

# CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL ARN DEL VIRUS SATÉLITE DEL MOSAICO DEL TABACO

## STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF SATELLITE TOBACCO MOSAIC VIRUS ARN

Ana P. Barba-de la Rosa<sup>1</sup>, Joseph Ng<sup>2</sup>, John Day<sup>3</sup> y Alexander McPherson<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Molecular. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Camino a la Presa San José Núm. 2055. Lomas 4<sup>a</sup>. 78216, San Luis Potosí, S.L.P. México. Tel.: (0152) 4448342000 y Fax: (0152) 4448342010 (apbarba@ipicyt.edu.mx). <sup>2</sup>Departamento de Biología Estructural. Universidad de Hunstville en Alabama. Hunstville Alabama. <sup>3</sup>Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Universidad de California. Irvine, 471 Steinhaus Hall. Irvine CA 92697-3900.

### RESUMEN

El virus satélite del mosaico del tabaco (STMV) se ha detectado en infecciones naturales mixtas en plantas de tabaco y diversas hortalizas, coinfectando con el virus del mosaico de tabaco (TMV). El TMV es un virus bien caracterizado, pero el STMV fue descubierto hasta 1986, y en 1993 se reportó la presencia de un arreglo especial del ARN dentro de la cápside. Por ello es importante conocer más las características estructurales y funcionales del STMV. En este estudio el STMV se obtuvo de hojas infectadas de tabaco por precipitación diferencial con polietilenglicol, el ARN se purificó obteniendo el genoma intacto de 1059 nt. Se observó que el ARN de STMV presenta una asociación espontánea en presencia de  $Mg^{+2}$ , comportamiento similar a los ARN con actividad catalítica. Por análisis computacional se encontró que el ARN de STMV contiene las regiones conservadas para las ribozimas tipo cabeza de martillo. Además, esta estructura posee el par GC en el Tallo II, el cual ha sido reportado para las ribozimas más activas. La información básica reportada en el presente trabajo ayudará a entender los mecanismos de infección de los virus, lo cual podría ser útil para el diseño de estrategias más racionales para el control de los virus patógenos de plantas.

**Palabras clave:** STMV, RNA, ribozimas, virus de plantas.

### INTRODUCCIÓN

Los virus de plantas son una de las principales causas de la disminución en la producción de hortalizas. En los últimos años los virus fitopatógenos han aparecido en casi todas las áreas de producción agrícola en México (Argüello-Astorga *et al.*, 1994; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). No existe ningún tratamiento o compuesto químico que contrarreste las infecciones virales; los tratamientos aplicados en campo son preventivos. Por tanto, es importante el estudio

Recibido: Agosto, 2002. Aprobado: Agosto, 2003.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 37: 503-510. 2003.

### ABSTRACT

Satellite tobacco mosaic virus (STMV) has been detected in natural mixed infections in tobacco plants and in several horticultural crops co-infected with tobacco mosaic virus (TMV). TMV is a well characterized virus, but STMV was not discovered until 1986, and in 1993, a unique RNA arrangement inside the capsid was reported, which was of special interest as it extended the knowledge of the structural and functional characteristics of the STMV. In this study STMV was purified from infected tobacco leaves by differential precipitation with polyethylene glycol, purifying RNA, an intact genome of 1059 nt was obtained. It was observed that STMV-RNA spontaneously associates in the presence of  $Mg^{+2}$  similar to RNA with catalytic activity. By means of computer analyses it was found that STMV-RNA contains the regions conserved for hammerhead ribozymes. Besides, this structure has the GC pair in Tail II, which is reported for the most active ribozymes. The basic information reported in this work will help to understand the mechanisms of virus infection, which could be useful in designing more rational strategies for the control of pathogenic plant virus.

**Keywords:** STMV, RNA, ribozymes, plant virus.

### INTRODUCTION

Plant virus are one of the main causes of diminished production in horticultural crops. In recent years phyto-pathogenic virus have appeared in almost all agricultural production areas in México (Argüello-Astorga *et al.*, 1994; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Actually, there is no treatment or chemical compound to counteract viral infections; treatments applied in the field are preventive. Therefore, it is very important to study pathogenic plant virus in order to find strategies more and more specific to control crop infections.

Approximately 85% of pathogenic plant virus contain RNA in their genome; however, in México very few studies on viral RNA are conducted, especially RNA satellites of these virus. Tobacco mosaic virus (TMV)

de los virus patógenos de plantas, con el fin de encontrar estrategias cada vez más específicas para controlar la infección.

Alrededor de 85% de los virus patógenos contienen ARN en su genoma; sin embargo, en México se estudia poco los ARN virales, especialmente a los satélites de estos virus. El virus del mosaico del tabaco (TMV) posee un satélite, el virus satélite (STMV) descubierto en solanáceas (Valverde y Dodds, 1986). STMV contiene un ARN de cadena sencilla de 1059 bases con dos marcos de lectura; el primero codifica para una proteína con peso molecular de 6800 Da cuya función exacta se desconoce. El segundo marco codifica para el monómero de la proteína de la cápside (Valverde y Dodds, 1986; Mirkov *et al.*, 1989; Dodds, 1991). El STMV cristaliza rápidamente, tiene forma icosaédrica de 6 a 17 nm (Larson *et al.*, 1993) y dentro de la cápside se han observado residuos de ARN formando estructuras no canónicas.

Recientemente se descubrió la actividad catalítica de algunas moléculas de ARN, consideradas anteriormente sólo como acarreadores pasivos de la información genética (James y Turner, 1997; Rossi, 1998). A los ARN que pueden romper o formar enlaces covalentes se les conoce como ribozimas, y su habilidad para llevar a cabo rompimientos intermoleculares ha despertado un gran interés, por lo que se está estudiando sus estructuras y mecanismos catalíticos.

La explotación de los dominios catalíticos de las diferentes ribozimas para el rompimiento (inactivación) de los transcritos de ARN específicos, está emergiendo como una estrategia potencial en la terapia génica (Rossi y Server, 1990; Lan *et al.*, 1998; Rossi, 1998). El objetivo del presente trabajo fue determinar la organización modular del ARN-STMV utilizando análisis bioquímicos y computacionales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se infectaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, cv Xhanti) con una mezcla de virus del tabaco (TMV) y su satélite (STMV). Después de 14 días las hojas que presentaron síntomas de infección fueron recolectadas y se guardaron en bolsas de polietileno a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### Purificación de TMV y STMV

Las hojas infectadas congeladas (100 g) se molieron en una licuadora (marca Waring) con 200 mL de Tris HCl 0.2 M a pH de 7.2 y 2 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol. La suspensión se filtró a través de una gasa y se centrifugó 15 min a 8000 rpm. El sobrenadante se recuperó y se le adicionó 8% de n-butanol lentamente con agitación y, después de 2 h de reposo, se centrifugó y al sobrenadante resultante se le añadió se le añadió 4% de

has a satellite, satellite virus (STMV) discovered in solanáceas (Valverde and Dodds, 1986). STMV has a single stranded RNA of 1059 with two (open) reading frames (ORF), the first encoding a 6800 Da protein whose exact function is still unknown. The second ORF encodes monomeric capsid protein (Valverde and Doods, 1986; Mirkov *et al.*, 1989; Dodds, 1991). STMV, a small icosahedral virus particle (16-17 nm) (Larson *et al.*, 1993), crystallizes very fast, and inside of the capsid RNA residues forming non-canonical structures have been observed.

Recently, catalytic activity for some RNA has been discovered, which had been considered just passive transporters of genetic information (James and Turner, 1997; Rossi, 1998). Those RNA who have the ability to break or form bonds are known as ribozymes, and their ability to break molecular bonds is drawing great attention; therefore, their structures and catalytic mechanisms are being studied.

The exploitation of the catalytic domain of different ribozymes for inactivating specific RNA codes is becoming known as a potential strategy for genetic therapy (Rossi and Server, 1990; Lan *et al.*, 1998; Rossi, 1998). The objective of the present work was to determine the modular organization of STMV-RNA utilizing computer and biochemical analysis.

## MATERIALS AND METHODS

Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv Xhanti) were infected with a mixture of tobacco mosaic virus (TMV) and its satellite (STMV). Fourteen days after infection, the leaves showing infection symptoms were picked and kept in plastic bags at  $-20^{\circ}\text{C}$  until they were used.

### TMV and STMV purification

Frozen infected leaves (100 g) were ground in a Waring blender with 200 mL 0.2 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7.2 and 2 mL  $\beta$ -mercaptoethanol. The suspension was filtered through gauze and centrifuged at 8000 rpm for 15 min. The supernatant was recovered and 8% of n-butanol added slowly, stirring for 15 min, after settling for 2 h, the solution was centrifuged again and 4% of PEG 6000-8000 was added to the supernatant. The solution was allowed to settle during the night and TMV was recovered by centrifuging at 8000 for 15 min. Another 4% of PEG were added to the supernatant and 4 hours later STMV was recovered by centrifugation.

### Electrophoretic patterns of protein

Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out according to Laemmli (1970), using 15% gels in the presence of 0.1% SDS. The protein samples (1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) were suspended in 0.1 M Tris HCl, pH 6.8 and 2% (w/v) SDS. Protein separation was made running gels at 20 mA for 2-3 h. Gels were stained with a solution of 25% (v/v) methanol, 10% (v/v)

polietilenglicol 6000-8000 (PEG). La solución se dejó reposar toda la noche y el TMV se recuperó por centrifugación a 8000 por 15 min. Al sobrenadante se le agregó 4% más de PEG y 4 h más tarde el STMV se recuperó por centrifugación.

#### Patrones electroforéticos de proteínas

Se prepararon geles de poliacrilamida a 15% conteniendo dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Las muestras de proteínas ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) se suspendieron en 0.1 M Tris HCl, pH 6.8 y 2% (w/v) de SDS. La separación de proteínas se realizó corriendo los geles a 20 mA de 2 a 3 h. Los geles se tiñeron con una solución de metanol: ácido acético: agua (45:45:10 v/v/v) conteniendo azul brillante de Coomassie R250 a una concentración final de 0.25% (w/v). El desteñido se hizo con la misma solución, sin el colorante. Se utilizó el marcador de peso molecular GIBCO-BRL (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

#### Purificación de ARN

A  $100 \mu\text{L}$  de una muestra de virus a una concentración de  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  se le adicionaron  $10 \mu\text{L}$  de amortiguador de proteinasa 10X (Tris 1M, pH 7.5, EDTA 100 mM, NaCl 500 mM, SDS 5%) y  $1.1 \mu\text{L}$  de proteinasa K ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ). La mezcla se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 2 h. Después del tratamiento enzimático, se llevó a cabo una extracción con fenol, fenol-cloroformo y cloroformo. El sobrenadante se recuperó y se le adicionó  $15 \mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M a pH de 5.5 y 1.5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó reposar a  $-20^\circ\text{C}$ . Después de 1 a 2 h, se centrifugó a 14 000 rpm por 20 min y la pastilla se lavó con etanol a 70%; finalmente se dejó secar y se disolvió en agua desionizada (Mathews y Heick, 1995).

#### Geles de agarosa que contienen formaldehído

El ARN se desnaturalizó con formaldehído y formamida y se separó en gel de agarosa. El gel se preparó disolviendo 1 g de agarosa en 10 mL de amortiguador MOPS 10X, 75 mL de agua desionizada y 15 mL de formaldehído (solución a 40%). La muestra de ARN se preparó como sigue:  $6 \mu\text{L}$  de ARN +  $12.5 \mu\text{L}$  de formamida +  $2.5 \mu\text{L}$  de buffer MOPS 10X +  $8 \mu\text{L}$  de formaldehído (solución a 40%) y  $2 \mu\text{L}$  de amortiguador de carga (6X). El gel se corrió con MOPS 1X a 70 V (Mathews y Heick, 1995).

#### Transferencia Northern

Se cortaron membranas de nailon y papel 3MM al tamaño de los geles, fueron humedecidos con solución de transferencia SSPE (solución salina de fosfatos y EDTA) y el gel se transfirió por al menos 12 h (Sambrook *et al.*, 1989). Una vez transferido el ARN, la membrana se prehibridó durante 1 h a  $55^\circ\text{C}$  con una solución conteniendo 0.5 mL de ADN de esperma de ballena ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) desnaturalizado por calentamiento en baño de agua hirviendo

acetic acid, and water containing R250 Coomassie brilliant blue at a final concentration of 0.25% (w/v). Destaining was performed in the same solution without the coloring matter. A GIBCO-BRL molecular weight marker (Life Technologies, Gaithersburg, MD) was employed.

#### RNA purification

Ten ( $10 \mu\text{L}$ ) of 10X proteinase buffer (1M Tris, pH 7.5, 100 mM EDTA, 500 mM NaCl, 5% SDS) and 1.1 mL of proteinase K ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ) were added to a 100  $\mu\text{L}$  of virus samples at a concentration of  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ . The mixture was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 2 h. After the enzymatic treatment, an extraction with phenol, phenol-chloroform, and chloroform was made. The supernatant was recovered and 15 mL of sodium acetate pH 5.5 (3M) and 1.5 vol of absolute ethanol were added, letting settle at  $-20^\circ\text{C}$ . After 1 to 2 h, centrifugation was performed at 14 000 rpm for 20 min and the pellet was washed with ethanol at 70% and finally allowed to dry and redissolved in double distilled water (Mathews and Heick, 1995).

#### Formaldehyde- containing agarose gels

After being denatured with formaldehyde and formamide, RNA was separated in agarose gel. The gel was prepared by dissolving 1 g of agarose in 10 mL of 10X MOPS buffer, 75 mL of double distilled water, and 15 mL of formaldehyde (40% solution). The RNA sample was prepared as follows:  $6 \mu\text{L}$  of RNA +  $12.5 \mu\text{L}$  of formamide +  $2.5 \mu\text{L}$  10X MOPS buffer +  $8 \mu\text{L}$  formaldehyde (40% solution), and  $2 \mu\text{L}$  of loading buffer (6X). The gel was run with 1X MOPS buffer at 70 V (Mathews and Heick, 1995).

#### Northern Blot

Nylon membrane and 3MM paper were cut at the same size as the gel and were soaked with SSPE transfer solution (a salt solution of phosphates and EDTA) and the gel was transferred for at least 12 h (Sambrook *et al.*, 1989). Once the RNA having been transferred the membrane was prehybridized during 1 h at  $55^\circ\text{C}$  with a solution containing 0.5 mL of whale sperm DNA ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) denatured by heating in a double boiler for 5 min. Hybridization was carried out with the same solution of prehybridization adding the specific probe. The probes used were the 3' end (TGG GCC GCT TAC CCG CGG TT) and 5' end one (TTT GAT TGG TAA GTT TTA CT). Hybridization was made for 12 h at  $55^\circ\text{C}$ . Afterwards, the membranes were washed in 100 mL of 3XSSPE solution plus 0.5% SDS at  $60^\circ\text{C}$  for 15 min. The washes were repeated twice, and finally the excess liquid was removed with filter paper as well as the membrane, and the autoradiograph was exposed for 16 h (Sambrook *et al.*, 1989).

#### Determination of secondary structure by computer analysis

The secondary structures of STMV-RNA were analyzed using the RNAFOLD software program (Denman, 1993).

por 5 min. La hibridación se realizó con la misma solución de prehibridación añadiendo la sonda específica. Una sonda utilizada fue el extremo 3' (TGG GCC GCT TAC CCG CGG TT) y otra al extremo 5' (TTT GAT TGG TAA GTT TTA CT). La hibridación se llevó a cabo por 12 h a 55 °C. Después de este tiempo las membranas se lavaron con 100 mL de una solución 3XSSPE más 0.5% SDS, por 15 min a 60 °C. Los lavados se repitieron dos veces más, se retiró el exceso de solución con papel filtro y la membrana, y se expuso por 16 h (Sambrook *et al.*, 1989).

#### Determinación de la estructura secundaria por métodos computacionales

El estudio computacional de las estructuras secundarias del ARN de STMV se realizó con el programa RNAFOLD (Denman, 1993).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Purificación del STMV

Se recolectaron las hojas de las plantas de tabaco que mostraron el amarillamiento característico de la infección por TMV+STMV. El STMV se purificó y la pureza de los preparados se determinó en geles de poliacrilamida (Figura 1). Se pudo observar la banda característica de 17 500 Da correspondiente al monómero de la proteína de la cápside; 60 de estas subunidades se asocian y forman la cubierta proteinica que protege al ARN (Dodds, 1991; Larson *et al.*, 1993).

### Purificación del ARN del STMV

En la Figura 2A se puede observar la banda de 1059 nt que corresponde al genoma intacto (Mirkov *et al.*, 1989; Dodds, 1991). Las flechas indican dos bandas más, de un tamaño aproximado de 600 y 400 nt, que no habían sido reportadas (Valverde y Dodds, 1986; Mirkov *et al.*, 1989). Por un ensayo de transferencia Northern hibridando con los oligos al extremos 3' (Figura 2B) y al extremo 5' (Figura 2C), se observó que los fragmentos de 600 y 400 nt hibridan con ambos extremos sugiriendo que éstos resultarían de un procesamiento interno del genoma. Se ha reportado procesamientos de ARN debidos a actividades intrínsecas del ARN; estos ARN son conocidos como ribozimas, y las estructuras del tipo cabeza de martillo se encuentran principalmente en virus satélites de plantas y viroides (DeYoung *et al.*, 1995; Birikh *et al.*, 1997; Symons, 1997). Los ARN catalíticos de autorompimiento (intrones grupos I y II) se han encontrado en las secuencias interventoras (intron IVS) del gen nuclear 26S ARNr en *Tetrahymena thermophila* (James y Turner, 1997). Cabe notar que el fragmento de 400 nt sería el tamaño aproximado del marco de lectura que codifica para la proteína de 6800 Da, y el resto,

## RESULTS AND DISCUSSION

### STMV purification

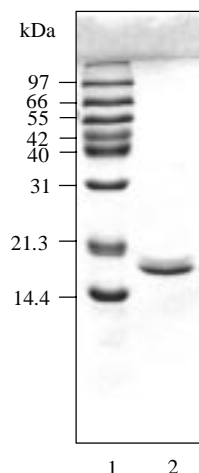
Leaves were harvested from tobacco plants showing yellowish characteristic of infection with TMV and STMV. STMV was purified from leaves according to differential precipitation on polyethylenglycol, and purity of the virus was tested in SDS-Page (Figure 1). The characteristic band of 17 500 Da corresponding to the protein capsid monomer was observed; 60 of these subunits associate forming the protein capsid that protects the RNA (Dodds, 1991; Larson *et al.*, 1993).

### STMV-RNA purification

Figure 2A shows the 1,059 nt band that corresponds to the intact genome (Mirkov *et al.*, 1989; Dodds, 1991). The arrows indicate two more bands about the size of 600 and 400 nt, which had not been reported (Valverde and Dodds, 1986; Mirkov *et al.*, 1989). Through Northern transfer assay, hybridizing with the 3' end (Figure 2B) and the 5' end probe (Figure 2C), it was observed that 400 and 600 nt fragments were hybridized with both probes, suggesting that STMV-RNA went through an internal processing of the genome. RNA processing due to intrinsic RNA activity has been reported; these RNA are known as ribozymes, and structures of the hammerhead type are found mainly in satellite plant virus and viroids (DeYoung *et al.*, 1995; Birikh *et al.*, 1997; Symons, 1997). Autocatalytic RNA (group I and II introns) have been found in the intervening sequences (IVS, intron) of the nuclear 26S rRNA gene in *Tetrahymena thermophila* (James and Turner, 1997). It is worth noting that the 400 nt fragment would be approximately the size of the reading frame encoding 6 800 Da protein, and the remaining 600 nt fragments would give the approximate size of the STMV genome (1059 nt).

### Determination of secondary structure

To determine if there is a type of structure in the STMV genome responsible for its breakdown, the STMV-RNA sequence was analyzed using the RNAFOLD program which predicts the folding to generate secondary structures, and homologies with structures reported for the known ribozymes were searched in the data base (Denman, 1993). In this computer analysis it was found that STMV-RNA has the conserved sequences that generate hammerhead structures; these sequences are shown in Figure 3. The sequences UCACAGUGAUGAGUGUCCG (region 380-398), AGUUUUGUGA (436-445) and AGUACGAAAUCU



**Figura 1.** Gel de poliacrilamida mostrando en la línea 2 la banda característica del monómero de la cápside del virus satélite del mosaico de tabaco (STMV). En la línea 1 se muestra el marcador de peso molecular.

**Figure 1.** SDS-PAGE gel showings, in lane 2, the characteristic monomer of satellite mosaic tobacco virus (STMV) capsid. The molecular weight marker is shown in line 1.

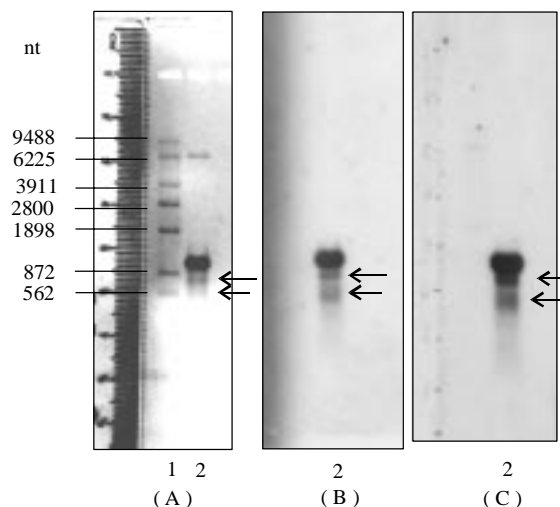
600 nt, daría el tamaño aproximado del genoma de STMV (1059 nt).

### Determinación de estructura secundaria

Para determinar si en el genoma de STMV existe algún tipo de estructura que pudiera ser la responsable de su rompimiento, se analizó la secuencia del ARN de STMV con el programa RNAFOLD que predice el doblamiento para generar estructuras secundarias, y se buscaron homologías en la base de datos con estructuras reportadas para las ribozimas conocidas (Denman, 1993). En este análisis computacional se encontró que el ARN del STMV tiene las secuencias conservadas que dan lugar a la formación de las estructuras cabeza de martillo; estas secuencias se muestran en la Figura 3. Las secuencias UCACAGUGAUGAGUGUCCG, (región 905-916), AGUUUUGUGA (436-445) y AGUACGAAAUCU (380-398), se doblan de tal manera que dan lugar a la estructura mostrada en la Figura 4A, similar a la estructura clásica de cabeza de martillo (Figura 4B). El par de bases enmarcado GC ubicado en el Tallo II (Figura 4A), son dos nucleótidos conservados que se encuentran en las ribozimas más activas (Long y Uhlenbeck, 1993; DeYoung *et al.*, 1995; Birikh *et al.*, 1997).

### Comportamiento del ARN en presencia del ion $Mg^{+2}$

El ion  $Mg^{+2}$  tiene dos funciones importantes en las ribozimas: a) Promueve el doblamiento adecuado de la



**Figura 2.** A) Gel desnaturante de agarosa a 1%; línea 1: marcador de peso molecular; línea 2: banda característica del ARN del STMV. B) Transferencia Northern hibridando con el oligo al extremo 3' y C) al extremo 5'. Las flechas indican las bandas de 600 y 400 nt.

**Figure 2.** A) Denaturing 1% agarose gel; line 1: molecular weight marker; line 2: STMV-RNA genome. B) Northern blot hybridization with probe at the 3' end and C) at 5' end. The arrows indicate the bands at 600 y 400 nt.

(905-916), fold in such a way that they generate the structures shown in Figura 4A, similar to the classical hammerhead structures (Figure 4B). The GC pair located in Tail II (Figure 4A), are two conserved nucleotides that are found in the most active hammerhead ribozymes (Long and Uhlenbeck, 1993; DeYoung *et al.*, 1995; Birikh *et al.*, 1997).

### RNA behaviour in presence of $Mg^{+2}$ ion

The  $Mg^{+2}$  ion has two important functions in the ribozymes: a) It promotes the adequate folding of the catalytic structure; b) it acts as a catalytic cofactor. Adding different concentrations of the  $Mg^{+2}$  ion to the STMV-RNA there are changes in the electrophoretic mobility. Figure 5, line 1 shows the intact RNA, and adding an  $Mg^{+2}$  solution at concentrations of 10, 20, 30, and 40 mM (lines 2 to 5) causes the formation of an RNA aggregation or complex, indicated by the disappearing of the 1059 nt band and appearing material that does not enter the gel. This phenomenon of RNA aggregation in the presence of  $Mg^{+2}$  has been reported for hammerhead ribozyme (Bassi *et al.*, 1996; Birikh *et al.*, 1997). To confirm if this aggregation was a covalent association, 10 mL of an EDTA solution (0.5M) were added to the RNA aggregate, and the electrophoretic run was carried out observing that the high molecular weight RNA disappears and appears once more in its original size (as shown in Figure 2A). Thus it is confirmed that this

1	AGUAAAACUU	ACCAAUCAA	AGACCUAACC	AACAGGACUG	UCGUGGUCAU	UUAUGCUGUU	60
61	GGGGGACAAU	GGGGGAAAAC	AUAUUGCCUU	CUUCUACAAG	AGGCCUUCAG	UCGCCAAUAAU	120
121	UACUUGGCGC	CCAAUUUUGG	GUUUCAGUUG	CUGUUUCCAG	CUAUGGGGAG	AGGUAAGGUU	180
181	AAACCAAACC	GUAAAUCGAC	GGGUGACAAU	UCGAAUGUUG	UUACUAUGAU	UAGAGCUGGA	240
241	AGCUAUCCUA	AGGUCAAUCC	GACUCCAACG	UGGGUCAGAG	CCAUACCUUU	CGAAGUGUCA	300
301	GUUCAAUUCUG	GUAUUGCUUU	UAAAGUACCG	GUCGGGUCAC	UAUUUUCGGC	AAAUUUCGG	360
361	ACAGAUCCU	UUACAAGCGU	<u>CACAGUGAUG</u>	<u>AGUGUCCG</u> UG	CUUGGACCCA	GUAAACACCG	420
421	CCAGUAAAUG	AGUA <u>CAGUUU</u>	<u>UGUGA</u> GGGCU	AAGCCAUUGU	UCAAGACUGG	UGACUCUACU	480
481	GAGGAGUUCG	AAGGGCGUGC	AUCAAAACUC	AACACACGAG	CUUCUGUAGG	GUACAGGAUU	540
541	CCAACUAAUU	UGCGUCAGAA	UACUGUGGCA	GCCGACAAUG	UAUGCGAAGU	AAGAAGUAA	600
601	UGUCGACAAG	UCGCCUUGGU	UAUUUCGUGU	UGUUUUAACU	GAACCUCGAC	AUAAGCCUUU	660
661	UGGAUCGAAG	GUUAAACGAU	CCGCUCUCG	CUUGAGCUUG	AGGCGGCGUA	UCUCUUAUGU	720
721	CAACAGAGAC	ACUUUGGUCU	AUGGUUGUAU	AACAAUAGAU	AGACUCCCGU	UUGCAAGAUU	780
781	AGGGUUAACA	GAUCUUGCCG	UUAGUCUGGU	UAGCGCGUAA	CCGGCCUUGA	UUUAUGGAAU	840
841	AGAUCCAUUG	UCCA AUGGCU	UUGCCAAUGG	AACGCCGACG	UGGCUGUAUA	AUACGUCGUU	900
901	GACA <u>AGUACG</u>	<u>AAAUCU</u> UGUU	AGUGUUUUUC	CCUCCACUUA	AAUCGAAGGG	UUUUGUUUUG	960
961	GUCUUCGCGA	ACGCAUACGU	UAGUGUGACU	ACCGUUGUUC	GAAACAAGUA	AAACAGGAAG	1020
1021	GGGGUUCGAA	UCCCUCUUA	ACCGCGGGUA	AGCGGCCCA			

Figura 3. Secuencias de bases (sentido genómico) del ARN de STMV. Las bases enmarcadas muestran las regiones conservadas para las estructuras cabeza de martillo.

Figure 3. Nucleotide sequence (genomic sense) of STMV-RNA. The underline nucleotides show the conserved regions for hammerhead ribozymes.

estructura catalítica, y b) actúa como un cofactor catalítico. La adición de diferentes concentraciones del ion  $Mg^{+2}$  al ARN de STMV causa cambios en la movilidad electroforética. En la Figura 5 se observa el ARN intacto (línea 1) y al agregar una solución de  $Mg^{+2}$  a concentraciones de 10, 20, 30 y 40 mM (líneas 2 a 5), ocasiona que se forme una agregación o complejo de ARN, indicado por la desaparición de la banda de 1059 nt y apareciendo material que queda sin entrar al gel. Este fenómeno de agregación de ARN en presencia del ion  $Mg^{+2}$  ha sido reportado para ribozimas cabeza de martillo (Bassi *et al.*, 1996; Birikh *et al.*, 1997). Para comprobar si esta agregación fue una asociación covalente, al ARN agregado se le adicionó 10  $\mu$ L de una solución de EDTA (0.5 M) y se realizó la separación electroforética, observando que el ARN de alto peso molecular desaparece, volviendo a aparecer en su tamaño original (como se muestra en la Figura 2A). Con esto se determinó que esta asociación de complejos de ARN no es del tipo covalente y que ARN no tiene actividad ligasa como la reportada para los intrones tipo I y II (Buzayan *et al.*, 1986; James y Turner, 1997).

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se reporta por primera vez una actividad catalítica para el ARN del STMV. El análisis computacional muestra que la región catalítica tiene la estructura de cabeza de martillo, además de que posee el apareamiento de bases GC en el Tallo II, lo que sugiere

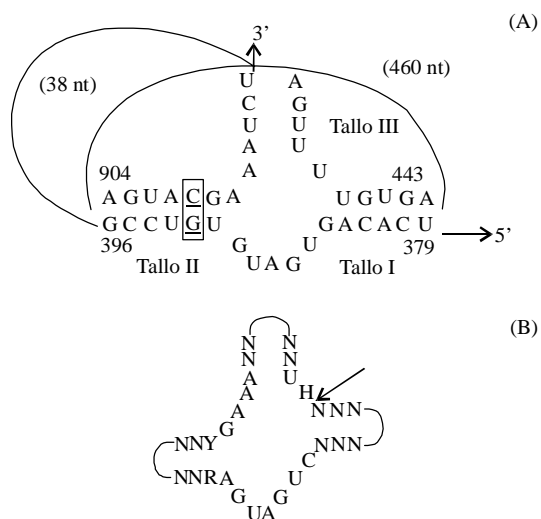
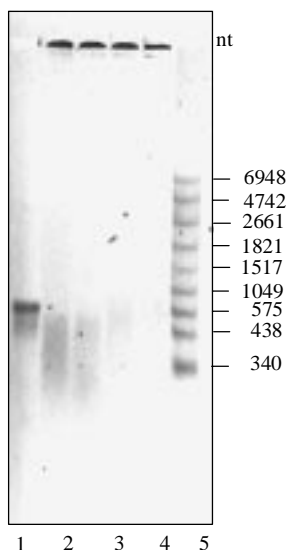


Figure 4. A) Estructura cabeza de martillo predicha para el ARN de STMV. Los nt enmarcados muestran el par GC encontrado en las ribozimas más activos. B) Representación esquemática de una ribozima cabeza de martillo clásico. Las bases conservadas se muestran en negrillas y la flecha indica el sitio de corte (Long y Uhlenbeck, 1993).

Figure 4. A) Hammerhead ribozyme predicted for ARN-STMV. The underline nt show the pair GC found in the most active ribozymes. B) Schematic diagram of a typical hammerhead ribozyme. Dark nucleotides represents the conserved bases; the arrow indicates the cut site (Long and Uhlenbeck, 1993).

association of RNA complexes is not of the covalent type, suggesting that the RNA does not have ligase



**Figura 5.** Asociación espontánea del ARN de STMV por la presencia de  $Mg^{+2}$ . Línea 1: ARN nativo; líneas 2 a 5: ARN incubado a 37 °C con diferentes concentraciones de  $Mg^{+2}$ : 2=10 mM, 3=20 mM, 4=30 mM y 5=40 mM. Línea 7: marcador de peso molecular.

**Figure 5.** Spontaneous association of ARN-STMV in presence of the  $Mg^{+2}$ . Line 1: native ARN; line 2 to 5, ARN incubated at 37 °C with different  $Mg^{+2}$  concentrations: line 2=10 mM, 3=20 mM, 4=30 mM and 5=40 mM. Line 6: molecular weight marker.

una estructura de alta actividad catalítica. Se reconoció la importancia del ion  $Mg^{+2}$  como factor que causa agregación del ribozima.

Las ribozimas tienen una amplia aplicación en terapia génica, pero es necesario una serie de estudios para determinar la eficiencia de estos tipos de ARN catalíticos.

#### AGRADECIMIENTOS

A UC-Mexus (proyecto 1998) y al Sistema de Investigación Miguel Hidalgo-CONACYT (1998). Al Dr. Irineo Torres, (INIFAP-Celaya).

#### LITERATURA CITADA

- Argüello-Astorga, G. R., R. G. Guevara-González, L. R. Herrera-Estrella, and R. F. Rivera-Bustamante. 1994. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. *Virology* 203: 90-100.
- Bassi, G. S., A. I. Murchie, and D. M. Lilley. 1996. The ion-induced folding of the hammerhead ribozyme: core sequence changes that perturb folding into the active conformation. *RNA* 2: 756-768.
- Birikh, K. R., P. A. Heaton, and F. Eckstein. 1997. The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *Review Eur. J. Biochem.* 245: 1-16.
- Buzayan, J. M., W. L. Gerlach, and G. Bruening. 1986. Non-enzymatic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA. *Nature* 323: 349-353.

activity as reported for intron I or II types (Buzayan *et al.*, 1986; James and Turner, 1997).

#### CONCLUSIONS

The present work reports for the first time the catalytic activity of STMV-RNA. The computer analysis shows that the catalytic region has the structure of hammerhead, besides possessing the matching of GC bases in Tail II, which suggests an structure with high catalytic activity. It was known the importance of the  $Mg^{+2}$  ion as factor causing aggregation of the ribozyme.

The ribozymes have a wide potential in genic therapy, but it is necessary to make more studies to determine the efficiency of these catalytic ARN types.

—End of the English version—



- Denman, R. B. 1993. Using RNAFOLD to predict the activity of small catalytic RNAs. *BioTechniques* 15: 1090-1094.
- DeYoung, M. B., A. M. Siwkowski, Y. Lian, and A. Hampel. 1995. Catalytic properties of hairpin ribozymes derived from chicory yellow mottle virus and arabis mosaic virus satellite RNAs. *Biochemistry* 34: 15785-1791.
- Dodds, J. A. 1991. Structure and function of the genome of STMV. *Can. J. Plant Pathol.* 13: 192-195.
- James, H. A., P. C. Turner. 1997. Ribozymes: An introduction. *In: Ribozyme Protocols. Methods in Molecular Biology.* Turner, Phillip C. (ed). Humana Press Totowa, New Jersey, USA. pp: 1-10.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227: 680-685.
- Lan, N., R. P. Howrey, S. W. Lee, C. A. Smith, and B. A. Sullenger. 1998. Ribozyme-mediate repair of sickle b-globin in RNAs in erythrocyte precursor. *Science* 280: 1593-1596.
- Larson, S. B., S. Koszelak, J. Day, A. Greenwood, J.A. Dodds, and A. McPherson. 1993. Three dimensional structure of satellite tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 231: 375-391.
- Long, D. M., and O. C. Uhlenbeck. 1993. Self-cleaving catalytic RNA. *FASEB J.* 7: 25-30.
- Mathews, D., and J. Heick. 1995. *Manual of Laboratory Techniques.* Dodds Laboratory Section. University California, Riverside, CA. 204 p.
- Mirkov, T. E., D. M. Mathews, D. H. DuPlessis, and J. A. Dodds. 1989. Nucleotide sequence and translation of satellite tobacco mosaic virus RNA. *Virology* 170:139-146.
- Rossi, J. J. 1998. Ribozymes to the rescue: repairing genetically defective mRNAs. *TIG* 14: 285-288.
- Rossi, J. J., and N. Server. 1990. RNA enzymes (ribozymes) as antiviral therapeutic agents. *TIBTECH* 8: 79-82.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning, A laboratory manual.* 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Secciones 7.37, 7.39 y 7.43-7.45
- Symons, R. H. 1997. Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucl. Acids Res.* 25: 2683-2689.
- Torres-Pacheco, I., J. A. Garzón-Tiznado, J. K. Brown, A. Becerra-Flora, and R. F. Rivera-Bustamante. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and southern United States. *Phytopathol.* 86: 1186-1192.

Valverde, R., and J. A. Dodds. 1986. Evidence for a satellite RNA associated naturally with the U<sub>5</sub> strain and experimentally with de U<sub>1</sub> strain of tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 67: 1875-1884.