

# Comentarios de Artículos

## Virus de plantas

### COORDINADOR:

Ricardo Flores

rflores@ibmcp.upv.es

El factor HCPro de *Potyvirus* interacciona con una proteína de la planta, HIP2, asociada al citoesqueleto de microtúbulos. Una interacción importante para el devenir de la infección viral

Tomás Canto Ceballos

Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid.

En comparación con otros virus de plantas con RNA genómico de polaridad positiva, los miembros del género *Potyvirus* son relativamente grandes, expresando numerosos productos génicos. La estrategia de expresión de estos productos (excepto uno) como una única poliproteína que sufrirá procesamientos postraduccionales mediados por proteasas virales, hace que estos se generen en cantidades equimolares. Como no es esperable que en cada momento del ciclo infectivo viral se requieran cantidades similares de replicasa o de proteína de la cápsida, por poner un ejemplo, esta estrategia no parecería muy eficiente. Sin embargo, estos virus se encuentran entre los más numerosos, cosmopolitas e importantes desde un punto de vista agronómico.

Para que todos estos factores virales realicen sus funciones en interacciones compatibles virus-planta sin competir o interferirse entre ellos, su localización subcelular y procesamiento deben estar integrados y regulados. Aunque nuestro conocimiento del interactoma de cada una de estas proteínas potyvirales con factores de la planta (proteínas o ácidos nucleicos) no cesa de aumentar, sabemos menos acerca de cómo estas se traslocan a los sitios donde deben realizar sus funciones biológicas, se acumulan, procesan o degradan. Varias de estas proteínas forman inclusiones en distintos compartimentos subcelulares, como en el caso de las proteínas NIa y NIb (*nuclear inclusion proteins a y b*) en el núcleo, de la proteína CI (*cylindrical inclusion protein*) en el citoplasma formando los característicos molinetes (*pinwheels* asociados a plasmodesmos, o la proteína HCPro (*helper component protease*) en inclusiones irregulares en el citoplasma. Pero no se conoce si estas estructuras constituyen meros sitios de almacenamiento o eliminación de exceso de proteína, o si tienen alguna funcionalidad.

Así pues, aun conociendo mediante aproximaciones genéticas las funciones de estos factores virales, carecemos de una visión integrada acerca de cómo estos las realizan en el entorno celular durante la infección. Quizás el factor mejor comprendido en este sentido sea la CI, de la que se sabe que ayuda a la traslocación (junto con el factor viral 6K2) de las estructuras vesiculares que constituyen las factorías donde se produce la replicación y traducción viral, desde el retículo endoplasmático (ER) al entorno de los cloroplastos vía filamentos de actina, y también que se trasloca mediante la ruta secretora del Golgi hacia los plasmodesmos, donde está involucrada en el movimiento viral.

La HCPro es una proteína viral multifuncional importante, que aparte de su actividad como proteasa, suprime el silenciamiento antiviral y es, además, necesaria en la dispersión horizontal de virus por sus insectos vectores. Se sabe que la HCPro interacciona con diversos factores del huésped, incluyendo componentes de la maquinaria del silenciamiento antiviral, de la ruta de autofagia o del proteasoma, factores de transcripción, y otros. Poco se sabe acerca de su tráfico y dinámicas intracelulares, más allá de su distribución difusa en el citoplasma, afectando al ER, o formando inclusiones amorfas. En los dos artículos de Haikonen y colaboradores, se muestra, mediante fluorescencia por complementación bimolecular, que la HCPro es capaz de interactuar con proteínas HIP2 asociadas a los microtúbulos (MT) en doble híbrido en levadura y en planta. Los autores asocian los dominios de interacción, tanto en la proteína viral como en HIP2, a motivos específicos de sus regiones C-terminales: en el caso de la HCPro, a la región HVR (*highly variable region*) de seis aminoácidos. Y, además, demuestran cómo mutaciones en la zona HVR afectan a dicha interacción, así como a la velocidad de la dispersión sistémica del *potyvirus* *Potato virus A* (PVA) y a su título viral en *Nicotiana benthamiana* y en la planta del tabaco, sugiriendo que esta interacción es importante para el virus. Sin embargo, y como su nombre indica, esta HVR no está conservada en otros



### ARTÍCULO DE PROCEDENCIA

- Haikonen, T. *et ál.* (2013). «Mutation of a Short Variable Region in HCpro Protein of *Potato virus A* Affects Interactions with a Microtubule-Associated Protein and Induces Necrotic Responses in Tobacco». *Mol. Plant-Microbe Interact.* **26**: 721-733.

potyvirus. Es más, las mutaciones en la misma afectan a la conformación de regiones adyacentes de la HCPro involucradas en importantes funciones biológicas, lo que hace difícil discriminar la importancia para el virus de la interacción con HIP2. Pero los autores también muestran que el silenciamiento de HIP2 en *N. benthamiana* mediante metodología VIGS (*virus-induced gene silencing*) reduce la acumulación del PVA, lo que apoya su tesis de que la interacción es importante. En cualquier caso, estos trabajos revelan que la HCPro interactúa con el citoesqueleto de los MT y posiblemente lo utiliza para trasladarse, quizás entre diversas estructuras como el ER o las inclusiones amorfas, llevando a cabo algunas de sus diversas funciones por rutas diferentes de las utilizadas por otros factores virales, como las mencionadas para la CI.

■ Haikonen, T. *et al.* (2013). «Interaction of the Microtubule-Associated Host Protein HIP2 with Viral Helper Component Proteinase Is Important in Infection with *Potato virus A*». *Mol. Plant-Microbe Interact.* **26**: 734-744.

## Virus de plantas

### La proteína de movimiento del TMV se asocia, sin integrarse, a membranas celulares

Frederic Aparicio Herrero

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, IBMCP (CSIC-UPV).Valencia

Para invadir sistémicamente una planta, los virus deben transportarse desde las células inicialmente infectadas a las adyacentes, en un proceso denominado «movimiento a corta distancia» o intercelular, para luego acceder al sistema vascular y, mediante el mismo, alcanzar las partes distales de la planta («transporte a larga distancia»). El transporte intercelular se lleva a cabo a través de los plasmodesmos (PD), canales que atraviesan las membranas y paredes celulares conectando células vecinas, y que a lo largo de su eje contienen una estructura cilíndrica especializada del retículo endoplasmático (ER) a la que se denomina desmotúbulo. Los virus expresan una o varias proteínas, conocidas como de movimiento (MP), que permiten la translocación del virus a través de los PD.

Uno de los virus de plantas más estudiados para entender los mecanismos implicados en el transporte intercelular es el virus del mosaico del tabaco (TMV). La MP del TMV es la proteína tipo de la familia de proteínas de movimiento, denominada 30K. Esta familia de MPs es mayoritaria en los virus de plantas puesto que se encuentra en 18 géneros virales. Una larga serie de estudios ha permitido identificar en la MP del TMV diferentes dominios implicados en los diversos procesos requeridos en el transporte intercelular, tales como: la unión al RNA viral, la localización en los PD, el aumento del tamaño de exclusión molecular de estos, y la asociación al ER. La replicación y síntesis de los componentes virales del TMV ocurre en las denominadas factorías virales, que son compartimentos derivados del ER. La MP se asocia al ER e interactúa con estos complejos transportándolos hacia y a través de los PD, por lo que la asociación entre la MP y el ER es un requerimiento crítico en el transporte intercelular del TMV. En este contexto, Brill y colaboradores (2000) propusieron un modelo topológico para explicar la asociación de la MP del TMV con las membranas del ER: la proteína viral estaría integrada en la membrana del ER a través de sus dos dominios transmembrana, dejando los extremos N- y C-terminales expuestos hacia el citoplasma, mientras que el dominio central hidrofílico (localizado entre los dos dominios transmembrana), quedaría expuesto hacia el lumen del retículo. Sin embargo, durante los últimos años este modelo ha sido cuestionado al no poder explicar cómo se establecen diversas interacciones entre la MP y factores celulares descritas en la literatura.

Los autores del trabajo objeto de este comentario proponen la modificación del modelo previamente aceptado, ya que, según sus resultados, ninguna de las dos regiones hidrofóbicas de la MP se integraría en las membranas celulares. Mediante estudios bioquímicos y celulares, demuestran que la proteína viral está asociada periféricamente a la cara citosólica de las membranas del ER, de modo que, tanto las regiones N- y C-terminales como el dominio central hidrofílico de la proteína, quedarían expuestos hacia el citosol. Este nuevo modelo topológico es compatible con las diferentes interacciones de la MP con factores huésped previamente descritas por otros laboratorios. Asimismo, este modelo coincide con el descrito para otras MPs de la familia 30K, con lo que, considerando la similitud de la estructura secundaria observada para todas las MP de la familia 30K, es muy posible que la topología descrita para la MP de TMV sea la que adoptan de forma general estas proteínas. Por último, cabe resaltar que este hallazgo ayudará a clarificar los mecanismos de transporte intercelular, incluyendo la búsqueda de nuevos factores del huésped implicados en este proceso, punto este que podría contribuir al diseño y desarrollo de nuevas estrategias para combatir la incidencia de estos patógenos en el futuro.

#### ARTÍCULO DE PROCEDENCIA

■ Ana Peiró *et al.* (2013). «The tobacco mosaic virus movement protein associates with but does not integrate into biological membranes». *J. Virol.* **88**: 3016-3026.

# Los virus de plantas como herramientas de silenciamiento y expresión de genes en hongos filamentosos

Beatriz Navarro Ramírez

Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP)- UOS Bari  
Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari (Italia)

El silenciamiento del RNA, también conocido como interferencia de RNA (RNAi) en animales, o RNA *quelling* en hongos, es un proceso conservado en plantas, animales y hongos, que desempeña un importante papel en la regulación de la expresión génica, el desarrollo, el mantenimiento de la integridad genómica y la defensa contra ácidos nucleicos foráneos. Este proceso, que se induce por moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA), muestra especificidad de secuencia: los pequeños RNAs de 21-24 nucleótidos (sRNAs) que derivan del procesamiento del dsRNA inductor por unas RNAsas de tipo III, se incorporan a un complejo proteico y lo guían a cortar o reprimir la traducción del RNA complementario, o bien a metilar el DNA complementario inhibiendo su transcripción. Este importante mecanismo ha sido utilizado como herramienta para el estudio de la función génica en numerosos organismos, incluyendo los hongos fitopatógenos. El silenciamiento génico se induce mediante la generación de sRNAs complementarios al gen de interés, que derivan de construcciones que expresan dsRNAs o RNAs con una estructura en forma de horquilla. En los hongos fitopatógenos la introducción de tales construcciones se realiza mediante vectores plasmídicos, o secuencias integradas en el genoma del hongo o de la planta hospedadora. Este último procedimiento se denomina «silenciamiento génico inducido por el huésped», ya que los sRNAs generados en plantas transgénicas que expresan dsRNAs con secuencias del hongo, se mueven de estas al hongo infeccioso. El silenciamiento en hongos también puede inducirse por virus (VIGS) que infectan la planta hospedadora. En este caso, los virus han sido modificados para contener en su genoma un fragmento de secuencia homólogo al gen diana que se desea silenciar. Durante la replicación viral se generan dsRNAs que inducen el silenciamiento, dando lugar a sRNAs que, a su vez, se amplifican por la acción de una RNA polimerasa dependiente de RNA, de la propia planta. Sin embargo, todos estos procedimientos tienen sus desventajas, principalmente la dificultad de generar plantas transgénicas, o la inestabilidad de las construcciones que contienen secuencias en forma de horquilla en las células fúngicas.

En este artículo los autores consiguen el silenciamiento génico en el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum*, directamente mediante VIGS, sin la planta hospedadora como intermediario, es decir, infectando el hongo con un fitovirus recombinante como vector. En primer lugar, los autores demuestran la capacidad de un virus de plantas modelo, el virus del mosaico del tabaco (TMV), de infectar y completar su ciclo replicativo en células de *C. acutatum* y de otros dos hongos filamentosos. Además, la infección viral no altera ni la morfología, ni el crecimiento, ni las características patogénicas del hongo, aunque en su citoplasma se observa la acumulación de partículas virales así como proliferaciones del retículo endoplasmático similares a las presentes en células vegetales infectadas por el TMV. Estas observaciones llevan a los autores a plantearse si estos hongos podrían ser huéspedes naturales del TMV, ilustrando otro ejemplo de «salto de especie». Si bien existen algunos ejemplos de fitovirus que se replican en levadura, no ocurre así en hongos filamentosos.

En segundo lugar los autores demuestran que un TMV quimérico que contiene el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) induce el silenciamiento estable de la misma en una línea de hongo transgénico que la expresa; de este modo, el TMV recombinante es capaz de suprimir la expresión de un transgén establemente integrado en el genoma del hongo con niveles de expresión elevados antes de la infección viral.

El procedimiento descrito en el presente artículo, que consiste únicamente en añadir al cultivo líquido de conidias el vector vírico purificado, o bien un extracto de una planta infectada con este, puede utilizarse también para la expresión de proteínas exógenas en el hongo, sin la necesidad de transformación y con una expresión que se mantiene en el tiempo hasta dos meses posinfección. Esta tecnología ofrece nuevas posibilidades en los estudios de fisiología de hongos filamentosos y podría tener una amplia aplicación como herramienta para estudios de su genómica funcional, tanto de interés fitopatológico como biomédico.

## ARTÍCULO DE PROCEDENCIA

- Mascia, T. *et al.* (2014). «Gene silencing and gene expression in phytopathogenic fungi using a plant virus vector». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**: 4291-4296.

## Virus de animales

## COORDINADOR

Miguel Ángel Martínez  
MMartinez@irsicaixa.es

## Un familiar de 30.000 años de antigüedad de los virus gigantes icosaédricos de DNA con la morfología de los *Pandoravirus*

Rosario Sabariego

Centro Regional de Investigaciones Biomédicas  
Universidad de Castilla La Mancha, Albacete

En la mitología griega, a la primera mujer que fue creada por los dioses se la llamó Pandora; en la tradición judeocristiana, Eva. Ambas vienen a representar lo mismo: un regalo envenenado de los dioses a los hombres. Igual que Eva probó la dichosa manzana y nos sacó del aburrido Paraíso, Pandora abrió la caja y creó la microbiología, la virología y la parasitología. En la traducción del griego antiguo se cometió un error: Pandora, lo que abrió fue un ánfora grande (*pithos*, del griego *πίθος*), que es lo que había por allí, no una caja. Se ha denominado *Pithovirus* al tercer género de virus gigante descubierto hasta la fecha porque tiene forma de ánfora. Bueno, por eso y porque son tan antiguos que podrían haber salido directamente de la de Pandora.

El suelo de Siberia está permanentemente congelado (permafrost), tiene un pH neutro y características reductoras y anaerobias. Por eso, es un sitio ideal para buscar y encontrar microorganismos congelados desde hace muchísimos años. La muestra de sedimento donde se encontró este virus gigante, llamado *Pithovirus sibericum*, data de hace tantos años como 30.000 (Pleistoceno). Es, por tanto, el virus de DNA capaz de infectar eucariotas más antiguo revivido hasta el momento.

Tres son los géneros de virus gigantes descritos hasta la fecha: los *Mimivirus*, los *Pandoravirus* y, ahora, los *Pithovirus*. Estos son algo mayores que los pandoravirus (1,5 µm de largo frente a 1-1,2 µm). Y, como ellos, se pueden reproducir en un cultivo de *Acanthamoeba castellanii*, una ameba parásita facultativa. Observados al microscopio electrónico, ambos se asemejan a un ánfora abierta en la zona apical, con un tegumento grueso y denso a los electrones, bajo el cual se encuentra un compartimento interno carente de estructuras encerrado por una membrana. Y aquí es donde se acaban las similitudes. Porque el ciclo de vida muestra diferencias, así como el tamaño del genoma, la composición de nucleótidos, la topología y el número de proteínas codificadas.

El origen evolutivo de estos virus queda en el aire por el momento. Tendrán que descubrirse muchos más para poder llegar a una conclusión válida.

El cambio climático está afectando al Ártico ruso. Mientras que en los últimos 100 años la temperatura global se ha incrementado 0,7 °C, la temperatura del permafrost ártico ha subido 3 °C en el mismo periodo. Durante el siglo pasado se perdió un 7 % de permafrost. No hay duda de que la descongelación de esta capa, ya sea por causas naturales o por la búsqueda de reservas minerales, puede liberar microorganismos, potencialmente patógenos, en zonas cercanas al polo. Los autores apuntan que hay que buscar y caracterizar virus de DNA capaces de infectar animales en capas profundas del permafrost como una manera de adelantarse a futuros problemas.

## ARTÍCULO DE PROCEDENCIA

■ Legendre *et ál.* (2014). «Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**: 4274-4279.

## Mecanismos virológicos e inmunológicos de protección frente a los virus de la inmunodeficiencia humana y de la inmunodeficiencia de simio

Eloísa Yuste

AIDS Research Group

IDIBAPS-Facultad de Medicina. Hospital Clínic de Barcelona

Tras más de una década de investigación y cinco ensayos de vacuna en humanos, seguimos sin tener una vacuna que consiga prevenir la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El principal obstáculo para el desarrollo de dicha vacuna es el desconocimiento de los mecanismos necesarios para el desarrollo de respuestas inmunes protectoras frente al VIH.

Para abordar este problema, en la publicación que comentamos se ha utilizado la infección en macacos con el virus de la inmunodeficiencia de simio (VIS), por ser el modelo animal disponible que mejor reproduce la infección por el VIH. Se trata de un ensayo de vacunas en el que se han incluido 80 macacos en cuatro ramas de inmunización distintas diseñadas para inducir tanto inmunidad celular como humoral. En todas las ramas se administraron los correspondientes inmunógenos utilizando los mismos vectores y los mismos regímenes de inmunización. Tras comprobar que todos los inmunógenos habían inducido la respuesta inmune esperada, se realizó el desafío con una cepa de virus heteróloga y heterogénea, administrando el virus semanalmente a dosis bajas por vía intrarrectal.

## Virus de animales

Los resultados de este estudio indican que la respuesta inmune inducida frente a la proteína de la envuelta (Env) del VIS es necesaria y suficiente para inducir protección. Además, se han encontrado varias correlaciones con protección basadas en la respuesta de anticuerpos a diferentes epítomos. En este trabajo también se hace un estudio exhaustivo de los virus presentes en los animales infectados a pesar de la vacunación. Este análisis revela una presión selectiva debida a la inmunización, que favorece la replicación de las variantes minoritarias resistentes a la neutralización mediada por anticuerpos. Esta presión selectiva también se refleja en el hecho de que, el inmunógeno que más protege, es también el que mejor selecciona virus resistentes en los animales vacunados que se infectan.

En resumen, en este estudio se ha comprobado que no existe una relación directa entre la protección frente a la infección y la protección frente a la patogénesis. O, lo que es lo mismo, la reproducción de las respuestas inmunes responsables del control de la viremia a lo largo de la enfermedad no garantiza que dichas respuestas sean eficaces para prevenir la infección. Este artículo nos permite comprender mejor la limitada eficacia de los ensayos de vacuna frente al VIH realizados hasta la fecha y nos proporciona las claves para avanzar en el desarrollo de nuevas vacunas más eficientes.

## ARTÍCULO DE PROCEDENCIA

■ Roederer, M. *et al.* (2014). «Immunological and virological mechanisms of vaccine-mediated protection against SIV and HIV». *Nature* **505**: 502-505.

## Mejora en la estimación de mutaciones en poblaciones de virus RNA por secuenciación masiva por replicación circular previa: aplicación a la obtención de paisajes adaptativos

Cecilio López-Galíndez

Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III  
Majadahonda, Madrid

El grupo de Raúl Andino lleva años investigando el papel de la variabilidad genética y la estructura de las poblaciones virales en la patogenia y evolución de los virus RNA. Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos que subyacen a la evolución viral se ha visto limitado por la dificultad de describir apropiadamente las poblaciones virales. Las técnicas de secuenciación masiva (en inglés, *Next Generation sequencing*, NGS) ofrecen una gran oportunidad para poder profundizar en las poblaciones virales. Sin embargo, estas técnicas tienen la limitación de los errores que cometen. En este trabajo se describe un método para poder reducir el error de la NGS.

El método puesto a punto por el grupo de Andino, denominado CirSeq o secuenciación circular, consiste en hacer copias en tándem de un molde de RNA que se circulariza y copia a cDNA. La secuenciación masiva (con el equipo de Illumina) de este cDNA permite dilucidar cuáles son las mutaciones debidas al error de la técnica de NGS, y las auténticas, que son aquellas que están presentes en todas las copias en tándem del molde.

Aplicando este método, los autores han analizado la tasa de mutación cuantificando las mutaciones letales que ocurren de nuevo en cada generación y las tasas obtenidas son: de entre  $2,5 \times 10^{-5}$  y  $2,6 \times 10^{-4}$  sustituciones por sitio para las transiciones; y  $1,2 \times 10^{-6}$  a  $1,5 \times 10^{-5}$  para las transversiones. A continuación se midió la eficacia biológica de cada alelo de la población calculando el cambio en la frecuencia de mutación de cada variante a lo largo de siete pases seriados del virus de la polio. En este análisis, la distribución de las mutaciones no letales se centra alrededor de la neutralidad, mientras que el de mutaciones no sinónimas se centra sobre todo en mutaciones deletéreas como en estudios previos. Sin embargo es muy interesante resaltar que un porcentaje significativo de los cambios sinónimos estaban sometidos a una fuerte presión selectiva y algunas de las mutaciones eran altamente beneficiosas con valores de *fitness* mayores de 1,2 y, además, un 10 % de las mutaciones eran letales. En concordancia con otros trabajos, el mayor efecto beneficioso en *fitness* era el resultado de mutaciones no sinónimas, y además se pudieron identificar hasta 145 mutaciones beneficiosas en el genoma del virus de la polio. El efecto beneficioso de las mutaciones no se distribuía uniformemente en el genoma y las proteínas. Finalmente, los autores mapearon en la estructura tridimensional las mutaciones deletéreas comprobando que se localizaban en residuos asociados con la unión al RNA y en el centro catalítico.

En resumen, la aplicación de esta nueva técnica a la secuenciación masiva ofrece la posibilidad de examinar y cuantificar la dinámica de evolución de una población viral con una resolución de nucleótido y analizar el genoma completo. Además, esta aproximación ofrece la posibilidad de integrar información evolutiva en datos estructurales y fisiológicos.

Virus de animales

## ARTÍCULO DE PROCEDENCIA

■ Acevedo, A., Brodsky, L. y Andino, R. (2014). «Mutational and fitness landscapes of an RNA virus revealed through population sequencing». *Nature* **505**: 686-690.

