that are complementary to a plant virus satellite RNA. *Nature* **323**, 349-353.
- CECH, T. R. (2000). Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science* **289**, 878-889.
- CECH, T. R., ZAUG, A. J. Y GRABOWSKI, P. J. (1981). *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* **27**, 487-493.
- CHAO, L. (1990). Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* **348**, 454-455.
- COLLINS, R. F., GELLATLY, D. L., SEHGAL, O. P. Y ABOUHAIIDAR, M. G. (1998). Self-cleaving circular RNA associated with rice yellow mottle virus is the smallest viroid-like RNA. *Virology* **241**, 269-275.
- CONEJERO, V., PICAZO, I. Y SEGADO, P. (1979). Citrus exocortis viroid (CEV): protein alterations in different hosts following viroid infection. *Virology* **97**, 454-456.
- CONEJERO, V. Y SEMANCIK, J. S. (1977). Exocortis viroid: alterations in the proteins of *Gynura aurantiaca* accompanying viroid infection. *Virology* **77**, 221-223.
- CÔTÉ, F. Y J. P. PERRAULT. (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.
- CÔTÉ, 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.
- COX, K.H. Y GOLBERG, R. B. (1988). Analysis of plant gene expression. *En Plant Molecular Biology: A Practical Approach*" (C. H. Shaw ed.), pp 1-35. IRL Press. Oxford.

- CURTIS, E. A. Y BARTEL, D. P. The hammerhead cleavage reaction in monovalent cations. *RNA* **7**, 546-552.
- DAHM, S. C., DERRICK, W. B. Y UNHLENBECK, O. C. (1993). Evidence for the role of solvated metal hydroxide in the hammerhead cleavage mechanism. *Biochemistry* **32**, 13040-13045.
- DAHM, S. C. Y UNHLENBECK, O. C. (1991). Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry* **30**, 9464-9469.
- DARÒS, 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. USA* **91**, 12813-12817.
- DARÒS, J. A. Y FLORES, R. (1995a). Identification of a retroviroid-like element from plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6856-6860.
- DARÒS, J. A. Y FLORES, R. (1995b). Characterization of multiple circular RNAs derived from a plant viroid-like RNA by sequence deletions and duplications. *RNA*. **1**, 734-744.
- DAVIES, C., HASELOFF, J. Y SYMONS, R. H. (1990). Structure, self-cleavage, and replication of two viroid-like satellite RNAs (virusoids) of subterranean clover mottle virus. *Virology* **177**, 216-224.
- DE LA PEÑA, M., ELENA, S. F. Y MOYA, A. (2000). Effect of deleterious mutation-accumulation on the fitness of RNA bacteriophage MS2. *Evolution* **54**, 686-691.
- DESVIGNES, J. C. (1976). The virus diseases detected in greenhouse and in field by the peach seedling GF 305 indicator. *Acta Hort.* **67**, 315-323.
- DEYOUNG, M. B., SIWKOWSKI, A. M. LIAN, Y. Y HAMPEL, A. (1995). Catalytic properties of hairpin ribozymes derived from chicory yellow mottle virus and arabis mosaic virus satellite RNAs. *Biochemistry* **34**, 15785-15791.
- DIENER, T. O. (1971). Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. III. Subcellular location of PSTV-RNA and the question of whether virions exist in extracts or *in situ*. *Virology* **43**, 75-98.
- DIENER, T. O. (1981). Are viroids escaped introns? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 5014-5015.
- DIENER, T. O. (1986). Viroid processing: a model involving the central conserved region of hairpin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 58-62.
- DIENER, T. O. (1989). Circular RNAs: Relics of precellular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9370-9374.
- DIENER, T. O. (1991). Subviral pathogens of plants: viroids and viroidlike satellite RNAs. *FASEB J.* **5**, 2808-2813.



- DIENER, T. O. (1996). Origin and evolution of viroids and viroid-like satellites RNAs. *Virus Genes* **11**, 119-131.
- DIMOCK, A. W. Y GEISSINGER, C. M. (1969). A newly recognized disease of chrysanthemums caused by a graft-transmissible agent. *Phytopathology* **59**, 1024.
- DIMOCK, A. W., GEISSINGER, C. M. Y HORST, R. K. (1971). Chlorotic mottle: recognized disease of chrysanthemum. *Phytopathology* **61**, 415-419.
- 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.
- 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., DARÒS, J. A., RAGOZZINO, A. Y FLORES, R. (1997). A 451-nucleotide circular RNA from cherry with hammerhead ribozymes in its strands of both polarities. *J. Virol.* **71**, 6603-6610.
- DOMINGO, C., CONEJERO, V. Y VERA, P. (1994). Genes encoding acidic and basic class III  $\beta$ -1,3-glucanases are expressed in tomato plants upon viroid infection. *Plant Mol. Biol.* **24**, 725-732.
- DOMINGO, E., FLAVELL, R. A. Y WEISSMANN, C. (1976). *In vitro* site-directed mutagenesis: generation and properties of an infectious extracistronic mutant of bacteriophage Q $\beta$ . *Gene* **1**, 3-25.
- DOMINGO, E. Y HOLLAND, J. J. (1994). Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses *En: Evolutionary Biology of Viruses* (S. S. Morse, Ed.), pp. 171-180. Raven Press, New York.
- DOMINGO, E., MARTÍNEZ-SALAS, E., SOBRINO, F., DE LA TORRE, J. C., PORTELA, A., ORTÍN, J., LÓPEZ-GALÍNDEZ, C., PÉREZ-BRENA, P., VILLANUEVA, N., NÁJERA, R., VANDEPOL, S., STEINHAEUER, D., DE POLO, N. Y HOLLAND, J. J. (1985) The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance - a review. *Gene* **40**, 1-8.
- DOMINGO, E., SABO, D., TANIGUCHI, T. Y WEISSMANN, C. (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* **13**, 735-744.
- DRAKE, J. W. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4171-4175.
- DUARTE, E. A., CLARKE, D. K., MOYA, A., DOMINGO, E. Y HOLLAND, J. J. (1992). Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6015-6019.

- DURÁN-VILA, N. Y SEMANCIK, J. S. (1990). Variations in the cross protection effect between two strains of citrus exocortis viroid. *Ann. Appl. Biol.* **117**, 367-377.
- EARNSHAW, D. J., MASQUIDA, B., MULLER, S., SIGURDSSON, S. T., ECKSTEIN, F., WESTHOF, E. Y GAIT, M. J. (1997). Inter-domain cross-linking and molecular modeling of the hairpin ribozyme. *J. Mol. Biol.* **274**, 197-212.
- EIGEN, M. (1971). Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**, 465-523.
- EIGEN, M. (1992). Steps towards life. A perspective on evolution. *Oxford Univ. Press*.
- ELENA, S. F., DOPAZO, J., FLORES, R., DIENER, T. O. Y MOYA, A. (1991). Phylogeny of viroids, viroidlike satellite RNAs, and the viroidlike domain of hepatitis  $\delta$  virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5631-5634.
- ELENA, S. F., DOPAZO, J., DE LA PEÑA, M., FLORES, R., DIENER, T. O. Y MOYA, A. (2001). Phylogenetic analysis of viroid and viroid-like satellite RNAs from plants: a reassessment. *J. Mol. Evol.* **53**, 155-159.
- EPSTEIN, L. M. Y GALL, J. (1987). Self-cleaving transcripts of satellite DNA from the newt. *Cell* **48**, 535-543.
- ETSCHIED, M., TOUSIGNANT, M. E. Y KAPER, J. M. (1995). Small satellite of arabis mosaic virus: autolytic processing of *in vitro* transcripts of (+) and (-) polarity and infectivity of (+) strand transcripts. *J. Gen. Virol.* **76**, 271-282.
- FELDSTEIN, P. A., BUZAYAN, J. M. Y BRUENING, G. (1989). Two sequences participating in the autolytic processing of satellite ringspot virus complementary RNA. *Gene* **82**, 53-61.
- FELDSTEIN, P.A., HU, Y., OWENS, R.A. (1998) Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6560-6565.
- FERBEYRE, G., SMITH, J. M. Y CEDERGREN, R. Schistosome satellite DNA encodes active hammerhead ribozymes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3880-3888.
- FERNOW, K. H. (1967). Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology* **57**, 1347-1352.
- FLORES, R. (1989). Synthesis of RNAs specific to citrus exocortis viroid by a fraction rich in nuclei from infected *Gynura aurantiaca*: examination of the nature of the products and solubilization of the polymerase-template complex. *J. Gen. Virol.* **70**, 2695-2703.
- FLORES, R. (1995). Subviral agents: Viroids. *Arch. Virol. Suppl.* **10**, 495-497.

- FLORES, R., RANGLES, J. W., BAR-JOSEPH, M. Y DIENER, T. O. (2000). Viroids. *En Virus Taxonomy, 7th Rep. Intern. Com. Taxon. Viruses* (M. H. V. Van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle y R. B. Wickner, Eds.), pp. 1009-1024 Academic Press, San Diego.
- FLORES, R., HERNÁNDEZ, C., DE LA PEÑA, M., VERA, A. Y DARÒS, J. A. (2001) Hammerhead ribozyme structure and function in plant RNA replication. *Methods Enzymol.* **341**, 540-552.
- FLORES, R., DI SERIO, F. Y HERNÁNDEZ, C. (1997). Viroids: the non coding genomes. *Semin. Virol.* **8**, 65-73.
- FLORES, R. Y SEMANCIK, J. S. (1982). Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6285-6288.
- FORSTER, A. C., DAVIES, C., SHELDON, C., JEFFRIES, A. C. Y SYMONS, R. H. (1988). Self-cleaving viroid and newt RNAs may only be active as dimers. *Nature* **334**, 265-267.
- 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.
- FRANCKI, R. I. (1985). Plant virus satellites. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**, 151-174.
- GARCÍA-BREIJO, F. J., GARRO, R. Y CONEJERO, V. (1990). C7(P32) and C6(P34) PR proteins induced in tomato leaves by citrus exocortis viroid infection are chitinases. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **36**, 249-260.
- GAST, F. U., KEMPE, D., SPIEKER, R. L. Y SÄNGER, H. L. (1996). Secondary structure probing of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and sequence comparison with other small pathogenic RNA replicons provides evidence for central non canonical base-pairs, large A-rich loops, and a terminal branch. *J. Mol. Biol.* **262**, 652-670.
- GÓRA-SOCHACKA, A., KIERZEK, A., CANDRESSE, T. Y ZAGÓRSKI, W. (1997). The genetic stability of potato spindle tuber viroid (PSTVd) molecular variants. *RNA* **3**, 68-74.
- 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. USA* **75**, 896-900.
- GROSS, H. J., DOMDEY, H., LOSSOW, C. H., JANK, P., RABA, M., ALBERTY, H. Y SÄNGER, 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 SÄNGER, H. L. (1982). Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. *Eur. J. Biochem.* **121**, 249-257.

- GROSS, H. J., LIEBL, U., ALBERTY, H., KRUPP, G., DOMDEY, H., RAMM, K. Y SÄNGER, H. L. (1981). A severe and mild potato spindle tuber viroid isolate differ in three nucleotide exchanges only. *Biosci. Rep.* **1**, 235-241.
- GUERRIER-TAKADA, C., GARDINER, K., MARSH, T., PACE, N. Y ALTMAN, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**, 849-857.
- GULTYAEV, A. P., VAN BATENBURG, F. H. Y PLEIJ, C. W. (1998). Dynamic competition between alternative structures in viroid rnas simulated by an rna folding algorithm. *J. Mol. Biol.* **276**, 43-55.
- GUO, H. C. T., DE ABREU, D. M., TILLIER, E. R. M., SAVILLE, B. J., OLIVE, J. E. Y COLLINS, R. A. (1993). Nucleotide sequence requirements for self-cleavage of *Neurospora* VS RNA. *J. Mol. Biol.* **232**, 351-361.
- HAMMOND, R. W., SMITH, D. R. Y DIENER, T. O. (1989a). Nucleotide sequence and proposed secondary structure of *Columnea* latent viroid: a natural mosaic of viroid sequences. *Nucleic Acids Res.* **17**, 10083-10094.
- HAMMOND, R. W., DIENER, T. O. Y OWENS, R. A. (1989b). Infectivity of chimeric viroid transcripts reveals the presence of alternative processing sites in potato spindle tuber viroid. *Virology* **170**, 486-495.
- HAMPEL, A., TRITZ, R., HICKS, M. Y CRUZ, P. (1990). Hairpin catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA. *Nucleic Acids Res.* **18**, 299-304.
- HANOLD, D. Y RANGLES, J. W. (1991). Coconut cadang-cadang disease and its viroid agent. *Plant Dis.* **75**, 330-335.
- HARDERS, J., LUKÁCS, N., ROBERT-NICOUD, M., JOVIN, T. M., Y RIESNER, D. (1989). Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by *in situ* hybridisation and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.* **8**, 3941-3949.
- HASELOFF, J. Y GERLACH, W. L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endorribonuclease activities. *Nature* **334**, 585-591.
- HASELOFF, J., MOHAMED, N. A. Y SYMONS, R. H. (1982). Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconuts. *Nature* **299**, 316-321.
- HASELOFF, J. Y SYMONS, R. H. (1981). Chrysanthemum stunt viroid: primary sequence and secondary structure. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2741-2752.
- HASELOFF, J. Y SYMONS, R. H. (1982). Comparative sequence and structure of viroid-like RNAs of two plant viruses. *Nucleic Acids Res.* **10**, 3681-3691.

- HASHIMOTO, J. Y KOGANEZAWA, H. (1987). Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid. *Nucleic Acids Res.* **15**, 7045-7052.
- HEIDENREICH, O. Y ECKSTEIN, F. (1997). Synthetic ribozymes: the hammerhead ribozyme. *En Concepts in Gene Therapy* (M. Strauss y J. Baranger Eds), Walter de Gruyter, Berlin.
- HENDRY, P., McCALL, M. J., SANTIAGO, F. S. Y JENNINGS, P. A. (1995). *In vitro* activity of minimised hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3922-3927.
- HERMANN, T. Y PATEL, D. J. (1999). Stitching together RNA tertiary architectures. *J. Mol. Biol.* **294**, 829-849
- HERNÁNDEZ, C., DARÒS, J. A., ELENA, S. F., MOYA, A. Y FLORES, R. (1992a). The strands of both polarities of a circular RNA from carnation self-cleave *in vitro* through alternative double- and single-hammerhead structures. *Nucleic Acids Res.* **20**, 6323-6329.
- HERNÁNDEZ, C., ELENA, S. F., MOYA, A. Y FLORES, R. (1992b). Pear blister canker viroid is a member of the apple scar skin subgroup (apscaviroids) and has also sequence homologies 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 self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3711-3715.
- HEROLD, T., HAAS, B., SINGH, R. P., BOUCHER, A. Y SÄNGER, H. L. (1992). Sequence analysis of five new field isolates demonstrates that the chain length of potato spindle tuber viroid (PSTVd) is not strictly conserved but as variable as in other viroids. *Plant Mol. Biol.* **19**, 329-333.
- HERTEL, K. J., PARDI, A., UHLENBECK, O. C., KOIZUMI, M., OHTSUKA, E., UESUGI, S., CEDERGREN, R., ECKSTEIN, F., GERLACH, W. L., HODGSON, R. Y SYMONS, R. H. (1992). Numbering system for the hammerhead. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3252.
- HISAMATSU, S., MORIKAWA, Y., TOMITA, R., TANAKA, T., SONOKI, S. Y KIKUCHI, Y. (1997). *In vitro* activity of the hairpin ribozyme derived from the negative strand of arabis mosaic virus satellite RNA. *J. Biochem.* **122**, 352-357.
- HOLLAND, J. J., DOMINGO, E., DE LA TORRE, J. C. Y STEINHAEUER, D. A. (1990). Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J. Virol.* **64**, 3960-3962.
- HOLLAND, J. J., SPINDLER, K., HORODYSKI, F., GRABAU, E., NICHOL, S. Y VANDEPOL, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science*, **215**, 1577-1585.
- HOLLAND, J. J. (1992). Genetic diversity of RNA viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **176**.
- HORST, R. K. (1975). Detection of a latent infectious agent that protects against infection by chrysanthemum chlorotic mottle viroid. *Phytopathology* **65**, 1000-1003.

- HORST, R. K., GEISSINGER, C. M. Y STASZEWICK, M. (1974). Treatments that improve mechanical transmission of chrysanthemum chlorotic mottle virus. *Acta Hort.* **36**, 59-63.
- HORST, R. K. Y KRYCZYNSKY (1971). The effect of the temperature on symptom expression of chrysanthemum chlorotic mottle. *Phytopathology* **61**, 895.
- HORST, R. K., LANGHANS, R. W. Y SMITH, S. H. (1977). Effects of chrysanthemum stunt, chlorotic mottle, aspermy and mosaic on flowering and rooting of chrysanthemums. *Phytopathology* **67**, 9-14.
- HU, Y., FELDSTEIN, P. A., BOTTINO, P. J. Y OWENS, R. A. (1996). Role of the variable domain in modulating potato spindle tuber viroid replication. *Virology* **219**, 45-56.
- HU, Y., FELDSTEIN, P. A., HAMMOND, J., HAMMOND, R. W., BOTTINO, P. J. Y OWENS, R. A. (1997). Destabilization of potato spindle tuber viroid by mutations in the left terminal loop. *J. Gen. Virol.* **78**, 1199-1206.
- HUTCHINS, C. J., KEESE, P., VISVADER, J. E., RATHJEN, P. D., MCINNES, J. L. Y SYMONS, R. H. (1985). Comparison of 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. *Nucleic Acid Res.* **14**, 3627-3640.
- 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 viroid RNA in viroid replication. *Mol. Gen. Gen.* **196**, 421-428.
- ISHIZAKA, M., OHSHIMA, Y. Y TANI, T. (1995). Isolation of active ribozymes from an RNA pool of random sequences using an anchored substrate RNA. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **214**, 403-409.
- ITAYA, A., FOLIMONOV, A., MATSUDA, Y., NELSON, R. Y DING, B. (2001). Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* (en prensa).
- JENG, K. S., DANIEL, A. Y LAI, M. M. C. (1996). A pseudoknot ribozyme structure is active *in vivo* and required for hepatitis delta virus RNA replication. *J. Virol.* **70**, 2403-2410.
- KAPER, J. M., TOUSIGNANT, M. E. Y STEGER, G. (1988). Nucleotide sequence predicts circularity and self-cleavage of 300-ribonucleotide satellite of arabis mosaic virus. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **154**, 318-325.
- KAUFFMAN, S. A. (1993). The origins of order. Self organization and selection in evolution. Oxford University Press, New York.

- KAWAMOTO, S. O., HORST, R. K. Y WONG, S. M. (1985). Solubility of chrysanthemum chlorotic mottle viroid in LiCl solutions. *Acta Hort.* **164**, 333-340.
- KEESE, P., BRUENING, G. Y SYMONS, R. H. (1983). Comparative sequence and structure of circular RNAs from two isolates of lucerne transient streak virus. *FEBS Lett.* **159**, 185-190.
- 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.
- 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. USA* **82**, 4582-4586.
- KEESE, P. Y SYMONS, R. H. (1987). Physical-chemical properties: molecular structure (primary and secondary). *En The Viroids* (T. O. Diener Ed), pp. 37-62. Plenum Press, New York.
- KENNEL, J. C., SAVILLE, B. J., MOHR, S., KUIPER, M. T. R., SABOURIN, J. R., COLLINS, R. A. Y LAMBOWITZ, A. L. (1995). The VS catalytic RNA replicates by reverse transcription as a satellite of a retroplasmid. *Gen. Devel.* **9**, 294-303.
- KHOURY, J., 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.
- KIEFER, M. C., OWENS, R. A. Y DIENER, T. O. (1983). Structural similarities between viroids and transposable elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6234-6238.
- KOLTUNOW, A. M., KRAKE, L. R., JOHNSON, S. D. Y REZAIAN, M. A. (1989). Two related viroids cause grapevine yellow speckle disease independently. *J. Gen. Virol.* **70**, 3411-3419.
- 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.
- 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.
- KRUGER, K., GRABOWSKI, P. J., ZAUG, A. J., SANDS, J., GOTTSCHLING, D. E. Y CECH, T. R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* **31**, 147-157.
- KRYCZYNSKY, S. P., HORST, R. K. Y DIMOCK, A. W. (1971). Some properties of chrysanthemum chlorotic mottle virus. *Acta Hort.* **36**, 59-63.

- KUO, M. Y. P., SHARMEEN, L., DINTER-GOTTLIEB, G. Y TAYLOR, J. (1988). Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J. Virol.* **62**, 4439-4444.
- LAFONTAINE, D., BEAUDRY, D., MARQUIS, P. Y PERRAULT, J. P. (1995). Intra- and intermolecular non enzymatic ligations occur within transcripts derived from the peach latent mosaic viroid. *Virology* **212**, 705-709.
- LAI, Y. C., LEE, J. Y., LIU, H. J., LIN, J. Y. Y WU, H. N. (1996). Effects of circular permutation on the cis-cleavage reaction of a hepatitis-delta virus ribozyme - application to trans-acting ribozyme design. *Biochemistry* **35**, 124-131.
- LAZINSKI, D. W. Y TAYLOR, J. M. (1994). Recent developments in hepatitis delta virus research. *Adv. Virus Res.* **43**, 187-231.
- LIMA, M. I., FONSECA, M. E. N., FLORES, R. Y KITAJIMA, E. W. (1994). Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplast of avocado leaves by *in situ* hybridization. *Arch. Virol.* **138**, 285-390.
- LIU, Y-H. Y SYMONS, R. H. (1998). Specific RNA self-cleavage in coconut cadang cadang viroid: potential for a role in rolling circle replication. *RNA* **4**, 418-429.
- LONG, D. M. Y UHLENBECK, O. C. (1994). Kinetic characterization of intramolecular and intermolecular hammerhead RNAs with stem II deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6977-6981.
- LOSS, P., SCHIMTZ, 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.
- LUZI, E., ECKSTEIN, F. Y BARSACCHI, G. (1997). The newt ribozyme is part of a riboprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9711-9716.
- MARCOS, J. F. Y FLORES, R. (1992). Characterization of RNAs specific to avocado sunblotch viroid synthesized *in vitro* by a cell-free system from infected avocado leaves. *Virology* **186**, 481-488.
- MARTÍNEZ-SORIANO, J. P., GALINDO-ALONSO, J., MAROON, C. J. M., YUCEL, I., SMITH, D. Y DIENER, T. O. (1996). Mexican papita viroid: putative antecesor of crop viroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9397-9401.
- MARZKUFF, W. F. Y HUANG, R. C. (1984). Transcription of RNA in isolated nuclei. *En Transcription and translation: A practical approach* (B. D. Hames y S. J. Higgings, Eds.) pp 89-129. IRL Press. Oxford y Washington DC.



- MCKAY, D. B. (1996). Structure and function of the hammerhead ribozyme: an unfinished story. *RNA* **2**, 395-403.
- MILLER, E. D., KIM, K. H. Y HEMENWAY C. (1999) Restoration of a stem-loop structure required for potato virus X RNA accumulation indicates selection for a mismatch and a GNRA tetraloop. *Virology* **260**, 342-353.
- MILLER, W. A., HERCUS, T., WATERHOUSE, P. M. Y GERLACH, W. L. (1991). A satellite RNA of barley yellow dwarf virus contains a novel hammerhead structure in the self-cleavage domain. *Virology* **183**, 711-720.
- MILLER, W. A. Y SILVER, S. L. (1991). Alternative tertiary structure attenuates self-cleavage of the ribozyme in the satellite RNA of barley yellow dwarf virus. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5313-5320.
- MÜHLBACH, H. P. Y SÄNGER, H. L. (1979). Viroid replication is inhibited by alpha-amanitin. *Nature* **278**, 185-188.
- MULLER, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mut. Res.* **1**, 2-9.
- MURRAY, J. B., TERWEY, D. P., MALONEY, L., KARPEISKY, A., USMAN, N., BEIGELMAN, L. Y SCOTT, W. G. (1998a). The structural basis of hammerhead ribozyme self-cleavage. *Cell* **92**, 665-673.
- MURRAY, J. B., SEYHAN, A. A., WALTER, N. G., BURKE, J. M. Y SCOTT, W. G. (1998b). The hammerhead, hairpin and VS ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone. *Chem Biol.* **5**, 587-95.
- MURRAY, J. B. Y SCOTT, W. G. (2000). Does a single metal ion bridge the A-9 and scissile phosphate groups in the catalytically active hammerhead ribozyme structure? *J. Mol. Biol.* **296**, 33-41.
- NAVARRO, B. (1997). El viroide del moteado clorótico del crisantemo: propiedades estructurales inusuales de un subgrupo de viroides con ribozimas de cabeza de martillo. Universidad de Valencia. (Tesis doctoral).
- 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. USA* **94**, 11262-11267.
- NAVARRO, J. A., DARÒS, 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., 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.

- 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.
- NIBLETT, C. L., DICKSON, E., FERNOW, K. H., HORST, R. K. Y ZAITLIN, M. (1978). Cross-protection among four viroids. *Virology* **91**, 198-203.
- OHKAWA, J., KOGUMA, T., KOHDA, T. Y TAIRA, K. (1995). Ribozymes: from mechanistic studies to applications *in vivo*. *J. Biochem.* **118**, 251-258.
- OHNO, T., TAKAMATSU, N., MESHI, T. Y OKADA, Y. (1983). Hop stunt viroid: molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA. *Nucleic Acids Res.* **11**, 6185-6187.
- O'REAR, J. L., WANG, S., FEIG, A. L., BEIGELMAN, L., UHLENBECK, O. C. Y HERSCHLAG, D. (2001). Comparison of the hammerhead cleavage reactions stimulated by monovalent and divalent cations. *RNA* **7**, 537-545.
- OWENS, R. A., CHEN, W., HU, Y. Y HSU, Y. H. (1995). Suppression of potato spindle tuber viroid replication and symptom expression by mutations which stabilize the pathogenicity domain. *Virology* **208**, 554-564.
- OWENS, R. A., HAMMOND, R. W., GARDNER, R. C., KIEFER, M. C., THOMSON, S. M. Y CRESS, D. E. (1986). Site-specific mutagenesis of potato spindle tuber viroid cDNA. *Plant Mol. Biol.* **6**, 179-192.
- OWENS, R. A., STEGER, G., HU, Y., FELLS, A., HAMMOND, R. W. Y RIESNER, D. (1996). RNA structural features responsible for potato spindle tuber viroid pathogenicity. *Virology* **222**, 144-158.
- OWENS, R. A., THOMSON, S. M. Y STEGER, G. (1991). Effects of random mutagenesis upon potato spindle tuber viroid replication and symptom expression. *Virology* **185**, 18-31.
- PALLÁS, V. Y FLORES, R. (1989). Interactions between citrus exocortis and potato spindle tuber viroids in plants of *Gynura aurantiaca* and *Lycopersicon esculentum*. *Intervirology* **30**, 10-17.
- PALLÁS, V., GARCÍA-LUQUE, I., DOMINGO, E. Y FLORES, R. (1988). Sequence variability in avocado sunblotch viroid (ASBV). *Nucleic Acids Res.* **16**, 9864.
- PALUKAITIS, P., KURATH, G. Y BOCCARDO, G. (1991). Viroids-purification, characterization, diagnosis, and detection of sequence variation: application to the carnation stunt associated viroid RNAs. En *Viroids and Satellites: Molecular Parasites in the Frontier of Life* (K. Maramorosh, Ed.), pp. 59-77. CRC Press, Boca Raton.
- 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.
- PERROTA, A. T. Y BEEN, M. D. (1991). A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis  $\delta$  virus RNA. *Nature* **350**, 434-436.
- PLEY, H. W., FLAHERTY, K. M. Y MCKAY, D. B. (1994). Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature* **372**, 111-113.
- POLIVKA, H., STAUB, U. Y GROSS, H. J. (1996). Variation of viroid profiles in individual grapevine plants: novel grapevine yellow speckle viroid 1 mutants show alteration of hairpin I. *J. Gen. Virol.* **77**, 155-161.
- PONTIUS, B. W., LOTT, W. B. Y VON HIPPEL, P. H. (1997). Observations on catalysis by hammerhead ribozymes are consistent with a two-divalent-metal-ion mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2290-2294.
- PRODY, G. A., BAKOS, J. T., BUZAYAN, J. M., SCHENEIDER, I. R. Y BRUENING, G. (1986). Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* **231**, 1577-1580.
- PUCHTA, H., RAMM, K., LUCKINGER, R., HADAS, R., BAR-JOSEPH, M. Y SÄNGER, 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.
- PUCHTA, H., RAMM, K. Y SÄNGER, H. L. (1988). The molecular structure of hop latent viroid (HLV) a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucleic Acids Res.* **16**, 4197-4216.
- QU, F., HEINRICH, C., LOSS, P., STEGER, G., TIEN, P. Y RIESNER, D. (1993). Multiple pathways of reversion in viroid conservation of structural domains. *EMBO J.* **12**, 2129-2139.
- QUIGLEY, G. J. Y RICH, A. (1976). Structural domains of transfer RNA molecules. *Science* **194**, 796-806.
- RAKOWSKI, A. G. Y SYMONS, R. H. (1989). Comparative sequence studies of variants of avocado sunblotch viroid. *Virology* **173**, 352-356.
- RAKOWSKI, A. G. Y SYMONS, R. H. (1994). Infectivity of linear monomeric transcripts of citrus exocortis viroid: terminal sequences requirements for processing. *Virology* **203**, 328-335.
- RASTOGI, T., BEATTIE, T., OLIVE, J. E. Y COLLINS, R. A. (1996). A long-range pseudoknot is required for activity of the *Neurospora* VS ribozyme. *EMBO J.* **15**, 2820-2825.
- 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.
- REZAIAN, M. A. (1990). Australian grapevine viroid-evidence for extensive recombination between viroids. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1813-1818.

- RIESNER, D. (1990). Structure of viroids and their replication intermediates. Are thermodynamic domains also functional domains?. *Semin. Virol.* **1**, 83-99.
- RIESNER, D. (1991). Viroids: from thermodynamics to cellular structure and function. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 122-131.
- RIVERA-BUSTAMANTE, R. F. Y SEMANCIK, J. S. (1989). Properties of a viroid-replicating complex solubilized from nuclei. *J. Gen. Virol.* **70**, 2707-2716.
- ROBERTSON, H. D. (1996). How did replicating and coding RNAs first get together?. *Science* **274**, 66-67.
- ROEDER, R. G. (1976). Eukaryotic nuclear RNA polymerases. *En RNA Polymerases* (R. Losick y M. Chamberlin, Eds.), pp. 285-329. Cold Spring Harbor. New York.
- ROMAINE, C. P. Y HORST, R. K. (1975). Suggested viroid etiology for chrysanthemum chlorotic mottle disease. *Virology* **64**, 86-95.
- ROOSSINCK, M. J., SLEAT, D. Y PALUKAITIS, P. (1992). Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. *Microbiol. Rev.* **56**, 265-279.
- ROSENSTEIN, S. P. Y BEEN, M. D. (1991). Evidence that genomic and antigenomic RNA self-cleaving elements from hepatitis  $\delta$  virus have similar secondary structures. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5409-5416.
- ROSENSTEIN, S. P. Y BEEN, M. D. (1996). Hepatitis delta virus ribozymes fold to generate a solvent-inaccessible core with essential nucleotides near the cleavage site phosphate. *Biochemistry* **35**, 11403-11413.
- RUBINO, L., TOUSIGNANT, M. E., STEGER, G. Y KAPER, J. M. (1990). Nucleotide sequence and structural analysis of two satellite RNAs associated with chicory yellow mottle virus. *J. Gen. Virol.* **71**, 1897-1903.
- RUFFNER, D. E., STORMO, G. D. Y UHLENBECK, O. C. (1990). Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry* **29**, 10695-10702.
- RUPERT, P. B. Y FERRE-D'AMARE, A.R. (2001). Crystal structure of a hairpin ribozyme-inhibitor complex with implications for catalysis. *Nature* **410**, 780-786.
- RYU, W-S., NETTER, H. J., BAYER, M. Y TAYLOR, J. (1993). Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus. *J. Virol.* **67**, 3281-3287.
- SAKAMOTO, T., TANAKA, Y., KUWABARA, T., KIM, M. H., KURIHARA, Y., KATAHIRA, M. Y UESUGI, S. (1997). Properties of hepatitis-delta-virus ribozyme, which consists of three RNA oligomer strands. *J. Biochem.* **121**, 1123-1128.

- 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. USA* **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. USA* **89**, 10104-10108.
- SAVILLE, B. J. Y COLLINS, R. A. (1990). A site specific self-cleavage reaction performed by a novel RNA in *Neurospora* mitochondria. *Cell* **61**, 685-696.
- SAVILLE, B. J. Y COLLINS, R. A. (1991). RNA-mediated ligation and self-cleavage products of a *Neurospora* mitochondrial plasmid transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8826-8830.
- SCHINDLER, I. M. Y MÜHLBACH, H. P. (1992). Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci.* **84**, 221-229.
- SCOTT, W. G., FINCH, J. T. Y KLUG, A. (1995). The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell* **81**, 991-1002.
- SCOTT, W. G., MURRAY, J. B., ARNOLD, J. R. P., STODDARD, B. L. Y KLUG, A. (1996). Capturing the structure of a catalytic RNA intermediate: the hammerhead ribozyme. *Science* **274**, 2065-2069.
- SELINGER, D., LIAO, X. Y WISE, J. A. (1993). Functional interchangeability of the structurally similar tetranucleotide loops GAAA and UUCG in fission yeast signal recognition particle RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5409-5413.
- 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.
- SEMANCIK, J. S. Y SZYCHOWSKI, J. A. (1994). Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *J. Gen. Virol.* **75**, 1543-1549.
- SEMANCIK, J. S. Y VANDERWUODE, W. J. (1976). Exocortis viroid: cytopathic effects at the plasma membrane in association with pathogenic RNA. *Virology* **69**, 719-726.
- SHAPIRO, B. A., BENGALI, D., KASPRZAK, W., WU, J. C. (2001). RNA folding pathway functional intermediates: their prediction and analysis. *J Mol. Biol.* **312**, 27-44.
- SHELDON, C. C. Y SYMONS, R. H. (1989). Mutagenesis analysis of a self-cleaving RNA. *Nucleic Acids Res.* **17**, 5679-5685.
- SHIKATA, E. (1990). New viroids from Japan. *Semin. Virol.* **1**, 107-115.

- SHIPPY, R., SIWKOWSKI, A. Y HAMPEL, A. (1998). Mutational analysis of loops 1 and 5 of the hairpin ribozyme. *Biochemistry* **37**, 564-570.
- 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.
- SIWKOWSKI, A., SHIPPY, R. Y HAMPEL, A. (1997). Analysis of hairpin ribozyme base mutations in loop-2 and loop-4 and their effects on *cis*-cleavage in-vitro. *Biochemistry* **36**, 3930-3940.
- ŠKORI , D., CONERLY, M., SZYCHOWSKI, J. A. Y SEMANCIK, J. S. (2001). CEVd-induced symptom modification as a response to a host-specific temperature-sensitive reaction. *Virology* **280**, 115-123.
- 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.
- SONG SI, SILVER SL, AULIK MA, RASOCHOVA L, MOHAN BR, MILLER WA. (1999). Satellite cereal yellow dwarf virus-RPV (satRPV) RNA requires a double hammerhead for self-cleavage and an alternative structure for replication. *J. Mol Biol.* **293**, 781-793.
- SPIEKER, R. L. (1996a). The molecular structure of *Iresine* viroid, a new viroid species from *Iresine herbstii* (beefsteak plant). *J. Gen. Virol.* **77**, 2631-2635.
- SPIEKER, R. L. (1996b). A new sequence variant of *coleus blumei* viroid-1 from the *coleus blumei* cultivar "Rainbow Gold". *Arch. Virol.* **141**, 2153-2161.
- SPIEKER, R. L., HAAS, B., CHARNG, Y. C., FREIMÜLLER, K. Y SÄNGER, H. L. (1990). Primary and secondary structure of a new viroid 'species' (CbVd1) present in the *Coleus blumei* cultivar 'Bienvenue'. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3998.
- SPIEKER, R. L., MARINKOVIC, S. Y SÄNGER, H. L. (1996). A new sequence variant of *coleus blumei* viroid 3 from *coleus blumei* cultivar "Fairway Ruby". *Arch. Virol.* **141**, 1377-1386.
- SPIESMACHER, E., MÜLBACH, H. P., SCHNÖLZER, M., HAAS, B: Y SÄNGER, H. L. (1983). Oligomeric forms of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and of its complementary RNA are present in nuclei isolated from viroid-infected potato cells. *Biosci. Rep.* **3**, 767-774.
- STAGE-ZIMMERMANN, T.K. Y UHLENBECK, O.C. (1998). Hammerhead ribozyme kinetics. *RNA* **4**, 875-889.
- SULLENGER, B. A. Y CECH, T. R. (1993). Tethering ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science* **262**, 1566-1569.
- SYMONS, R. H. (1981). Avocado sunblotch viroid: primary structure and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Res.* **9**, 6527-6537.
- SYMONS R. H. (1997). Small catalytic RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 2683-2689.

- SYMONS R. H. (1992). Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Res.* **25**, 641-671.
- TAKAHASHI, T., YAGUCHI, S., OIKAWA, S. Y KAMITA, N. (1992). Subcellular location of hop stunt viroid. *Phytopath. Z.* **103**, 285-293.
- TANG, J. Y BREAKER, R. R. (1997). Examination of the catalytic fitness of the hammerhead ribozyme by *in vitro* selection. *RNA* **3**, 914-925.
- TANNER, N. K., SCHAFF, S., THILL, E., PETIT-KOSKAS, E., CRAIN-DENOYELLE, A. M. Y WESTHOF, E. (1994). A three dimensional model of hepatitis delta virus ribozyme based on biochemical and mutational analysis. *Curr. Biol.* **4**, 488-498.
- TAYLOR, J. M. (1999). Human hepatitis delta virus: an agent with similarities to certain satellite RNAs of plants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **239**, 107-122.
- THOMSON, J. B., SIGURDSSON, S. T., ZEUCH, A. Y ECKSTEIN, F. (1996). *In vitro* selection of hammerhead ribozymes containing a bulged nucleotide in stem II. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4401-4406.
- TINOCO, I., CAI, Z. P., Y KIEFT, J. (1995). Structural elements in a hairpin ribozyme. *J. Cell Biochem.* **S19A**, 204.
- THILL, G., BLUMENFELD, M., LESCURE, F. Y VASSEUR, M. (1991). Self-cleavage of a 71 nucleotide-long ribozyme derived from hepatitis delta virus genomic RNA. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6519-6525.
- TORNERO, P., CONEJERO, V. Y VERA, P. (1997). Identification of a new pathogen induced member of the subtilisin like processing protease family from plants. *J. Biol. Chem.* **272**, 14412-14419.
- TSAGRIS, M., TABLER, M., MÜHLBACH, H. P. Y SÄNGER, 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.
- TSAGRIS, M., TABLER, M. Y SÄNGER, H. L. (1991). Ribonuclease T1 generates circular RNA molecules from viroid-specific RNA transcripts by cleavage and intramolecular ligation. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1605-1612.
- TUSCHL, T. Y ECKSTEIN, F. (1993). Hammerhead ribozymes - importance of stem-loop-II for activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6991-6994.
- UHLENBECK, O. C. (1987). A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* **328**, 596-600.

- VERA, A., DARÒS, J. A., FLORES, R. Y HERNÁNDEZ, C. (2000). The DNA of a plant retroviroid-like element is fused to different sites in the genome of a plant pararetrovirus and shows multiple forms with sequence deletions. *J Virol.* **74**, 10390-10400.
- VERA, P. Y CONEJERO, V. (1988). Pathogenesis-related proteins in tomato. P69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiol.* **88**, 58-63.
- VERA, P. Y CONEJERO, V. (1989). The induction and accumulation of the pathogenesis-related P69 proteinase in tomato during citrus exocortis viroid infection and in response to chemical treatments. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**, 323-334.
- VERA, P., TORNERO, P. Y CONEJERO, V. (1993). Cloning and expression analysis of a viroid-induced peroxidase from tomato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**, 790-794.
- VISVADER, J. E., FORSTER, A. C. Y SYMONS, R. H. (1985). Infectivity and *in vitro* mutagenesis of monomeric cDNA clones of citrus exocortis viroid indicate the site of processing of viroid precursors. *Nucleic Acids Res.* **13**, 5843-5856.
- VISVADER, J. E. Y SYMONS, R. H. (1985). Eleven new sequences variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with the pathogenicity. *Nucleic Acids Res.* **13**, 2907-2920.
- 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.
- WANG, S., KARBSTEIN, K., PERACCHI, A., BEIGELMAN, L. Y HERSCHLAG, D. (1999). Identification of the hammerhead ribozyme metal ion binding site responsible for rescue of the deleterious effect of a cleavage site phosphorothioate. *Biochemistry* **38**, 14363-14378.
- WASSENEGGER, M., HEIMES, S. Y SÄNGER, H. L. (1994). An infectious viroid RNA replicon evolved from a *in vitro*-generated non-infectious viroid deletion mutant via a complementary deletion *in vivo*. *EMBO J.* **13**, 6172-6177.
- WRIGHT, S. (1967). Surfaces of selective value. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 165-172.
- YOSHIKAWA, N. Y TAKAHASHI, T. (1986). Inhibition of hop stunt viroid replication by  $\alpha$ -amanitin. *Z. Pflkrankh. Pflschutz.* **93**, 62-71.
- 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.
- 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.



## AGRADECIMIENTOS





### **Agradecimientos**

A Ricardo por el interés y la confianza que depositó en mí y por todo lo que tan generosamente ha querido enseñarme.

A toda la gente del laboratorio 4 que estuvo, o está, y que contribuyó de una manera u otra a que esta tesis haya salido adelante. Especialmente a Amparo, te agradezco de todo corazón tu labor durante estos años (aunque sé que muchas plantas de crisantemo no piensan lo mismo), a Bea, como ves, tu “herencia” dio sus frutos, a Carmelo, que siempre has estado ahí para lo que hiciera falta (incluso para jugar al squash, Miliu y Fede incluidos), a M<sup>a</sup> Eugenia, la mejor sonrisa del lab, y a Alberto, que me enseñaste lo difícil que es enseñar.

A Carmen, gracias por estar siempre dispuesta a compartir tu experiencia.

A Toni, no, no me he olvidado de tí, gracias por ser tan buen amigo.

A l@s buen@s amigos@s desperdigados por todo el IBMCP y que han permitido tantos buenos ratos.

...y como no, a mi familia, especialmente a Inma, por todo.

