

Progetto di Ricerca:

“Mantenimento dell'integrità genomica dei fitovirus a RNA multipartiti: studio di complessi ribonucleoproteici virali”

Sintesi del progetto

I fitovirus multipartiti possiedono almeno due o più elementi genomici incapsidati in particelle indipendenti. Uno dei paradigmi della virologia sostiene che per garantire un'infezione produttiva, i virus devono preservare la loro integrità del genoma come unità infettiva funzionale. Contrariamente ai virus monopartiti e segmentati, la compartimentazione del genoma in entità separatamente rende il mantenimento della sua integrità uno degli aspetti più dibattuti del multipartitismo. Per assicurare l'insieme completo di segmenti genomici in ogni cellula infetta e la trasmissione nel vettore è, infatti, implicito un alto livello di molteplicità di infezione che può essere visto come un costo biologico insostenibile in termini di replicazione virale.

Il fitovirus a ssDNA *Faba bean necrotic stunt virus* supera questa costrizione utilizzando una strategia “multicellulare”: i suoi 8 elementi genomici, anche se segregati in cellule diverse, sono interconnessi dalla continuità simplastica dell'ospite, come dimostra la libera diffusione di proteine virali che permette al virus di espletare il proprio ciclo cellulare.

Tale modello sembra però non essere applicabile per i virus multipartiti a RNA se si considera la più limitata emivita dell'acido nucleico in questione e l'impossibilità per molecole di grosse dimensioni come le Replicasi virali di diffondere liberamente da una cellula e un'altra.

Il nostro modello propone, per i virus multipartiti a RNA, un network di interazioni RNA/RNA determinante il riconoscimento di ogni RNA genomico in un complesso ribonucleoproteico da considerarsi come l'unità infettiva durante la diffusione del virus nella pianta e nel vettore.

Introduzione e obiettivi del progetto

Ad oggi, il movimento dei virus nella pianta è descritto come una circolazione non coordinata di particelle o complessi ribonucleoproteici. Tuttavia, l'accumulo differenziale degli RNA virali nei tessuti infetti, dimostrato per virus come *l'Alfalfa mosaic virus* e *Beet necrotic mosaic virus*, rende insostenibile il costo di assicurare all'interno di ogni cellula infetta il corredo genomico completo. Questo stato di fatto ha portato, per la prima volta, alla formulazione dell'ipotesi per cui la formazione di complessi ribonucleoproteici, nei quali ogni segmento genomico è presente almeno con una copia, garantisce il movimento del virus multicomponente attraverso cellule adiacenti e a livello sistemico. In questo modo vengono scongiurati gli alti livelli di molteplicità di infezione necessari per garantire

la comparsa di loci di infezione rilevati in esperimenti classici di titolazione dose/risposta. L'originalità del progetto di ricerca sta quindi sia nell'affrontare una tematica emergente della virologia vegetale, che è quella concernente l'integrità genomica dei virus multipartiti, sia nel trattare argomenti di interesse fisiologico vegetale relativi al flusso di macromolecole nel floema: tanti e diversi tipi di RNA endogeno passano lungo i tubi cribrosi e la loro entrata e uscita dal circuito floematico potrebbe avvenire grazie alla formazione di complessi ribonucleici includenti fattori "driver" aventi motivi che permettono l'indirizzamento e il passaggio attraverso i plasmodesmi posti tra i tubi cribrosi e cellule compagne.

L'obiettivo principale del progetto è quello di dimostrare che tra gli RNA del *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), virus multipartitico con il più alto numero di RNA genomici, esiste un network di interazione specifico che permette il loro assemblamento in un complesso ribo-nucleo proteico. Il BNYVV possiede dai quattro ai cinque RNA genomici aventi polarità positiva, un "capuccio" e una coda poliadenilata. L'RNA1 è essenziale per la replicazione virale, l'RNA2 assicura le funzioni d'incapsidazione, di movimento cellula-cellula e di soppressione del silenziamento genico. Gli RNA3 e -4 sono implicati, nelle interazioni pianta-virus e virus-vettore. Gli RNA1 e -2 sono essenziali per l'infezione e gli RNA3 e -4, sebbene siano necessari durante il ciclo naturale dei due virus, diventano accessori nelle foglie e possono quindi essere utilizzati come vettori di espressione. Esperimenti preliminari hanno dimostrato che durante l'infezione tutti gli elementi genomici sono presenti in ogni cellula infetta. Inoltre, in vitro, L'RNA1 e RNA2 interagiscono con sé stessi, L'RNA1 interagisce con l'RNA2 e l'RNA2 interagisce con l'RNA3. Due domini responsabili della formazione dell'eterodimero RNA1/RNA2 sono stati caratterizzati e sembrano essere determinanti per la capacità infettiva virale. Su questa base sperimentale, saranno ricercati tutti i domini di interazione che esistono tra gli RNA virali risolvendo quindi il network di interazioni RNA/RNA del virus similmente a quanto è stato fatto per il virus dell'influenza A. I risultati in vitro saranno convalidati attraverso esperimenti di infezione in piante di *Chenopodium quinoa* (ospite locale) e *Spinacia oleracea*, (ospite sistemico) inoculate con combinazioni wild type, mutate per la perdita di funzione e mutate in maniera compensatoria.

Un'altra via per dimostrare l'occorrenza di interazione RNA / RNA durante la diffusione virale nell'ospite è quella di produrre un RNA in grado di muoversi grazie a una interazione artificiale RNA/RNA con uno degli RNA genomici del BNYVV. Successivamente saranno realizzati esperimenti di immuno-cattura, o cattura attraverso l'etichettamento dell'aptemero e coat protein del fago MS2, dei complessi ribonucleoproteici al fine di determinare la loro composizione proteica e acido nucleica. In particolare, si vorrà determinare la stecheometria degli RNA virali che compongono l'unità infettiva mobile.

Piano di formazione:

**“Mantenimento dell’integrità genomica dei fitovirus a RNA multipartiti:
studio di complessi ribonucleoproteici virali”**

L’attività pratica dell’assegnista sarà mirata alla realizzazione dei seguenti Work Packages (WP):

- WP 1. Esperimenti di ritardo elettroforetico su gel (Electrophoretic mobility shift assay - EMSA) e mutagenesi sito diretta: trascritti *in vitro* a partire da cloni cDNA completi o parziali saranno utilizzati, in differenti combinazioni, per realizzare test di interazione e per mappare i domini di contatto. Le regioni identificate saranno modificate in modo da impedire le interazioni tra gli RNA preservandone la sequenza codificante, per poi restaurarle attraverso mutazioni compensatorie.
- WP 2. Test di vitalità degli RNA genomici modificati nelle zone d’interazione in ospite locale (*Chenopodium quinoa*): questi esperimenti permettono di valutare se le funzioni di base (replicazione, movimento e soppressione dell’RNAi) sono mantenute dalle combinazioni mutate. Il diametro e il fenotipo delle lesioni saranno valutati e il loro contenuto sarà caratterizzato attraverso Northern blot e Western Blot. Attraverso un approccio simile le interazioni tra gli RNA genomici verranno ostacolate attraverso l’uso di piccoli RNA competitori di 17-20 nucleotidi complementari ai domini di interazione caratterizzati.
- WP 3. Infezioni in ospite sistemico (*Spinacea oleracea*) con RNA genomici modificati nelle zone di interazione: questi esperimenti consentiranno di determinare se le interazioni tra i differenti RNA genomici sono alla base della formazione di un complesso supramolecolare che permette il movimento sistemico virale nella pianta. I costrutti mutati saranno testati come combinazioni di RNA nei quali sono state introdotti cambiamenti di basi compensativi.
- WP 4. Esperimenti di guadagno di funzione attraverso l’introduzione di interazioni RNA/RNA artificiali tra il replicone rep3, derivante dall’RNA3 di BNYVV e non in grado di muoversi a lunga distanza e il costrutto di fusione RNA2 eGFP: rep3 portanti 17 nucleotidi (lunghezza dei domini di interazione caratterizzata negli RNA1 e RNA2) complementari alla sequenza della eGFP verranno testati assieme alla combinazione RNA1+RNA2eGFP in esperimenti di infezione sistemica di *S. oleracea*. la presenza del replicone nei tessuti sistemici infetti rappresenterebbe una dimostrazione cruciale del ruolo delle interazioni RNA/RNA nel movimento del BNYVV
- WP 5. Caratterizzazione proteica dei complessi: l’utilizzo di virus marcati con sequenze aptameriche o codificanti differenti proteine fluorescenti, permetterà di realizzare,

rispettivamente “pull down” e immunoprecipitazioni, seguite da spettrometria di massa, delle proteine virali e dell’ospite associate al complesso ribonucleoproteico.