

**Relazione dell'attività
nell'ambito del Programma di ricerca STM 2015 CNR dal titolo:**

“In vivo interaction of the nuclear-replicating potato spindle tuber viroid with nuclear proteins”

Fruitore : Beatriz Navarro Ramirez, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante del CNR, UOS Bari.

Istituzione ospitante: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spagna.

I viroidi sono agenti infettivi con un genoma costituito da una piccola molecola di RNA circolare (246-401 nt) priva della capacità di codificare proteine ma dotata di replicazione autonoma. Sono classificati in due famiglie: *Pospiviroidae*, che include i viroidi che contengono una regione centrale conservata e si replicano e si accumulano nel nucleo, e *Avsunviroidae*, i cui membri si replicano e si accumulano nel cloroplasto e presentano ribozimi a testa di martello negli RNA di entrambe le polarità. In assenza di proteine derivate dal patogeno, l'infettività degli RNA viroidali risiede nella loro capacità di interagire direttamente con i fattori dell'ospite e di indirizzare i meccanismi cellulari e i processi biosintetici a favore della propria replicazione ed invasione dell'ospite. A questo scopo, i viroidi probabilmente imitano le proprietà degli RNA dell'ospite. Questi patogeni hanno, inoltre, la capacità di ridirigere sull'RNA viroidale alcuni enzimi che generalmente utilizzano in maniera specifica DNA come substrato o come stampo. In particolare, l'RNA polimerasi dipendente da DNA e la DNA ligase I nucleare dell'ospite sono coinvolte in diversi processi della replicazione dei *Pospiviroidi* (Flores et al., 2015). In questo contesto, i viroidi nucleari potrebbero interagire anche con altre proteine di unione al DNA, come gli istoni, il principale componente della cromatina. Studi realizzati 30 anni fa mostrarono che il viroide del tubero fusiforme della patata (Potato spindle tuber viroid, PSTVd), membro tipo della famiglia *Pospiviroidae*, formava complessi con gli istoni utilizzando saggi di ricostituzione *in vitro* (Wolff et al., 1985).

L'associazione stabile di RNA cellulari con la cromatina è stata evidenziata nei anni 70. In questi studi pionieri fu ipotizzato che gli RNA associati alla cromatina (caRNA) potessero essere coinvolti nell'organizzazione della struttura cromatinica. Recentemente gli caRNAs sono stati caratterizzati a livello genomico e studi funzionali suggeriscono che gli caRNAs, composti da RNA non-codificanti di natura eterogenea, possono regolare diverse funzioni biologiche come la trascrizione, attraverso la fine modulazione della struttura della cromatina (Mondal et al, 2010; Schubert and Längst, 2013).

Il programma di ricerca svolto presso l'IBMCP aveva la finalità di studiare, mediante immunoprecipitazione dell'RNA, la possibile interazione *in vivo* dei pospiviroidi con alcune proteine nucleari dell'ospite note per interagire con RNA e/o DNA cellulari.

Attività svolta presso l'Istituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia, Spagna

Durante il periodo di permanenza di B. Navarro nel laboratorio del Dr. Flores presso l'IBMCP è stato messo a punto un metodo di immunoprecipitazione dell'RNA (RNA-IP) per studiare l'interazione *in vivo* del viroide PSTVd con alcune proteine nucleari, in particolare l'istone H3 e la fibrillarina. In questo studio sono stati utilizzati, come materiale di partenza, nuclei purificati da foglie di *Nicotiana benthamiana* sane o infette con il viroide PSTVd. Il protocollo adoperato era stato previamente sviluppato nel laboratorio del Dr. Flores (Minoia et al., 2015). Per preservare l'interazione dell'RNA con le proteine durante il processo di estrazione e immunoprecipitazione, le foglie sono state previamente irradiate con UV. La irradiazione UV

genera un'unione covalente ("crosslink") fra i complessi RNA-proteina che sono in stretto contatto nelle cellule intatte, consentendo l'utilizzo di condizione di immunoprecipitazione più stringenti. Diversi studi di RNA-IP hanno mostrato che il "crosslink" aumenta il pull-down degli RNA che interagiscono in maniera specifica con la proteina d'interesse e riduce le associazioni non-specifiche che si possono generare *in vitro*.

Analisi western blot hanno mostrato che l'anticorpo anti-H3 (Agrisera) riconosce l'istone H3 di *N. benthamiana* in modo specifico. Al contrario, l'anticorpo anti-fibrillarina (Genetech), specifico per la regione centrale conservata della fibrillarina umana, si è rivelato non adatto per esperimenti in *N. benthamiana*. Pertanto, i nostri studi si sono focalizzati sulla RNA-IP dell'istone H3. Questo primo esperimento ha mostrato anche che l'istone H3 era maggiormente presente nella frazione di proteine nucleari insolubile nel buffer di IP. Pertanto, per ottenere la disaggregazione della cromatina ed aumentare la solubilizzazione dei complessi riboproteici nucleari nel buffer IP, la preparazione di nuclei è stata sonicata prima di procedere all'immunoprecipitazione. Questo trattamento ha consentito la quasi totale solubilizzazione delle proteine nucleari. Infatti, mediante western blot è stato confermato l'arricchimento dell'istone H3 nella frazione nucleare solubile, utilizzata poi per l'IP.

Il protocollo di RNA-IP, messo a punto per l'identificazione dei piccoli RNA viroidali che interagiscono con le proteine Argonata (Minoia et al., 2014) è stato adattato allo studio dell'interazione di PSTVd con l'istone H3. I complessi PSTVd-istone H3 sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo anti-H3, utilizzando come controllo negativo dell'IP IgG di coniglio. Estratti di proteine e preparazioni di RNA nucleare (Input) e di RNA immunoprecipitato con l'anticorpo anti-H3 (o con le IgG, controllo negativo) sono stati analizzati rispettivamente mediante ibridazione western blot e Northern blot. L'analisi western blot ha mostrato la presenza dell'istone H3 nelle frazioni input e immunoprecipitate con anti-H3, ma non nella frazione immunoprecipitata con IgG, indicando un efficiente immunoprecipitazione dell'istone H3 nelle nostre condizioni sperimentali. L'ibridazione Northern blot con una sonda specifica per PSTVd ha mostrato la presenza delle forme circolari e lineari del viroide nella frazione di RNA immunoprecipitata con anti-H3 ma non con IgG, indicando la possibile interazione *in vivo* del viroide nucleare PSTVd con l'istone H3. Inoltre, lo snoRNA U6 (controllo positivo), un piccolo RNA nucleare associato a cromatina in umani, è stato rilevato specificamente nella frazione IP con anti-H3, ma non con l'IgG, confermando la validità del metodo d'IP.

Per escludere che l'interazione del PSTVd con l'istone H3 fosse generata *in vitro* durante il processo d'incubazione con l'anticorpo, è stato realizzato un esperimento controllo nel quale RNA circolari di PSTVd sono stati aggiunti a nuclei purificati di *N. benthamiana* sana prima della sonicazione. Dopo IP, l'ibridazione Northern blot non ha rilevato l'RNA viroide nella frazione immunoprecipitata con anti-H3, indicando l'assenza di associazioni generate in maniera aspecifica tra l'RNA viroide e l'istone H3 durante la procedura sperimentale. Lo snoRNA U6, come atteso, è stato rilevato nella stessa frazione immunoprecipitata.

Per confermare i risultati ottenuti è stato applicato un protocollo alternativo di RNA-IP in cui si utilizzano condizioni più stringenti, previamente utilizzato in maniera specifica per la RNA-IP di proteine nucleari di piante (Terzi and Simpson, 2009). In tali condizioni sono stati confermati i risultati già descritti.

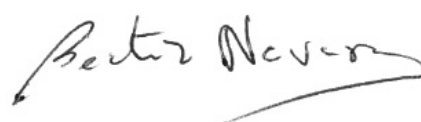
In conclusione, il breve periodo di tempo trascorso nel laboratorio del Prof. Flores ha consentito la messa a punto di un sistema di RNA-IP e l'ottenimento di risultati preliminari che, sebbene debbano essere confermati e ampliati, sono particolarmente interessanti. Il presente studio, mostrando che il viroide nucleare PSTVd interagisce *in vivo* con l'istone H3, supporta l'idea che il viroide associato alla cromatina possa modificare la struttura della stessa e, come è stato proposto

per i caRNAs, modulare l'espressione genica dell'ospite. Pertanto, questo studio apre stimolanti prospettive per verificare se tali interazioni possano essere coinvolte nella patogenesi viroidale.

Referenze bibliografiche

- Flores R., Minoia S., Carbonell A., Gisel A., Delgado S., López-Carrasco A., Navarro B., Di Serio F. (2015) Viroids, the simplest RNA replicons: How they manipulate their hosts for being propagated and how their hosts react for containing the infection. *Virus Research* (doi: 10.1016/j.virusres.2015.02.027.)
- Minoia S., Carbonell A., Di Serio F., Gisel A., Carrington J.C., Navarro B., Flores R. (2014) Specific ARGONAUTES bind selectively small RNAs derived from potato spindle tuber viroid and attenuate viroid accumulation in vivo. *Journal of Virology* 88:11933-11945.
- Minoia S., Navarro B., Delgado S., Di Serio F., Flores R. (2015) Viroid RNA turnover: characterization of the subgenomic RNAs of potato spindle tuber viroid accumulating in infected
- Mondal T., Rasmussen M., Pandey GK., Isaksson A., Kanduri C. (2010) Characterization of the RNA content of chromatin. *Genome Research* 20:899–907.
- Schubert T., Längst G. (2013) Changes in higher order structures of chromatin by RNP complexes. *RNA Biology* 10:175–179.
- Terzi LC., Simpson GG. (2009) Arabidopsis RNA immunoprecipitation. *Plant Journal* 59:163-168
- Wolff P., Gilz R., Schumacher J., Riesner D. (1985) Complexes of viroids with histones and other proteins. *Nucleic Acids Research* 13:356-367

Bari, 19/09/2013



Beatriz Navarro Ramirez