

Análisis de la interacción del virus del arabesco del *Pelargonium* con la ruta de silenciamiento por RNA del huésped

MIRYAM PÉREZ CAÑAMÁS

Directora: DRA. CARMEN HERNÁNDEZ FORT



València, abril 2019



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DEL VIRUS
DEL ARABESCO DEL *PELARGONIUM* CON
LA RUTA DE SILENCIAMIENTO POR RNA
DEL HUÉSPED

Miryam Pérez Cañamás

Memoria presentada para optar al grado de Doctora
en Biotecnología por la Universidad Politécnica de
València

CARMEN HERNÁNDEZ FORT, Doctora en Ciencias Biológicas, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia – Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia.

CERTIFICA:

Que Miryam Pérez-Cañamás ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que, con el título “Análisis de la interacción del virus del arabesco del *Pelargonium* con la ruta de silenciamiento por RNA del huésped”, presenta para optar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia a 29 de mayo de 2019.



Firmado: Carmen Hernández Fort

“Tots, si arribem a tenir raó, la tenim a mitges”

Joan Fuster

ÍNDICE

Acrónimos	1
Acrónimos de virus	5
Resumen	9
Resum	13
Abstract	17
INTRODUCCIÓN	21
1. Los virus de plantas	23
2. El silenciamiento por RNA	31
2.1. Generalidades	31
2.2. Componentes del silenciamiento por RNA	36
2.3. El silenciamiento por RNA: un mecanismo antiviral	39
2.4. Estrategias de supresión del silenciamiento	42
2.4.1. Interacción con RNAs relacionados con el silenciamiento	44
2.4.2. Interacción con proteínas del huésped relacionadas con el silenciamiento	48
2.4.3. Otras estrategias de supresión	51
2.5. Silenciamiento por RNA y patogénesis viral	53
3. El transporte nucleocitoplasmático	59
3.1. Señales de localización nuclear	61
3.2. Receptores de transporte nucleares	65
3.2.1. Carioferinas β	65

3.2.2. Carioferinas α	67
3.2.3. Ruta de importación nuclear mediada por el heterdímero importina α/β	71
3.3. Localización nucleolar	73
3.3.1. Señales de localización nucleolar	76
3.4. Localización nuclear/nucleolar de proteínas virales	77
4. El virus del arabesco del <i>Pelargonium</i>	80
4.1. Importancia como agente viral	80
4.2. Propiedades biológicas y modos de transmisión	81
4.3. Propiedades moleculares	82
OBJETIVOS	87
CAPÍTULO 1	91
CAPÍTULO 2	147
CAPÍTULO 3	189
DISCUSIÓN GENERAL	219
CONCLUSIONES	239
BIBLIOGRAFÍA	243
AGRADECIMIENTOS	283

ACRÓNIMOS

aa	Aminoácido
ADK	Adenosín-quinasa (<i>adenosine kinase</i>)
AGO	Argonauta
BiFC	Complementación bimolecular de la fluorescencia (<i>bimolecular fluorescence complementation</i>)
bp	Par de bases (<i>base pair</i>)
CITE	Estimulador de la traducción independiente de cap (<i>cap independent translation enhancer</i>)
CP	Proteína de cubierta (<i>coat protein</i>)
DCL	Dicer-like
DFC	Componente fibrilar denso (<i>dense fibrillar component</i>)
DRB	Proteína de unión a dsRNA (<i>dsRNA-binding protein</i>)
dsRBD	Dominio de unión a dsRNA (<i>dsRNA-binding domain</i>)
dsDNA	DNA de doble cadena (<i>double-stranded DNA</i>)
dsRNA	RNA de doble cadena (<i>double-stranded RNA</i>)
FC	Centros fibrilares (<i>fibrillar centers</i>)

FG	Fenilalanina-glicina
GC	Componente granular (<i>granular component</i>)
gRNA	RNA genómico (<i>genomic RNA</i>)
hetsiRNA	Pequeño RNA interferente heterocromático (<i>heterochromatic small interfering RNA</i>)
IBB	Dominio de unión a la importina β (<i>importin β-binding</i>)
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía Viral (<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
miRNA	Micro RNA
MP	Proteína de movimiento (<i>movement protein</i>)
mRNA	RNA mensajero (<i>messenger RNA</i>)
natsiRNA	Pequeño RNA interferente derivado de transcritos naturales antisentido (<i>natural antisense short interfering RNA</i>)
NES	Señal de exportación nuclear (<i>nuclear export signal</i>)
NLS	Señal de localización nuclear (<i>nuclear localization signal</i>)
NoLS	Señal de localización nucleolar (<i>nucleolar localization signal</i>)
NPC	Complejo del poro nuclear (<i>nuclear pore complex</i>)
nt	Nucleótido

ORF	Pauta abierta de lectura (<i>open reading frame</i>)
PAZ	Dominio Piwi/Argonaute/Zwille
PTGS	Silenciamiento génico post-transcripcional (<i>post-transcriptional gene silencing</i>)
ra^{si}RNA	Pequeño RNA interferente asociado a repeticiones (<i>repeat associated small interfering RNA</i>)
RDR	RNA polimerasa dependiente de RNA (<i>RNA dependent-RNA polymerase</i>)
rDNA	DNA ribosomal (<i>ribosomal DNA</i>)
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RNP	Ribonucleoproteína
rRNA	RNA ribosomal (<i>ribosomal RNA</i>)
RT	Codón de terminación débil (<i>readthrough</i>)
sgRNA	RNA subgenómico (<i>subgenomic RNA</i>)
siRNA	Pequeño RNA de interferencia (<i>small interfering RNA</i>)
SNF1	Proteína quinasa SNF1 (<i>sucrose non fermenting kinase 1</i>)
sRNA	Pequeño RNA (<i>small RNA</i>)
ssDNA	DNA de simple cadena (<i>single-stranded DNA</i>)

ssRNA	RNA de simple cadena (<i>single-stranded RNA</i>)
ssRNA(+)	RNA de simple cadena y polaridad positiva (<i>positive sense single-stranded RNA</i>)
ssRNA(-)	RNA de simple cadena y polaridad negativa (<i>negative sense single-stranded RNA</i>)
tasiRNA	Pequeño RNA interferente que actúa en trans (<i>trans-acting small interfering RNA</i>)
TGS	Silenciamiento génico transcripcional (<i>transcriptional gene silencing</i>)
UTR	Región no traducible (<i>unstranlated region</i>)
VRC	Complejo de replicación viral (<i>viral replication complex</i>)
vsRNA	Pequeño RNA viral (<i>viral small RNA</i>)
VSR	Supresor virales del silenciamiento por RNA (<i>viral suppressor of RNA silencing</i>)
WEL1	Exonucleasa Werner I
wt	Silvestre (<i>wild type</i>)

ACRÓNIMOS DE VIRUS

CaMV	Virus del mosaico de la coliflor (<i>Cauliflower mosaic virus</i>) Género <i>Caulimovirus</i> , familia <i>Caulimoviridae</i>
CMV	Virus del mosaico del pepino (<i>Cucumber mosaic virus</i>) Género <i>Cucumovirus</i> , familia <i>Bromoviridae</i>
CTV	Virus de la tristeza de los cítricos (<i>Citrus tristeza virus</i>) Género <i>Closterovirus</i> , familia <i>Closteroviridae</i>
CymRSV	Virus de las manchas en anillo del <i>Cymbidium</i> (<i>Cymbidium ringspot virus</i>) Género <i>Tombusvirus</i> , familia <i>Tombusviridae</i>
ELV	Virus latente de la baya del saúco (<i>Elderberry latent virus</i>) Género <i>Pelarspovirus</i> , familia <i>Tombusviridae</i>
PCRPV	Virus de los anillos cloróticos del <i>Pelargonium</i> (<i>Pelargonium chlorotic ring pattern virus</i>) Género <i>Pelarspovirus</i> , familia <i>Tombusviridae</i>
PelRSV	Virus de las manchas anulares del <i>Pelargonium</i> (<i>Pelargonium ringspot virus</i>) Género <i>Pelarspovirus</i> , familia <i>Tombusviridae</i>
PFBV	Virus de la rotura del color de la flor del <i>Pelargonium</i> (<i>Pelargonium flower break virus</i>) Género <i>Carmovirus</i> , familia <i>Tombusviridae</i>
PLCV	Virus del rizado de la hoja del <i>Pelargonium</i> (<i>Pelargonium leaf curl virus</i>) Género <i>Tombusvirus</i> , familia <i>Tombusviridae</i>
PLPV	Virus del arabesco del <i>Pelargonium</i> (<i>Pelargonium line pattern virus</i>) Género <i>Pelarspovirus</i> , familia <i>Tombusviridae</i>

PLRV	Virus del enrollamiento de la hoja de la patata (<i>Potato leafroll virus</i>) Género <i>Polerovirus</i> , familia <i>Luteoviridae</i>
PoLV	Virus latente del Pothos (<i>Pothos latent virus</i>) Género <i>Aureusvirus</i> , familia <i>Tobusviridae</i>
PVA	Virus A de la patata (<i>Potato virus A</i>) Género <i>Potyvirus</i> , familia <i>Potyviridae</i>
RCNMV	Virus del mosaico necrótico del trébol rojo (<i>Red clover necrotic mosaic virus</i>) Género <i>Dianthovirus</i> , familia <i>Tombusviridae</i>
RrLDV	Virus de las hojas distorsionadas del rosal (<i>Rosa rugosa leaf distortion virus</i>) Género <i>Pelarspovirus</i> , familia <i>Tombusviridae</i>
RSV	Virus del rayado del arroz (<i>Rice stripe virus</i>) Género <i>Tenuivirus</i> ; familia <i>Phenuiviridae</i>
RYMV	Virus del moteado amarillo del arroz (<i>Rice yellow mottle virus</i>) Género <i>Sobemovirus</i> , familia <i>Solemoviridae</i>
RYSV	Virus del enanismo amarillo del arroz (<i>Rice yellow stunt virus</i>) Género <i>Nucleorhabdovirus</i> , familia <i>Rhabdoviridae</i>
SPCSV	Virus del enanismo clorótico de la batata (<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i>) Género <i>Crinivirus</i> , familia <i>Closteroviridae</i>
SPFMV	Virus del moteado plumoso de la batata (<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>) Género <i>Potyvirus</i> , familia <i>Potyviridae</i>
SPMMV	Virus del moteado suave de la batata (<i>Sweet potato mild mottle virus</i>) Género <i>Ipomovirus</i> , familia <i>Potyviridae</i>

TBV	Virus de la rotura del color del tulipán (<i>Tulip breaking virus</i>) Género <i>Potyvirus</i> , familia <i>Potyviridae</i>
TCV	Virus del marchitamiento del nabo (<i>Turnip crinkle virus</i>) Género <i>Carmovirus</i> , familia <i>Tombusviridae</i>
TEV	Virus del grabado del tabaco (<i>Tobacco etch virus</i>) Género <i>Potyvirus</i> , familia <i>Potyviridae</i>
TMV	Virus del mosaico del tabaco (<i>Tobacco mosaic virus</i>) Género <i>Tobamovirus</i> , familia <i>Virgaviridae</i>
TSWV	Virus del bronceado del tomate (<i>Tomato spotted wilt virus</i>) Género <i>Tospovirus</i> , familia <i>Bunyaviridae</i>
ToCV	Virus del amarilleo del tomate (<i>Tomato chlorosis virus</i>) Género <i>Crinivirus</i> , familia <i>Closteroviridae</i>
ToLCNDV	Virus del rizado amarillo del tomate de Nueva Delhi (<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i>) Género <i>Begomovirus</i> , familia <i>Geminiviridae</i>
ToRSV	Virus de la mancha anular del tomate (<i>Tomato ringspot virus</i>) Género <i>Nepovirus</i> , familia <i>Secoviridae</i>
TuMV	Virus del mosaico del nabo (<i>Turnip mosaic virus</i>) Género <i>Potyvirus</i> , familia <i>Potyviridae</i>
TYLCV	Virus del rizado amarillo del tomate (<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>) Género <i>Begomovirus</i> , familia <i>Geminiviridae</i>

RESUMEN

Los procesos de silenciamiento por RNA constituyen una de las principales respuestas de la planta frente a ácidos nucleicos exógenos, como transgenes, transposones o virus. Los RNA virales de doble cadena (dsRNA) activan este tipo de procesos y son digeridos por un tipo particular de enzima con actividad RNasa III, llamada DCL (*Dicer-like*), cuya acción genera pequeños RNA (sRNA) de entre 20 y 24 nt. A continuación, una de las cadenas del sRNA es reclutada por un complejo multiproteico conocido como RISC (*RNA-induced silencing complex*), cuya molécula efectora es una proteína Argonauta (AGO). RISC es dirigido por el sRNA hasta un RNA de secuencia complementaria al que este complejo se une promoviendo su degradación. Las RNA polimerasas RNA dependientes celulares, particularmente RDR6, potencian el silenciamiento antiviral al generar más dsRNA, a partir de los productos de corte de RISC u otros RNA aberrantes, que son procesados por DCL dando lugar a sRNA secundarios. Con el fin de evadir esta barrera defensiva del huésped, la mayoría de los virus de plantas codifican supresores del silenciamiento por RNA (VSR), cuyos mecanismos de acción son diversos y complejos y en muchos casos no se comprenden del todo. Aunque todas las etapas de la ruta pueden ser inhibidas, los sRNA y las proteínas AGO parecen ser las dianas más frecuentes. Se ha postulado que motivos GW/WG podrían ser fundamentales para la actividad de algunos VSR al intervenir en la interacción con proteínas AGO.

En este trabajo se ha pretendido seguir profundizando en el estudio de la respuesta antiviral en plantas y de los mecanismos de

acción de los supresores de silenciamiento. El primer objetivo abordado ha sido analizar la posible actividad como VSR de las proteínas codificadas por el virus del arabesco del *Pelargonium* (*Pelargonium line pattern virus*, PLPV), un miembro del género *Pelarspovirus* dentro de la amplia familia *Tombusviridae* que causa infecciones frecuentes en geranio. Los resultados han mostrado que la proteína de cubierta del virus (p37) es capaz de inhibir de manera eficiente el silenciamiento inducido por RNA. Para tratar de obtener más datos acerca del modo de acción de este supresor, se han modificado mediante mutagénesis dirigida distintos motivos de la proteína, incluido un motivo GW que está conservado en proteínas homólogas, y se ha obtenido una batería de moléculas capaces e incapaces de actuar como VSR y/o de empaquetar el RNA viral. Esta batería de mutantes ha permitido, por una parte, evaluar la importancia de ambas funciones de la proteína (encapsidación y supresión del silenciamiento) para la infección viral y, por otra parte, analizar distintas interacciones moleculares de p37 (unión a sRNA, dimerización, localización subcelular, asociación con proteínas AGO) y establecer posibles correlaciones entre las mismas y la actividad supresora. Los resultados nos han permitido sacar dos conclusiones principales: (i) tanto la función de supresión del silenciamiento como la función de encapsidación son esenciales para que el PLPV alcance una infección sistémica y (ii) p37, a pesar de contener un motivo GW funcional e interactuar con distintas AGO, emplea el secuestro de sRNA como estrategia principal para inhibir el silenciamiento. Además, los datos de este trabajo también han mostrado el solapamiento considerable entre señales de secuencia implicadas en distintas propiedades de la proteína, una situación que no es exclusiva

de este producto viral y que introduce un grado adicional de dificultad para establecer relaciones estructura-función en VSR.

A pesar de que ambas funciones conocidas de p37, supresión del silenciamiento y encapsidación, deben ser llevadas a cabo esencialmente en el citoplasma, el análisis de la localización subcelular de la proteína mostró que se localiza en citoplasma y núcleo, con gran acumulación en nucleolo. Esta localización nuclear/nucleolar se ha descrito para otras proteínas virales, aunque los determinantes moleculares y/o el significado biológico de la misma no se conocen en la mayoría de los casos. El segundo objetivo de este trabajo ha sido identificar señales en la secuencia de p37 e interacciones con factores del huésped involucrados en la localización nucleolar de esta proteína, así como conocer la relevancia de dicha localización en el ciclo infeccioso del virus. El análisis de la localización subcelular de versiones truncadas de p37 mediante microscopia confocal, nos ha permitido acotar la presencia de una señal de localización nucleolar (NoLS) en los primeros 45 aminoácidos de la molécula. La mayoría de proteínas emplea la clásica ruta de importinas para acceder al núcleo celular. Además, las importinas α , adaptadores moleculares del transporte nucleocitoplasmático, se han relacionado con la localización nucleolar de proteínas virales y celulares. Empleando aproximaciones distintas, hemos observado que p37 interacciona con diferentes miembros de la familia de las importinas α , y que esta interacción es esencial para la localización nucleolar de la proteína. Además, la anulación de la localización nucleolar de p37 mediante el silenciamiento de importinas α se ha correlacionado con una disminución de acumulación del virus, lo que sugiere que dicha localización es ventajosa para la infección viral.

Por último, estudios previos realizados con el PLPV mostraron que plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con este virus presentan una enorme cantidad de sRNA virales (vsRNA) que, además, son independientes de la actividad de RDR6. En estos estudios se sugirió que la actividad DCL, encargada de generar los vsRNA, podría ser la principal responsable del silenciamiento antiviral, ya que su función no estaría inhibida por la acción del VSR del virus, un supresor que secuestra vsRNA. Para intentar conocer más datos acerca de los factores de la ruta de silenciamiento que están implicados en la defensa frente al PLPV, analizamos la infección viral en líneas transgénicas de *N. benthamiana* con la expresión o actividad distintos componentes de la ruta comprometida. Los resultados han mostrado que DCL4 y, en menor medida, DCL2 afectan a la infección viral y que ambas tienen un efecto aditivo, tal y como se ha descrito en diversas interacciones virus-planta. Adicionalmente, AGO2 también se ha revelado como un factor clave en la respuesta frente al PLPV, ampliando el número de virus que están afectados por esta endonucleasa particular. En conjunto, los resultados obtenidos muestran que tanto el procesamiento de dsRNA mediado por enzimas DCL como el corte de RNA mediado AGO, contribuyen a la defensa de *N. benthamiana* frente al PLPV.

RESUM

Els processos de silenciament per RNA constitueixen una de les principals respostes de la planta davant àcids nucleics exògens, com transgens, transposons o virus. Els RNA virals de doble cadena (dsRNA) activen aquest tipus de processos, i són digerits per un tipus particular d'enzim amb activitat RNasa III, anomenada DCL (*Dicer-like*), donant lloc a xicotets RNA d'interferència (siRNA), d'entre 20 i 24 nt. A continuació, una de les cadenes del siRNA és reclutada per un complex multiproteic conegut com RISC (*RNA-induced silencing complex*), la molècula efectora del qual és una proteïna Argonauta (AGO). RISC és dirigit pel siRNA fins a un RNA de seqüència complementària al que s'uneix aquest complex promovent la seua degradació. Les RNA polimerases RNA dependents cel·lulars, particularment RDR6, potencien el silenciament antiviral en generar més dsRNA, a partir dels productes de tall de RISC o uns altres RNA aberrants, que són processats per DCL donant lloc a sRNA secundaris. Per tal d'evadir aquesta barrera defensiva de l'hoste, la majoria dels virus de plantes codifiquen supressors del silenciament per RNA (VSR), els mecanismes d'acció dels quals són diversos i complexos i en molts casos no es comprenen del tot. Encara que totes les etapes de la ruta poden ser inhibides, els sRNA i les proteïnes AGO semblen ser les dianes més freqüents. S'ha postulat que els motius GW/WG podrien ser fonamentals per a l'activitat d'alguns VSR, en intervindre en la interacció amb proteïnes AGO.

En aquest treball s'ha pretés continuar aprofundint en l'estudi de la resposta antiviral en plantes i dels mecanismes d'acció dels supressors

de silenciament. El primer objectiu abordat ha sigut analitzar la possible activitat com a VSR de les proteïnes codificades pel virus de l'arabesc del *Pelargonium* (*Pelargonium line pattern virus*, PLPV), un membre del gènere *Pelarspovirus* dins de l'amplia família *Tombusviridae* que causa infeccions freqüents en gerani. Els resultats han mostrat que la proteïna de coberta del virus (p37) és capaç d'inhibir de manera eficient el silenciament induït per RNA. Per a tractar d'obtenir més dades sobre la manera d'acció d'aquest supressor, s'han modificat mitjançant mutagenesi dirigida diferents motius de la proteïna, inclòs un motiu GW que està conservat en proteïnes homòlogues, i s'ha obtingut una bateria de molècules capaces i incapaces d'actuar com VSR i/o d'empaquetar l'RNA viral. Aquesta bateria de mutants ha permès, d'una banda, avaluar la importància de totes dues funcions de la proteïna (encapsidació i supressió del silenciament) per a la infecció viral i, d'altra banda, analitzar diferents interaccions moleculars de p37 (unió a sRNA, dimerització, localització subcel·lular, associació amb proteïnes AGO) i establir possibles correlacions entre les mateixes i l'activitat supressora. Els resultats ens han permès traure dues conclusions principals: (i) tant la funció de supressió del silenciament com la funció d'encapsidació són essencials per a que el PLPV aconseguisca una infecció sistèmica i (ii) p37, malgrat contindre un motiu GW funcional i interaccionar amb diferents AGO, emprà el segrest de sRNA com a estratègia principal per a inhibir el silenciament. A més, les dades d'aquest treball també han mostrat el solapament considerable entre senyals de seqüència implicades en diferents propietats de la proteïna, una situació que no és exclusiva d'aquest producte viral i que introdueix un grau addicional de dificultat per a establir relacions estructura-funció en VSR.

Malgrat que ambdues funcions conegudes de p37, supressió del silenciament i encapsidació, han de ser dutes a terme essencialment en el citoplasma, l'anàlisi de la localització subcel·lular de la proteïna mostrà que es localitza en citoplasma i nucli, amb gran acumulació en nuclèol. Aquesta localització nuclear/nucleolar s'ha descrit per a altres proteïnes virals, encara que els determinants moleculars i/o el significat biològic de la mateixa no es coneixen en la majoria dels casos. El segon objectiu d'aquest treball ha sigut identificar senyals en la seqüència de p37 i interaccions amb factors de l'hoste involucrats en la localització nucleolar d'aquesta proteïna, així com conèixer la rellevància d'aquesta localització en el cicle infecció del virus. L'anàlisi de la localització subcel·lular de versions truncades de p37 mitjançant microscòpia confocal, ens ha permès fitar la presència d'un senyal de localització nucleolar (NoLS) en els primers 45 aminoàcids de la molècula. La majoria de proteïnes emprà la clàssica ruta d'importines per a accedir al nucli cel·lular. A més, les importines α , adaptadors moleculars del transport nucleocitoplasmàtic, s'han relacionat amb la localització nucleolar de proteïnes virals i cel·lulars. Emprant aproximacions diferents, hem observat que p37 interacciona amb diferents membres de la família de les importines α , i que aquesta interacció és essencial per a la localització nucleolar de la proteïna. A més, l'anul·lació de la localització nucleolar de p37 mitjançant el silenciament d'importines α s'ha correlacionat amb una disminució d'acumulació del virus, la qual cosa suggereix que aquesta localització és avantatjosa per a la infecció viral.

Finalment, estudis previs realitzats amb el PLPV mostraren que plantes de *Nicotiana benthamiana* infectades amb aquest virus presenten una enorme quantitat de sRNA virals (vsRNA) que, a més,

són independents de l'activitat de RDR6. En aquests estudis se suggerí que l'activitat DCL, encarregada de generar els vsRNA, podria ser la principal responsable del silenciament antiviral, ja que la seua funció no estaria inhibida per l'acció del VSR del virus, un supressor que segresta vsRNA. Per a intentar conèixer més dades sobre els factors de la ruta de silenciament que estan implicats en la defensa front al PLPV, analitzem la infecció viral en línies transgèniques de *N. benthamiana* amb l'expressió o activitat diferents components de la ruta compromesa. Els resultats han mostrat que DCL4 i, en menor mesura, DCL2 afecten la infecció viral i que ambdues tenen un efecte additiu, tal com s'ha descrit en diverses interaccions virus-planta. Addicionalment, AGO2 també s'ha revelat com un factor clau en la resposta front al PLPV, ampliant el nombre de virus que estan afectats per aquesta endonucleasa particular. En conjunt, els resultats obtinguts mostren que tant el processament de dsRNA mediat per enzims DCL com el tall d'RNA mediat AGO, contribueixen a la defensa de *N. benthamiana* front al PLPV.

ABSTRACT

RNA silencing processes play an essential role in plant responses against exogenous nucleic acids such as transgenes, transposons or viruses. Viral-derived double-stranded RNAs (dsRNAs) trigger this type of processes, being digested by a particular RNase III-type enzyme, called DCL (Dicer-like), into virus-derived small RNAs (vsRNAs) of 20-24 nt. One strand of these vsRNAs is incorporated into a multiprotein complex known as RISC (RNA-induced silencing complex), whose main component is an endonuclease of Argonaute (AGO) family. Within the activated RISC, the vsRNAs act as guides to bring the RISC complex into contact with complementary RNAs, thereby causing their degradation. Host RNA dependent-RNA polymerases (RDRs), and particularly RDR6, strengthen RNA silencing by generating new dsRNA from RISC degraded products or other aberrant RNAs, which are processed by DCL enzymes into secondary vsRNA. To counteract this host defence response, most plant viruses encode suppressors of RNA silencing (VSRs), whose mechanisms of action are diverse, complex and often not well understood. Though virtually all stages of the antiviral silencing pathway can be blocked by VSRs, sRNAs and AGO proteins seem to be the most common targets. It has been postulated that GW/WG motifs could be fundamental for the activity of some VSRs by directing interaction with AGOs.

In this work, we have pursued to get further insights into the antiviral silencing in plants and the mechanisms of action of silencing suppressors. The first objective has been to analyse the potential

function as VSR of proteins encoded by *Pelargonium line pattern virus* (PLPV), a member of the genus *Pelarspovirus* within family *Tombusviridae* that causes frequent infections in geranium. The results have shown that the viral coat protein (p37) is able to efficiently inhibit RNA silencing. In order to obtain information on the mode of action of this suppressor, different protein motifs, including a GW motif conserved in homologous proteins, have been modified by site directed mutagenesis, generating suppressor-competent and -incompetent molecules and uncoupling the VSR and particle assembly capacities. The engineered mutants have been used, on the one hand, to assess the importance of the silencing suppression and the encapsidation functions of p37 for viral infection and, on the other hand, to analyse different molecular interactions of p37 (sRNAs binding, dimerization, subcellular localization, association with AGO proteins) in an attempt to establish possible correlations between such interactions and the suppression activity. Two main conclusions can be drawn from this work: (i) the silencing suppression and encapsidation functions of p37 are both required for systemic PLPV infection and, (ii) p37, even though it has a functional GW motif and interacts with different AGOs, inhibits silencing most likely through vsRNA sequestration. The data have also shown the important overlap of sequence signals related to distinct protein properties, a situation that is not exclusive to this viral product and that introduces an additional degree of difficulty to establish structure-function relationships in VSR.

Despite both p37 functions, RNA silencing suppression and encapsidation, have to be executed essentially in the cytoplasm, the analysis of the subcellular localization p37 has shown that it localizes in cytoplasm and nucleus, with high accumulation at the nucleolus. This

localization has been described for other viral proteins but, in most cases, the molecular determinants and/or biological significance of such subcellular localization remain elusive. The second objective of this work has been to identify p37 sequence signals and interactions with host factors that may be involved in the nucleolar localization of the protein, as well as to study the potential relevance of such localization for virus infection. Analysis of subcellular distribution of truncated versions of p37 through confocal microscopy, has allowed us to delimit the presence of a nucleolar localization signal (NoLS) within the first N-terminal 45 amino acids of the molecule. Most proteins follow the classical import pathway to reach the cell nucleus. Besides, importins α , adapters for nucleocytoplasmic transport, have been related to the nucleolar localization of some viral and cellular proteins. Using different approaches, we have observed that p37 interacts with distinct members of the importin α family, and that this interaction is essential for the nucleolar localization of the protein. In addition, impairment of p37 nucleolar localization through down-regulation of importin α expression has been correlated with a reduction of viral accumulation, suggesting that sorting of the protein to the major subnuclear compartment is advantageous for the infection process.

Finally, previous work showed that PLPV-infected *Nicotiana benthamiana* plants accumulate extraordinarily high amounts of vsRNAs that, strikingly, are independent of RDR6 activity. In the mentioned work, it was suggested that DCL activity, responsible of generating the vsRNA, could be the major effector for anti-PLPV silencing, since the dicing step would not be affected by the VSR encoded by the virus, a protein that acts via vsRNA sequestration. In order to obtain information on components of RNA silencing pathway

involved in the defense against PLPV, we analyzed the viral infection in *N. benthamiana* transgenic lines with the functions of distinct components of the pathway impaired. Results have shown that DCL4 and, to lesser extent, DCL2 contribute to restrict viral infection and that they have additive effects, in agreement with that observed in other plant-virus interactions. Additionally, AGO2 was found to be a key factor in the defense against PLPV, extending the number of viruses that are affected by this particular slicer. Altogether, the results supported that both dicing and slicing activities participate in the defense of *N. benthamiana* against PLPV.

INTRODUCCIÓN

1. Los virus de plantas

La disciplina científica que conocemos hoy como Virología de plantas nació a finales del siglo XIX cuando se empezaron a llevar a cabo estudios de enfermedades en plantas cuyo agente causal era un virus. Hasta ese momento, todas las enfermedades infecciosas se creía que estaban causadas por gérmenes que podían ser cultivados en medios especiales y aislados por medio de filtros muy finos que retenían a estos microorganismos. Sin embargo, el científico ruso Dmitri Ivanovsky demostró en 1892 que el agente causal del mosaico del tabaco, una enfermedad descrita por Adolf Mayer que afectaba a solanáceas, no seguía los criterios que se habían establecido para enfermedades infecciosas. Ivanovsky propuso que la enfermedad debía estar causada por una toxina producida por un microorganismo que era capaz de atravesar los filtros. En 1898, cuando el holandés Martinus Beijerinck repitió los experimentos de Ivanovsky, concluyó que el agente causal de la enfermedad era capaz de replicarse en el huésped, por lo que no podía tratarse de una toxina. A partir de entonces, Beijerinck acuñó el término virus (del latín *virus*, paradójicamente “toxina” o “veneno”) para referirse a este agente infeccioso que se comportaba como un “germen viviente soluble” (*contagium vivum fluidum*). Este agente, denominado posteriormente virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV; género *Tobamovirus*, familia *Virgaviridae*), fue la primera entidad biológica de tipo viral identificada.

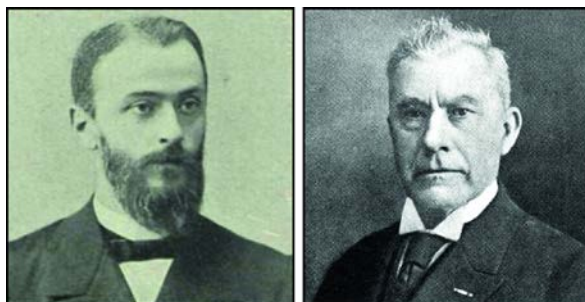


Figura 1. Los padres de la Virología de plantas. Dmitri Ivanovsky (izquierda) y Martinus Beijerinck (derecha).

Desde entonces, se han descrito multitud de virus capaces de infectar animales, plantas, hongos y bacterias. El Comité Internacional de Taxonomía Viral (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) ha reconocido hasta el momento más de 4800 especies virales distintas (Adams et al., 2016), de las cuales más de 1300 corresponden a virus de plantas agrupados en 28 familias y 128 géneros. Estos virus pueden infectar básicamente a todas las especies vegetales cultivadas o silvestres, aunque la gama de huéspedes varía dependiendo de cada virus o, incluso, de cada aislado viral. Asimismo, en función de la combinación virus (o aislado viral)-huésped y/o de las condiciones ambientales, las infecciones virales pueden ser asintomáticas o pueden causar importantes enfermedades que repercuten negativamente en la producción de los cultivos y que conllevan elevadas pérdidas económicas. Los efectos fenotípicos de las enfermedades virales pueden manifestarse en distintas partes de la planta ocasionando síntomas como patrones de mosaico, lesiones cloróticas, necrosis o enrollamiento en las hojas, anillos cloróticos, enanismo,

malformaciones o decoloración en los frutos, o cambios de color o deformaciones en las flores (Fig. 2).

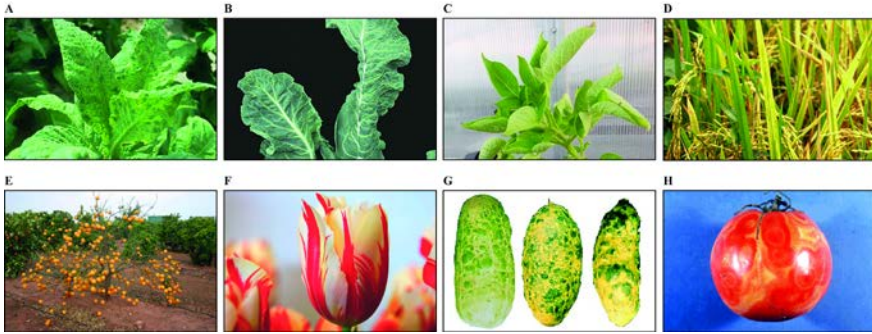


Figura 2. Sintomatología de virus. (A) Virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV; género *Tobamovirus*, familia *Virgaviridae*) en hojas de tabaco. (B) Virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV; género *Caulimovirus*; familia *Caulimoviridae*) en hojas de coliflor. (C) Virus del enrollamiento de la hoja de la patata (*Potato leafroll virus*, PLRV; género *Polerovirus*, familia *Luteoviridae*) en patata. (D) El virus del moteado amarillo del arroz (*Rice yellow mottle virus*, RYMV; género *Sobemovirus*, familia *Solemoviridae*) en arroz. (E) Virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV; género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae*) en naranjo. (F) Virus de la rotura del color del tulipán (*Tulip breaking virus*, TBV; género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*) en flor de tulipán. (G) Virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV; género *Cucumovirus*, familia *Bromoviridae*) en frutos de pepino. (H) Virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV; género *Tospovirus*, familia *Bunyaviridae*) en tomate.

Los virus se definen como un conjunto de una o más moléculas de ácidos nucleicos, normalmente encapsidadas en una o varias cubiertas proteicas o lipoproteicas, capaces de multiplicarse dentro de una célula hospedadora. Estos agentes son parásitos intracelulares obligados que requieren la maquinaria metabólica del huésped para poder multiplicarse. Este proceso de multiplicación conlleva la síntesis de todos los componentes virales y su posterior

ensamblaje para formar la progenie, que puede ser idéntica o diferir en mayor o menor medida del virus parental. Los virus muestran una gran diversidad en cuanto a tamaño y forma y resulta complicado establecer criterios para su clasificación. Uno de los criterios más obvios corresponde al tipo de ácido nucleico que constituye su genoma, ya que podemos encontrar virus con genomas de RNA de simple cadena (*single-stranded RNA*, ssRNA) y polaridad positiva [ssRNA(+)], simple cadena y polaridad negativa [ssRNA(-)], o doble cadena (*double-stranded RNA*, dsRNA); asimismo, los genomas virales pueden ser también de DNA de simple (*single-stranded DNA*, ssDNA) o doble cadena (*double-stranded DNA*, dsDNA). El tipo de genoma va a determinar, en gran medida, las características del ciclo replicativo de cada virus. Otros criterios de clasificación son la morfología de las partículas virales, las estrategias de expresión génica, particularidades estructurales de los ácidos nucleicos, de los genes o de las proteínas que codifican, hospedadores, etc.

La gran mayoría de virus de plantas presentan genomas de ssRNA(+) y se encuentran distribuidos dentro de las familias *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Benyviridae*, *Bromoviridae*, *Closteroviridae*, *Deltaflexiviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Luteoviridae*, *Potyviridae*, *Secoviridae*, *Solemoviridae*, *Tombusviridae*, *Tymoviridae* y *Virgaviridae*. Como ocurre con otros virus, el ssRNA(+) se encuentra recluido dentro de una cubierta proteica o cápsida que ejerce una función protectora frente a nucleasas y que está formada por subunidades de uno o varios tipos de proteína de cubierta (*coat protein*, CP). La(s) CP se pueden ensamblar siguiendo una estructura

helicoidal, formando bastones o filamentos flexibles, o una estructura icosaédrica, dando lugar a partículas similares a esferas.

El ciclo infeccioso de los virus ssRNA(+) de plantas comienza con la entrada del virión en la célula de una forma pasiva, normalmente a través de heridas o asistida por vectores, ya que por sí solos no son capaces de atravesar ni la cutícula ni la pared celular vegetal, una característica extensible a otros grupos de virus. Una vez en el citoplasma, la cubierta proteica del virión se elimina y se libera el RNA genómico (*genomic RNA*, gRNA). Este gRNA actúa ya como RNA mensajero (*messenger RNA*, mRNA) para la traducción de, al menos, las proteínas virales que se encargan de la replicación del virus, la RNA polimerasa dependiente de RNA (*RNA dependent-RNA polymerase*, RDR) viral y alguna(s) proteína(s) auxiliar(es) (Fig. 3). Estas proteínas, junto con el gRNA y factores del huésped, se asocian a estructuras membranosas y forman los denominados complejos de replicación viral (*viral replication complex*, VRC) (Heinlein, 2015a). Las membranas en las que se ensamblan estos complejos pueden derivar de cualquier orgánulo citoplasmático y existe una especificidad entre el virus y el tipo de orgánulo al que se asocia el VRC. En estos VRC, el gRNA sirve de molde para generar intermediarios de polaridad negativa que, a su vez, serán utilizados como molde para generar más hebras positivas que formarán el material genético de la progenie viral. En algunos casos, el gRNA de polaridad (+) o el de polaridad (-) sirve también de molde para formar RNA subgenómico(s) (*subgenomic RNA*, sgRNA) que permitirán la traducción de genes situados internamente en el gRNA y que, normalmente, están implicados en procesos más tardíos del ciclo

infeccioso, tales como el movimiento, la encapsidación o la transmisión por vectores (Hull, 2014). Una vez copiado el gRNA viral y traducidas las proteínas que codifica, las subunidades de CP y las moléculas de RNA de la progenie se ensamblan formando partículas virales que estarán listas para infectar una nueva célula (Fig. 3).

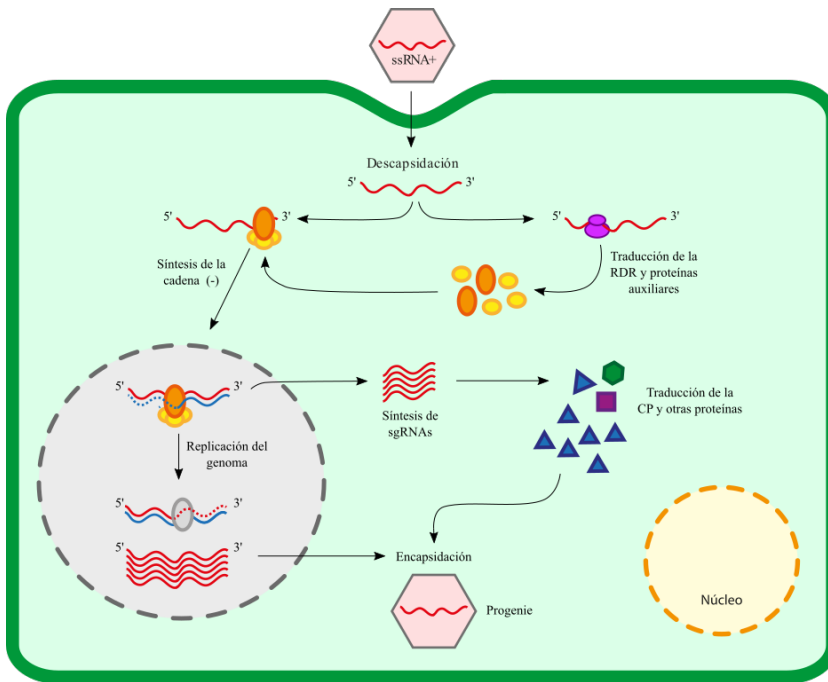


Figura 3. Representación esquemática del ciclo de replicación de los virus ssRNA(+). Tras la entrada del virus en el citoplasma, el gRNA es liberado y se traducen las replicasas virales: RDR viral y proteínas auxiliares. Estas proteínas se encargan de la síntesis de intermediarios de polaridad negativa que sirven de molde para sintetizar nuevas cadenas positivas (la progenie viral) y, en algunos casos, para formar sgRNA, a partir de los cuales se traducirán otras proteínas virales (CP y/u otras). La(s) CP reconocerán las copias del genoma viral dando lugar a nuevas partículas virales.

Estas partículas virales o, alternativamente, complejos de ribonucleoproteínas (RNP) que incluyen al genoma viral, se moverán célula a célula a través de los plasmodesmos asistidos por las proteínas de movimiento (*movement protein*, MP) codificadas por el virus (Harries and Ding, 2011; Heinlein, 2015b). Para extenderse sistémicamente en la planta, los virus han de alcanzar el sistema vascular, normalmente el floema. El proceso de transferencia de una planta infectada hacia una planta sana varía dependiendo del virus y puede producirse de manera vertical (a través de polen o semillas de plantas infectadas) y/o de manera horizontal. En este último caso, frecuentemente intervienen vectores que suelen corresponder a insectos, nematodos, ácaros u hongos (Gallet et al., 2018).

Para contrarrestar los efectos dañinos que causan los virus, las plantas han desarrollado una serie de mecanismos de defensa que pueden ser clasificados en constitutivos e inducibles (Pallás and García, 2011). Dentro de los mecanismos de defensa constitutivos encontramos todas aquellas barreras estructurales o químicas que impiden la entrada de los virus al citoplasma, como la cutícula, la pared celular, los tricomas, la cera o las saponinas. Dentro de este tipo de defensas también se pueden considerar los casos en los que la planta no produce alguno de los factores requeridos por el virus para poder llevar a cabo su ciclo infeccioso. Por otro lado, las defensas inducibles o activas son aquellas que se desencadenan tras detectar la presencia del virus y que pretenden eliminar o confinar al agente infeccioso en las zonas de inoculación para evitar su propagación por toda la planta. Este tipo de defensas requieren un elevado gasto energético para la planta y pueden ser inespecíficas, como la

producción de sustancias tóxicas o la muerte celular programada, o defensas específicas para cada virus, mediadas normalmente por genes de resistencia. Además, las plantas también poseen un sistema general de defensa contra virus, aparentemente universal, conocido como silenciamiento por RNA. Este sistema antiviral, descrito con más profundidad en el siguiente apartado, actúa a nivel de RNA, detectando y degradando el genoma viral y/o sus intermediarios replicativos (Csorba et al., 2009). Así pues, los virus han de ser capaces de escapar de este mecanismo para poder establecer una infección productiva.

2. El silenciamiento por RNA

2.1. El silenciamiento por RNA: generalidades

El silenciamiento por RNA es un sistema de inactivación génica específico de secuencia y conservado evolutivamente que desempeña un papel esencial en varios procesos biológicos como el control del desarrollo, el mantenimiento de la integridad del genoma, la regulación génica en procesos de respuesta a estrés, el control de transposones, la metilación del DNA o la modificación de la cromatina (Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009; Shriram et al., 2016; van Wolfswinkel and Ketting, 2010). En plantas superiores e insectos y, en menor medida, en hongos y probablemente en vertebrados, el silenciamiento por RNA también actúa como un mecanismo de defensa antiviral inducible (Bologna and Voinnet, 2014; Csorba et al., 2009; Ding, 2010). Los análisis bioquímicos y genéticos han demostrado que los mecanismos básicos del silenciamiento por RNA se comparten entre diferentes organismos (Wang and Metzlaff, 2005). Estos procesos de silenciamiento pueden actuar a nivel transcripcional o a nivel post-transcripcional. El silenciamiento génico transcripcional (*transcriptional gene silencing*, TGS) se produce cuando la expresión de un gen se ve comprometida al existir modificaciones epigenéticas en el DNA y/o las histonas que impiden el acceso de la maquinaria transcripcional. Por su parte, el silenciamiento génico post-transcripcional (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) implica la degradación del mRNA o la represión de su traducción, inhibiendo la síntesis proteica.

El silenciamiento por RNA puede seguir distintas rutas pero en todos los casos depende de pequeñas moléculas de RNA (*small RNA*, sRNA) de entre 21 y 24 nucleótidos (nt). Estos sRNA se producen a partir de dsRNA, o de ssRNA muy estructurados, que actúan como inductores del silenciamiento y que son procesados por la acción de una ribonucleasa de la familia de las RNasas III de tipo Dicer (*Dicer-like*, DCL) (Borges and Martienssen, 2015; Fukudome and Fukuhara, 2017) (Fig. 4). Una de las dos hebras de los sRNA bicatenarios resultantes de este procesamiento (“hebra guía”) es incorporada a un complejo multiproteico efector, el complejo de silenciamiento inducido por RNA (*RNA-induced silencing complex*, RISC), cuyo componente activo es una proteína de la familia de las endonucleasas denominadas Argonautas (AGO) (Carbonell, 2017; Carbonell and Carrington, 2015; Mallory and Vaucheret, 2010). En el caso del PTGS, RISC es dirigido por el sRNA asociado hasta un RNA diana, promoviendo su degradación o reprimiendo su traducción (Liu et al., 2004; Song et al., 2004; Tomari and Zamore, 2005) (Fig. 4). El reconocimiento específico de las secuencias diana está mediado por los sRNA a través de un mecanismo de apareamiento de bases, mientras que el corte del RNA diana lo realizan las proteínas AGO (Carbonell, 2017; Carbonell and Carrington, 2015; Ma and Zhang, 2018). En el TGS, RISC es dirigido hasta un DNA complementario que resulta modificado por metilación, dando lugar a heterocromatina transcripcionalmente inactiva (Rogers and Chen, 2013; Zvereva and Pooggin, 2012).

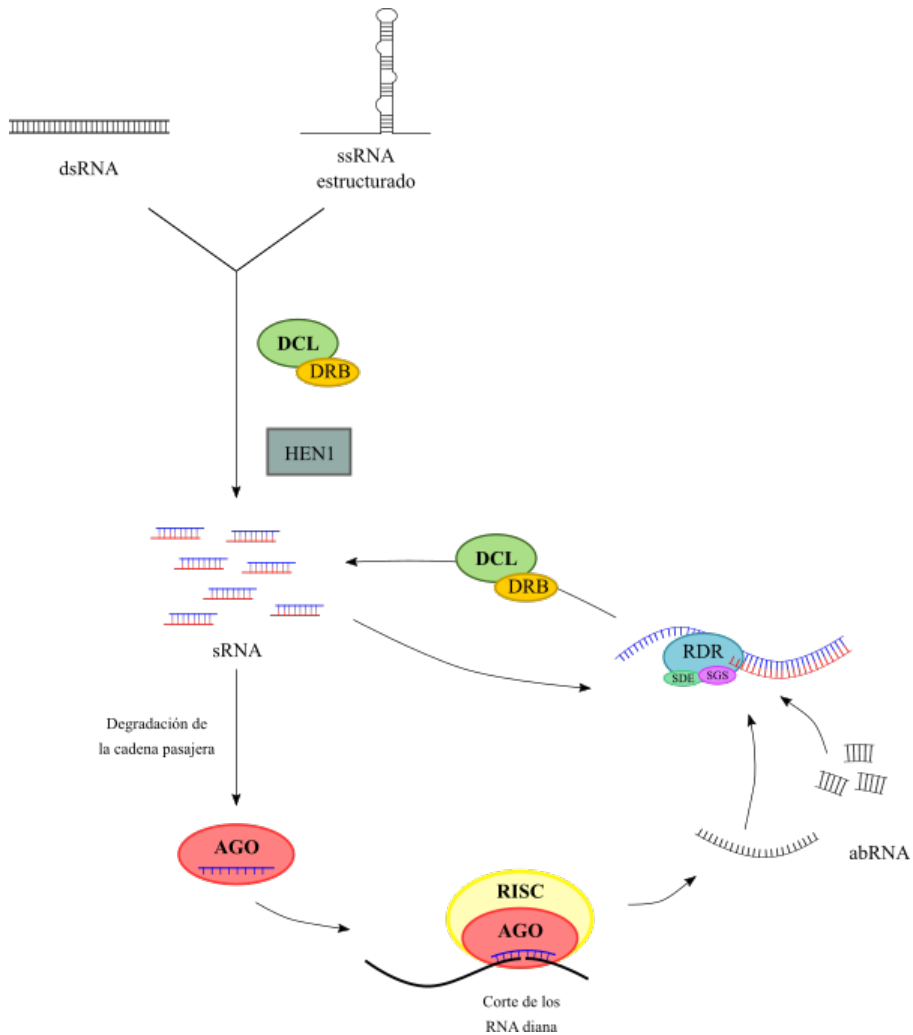


Figura 4. Ruta general del PTGS en plantas. Los dsRNA o ssRNA estructurados son reconocidos y procesados por DCL, asistida(s) por un cofactor DRB, para generar sRNA que son metilados por HEN1. La hebra guía de sRNA se carga en el complejo RISC, cuyo componente principal es una proteína AGO, para reconocer específicamente y cortar las moléculas de RNA diana (o reprimir su traducción). Los sRNA pueden ser empleados como cebadores para generar nuevas moléculas de dsRNA, con la mediación de RDR celulares, y amplificar la señal.

Los dsRNA (o ssRNA con alta estructura secundaria) que desencadenan el proceso de silenciamiento pueden originarse por transcripción en el núcleo, durante las infecciones virales o por la acción de RDR celulares. Estas enzimas, además de poder participar en la generación de las moléculas inductoras, están involucradas en la amplificación de respuesta de silenciamiento (Fig. 4). La amplificación se consigue mediante la síntesis de nuevos dsRNA por la acción de una RDR que utiliza como molde los ssRNA generados tras el corte por el complejo RISC (u otros ssRNA aberrantes) y los sRNA como cebadores (Voinnet, 2008). Estos dsRNA son entonces procesados por DCL para generar los denominados sRNA secundarios. Los mecanismos de silenciamiento activados en una célula simple pueden diseminarse a células adyacentes y a tejidos distantes (Voinnet, 2005; Voinnet and Baulcombe, 1997). La naturaleza de la señal móvil no se conoce con exactitud pero distintos resultados indican que los sRNA deben formar parte de ella (Chitwood and Timmermans, 2010; Liu and Chen, 2018; Melnyk et al., 2011; Zhang et al., 2019).

En plantas, al igual que en otros eucariotas, encontramos diversos tipos de sRNA. Basándonos en su biogénesis y en características moleculares, los sRNA pueden ser clasificados en dos grandes grupos: los sRNA de interferencia (*small interfering RNA*, siRNA) y los micro RNA (miRNA). La diferencia fundamental entre estas dos clases de sRNA radica en la estructura de su RNA precursor: mientras los siRNA resultan del procesamiento de dsRNA o ssRNA en horquilla con tallo perfectamente apareado, los miRNA se generan a partir de ssRNA que adoptan un plegamiento en horquilla con tallo

parcialmente apareado (Borges and Martienssen, 2015; Ghildiyal and Zamore, 2009; Singh et al., 2018). En concreto, la biogénesis de los miRNA comienza con la transcripción de los genes *MIR* por la RNA polimerasa II que da lugar a transcritos primarios (pri-miRNA) que presentan una estructura en forma de horquilla. Estos pri-miRNA serán procesados por DCL1 para formar los RNA precursores de miRNA (pre-miRNA) que, en última instancia, darán lugar a los miRNA maduros. Tras ser incorporados en AGO1, los miRNA dirigen el corte o la represión traduccional de los mRNA diana (Achkar et al., 2016). Los miRNA están principalmente implicados en procesos de desarrollo de la planta, como el desarrollo de la semilla, la germinación, la formación de raíces laterales o el desarrollo de hojas y flores, aunque también intervienen en la respuesta a distintos estreses abióticos y en defensa frente a patógenos (Meng et al., 2011; Singh et al., 2018; Sun et al., 2018).

Por otro lado, los siRNA constituyen un grupo heterogéneo de sRNA de naturaleza muy variada que pueden ser clasificados en tres subtipos: los pequeños RNA interferentes secundarios, los siRNA derivados de transcritos naturales antisentido (*natural antisense short interfering RNA*, natsiRNA) y los siRNA heterocromáticos (*heterochromatic small interfering RNA*, hetsiRNA). La biogénesis de los diferentes siRNA sigue rutas distintas en cuanto a la actividad polimerasa implicada en la generación de los precursores, la actividad DCL que los procesa y/o la(s) proteína(s) AGO en que son cargados (Borges and Martienssen, 2015; Ghildiyal and Zamore, 2009). Dentro de los siRNA secundarios destacan los pequeños RNA interferentes que actúan en *trans* (*trans-acting small interfering RNA*, tasiRNA)

que participan, junto con los miRNA, en la regulación de los procesos de desarrollo. Los natsiRNA son sRNA inusuales que provienen del corte de transcritos bidireccionales inducidos únicamente en situaciones de estrés e intervienen en la adaptación o respuesta en este tipo de situaciones. Y, por último, los hetsiRNA son siRNA de 24 nt que derivan de secuencias repetidas como los elementos transponibles o regiones pericentroméricas. Su función es la de guiar la metilación *de novo* de elementos transponibles para mantener la integridad del genoma (Borges and Martienssen, 2015).

2.2. Componentes de la ruta del silenciamiento por RNA

El genoma de *Arabidopsis thaliana*, la especie vegetal más extensamente utilizada como modelo, codifica cuatro DCL distintas: de DCL1 a DCL4. Estas proteínas, encargadas de degradar los dsRNA, poseen múltiples dominios incluyendo dos catalíticos con actividad RNasa III que constituyen el centro activo, un dominio conservado tipo PAZ (*Piwi/Argonaute/Zwille*), un dominio de unión a dsRNA (*dsRNA binding domain*, dsRBD) situado en el extremo C-terminal, otro con actividad helicasa/ATPasa de RNA y un dominio de función desconocida (DUF283). La separación que existe entre el centro activo y el dominio PAZ en cada tipo de enzima determina cuál será la longitud de los sRNA que se producen (Dunoyer et al., 2005; MacRae et al., 2006). En general, los sRNA bicatenarios generados por DCL poseen un grupo fosfato en el extremo 5' y dos bases no apareadas en los extremos 3' hidroxilo (Bernstein et al., 2001; Hamilton and Baulcombe, 1999; Hamilton et al., 2002) que, en la

mayor parte de los casos, resultan metilados por una metil-transferasa (HEN1) (Yu et al., 2005). Esta modificación es compartida por todas las rutas de silenciamiento de plantas y protege a los sRNA frente a la uridilación (Li et al., 2005) y frente a actividades exonucleasa (Frizzi and Huang, 2010; Ramachandran and Chen, 2008). Para poder unirse a las moléculas de dsRNA, DCL necesita formar un complejo con otras proteínas, las proteínas de unión a dsRNA (*dsRNA binding protein*, DRB), que la asisten en sus funciones. En *A. thaliana* se han identificado cinco DRB distintas (HYL1, DRB2-5). Estas proteínas son capaces de interaccionar de forma diferencial con las DCL y facilitan la producción de sRNA (Hiraguri et al., 2005; Nakazawa et al., 2007; Vaucheret, 2006).

En cuanto a las proteínas AGO, los componentes más relevantes de RISC, el genoma de *A. thaliana* codifica diez proteínas de este tipo: de AGO1 a AGO10. Las proteínas AGO poseen dos dominios principales: el dominio PAZ en el extremo N-terminal -un dominio de unión a sRNA (Ma et al., 2004)-, y el dominio PIWI en el extremo C-terminal que posee una triada catalítica DDE y es el responsable de la actividad RNasa sobre los ssRNA complementarios al sRNA cargado en AGO (Tolia and Joshua-Tor, 2007). La presencia de la triada catalítica no implica necesariamente actividad de corte ya que, en ocasiones, RISC induce una represión de la traducción del RNA diana en lugar de su degradación (Carbonell, 2017). De momento, solo se ha confirmado la capacidad de corte de cinco AGO (AGO1, AGO2, AGO4, AGO7 y AGO10) (Baumberger and Baulcombe, 2005; Carbonell et al., 2012; Montgomery et al., 2008; Qi et al., 2005). Como se ha indicado anteriormente, los sRNA generados

por DCL se ensamblan en el complejo RISC por unión a proteínas AGO. Mientras que la hebra guía del sRNA se une a la proteína AGO y dirige el proceso de degradación del RNA complementario, la otra hebra (“hebra pasajera”) es degradada durante el proceso de activación del RISC. Aunque en principio se supuso que una helicasa dependiente de ATP separaba ambas hebras, en realidad el proceso es independiente de ATP y realizado directamente por proteínas que componen el complejo RISC. El reclutamiento de los sRNA en un complejo AGO particular está determinado, aunque no de forma exclusiva, por el nucleótido del extremo 5’ (Kim, 2008; Mi et al., 2008). Los sRNA con uridina en su extremo 5’ son cargados en AGO1, mientras que los que contienen adenina se cargan en AGO2, AGO4, AGO6 y AGO9 y los de citosina en AGO5 (Mi et al., 2008; Montgomery et al., 2008).

El otro componente importante de los mecanismos de silenciamiento son las enzimas RDR que, como se ha indicado anteriormente, pueden intervenir en la generación inicial de los dsRNA inductores y, también, en la amplificación de la señal de silenciamiento (Dalmy et al., 2000; Wassenegger and Krczal, 2006). El genoma de *A. thaliana* codifica seis RDR: RDR1, RDR2, RDR3a (RDR3), RDR3b (RDR4), RDR3c (RDR5) y RDR6 (SDE1/SGS2). El dominio catalítico putativo contiene el motivo DFDGD en RDR3, RDR4 y RDR5, o el motivo DLDGD en RDR1, RDR2 y RDR6 (Wassenegger y Krczal, 2006). La existencia de seis RDR sugiere redundancia y/o especialización entre las RDR en las diferentes rutas de silenciamiento. La enzima RDR6 resulta particularmente importante para procesos de PTGS en plantas y sintetiza dsRNA

auxiliada por proteínas adicionales, como un estabilizador de RNA (SGS3), una exonucleasa RNasa D (WEX) y una helicasa de RNA (SDE3) (Dalmay et al., 2001; Glazov et al., 2003; Mourrain et al., 2000).

2.3. El silenciamiento por RNA: un mecanismo antiviral

Una de las primeras funciones descubiertas y bien estudiadas del silenciamiento por RNA es la defensa del huésped frente a la invasión de los virus, observada por primera vez en plantas (Dougherty et al., 1994; Lindbo et al., 1993; Ratcliff et al., 1997). Todos los tipos de virus generan en algún momento de su ciclo replicativo estructuras de dsRNA que pueden actuar como inductores del PTGS. En el caso de virus con genoma de DNA, estos dsRNA pueden provenir de la transcripción bidireccional de su genoma o de elementos de estructura secundaria presentes en sus mRNA. En el caso de los virus de RNA, la mayoría de los que infectan plantas, su replicación implica la formación de intermediarios de dsRNA que pueden ser los desencadenantes de procesos de silenciamiento (Ahlquist, 2006). No obstante, distintos datos sugieren que las regiones altamente estructuradas del genoma de este tipo de virus pueden actuar como dianas primarias del silenciamiento en algunos casos (Donaire et al., 2009; Molnár et al., 2005). Tanto en virus de DNA como de RNA, las especies moleculares que disparan el silenciamiento podrían ser también el resultado de la utilización del RNA viral como molde por las RDR celulares (Curaba and Chen, 2008).

La activación del silenciamiento por parte de los virus convierte a estos patógenos en dianas de este mecanismo, dando lugar a la fragmentación de su genoma y a la formación de sRNA de origen viral (*viral small RNA*, vsRNA) (Ding and Voinnet, 2007; Zhang et al., 2015). Como se ha descrito de forma general para el PTGS, en este caso la señal también se puede amplificar mediante la producción de vsRNA secundarios (Zhang et al., 2015). Asimismo, la señal antiviral puede diseminarse al resto de la planta, estableciendo una respuesta defensiva y una resistencia frente a la infección previa a la llegada del patógeno (Brosnan et al., 2007; Dunoyer et al., 2010; Molnár et al., 2010).

Como se ha indicado anteriormente, *A. thaliana* produce cuatro DCL distintas. La biogénesis de vsRNA necesita la acción coordinada y jerarquizada de estas enzimas (Deleris et al., 2006; Moissiard and Voinnet, 2006a). DCL2, DCL3 y DCL4 son capaces de reconocer estructuras virales y generan vsRNA de 22, 24 y 21 nt de longitud, respectivamente (Blevins et al., 2006; Deleris et al., 2006). La infección por un virus de RNA parece estar afectada principalmente por DCL4 y, en menor medida, por DCL2 seguida de DCL3. DCL1 contribuye escasamente a la formación de vsRNA pero podría intervenir cuando están comprometidas las actividades de otras DCL o cuando es necesario un procesamiento previo que facilite el acceso al dsRNA de otras DCL (Llave, 2010). Al igual que *A. thaliana*, *Nicotiana benthamiana* codifica cuatro DCL, siendo DCL4 y DCL2 las que, muy probablemente, desempeñan el papel más relevante en defensa antiviral (Dadami et al., 2013; Donaire et al., 2008). En contraste, en *Oryza sativa* se han identificado ocho DCL

distintas (DCL1a, DCL1b, DCL1c, DCL2a, DCL2b, DCL3a, DCL3b, and DCL4) (Kapoor et al., 2008) algunas de las cuales también han sido implicadas en la respuesta frente a virus (Urayama et al., 2010; Yang and Li, 2018).

Una vez generados, los vsRNA se asocian con complejos efectores RISC que serán los encargados de reconocer las dianas virales y cortarlas (Carbonell, 2017; Carbonell and Carrington, 2015; Ding and Voinnet, 2007). En *A. thaliana*, las proteínas AGO1 y AGO2 parecen contribuir en mayor medida al desarrollo de la respuesta antiviral (Carbonell and Carrington, 2015), pero también pueden intervenir las proteínas AGO4, AGO5, AGO7 y/o AGO10 en algunas circunstancias (Brosseau et al., 2016; Alazem et al., 2017; García-Ruiz et al., 2015). Los datos acerca de la contribución de las AGO en defensa antiviral en otras especies no es tan amplia y prácticamente solo se dispone información sobre estas proteínas en *N. benthamiana* y *O. sativa* (Carbonell and Carrington, 2015). En *N. benthamiana*, se ha implicado a AGO1 en la defensa frente al virus de la mancha anular del tomate (*Tomato ringspot virus*, ToRSV; género *Nepovirus*, familia *Secoviridae*) (Ghoshal and Sanfaçon, 2014). Además, distintos estudios también han mostrado que AGO2 desempeña un papel esencial en la respuesta frente a distintos tipos de virus (Ludman et al., 2017; Odokonyero et al., 2015, 2017; Paudel et al., 2018; Scholthof et al., 2011). Por otro lado, en *O. sativa*, cuyo genoma codifica diecinueve AGO distintas, datos genéticos y bioquímicos sugieren que AGO1, AGO2 y AGO18 están involucradas en respuesta antiviral (Du et al., 2011; Wu et al., 2015).

Por último, cabe señalar que el papel de las RDR celulares en respuesta antiviral mediada por silenciamiento, también puede ser bastante importante. La contribución de RDR6 parece ser especialmente relevante, ya que si las funciones de esta enzima se encuentran comprometidas en una planta, aumenta considerablemente su susceptibilidad a distintos virus (Schwach et al., 2005; Voinnet, 2008). Asimismo, también se ha constatado la participación de RDR1 y RDR2 como parte de la respuesta defensiva de las plantas frente a algunos virus (Díaz-Pendón et al., 2007; Donaire et al., 2008; Qi et al., 2009).

2.4. Estrategias de supresión del silenciamiento

Para contrarrestar el mecanismo de defensa del huésped basado en el silenciamiento por RNA, la mayoría de los virus de plantas codifican proteínas conocidas como supresores virales del silenciamiento por RNA (*viral suppressor of RNA silencing*, VSR) (Csorba et al., 2015). El descubrimiento de los VSR proporcionó la prueba más convincente de la naturaleza antiviral del silenciamiento por RNA y reveló la estrategia de defensa del patógeno frente al mecanismo de silenciamiento del huésped (Voinnet et al., 1999). Desde el descubrimiento del primer VSR, la proteína HC-Pro del virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV; género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*) (Anandalakshmi et al., 1998; Kasschau and Carrington, 1998), más de 50 VSR distintos han sido identificados, una lista que engloba a gran parte de los géneros de virus de plantas (Yang and Li, 2018; Zhao et al., 2016). Los datos disponibles sugieren

que todos los virus de plantas codifican, por lo menos, un supresor, aunque en algunos casos pueden codificar más de uno.

Los VSR son muy diversos, no comparten similitudes de secuencia o de estructura obvias ni siquiera dentro de la misma familia viral, de modo que parecen haber evolucionado de manera independiente para llevar a cabo la misma función (Ding and Voinnet, 2007). La posición en el genoma de las pautas abiertas de lectura (*open reading frame*, ORF) que los codifican es variable entre distintos virus, y se pueden expresar siguiendo distintas estrategias como la lectura a través de un codón de terminación débil (*readthrough*, RT), la maduración proteolítica de poliproteínas o la producción de un RNA subgenómico a partir del gRNA del virus, entre otras. Muchos de los VSR identificados hasta la fecha son multifuncionales: además de ser supresores del silenciamiento por RNA, también están involucrados en otros procesos del ciclo infeccioso al funcionar, por ejemplo, como CP, replicasa, MP, componente auxiliar para la transmisión del virus, proteasa o como regulador de la transcripción.

Tras estudiar distintos VSR, se ha observado que son capaces de interferir en distintos puntos de la ruta de silenciamiento (Fig. 5), ya sea actuando sobre las moléculas de RNA relacionadas con dicha ruta o interaccionando con componentes proteicos relevantes de la misma (Csorba et al., 2015). En cualquier caso, las bases moleculares de la acción de los VSR son complejas y cada vez existen más datos que indican que un mismo supresor puede utilizar diversas estrategias y afectar a diferentes etapas del proceso de silenciamiento.

2.4.1. Interacción con RNA relacionados con el silenciamiento

Existen distintas estrategias de supresión que interfieren con los RNA relacionados con el silenciamiento. La estrategia de supresión más utilizada, adoptada por muchos VSR distintos, es la unión a sRNA (Lakatos et al., 2006; Merai et al., 2006), lo que impide el ensamblaje del complejo efector RISC. En presencia de VSR capaces de secuestrar sRNA, la infección y la propagación del virus resultan altamente favorecidas ya que los vsRNA son capturados antes de que puedan ser incorporados en RISC. Aunque los VSR con este mecanismo de supresión son codificados por especies virales pertenecientes a géneros muy diversos, incluyendo *Tospo-*, *Cucumo-*, *Poty-*, *Ipomo-*, *Carmo-*, *Clostero-*, *Viti-*, *Tobamo-* u *Hordeivirus* (Lakatos et al., 2006; Martínez-Turiño and Hernández, 2009; Merai et al., 2006), el más caracterizado es la proteína p19 de miembros del género *Tombusvirus* (familia *Tombusviridae*), uno de los VSR mejor estudiados hasta el momento. Estudios cristalográficos han demostrado que la proteína p19 forma homodímeros que actúan como una pinza molecular capaz de medir la longitud de los sRNA y de unirse con alta afinidad e independientemente de su secuencia a la región de doble cadena de 19-22 pares de bases (*base pair*, bp) de estos pequeños RNA (Silhavy et al., 2002; Vargason et al., 2003; Ye et al., 2003).

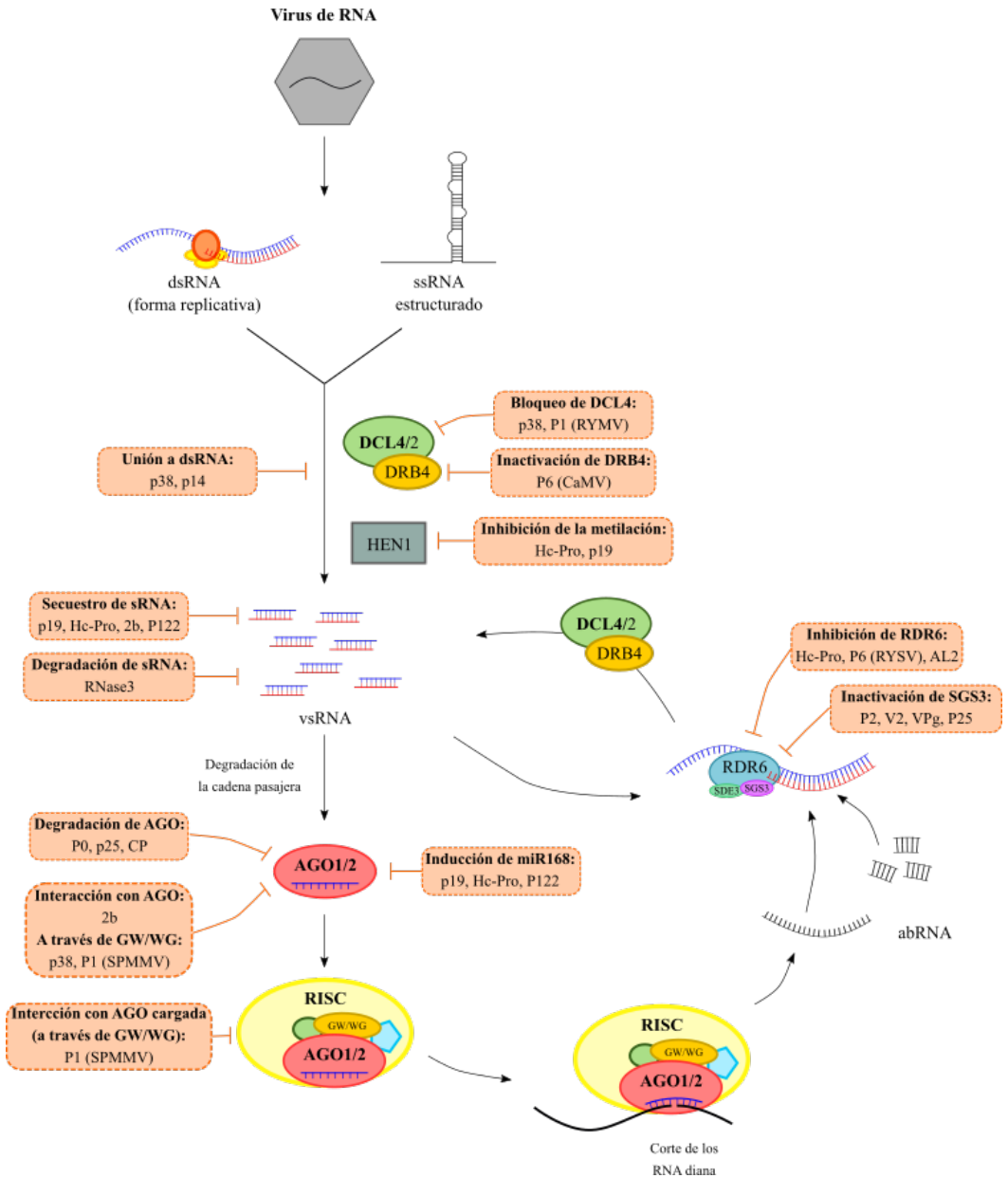


Figura 5. Modelo del silenciamiento antiviral por RNA y de su supresión por distintos VSR. Los VSR que aparecen son: p38 del virus del marchitamiento del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV; género *Carmovirus*, familia *Tombusviridae*); p14 del virus latente del Pothos (*Pothos latent virus*, PoLV; género *Aureusvirus*, familia *Tobusviridae*); p19 de los miembros del género *Tombusvirus* (familia *Tombusviridae*); Hc-Pro de los miembros del género *Potyvirus* (familia *Potyviridae*); 2b del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus CMV*; género *Cucumovirus*, familia *Bromoviridae*); P122 del virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV; género *Tobamovirus*, familia *Virgaviridae*); RNase3 del virus del enanismo clorótico de la batata (*Sweet potato chlorotic stunt virus*, SPCSV; género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*); P0 de los miembros del género *Polerovirus* (familia *Luteoviridae*); p25 de los miembros del género *Potexvirus* (familia *Alphaflexiviridae*); CP del virus de la mancha anular del tomate (*Tomato ringspot virus*, ToRSV; género *Nepovirus*; familia *Secoviridae*); P1 del virus del moteado suave de la batata (*Sweet potato mild mottle virus*, SPMMV género *Ipomovirus*; familia *Potyviridae*); P1 del virus del moteado amarillo del arroz (*Rice yellow mottle virus*, RYMV; género *Sobemovirus*, familia *Solemoviridae*); P6 del virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV; género *Caulimovirus*; familia *Caulimoviridae*); P6 del virus del enanismo amarillo del arroz (*Rice yellow stunt virus*, RYSV; género *Nucleorhabdovirus*; familia *Rhabdoviridae*); P2 del virus rayado del arroz (*Rice stripe virus*, RSV; género *Tenuivirus*, familia *Phenuiviridae*) y el supresor VPg del virus A de la patata (*Potato virus A*, PVA; género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*).

Algunos supresores, además de unir sRNA, son capaces de asociarse a dsRNA más largos. En este caso compiten con DCL por su sustrato e interfieren con el procesamiento mediado por este tipo de enzimas, lo que impide la generación de vsRNA que son el elemento clave de la respuesta del silenciamiento antiviral. Ejemplos de supresores que emplean esta estrategia son la proteína p14 del virus latente del Pothos (*Pothos latent virus*, PoLV; género *Aureusvirus*, familia *Tombusviridae*), la proteína p38 del virus del marchitamiento del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV; género *Carmovirus*, familia *Tombusviridae*) o la proteína p22 del virus del amarilleo del tomate (*Tomato chlorosis virus*, ToCV; género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*), que son capaces de unirse a dsRNA

independientemente del tamaño que tengan (Landeo-Ríos et al., 2016a; Merai et al., 2005, 2006). En el caso de estos VSR, la inhibición de la maquinaria de silenciamiento antiviral se puede producir a dos niveles: (i) secuestrando vsRNA e (ii) interfiriendo con el procesamiento de dsRNA virales por enzimas DCL (Merai et al., 2006). Otros VSR parecen tener especial predilección por dsRNA largos y, en ese caso, actuarán bloqueando la acción de DCL (Merai et al., 2006; Robles Luna et al., 2017).

Por otra parte, se ha demostrado también que algunos VSR pueden inhibir la formación de complejos RISC activos al impedir la metilación del extremo 3' de los sRNA, quizá porque presentan una mayor afinidad por estos pequeños RNA que la metiltransferasa HEN1 (Csorba et al., 2007; Ebhardt et al., 2005; Lozsa et al., 2008; Vogler et al., 2007). Otra estrategia parece ser la de transformar los sRNA en moléculas que no pueden ser incorporadas a RISC. Este modo de acción es utilizado por algún supresor que posee actividad endonucleasa del tipo RNasa III y que escinde los vsRNA de 21, 22 y 24 bp en productos de 14 bp (Cuellar et al., 2009).

Todas estas estrategias demuestran que los VSR son muy versátiles y son capaces de actuar sobre la misma molécula de la ruta de silenciamiento empleando distintos mecanismos.

2.4.2. Interacción con proteínas del huésped relacionadas con el silenciamiento

Los VSR también son capaces de actuar sobre distintos componentes proteicos de la ruta de silenciamiento. Como se ha indicado anteriormente, las proteínas DCL necesitan para su funcionamiento factores auxiliares que unen dsRNA, conocidos como DRB (Vaucheret, 2006). Se ha observado que algunos supresores virales se unen a DRB4, el factor auxiliar de DCL4, inhibiendo la formación de vsRNA de 21 nt (Deleris et al., 2006; Haas et al., 2008; Hiraguri et al., 2005; Qu et al., 2008).

Otra diana importante de distintos VSR son las proteínas AGO. El modo en que este componente esencial de RISC es bloqueado puede diferir entre supresores. Se ha descrito un caso, correspondiente a la proteína 2b del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV; género *Cucumovirus*, familia *Bromoviridae*), en el que el supresor interacciona físicamente con el dominio PAZ y con parte del dominio PIWI de AGO1 y bloquea su actividad endonucleasa (Zhang et al., 2006). Otra estrategia es la unión a AGO para inducir su degradación por distintas vías (Baumberger et al., 2007; Bayne et al., 2005; Bortolamiol et al., 2007, 2008; Chiu et al., 2010). Otros estudios han indicado que la unión a AGO de algunos VSR se basa en la presencia en estos últimos de motivos GW/WG, característicos de proteínas celulares, que participan en el ensamblaje/funcionamiento de RISC en distintos organismos (Azevedo et al., 2010; Giner et al., 2010). Este tipo de motivos normalmente se encuentran en un contexto de secuencia que

se caracteriza por una mayor representación de los residuos G, W, S y T y de los aminoácidos cargados E, D y K, y por un déficit notable de los residuos M, Y, C y H (El-Shami et al., 2007). Se ha propuesto que los supresores virales que contienen estos motivos podrían, por imitación y competencia con las proteínas celulares, interferir en la formación/actividad de RISC (Azevedo et al., 2010; Giner et al., 2010). Un ejemplo de un supresor de este tipo es la proteína p38 (CP) del TCV, que contiene dos repeticiones GW, uno en el extremo N-terminal y otro en el C-terminal. Experimentos de co-inmunoprecipitación mostraron que esta proteína interacciona con AGO1 pero no con AGO7 en *A. thaliana* (Azevedo et al., 2010). Además, se observó que mutaciones puntuales en cualquiera de los motivos GW (cambio de GW a GA) anulaban la interacción de p38 con AGO1 y eran suficientes para abolir la infectividad del TCV. En base a estos resultados, se sugirió que, muy probablemente, la interacción de p38 con AGO1 comprometía la carga de sRNA en esta última molécula, desviándola de su función antiviral (Azevedo et al., 2010). También se sugirió que la inactivación de AGO1 por p38 afectaba a los niveles de las cuatro DCL de *A. thaliana*, apuntando hacia la existencia de una red homeostática dependiente de AGO1 que conecta funcionalmente a estos factores (Azevedo et al., 2010).

El segundo supresor descrito capaz de interactuar con AGO1 a través de motivos GW/WG corresponde a la proteína P1 del virus del moteado suave de la batata (*Sweet potato mild mottle virus*, SPMMV; género *Ipomovirus*, familia *Potyviridae*). Esta proteína contiene tres motivos GW/WG en su parte N-terminal y experimentos de mutagénesis dirigida parecían indicar que estos motivos eran

esenciales tanto para la unión a AGO1 como para la supresión de su función (Giner et al., 2010). Sin embargo, estudios posteriores han mostrado que unos mutantes deficientes en actividad supresora mantenían la capacidad de interactuar con AGO1, indicando que ambas funciones pueden ser desacopladas (Kenesi et al., 2017). Además, en este estudio también se cartografió un dominio de dedos de zinc como un motivo efector involucrado en la función supresora mostrando que, al igual que ocurre en otras proteínas que poseen motivos GW, como GW182, KTF1, Tas3 y RNA Pol IV (Bies-Etheve et al., 2009; El-Shami et al., 2007; He et al., 2009; Zipprich et al., 2009), el dominio efector y el dominio de unión a AGO podrían estar situados en distintas regiones de la proteína (Kenesi et al., 2017).

Por último, también se ha descrito que la proteína P1N-PISPO del virus del moteado plumoso de la batata (*Sweet potato feathery mottle virus*, SPFMV; género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*) posee motivos GW/WG involucrados en la función supresora de la proteína y se ha sugerido que esta función podría requerir la interacción con proteínas AGO (Mingot et al., 2016; Untiveros et al., 2016).

Finalmente, algunos supresores virales parecen actuar sobre las enzimas RDR o sobre proteínas asociadas necesarias para su función (ej: SGS3), lo que probablemente da lugar a un bloqueo de la ruta de amplificación del silenciamiento (Fukunaga and Doudna, 2009; Glick et al., 2008; Zrachya et al., 2007). Ejemplos de supresores que interactúan con componentes de esta ruta son la proteína V2 del virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV; género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*) o la proteína p2

del virus del rayado del arroz (*Rice stripe virus*, RSV; género *Tenuivirus*; familia *Phenuiviridae*), que interactúan con SGS3 (Du et al., 2011; Glick et al., 2008). Otro ejemplo es la proteína supresora VPg del virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*, TuMV; género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*), que induce la degradación de SGS3 y de su interactor RDR6 a través de la ruta de del proteasoma y de rutas de autofagia (Cheng and Wang, 2017).

2.4.3. Otras estrategias de supresión del silenciamiento

Además de las estrategias anteriormente citadas, existen otros mecanismos que permiten a los virus de plantas combatir el silenciamiento por RNA del huésped. Por ejemplo, se ha demostrado que los virus son capaces de modular rutas bioquímicas endógenas para su propio beneficio. Un buen ejemplo de virus que emplean esta estrategia son los virus con genoma de DNA de la familia *Geminiviridae* que, a diferencia de los virus ssRNA(+), tienen una replicación nuclear. Una parte de la respuesta defensiva de la planta frente a estos patógenos tiene lugar en el núcleo e implica la metilación del genoma viral, lo que interfiere con la replicación posterior del patógeno. Algunos supresores codificados por geminivirus inhiben a la enzima adenosín-quinasa (*adenosine kinase*, ADK), una enzima que participa en el proceso de metilación. La inhibición de esta enzima bloquea indirectamente el ciclo de metilación y, por lo tanto, podría estar interfiriendo en la modificación epigenética del genoma viral (Bisaro, 2006; Wang et al., 2005), propiciando la infectividad de estos virus. Otro ejemplo de

geminivirus cuyo VSR altera rutas de metilación del huésped es el TYLCV, cuyo supresor, la proteína V2, interacciona con la desacetilasa de histonas HDA6 e interfiere con el reclutamiento de la metiltransferasa MET1, lo que provoca una disminución de la metilación del genoma viral (Wang et al., 2018). Por último, también se ha descrito que la proteína AC4 del virus del rizado amarillo del tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV; género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*) interacciona con AGO4, una proteína que interviene en una ruta de metilación *de novo* del DNA, modificando la metilación de citosinas del DNA del virus (Vinutha et al., 2018).

También dentro de la familia *Geminiviridae* se han descrito supresores capaces de inducir distintos genes del huésped, entre ellos la exonucleasa Werner 1 (WEL1) un regulador endógeno negativo de silenciamiento (Trinks et al., 2005). Sin embargo, la situación debe ser más compleja, ya que algunos de los genes inducidos también son reguladores positivos de silenciamiento.

Otra estrategia para combatir el silenciamiento por RNA parece ser la inducción específica del miR168, tal como se ha propuesto para el virus de las manchas en anillo del *Cymbidium* (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV; género *Tombusvirus*, familia *Tombusviridae*) (Bortolamiol et al., 2007). Se ha descrito que la expresión de p19 codificada por el virus aumenta el nivel endógeno de miR168, un regulador negativo de la traducción del mRNA de AGO1 (Varallyay et al., 2010). Al bloquear la traducción de AGO1, se inhibe la formación de complejos RISC cargados con vsRNA, aunque el

mecanismo por el cual p19 induce al miR168 aún está por determinar (Varallyay et al., 2010).

Por último, también se ha demostrado que, en algunos casos, la misma replicación viral puede tener un papel importante en la supresión del silenciamiento por RNA. Algunos factores del huésped que intervienen en las rutas de silenciamiento podrían ser reclutados en los complejos de replicación y, por tanto, apartados de las rutas de silenciamiento. Un ejemplo de virus que emplea esta estrategia es el virus del mosaico necrótico del trébol rojo (*Red clover necrotic mosaic virus*, RCNMV; género *Dianthovirus*, familia *Tombusviridae*), que parece suprimir el silenciamiento reclutando proteínas DCL en su complejo de replicación (Takeda et al., 2005), aunque estudios posteriores han mostrado que este virus también codifica un VSR (Powers et al., 2008)

Los ejemplos anteriores muestran que los virus de plantas han desarrollado diferentes estrategias para contrarrestar los mecanismos de silenciamiento antiviral del huésped y que, además, un mismo VSR puede dirigirse a más de uno de los elementos de las vías de silenciamiento (Fig. 5). La gran variedad de VSR identificados y sus distintos modos de acción convierten a estas proteínas en herramientas sumamente útiles para la disección y comprensión de las rutas de silenciamiento en plantas y para la identificación de sus distintos componentes.

2.5. Silenciamiento por RNA y patogénesis viral

Aunque muchas infecciones virales progresan de forma asintomática, la aparición de síntomas es también relativamente frecuente y ha sido un tema de estudio recurrente por sus implicaciones agronómicas. Pese a ello, las bases moleculares de la patogénesis viral siguen siendo objeto de debate en la actualidad. Durante mucho tiempo, se consideró que la inducción de mecanismos de defensa y el secuestro de factores del huésped (o la subversión de sus funciones) para sustentar la replicación o el movimiento del virus eran las causas más probables de la patogénesis viral. Tras el descubrimiento de los procesos de silenciamiento por RNA y de su papel antiviral, distintos trabajos han proporcionado datos que sugieren, o apoyan, que este tipo de procesos desempeña un papel relevante en la patogénesis de virus (Pallás and García, 2011; Wang et al., 2012a).

Tras una infección viral se generan una gran cantidad de vsRNA derivados generalmente de todas las regiones del genoma del virus. Estos vsRNA presentan una elevada diversidad de secuencia lo que les confiere un enorme potencial para interactuar funcionalmente con genes del huésped. Los vsRNA podrían ser capaces de silenciar genes endógenos de distintas maneras. Por un lado, estas moléculas podrían actuar a nivel post-transcripcional, provocando el corte de mRNA endógenos de la planta al presentar una elevada complementariedad de bases con algún mensajero del huésped. Por otro lado, algunos vsRNA con una complementariedad parcial con algún mRNA celular también podrían silenciar

indirectamente genes al actuar como cebadores para iniciar la síntesis de dsRNA mediada por RDR6, dando lugar a sRNA que dispararían el silenciamiento. Además, algunos mRNA de la planta contienen motivos en su secuencia que se asemejan a los orígenes de replicación virales. Estos motivos podrían ser reconocidos por la RDR viral, desencadenando la síntesis de RNA antisentido contra los mRNA del huésped (Wang et al., 2012a). En todos estos casos, la infección viral desencadenaría el silenciamiento de genes endógenos, lo que, en ocasiones, podría provocar la aparición de síntomas en el huésped.

La demostración de la implicación de los vsRNA en la inducción de síntomas virales llegó de dos estudios independientes llevados a cabo con el virus satélite Y del CMV (Shimura et al., 2011; Smith et al., 2011). Estos dos trabajos pusieron de manifiesto que los síntomas de amarilleo causados por la infección mixta del CMV y su virus satélite en tabaco se debían al silenciamiento del gen *CHLI*, un gen esencial para la síntesis de la clorofila, y que dicho silenciamiento estaba inducido por un vsRNA derivado del virus satélite. Estudios posteriores con distintas combinaciones virus-planta en los que se ha llevado a cabo secuenciación masiva de vsRNA y análisis bioinformáticos (en ocasiones acompañados de análisis transcriptómicos y/o de análisis totales o parciales del degradoma) han revelado que un gran número de genes del huésped podrían ser silenciados por los sRNA derivados de virus (Moissiard and Voinnet, 2006b; Qi et al., 2009; Xia et al., 2018; Yang et al., 2018). Los datos de este tipo de trabajos muestran el enorme potencial de los vsRNA en la patogénesis viral aunque, aparte de los estudios mencionados con el virus satélite, la relación entre el silenciamiento de genes mediado por

vsRNA y los síntomas causados por la infección está por demostrar en otros casos. Es interesante señalar en este contexto que la aparición de síntomas vinculada a la modulación de genes endógenos por sRNA derivados de un patógeno también ha sido descrita para viroides, pequeños RNA circulares infecciosos sin capacidad codificante. Estos agentes subvirales también son inductores del PTGS y sus infecciones generan una gran acumulación de sRNA viroidales, algunos de los cuales tienen como diana mRNA celulares cuya degradación da lugar a importantes efectos fenotípicos (Adkar-Purushothama et al., 2015, 2017; Navarro et al., 2012).

Otro factor que puede estar involucrado en la inducción de síntomas en el huésped es la expresión de VSR durante la infección. De hecho, muchos VSR fueron identificados inicialmente como determinantes de patogenicidad (García and Pallás, 2015). Se ha propuesto que el impacto de estas proteínas en el huésped podría estar relacionado con su capacidad para interferir con la ruta de miRNA. Los miRNA regulan negativamente mRNA implicados fundamentalmente en procesos de desarrollo de la planta, por lo que la variación de sus niveles puede causar alteraciones morfológicas muy destacables. Estas alteraciones son muy evidentes en plantas que expresan de forma constitutiva algunos VSR. En algunos estudios, los síntomas se han podido asociar con alteraciones en miRNA concretos, como es el caso de plantas transformadas con distintos VSR que presentaban cambios en los niveles del miR167 cuya diana es el factor de respuesta a auxinas 8 (ARF8) (Jay et al., 2011; Kasschau et al., 2003). Hay que tener en cuenta, no obstante, que cuando los supresores son expresados ectópicamente en grandes cantidades (y en

ausencia de vsRNA derivados de la infección) compiten por una gran cantidad de sRNA endógenos, entre ellos los miRNA, pero en un contexto de infección viral la situación es más compleja. Estudios llevados a cabo con el supresor p19 de tombusvirus han puesto de manifiesto que el secuestro de miRNA o sRNA endógenos se reduce drásticamente durante una infección viral debido a la presencia de grandes cantidades de vsRNA (Kontra et al., 2016). Los resultados de este trabajo cuestionan el modelo que postula que el desarrollo de síntomas durante una infección está causado por el secuestro de miRNA por parte de los VSR. En otro estudio muy reciente, donde se ha abordado este asunto, se ha observado que p19 regula de forma diferencial la actividad de los miRNA sobre sus dianas y que esta regulación desigual se debe a la afinidad que este VSR presenta por cada miRNA (Pertermann et al., 2018). En este trabajo, se ha propuesto que la unión diferencial de miRNA por los VSR podría ser una estrategia viral generalizada que permitiría modular la expresión génica y la respuesta inmune solamente durante el inicio de la infección viral, donde la baja tasa replicación viral y la baja presencia de vsRNA se asemejaría a la situación de plantas transgénicas que expresan VSR. Este efecto se revertiría en etapas más tardías, en las que la elevada tasa de replicación viral aumentaría los niveles de vsRNA, disminuyendo la proporción de VSR/vsRNA y de miRNA/vsRNA (Pertermann et al., 2018). En esta etapa, es más probable que p19 tenga un efecto indirecto a través de la inhibición de las repuestas antivirales de la planta y que los síntomas se deban a interacciones virus-huésped más complejas.

Por otro lado, el bloqueo la ruta de silenciamiento por los VSR también puede modular los fenotipos en los huéspedes o causar síntomas al inhibir el silenciamiento natural de genes endógenos. Un ejemplo es el caso de una variedad de petunia, conocida como estrella roja, que presenta una pérdida de pigmentación en la nervadura de los pétalos debida al silenciamiento natural de la chalcona sintasa (CHS). La infección por CMV en estas plantas bloquea la ruta de silenciamiento, eliminando este patrón de color tan característico y coloreando todos los pétalos (Koseki et al., 2005). De forma contraria, en algunos casos los VSR pueden ayudar a minimizar los síntomas virales. Se ha descrito que los VSR, al inhibir la ruta de silenciamiento, podrían impedir que los vsRNA generados en el curso de la infección silenciaran genes endógenos de la planta. Esto se observó en un trabajo donde la expresión del supresor de potyvirus P1/HC-Pro en tabaco anulaba completamente los síntomas de amarilleo causados por la infección del virus satélite Y del CMV (Wang et al., 2004). De esta forma, los VSR podrían garantizar la propagación del virus, evitando el silenciamiento del RNA viral y minimizando la severidad de los síntomas al inhibir el silenciamiento de genes endógenos (Smith et al., 2011).

Por último, los VSR no solo contribuyen a la patogénesis viral por los efectos que tienen sobre los procesos del silenciamiento por RNA. Se han descrito dos supresores virales codificados por geminivirus que interactúan con un regulador global del metabolismo, una quinasa (*Sucrose Non-fermenting*, SNF1). La interacción con este componente del metabolismo bloquea su función, lo que podría ocasionar un gran número de efectos pleiotrópicos.

Además, la inhibición de SNF1 aumenta la susceptibilidad a infecciones causadas por geminivirus, por lo que estos virus parecen haber evolucionado favoreciendo su capacidad de manipular el metabolismo de la planta en su propio beneficio (Hao et al., 2003; Wang et al., 2005).

3. El transporte nucleocitoplasmático

En las células eucariotas, el citoplasma y el núcleo se encuentran separados por una membrana nuclear que impide el libre paso de macromoléculas entre ambos compartimentos. Esta barrera física provoca un desacoplamiento entre los procesos de transcripción y traducción, por lo que se precisa de un mecanismo de transporte activo que permita el intercambio controlado de compuestos entre ambos compartimentos. Muchos RNA originados en el núcleo (mRNA, tRNA, rRNA...), han de atravesar la membrana nuclear para alcanzar el citoplasma donde ejercerán sus funciones, un proceso conocido como exportación nuclear (Köhler and Hurt, 2007). De forma contraria, las proteínas traducidas en el citoplasma pero con una función nuclear, han de ser dirigidas a este orgánulo por un mecanismo de transporte denominado importación nuclear (Christie et al., 2016). En algunos casos el transporte nucleocitoplasmático es más complejo, pudiendo experimentar un misma macromolécula importación y exportación nuclear.

El intercambio de macromoléculas entre el citoplasma y el núcleo se produce a través de unos canales proteicos situados en la membrana nuclear, los complejos del poro nuclear (*nuclear pore complex*, NPC). Estos complejos son unas estructuras proteicas enormes que fusionan la membrana nuclear interna y externa formando un canal acuoso. Las proteínas que forman el NPC se conocen como nucleoporinas y son las encargadas de coordinar y regular potencialmente la translocación a través del NPC (Meier and Brkljacic, 2010). Las moléculas pequeñas, como los iones o las

proteínas con un tamaño inferior a ~40 kDa, son capaces de atravesar pasivamente el NPC. Sin embargo, las macromoléculas o proteínas más grandes han de ser transportadas activamente en un proceso selectivo que requiere energía en forma de GTP, receptores de transporte nucleares (indicados también como transportadores en esta memoria) y señales de transporte. Este sistema de transporte, no solo es capaz de actuar contra el gradiente de concentración, sino que permite regular la proporción del transporte nuclear de distintas proteínas cargo en ambas direcciones.

Un componente clave del transporte es Ran. Esta pequeña proteína de la familia de las GTPasas Ran desempeña un papel muy importante en la regulación del transporte nuclear, ya que actúa como motor en dicho transporte. Esta proteína presenta dos estados distintos, caracterizados por la unión a GTP (Ran-GTP) o a GDP (Ran-GDP), que se encuentran distribuidos de forma asimétrica en la célula. Mientras que la concentración de Ran-GTP es muy alta en el núcleo y muy baja en el citoplasma, Ran-GDP se localiza principalmente en el citoplasma (Görlich et al., 1996; Izaurralde et al., 1997). Este gradiente se debe a la distribución de los reguladores del ciclo de la GTPasa Ran: RanGEF, RanGAP, RanBP1 y NTF2. RanGEF es una proteína nuclear asociada a las histonas que se encarga de la disociación de Ran-GDP y su unión a GTP, reduciendo la concentración de esta molécula en el núcleo. Por otro lado, RanGAP y RanBP1 son proteínas citoplasmáticas que intervienen en la hidrólisis de Ran-GTP, impidiendo su acumulación en el citoplasma.

El ciclo de la GTPasa Ran ha sido ampliamente estudiado y actualmente conocemos cómo se produce el gradiente de Ran a través de la membrana nuclear. En el citoplasma, Ran-GDP es reconocida por el transportador NTF2, una pequeña proteína capaz de interactuar con componentes del NPC e introducir Ran-GDP en el núcleo. Dentro de este compartimento, RanGEF intercambia los nucleótidos de Ran dando lugar a Ran-GTP, que es capaz de atravesar la membrana nuclear hacia el citoplasma al asociarse con transportadores nucleares que median su transporte junto con proteínas cargo. Una vez en el citoplasma, Ran-GTP es hidrolizado por la acción conjunta de RanBP1, que separa Ran-GTP de los transportadores, y RanGAP, que se encarga de la hidrólisis, dando lugar de nuevo a Ran-GDP y cerrando el ciclo.

3.1 Señales de localización nuclear

Las proteínas que han de ser transportadas hacia el núcleo poseen unas señales de transporte en su secuencia que son reconocidas por transportadores, encargados de dirigir estas proteínas cargo. Estas señales se conocen como señales de localización nuclear (*nuclear localization signal*, NLS) y, aunque presentan mucha diversidad en cuanto a longitud y características, son generalmente secuencias aminoacídicas cortas ricas en aminoácidos (aa) básicos. Desde el descubrimiento de la primera NLS, la señal de localización nuclear del antígeno grande T del virus SV40 (Kalderon et al., 1984), se han descrito y estudiado multitud de señales, lo que ha permitido establecer una clasificación según las características que presentan.

Dentro de las NLS clásicas, encontramos fundamentalmente dos tipos de señales de transporte, las señales monopartidas, formadas por un motivo corto rico en lisinas y argininas, y las señales bipartidas, formadas por dos motivos básicos separados por un región espaciadora de 10-12 aa. Las señales monopartidas fueron las primeras en ser estudiadas, y se establecieron dos clases distintas dentro de este grupo de NLS: la clase 1, que posee motivos que integran cuatro o más aa básicos seguidos y que está representada por la NLS del antígeno grande T del virus SV40 (¹²⁶PKKKRRV¹³²) (Kalderon et al., 1984), y la clase 2, donde encontramos señales que siguen el patrón K(K/R)X(K/R), como la NLS de c-Myc (³²⁰PAAKRVKLD³²⁸) (Dang and Lee, 1988). Posteriormente, en un estudio donde se realizó un rastreo de librerías de péptidos al azar con diferentes receptores de transporte nucleares, se consiguió identificar tres clases más de NLS monopartidas: la clase 3, la clase 4 y la clase 5 (Tabla 1), la última de ellas específica de plantas (Kosugi et al., 2009). Estas señales están formadas solo por dos o tres aminoácidos básicos consecutivos. Aunque los resultados de este estudio indicaron que es muy difícil establecer secuencias consenso por la gran diversidad que existe en las NLS, se sugirieron distintos patrones para cada clase de señal conocida (Tabla 1).

Otro de los puntos a tener en cuenta en estas señales es que diferentes residuos a lo largo de las secuencias de las distintas clases de NLS pueden activar o reprimir su actividad (Kosugi et al., 2009). Esta restricción y flexibilidad en los residuos, es otra de las causas de la enorme diversidad de señales que encontramos. Por este motivo, para conseguir secuencias consenso más precisas sería necesario

considerar la contribución de todos los aminoácidos en las distintas posiciones de una NLS.

Tabla 1: Señales de localización nuclear

Secuencias consenso de las seis clases de NLS	
Clase 1	KR(K/R)R, K(K/R)RK
Clase 2	(P/R)XXKR(^DE)(K/R) ^a
Clase 3	KRX(W/F/Y)XXAF
Clase 4	(R/P)XXKR(K/R)(^DE) ^a
Clase 5	LGKR(K/R)(W/F/Y)
Bipartida	KRX ₁₀₋₁₂ K(K/R)(K/R) ^b KRX ₁₀₋₁₂ K(KR)X(K/R) ^b

a Los residuos (^DE) corresponden a cualquier aminoácido excepto Asp o Glu

b X₁₀₋₁₂ indica una región de 10 a 12 aminoácidos. Para un patrón óptimo, la región central debe ser rica en residuos ácidos y pobre en residuos básicos e hidrofóbicos, mientras que en la región terminal debe ser rica en prolinas.

En cuanto a las señales bipartidas, cuyo modelo de referencia es la NLS de la nucleoplasmina (¹⁵⁵KRPAATKKAGQAKKK¹⁷⁰) (Robbins et al., 1991), están formadas por dos grupos de lisinas y argininas (Tabla 1). Este tipo de señales se componen de dos señales monopartidas imperfectas separadas por una secuencia de unión que parece interactuar de forma no específica con los receptores. La

longitud de esta región y su composición aminoacídica afectan sustancialmente a la actividad NLS, sugiriendo que la interacción de esta región con el correspondiente receptor posee una contribución funcional (Kosugi et al., 2009). Una longitud adecuada sería de 10 a 12 residuos, que correspondería a la distancia que existe entre los dos sitios de unión de las NLS en los receptores de transporte nucleares, aunque algunas señales bipartidas muy fuertes o con cierta flexibilidad estructural pueden tolerar regiones espaciadoras más grandes. Con respecto a la composición aminoacídica, para una buena función NLS, la región de unión debe ser rica en aminoácidos ácidos y en prolina, mientras que los aa hidrofóbicos o básicos parecen actuar como represores. Los residuos de prolina se suelen situar en el extremo terminal de la región, mientras que los aa ácidos son más abundantes en la región central (Kosugi et al., 2009).

Aunque cada vez se conocen más datos acerca de las NLS, algunas señales identificadas no se ajustan a las secuencias consenso definidas para las distintas clases. Varias están constituidas por residuos no básicos, como el dominio M9 de la proteína hnRNP A1, que está formada por una región de 38 aa rica en glicina (Pollard et al., 1996). Otras NLS están formadas por regiones muy extensas que adoptan una estructura terciaria específica para ser reconocidas por los transportadores, como la NLS de la chaperona de RNA Lhp1p (Rosenblum et al., 1998).

3.2 Receptores de transporte nucleares

Como se ha mencionado anteriormente, para que el transporte nucleocitoplasmático se produzca, se requieren unos receptores de transporte nucleares capaces de transportar las moléculas cargo a través del poro nuclear. La mayoría de transportadores son proteínas de unión a Ran y hasta el momento se han identificado tres clases distintas: la familia de las carioferinas β , la familia mejor estudiada y caracterizada, el factor de transporte nuclear 2 (NTF2)/p10, encargado de dirigir las moléculas de Ran-GTP al núcleo, y la familia de las Tap/Mex67, involucradas en el transporte del mRNA.

3.2.1 Carioferinas β

El primer receptor de transporte nuclear que se identificó fue la importina $\beta 1$ (Görlich et al., 1994; Radu et al., 1995). Este receptor pertenece a una amplia familia de proteínas conservada evolutivamente conocida como carioferinas β (también denominada familia de las importinas β), que están implicadas en el transporte de la mayoría de proteínas y RNA, a excepción de los mRNA. Los miembros de esta familia tienen una similitud de secuencia baja, pero comparten características estructurales y funcionales. Presentan una masa molecular entre 95 y 145 kDa y un punto isoeléctrico de 4.0-5.0. Su modelo estructural está basado en repeticiones en tándem de motivos HEAT, motivos cuyo nombre es un acrónimo derivado de las cuatro proteínas donde fueron identificados inicialmente: Huntington, Factor de Elongación 3, la proteína fosfatasa PP2A y la quinasa Tor1

de levadura. Estos motivos HEAT, de unos 40 residuos aproximadamente, forman estructuras superhelicoidales dextrógiras compuestas por dos hélices antiparalelas conectadas por un lazo que confieren flexibilidad a los transportadores y contribuyen al reconocimiento de las proteínas cargo para su unión y disociación (Conti et al., 2006).

Las carioferinas β son transportadores con múltiples dominios: poseen un dominio de unión a Ran-GTP en su extremo N-terminal, una zona central de unión a nucleoporinas y un dominio de unión a las moléculas cargo en el extremo C-terminal. Dependiendo de la direccionalidad del transporte en el que actúan se diferencian en importinas y exportinas, aunque existen algunas carioferinas, como la Msn5 de levadura y la importina 13 de mamífero, que actúan tanto en la importación como en la exportación nuclear (Mingot et al., 2001; Yoshida and Blobel, 2001). La interacción de las carioferinas con la proteína Ran regula la unión a las proteínas cargo y por tanto el proceso de transporte. Las importinas presentan una alta afinidad por las proteínas cargo en el citoplasma, en ausencia de Ran-GTP, mientras que en el núcleo la unión con Ran-GTP provoca la disociación del complejo importina-proteína cargo. Por el contrario, las exportinas requieren la presencia de Ran-GTP para unirse a sus proteínas cargo y el complejo se disocia tras la hidrólisis de GTP en el citoplasma, gracias a la acción de los reguladores RanBP1 y RanGAP.

El genoma de *A. thaliana* contiene al menos 18 genes que codifican receptores de transporte nucleares (Tamura and Hara-Nishimura, 2014) (Fig. 4), mientras que en levaduras se han

identificado 14 genes y en humanos más de 20. Dentro de esta familia, en *A. thaliana* encontramos dos importinas (la importina β 1 y la transportina 1) y cinco exportinas (CAS, XPO1a, XPO1b, XPO5 y PAUSED) que ya han sido caracterizadas funcionalmente (Bollman et al., 2003; Haasen and Merkle, 2002; Haasen et al., 1999; Hunter et al., 2003; Luo et al., 2013; Ziemienowicz et al., 2003). El estudio de estas proteínas implicadas en el transporte nucleocitoplasmático parece indicar que existe un elevado grado de conservación en este proceso de transporte entre distintos organismos.

3.2.2 Carioferinas α

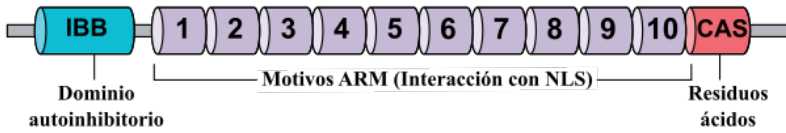
Aunque algunas proteínas cargo se unen directamente a los transportadores, otras requieren proteínas adaptadoras para poder formar los complejos de transporte, ampliando así la especificidad del transporte. Los adaptadores más conocidos son las carioferinas α , también conocidas como importinas α , que participan en el transporte de proteínas cargo con señales NLS clásicas (Görlich et al., 1994).

Las importinas α presentan tres regiones estructurales características: un dominio N-terminal de unión a la importina β , una región central que contiene los sitios de unión a las NLS y una región C-terminal que actúa en la exportación nuclear de las importinas α (Fig. 7). El dominio N-terminal, conocido como dominio de unión a la importina β (*importin β -binding*, IBB), es una región rica en aminoácidos básicos que forma una hélice α unida al resto de la importina por un codo flexible. Además de interactuar con la importina β , esta región también tiene una función autoinhibitoria:

posee tres grupos de residuos básicos que imitan a las NLS y son capaces de interactuar en *cis* con los sitios de unión de la región central cuando el IBB no está interactuando en *trans* con la importina β , impidiendo la unión de proteínas cargo (Fig. 6) (Miyamoto et al., 2016).

La región central de las importinas α está formada por 10 repeticiones de motivos armadillo (ARM), motivos estructuralmente similares a los HEAT de las carioferinas β , que forman una superhélice dextrógira (Andrade et al., 2001). En la superficie cóncava interior de esta superhélice se encuentran dos sitios de unión a NLS: el sitio mayor, formado por los motivos ARM del 2 al 4 y el sitio menor, más cerca de la región C-terminal, formado por los ARM 7 y 8. Ambos sitios se componen de residuos de asparragina, triptófano y residuos con carga negativa que interactúan con las NLS de las proteínas cargo. El estudio de la estructura cristalina de la interacción de la importina α con las NLS clásicas en levadura, mamíferos y plantas, muestra que las interacciones que se producen están conservadas en eucariotas (Chang et al., 2012; Conti et al., 1998; Fontes et al., 2000). Las NLS monopartidas se unen principalmente al sitio mayor de la importina α mientras que las señales bipartidas interactúan a través de los dos sitios de unión. El primer grupo de residuos básicos de estas NLS interactúa con el sitio menor y el segundo grupo con el sitio mayor (Fontes et al., 2000). La región espaciadora se dispone de forma extendida y establece interacciones con la superficie interna de la importina que favorecen la correcta disposición de los residuos básicos en los sitios de unión (Kosugi et al., 2009).

A



B

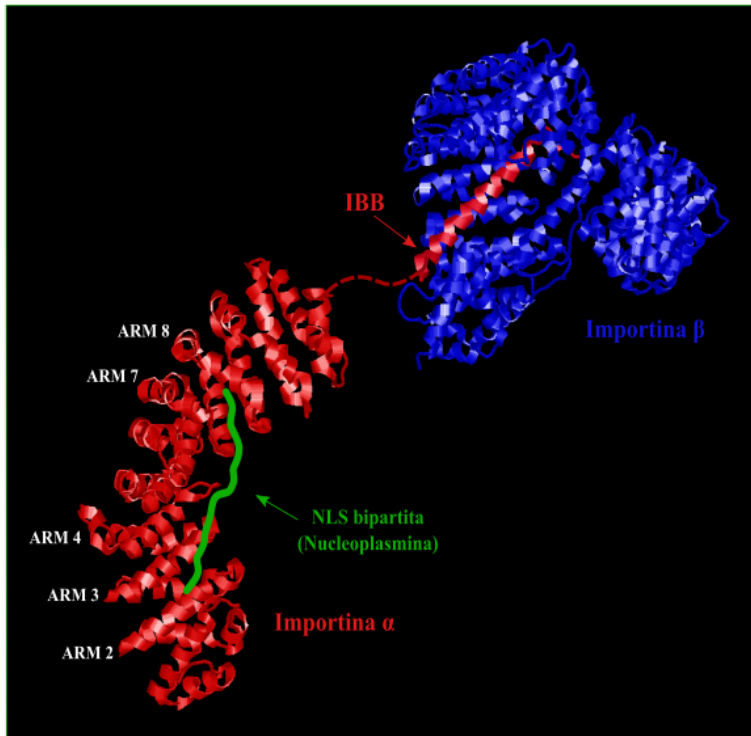


Figura 6. Estructura de las importinas. A) Diagrama de la estructura de las importinas α con los distintos dominios estructurales representados en cilindros: el dominio IBB en el extremo N-terminal, el dominio central de motivos ARM y el dominio de unión al exportador CAS en la región C-terminal. (B) Estructura del complejo trimérico formado por la importina α interaccionando con la NLS bipartida de la nucleoplasmina (PDB ID: 1EJY) (Fontes et al., 2000) y la importina β (PDB ID: 1QGK) (Cingolani et al., 1999). Una hipotética línea discontinua conecta las dos importinas. Los ARM que forman los sitios de unión a NLS en la importina α se muestran en la figura. Figura adaptada de Goldfarb et al., 2004.

Aunque las bases moleculares de la interacción importina α -NLS están conservadas en eucariotas, el estudio de la estructura cristalina de esta interacción en *Oryza sativa* reveló algunas características específicas de plantas (Chang et al., 2012). Por ejemplo, en plantas se han descrito NLS monopartidas (clase 5, Tabla 1) que son capaces de unirse al sitio menor de la importina α , por lo que el sitio menor no parece desempeñar un papel suplementario al sitio mayor en el reconocimiento de las señales bipartidas, sino que puede desempeñar un papel importante en el reconocimiento de NLS específicas de planta (Chang et al., 2012).

Por último, en la región C-terminal de las importinas α encontramos un grupo conservado de residuos ácidos que funciona como una región de unión con el exportador nuclear CAS, encargado de transportar las importinas α hacia el citoplasma junto con Ran-GTP. Esta interacción parece contribuir a la liberación de las proteínas cargo de la importina α y previene que los dos interactores se vuelvan a unir. Además, la región C-terminal también parece interactuar con nucleoporinas del poro nuclear, ayudando a la translocación del complejo trimérico NLS-Imp α -Imp β hacia el núcleo (Ogawa et al., 2012). Esto sugiere que las importinas α no solo actuarían como adaptadores sino que podrían desempeñar un papel más activo en el transporte nuclear.

Las importinas α están muy conservadas entre los organismos eucariotas aunque existe mucha diversidad en el número de importinas que codifica cada organismo. Mientras que en levaduras solo encontramos una o dos importinas α , en humanos encontramos seis

isoformas y en *A. thaliana* nueve importinas distintas (Miyamoto et al., 2016). A día de hoy, aún no se conoce la razón por la cual existe tanta diversidad de importinas α . Esta gran diversidad de adaptadores podría deberse en parte a la necesidad de transportar cientos de macromoléculas a través de la membrana nuclear. Aunque no existen diferencias con respecto a la afinidad de interacción con la importina β y con el exportador CAS, sí que se han descrito diferentes afinidades por los sustratos, por lo que cada subtipo podría haberse especializado en un grupo de proteínas diana (Köhler et al., 1999).

3.2.3. Ruta de importación nuclear mediada por el heterodímero importina α/β

La caracterización de varios transportadores de tipo carioferinas y el estudio de las estructuras moleculares mediante cristalografía han permitido establecer un modelo para la importación nuclear. En el citoplasma, donde la concentración de Ran-GTP es baja, se forma un complejo trimérico de transporte constituido por importina α , importina β y la proteína cargo con NLS. Aún no se sabe si primero se produce la unión entre las importinas mediante el dominio IBB, provocando la exposición de los sitios de unión a NLS de la importina α y permitiendo su interacción con las proteínas cargo, o si, por el contrario, se produce primero la unión de importinas α con el sustrato de transporte, liberando el dominio IBB para que tenga lugar la interacción con la importina β . En ambos casos, el resultado es la formación de un complejo trimérico que es capaz de atravesar el poro nuclear gracias a la interacción de las importinas β con las

nucleoporinas. Una vez dentro del núcleo, donde la concentración de Ran-GTP es muy alta, el complejo se disocia debido a la interacción de Ran-GTP con la importina β , que provoca un cambio de conformación desestabilizando la unión de esta importina y el dominio IBB de la importina α . Así pues, el dominio IBB queda libre y puede volver a inhibir los sitios de unión de la importina α , liberando a las proteínas cargo (Fig. 7).

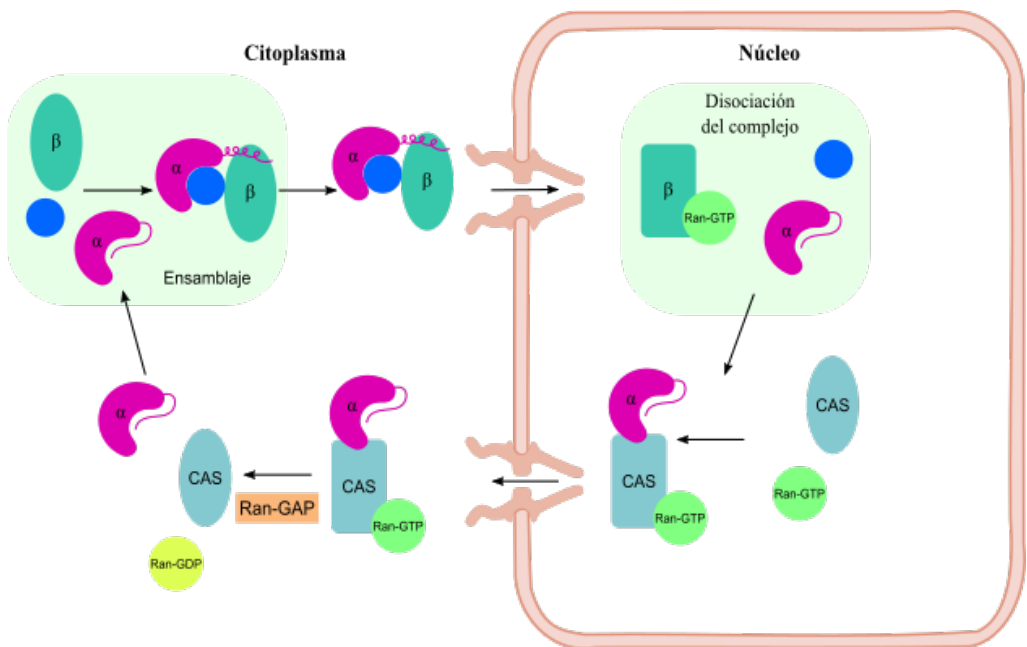


Figura 7. Esquema del transporte nuclear. En el citoplasma se forma un complejo trimérico de transporte formado por importina α , importina β y la proteína cargo con NLS. Este complejo atraviesa el NPC y, dentro del núcleo, la interacción de Ran-GTP con la importina β desestabiliza el complejo liberando la proteína cargo. Mientras que la importina β es capaz de volver al citoplasma al interactuar con las nucleoporinas del NPC, la importina α requiere del exportador CAS para su transporte. Figura adaptada de Goldfarb et al., 2004.

Mientras que la importina β es capaz de volver al citoplasma unida a Ran-GTP, gracias a su capacidad de interacción con las nucleoporinas, las importinas α requieren de un exportador nuclear, la proteína CAS, para poder atravesar el poro y seguir ejerciendo su función. En el núcleo, el exportador CAS se une a una molécula de Ran-GTP y reconoce las importinas α , formando un complejo que migra a través del NPC. Una vez en el citoplasma, los reguladores RanGAP y RanBP1 promueven la actividad GTPasa de Ran, que hidroliza GTP dando lugar a Ran-GDP. Esto provoca un cambio conformacional que desestabiliza el complejo, liberando las importinas α en el citoplasma. El último paso del proceso de importación nuclear es el reciclaje de las moléculas de Ran-GDP, que son transportadas de nuevo al núcleo gracias a NTF2, donde RanGEF se encarga de intercambiar GDP por GTP, cerrando así el ciclo (Fig. 7).

3.3. Localización nucleolar

Una vez que las proteínas son importadas al núcleo, algunas permanecen en el nucleoplasma mientras que otras se asocian con cuerpos subnucleares, entre los que destaca el nucleolo. El nucleolo es el compartimento subnuclear más prominente, con un tamaño de alrededor de 8 μm . Su principal función es la transcripción del DNA ribosomal (*ribosomal DNA*, rDNA), el procesamiento de los rRNA ribosomales (*ribosomal RNA*, rRNA) y el ensamblaje de los ribosomas, aunque en los últimos años diversos estudios han implicado al nucleolo en otras funciones celulares como la regulación

del ciclo celular, la senescencia, las respuestas a estrés o la biogénesis de partículas ribonucleoproteicas (Boisvert et al., 2007; Olson and Dundr, 2005).

El nucleolo contiene tres regiones diferentes: los centros fibrilares (*fibrillar centers*, FC), que contienen los rDNA y factores asociados a la transcripción, el componente fibrilar denso (*dense fibrillar component*, DFC), donde se produce la transcripción de los rRNA precursores y su procesamiento inicial, y el componente granular (*granular component*, GC), donde continúa el procesamiento de los rRNA y se ensamblan los ribosomas (Fig. 8). En plantas, además de estas tres regiones, el nucleolo posee una cavidad central, la cavidad nucleolar, que podría estar implicada en la acumulación de factores bioquímicos relacionados con respuestas a estrés (Brown and Shaw, 1998; Mineur et al., 1998).

Debido a los procesos celulares en los que está involucrado, el nucleolo presenta una estructura muy dinámica con un constante flujo de entrada y salida de proteínas y RNA. Sin embargo, aún no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual algunas proteínas son dirigidas hacia a este compartimento. A diferencia del núcleo, el nucleolo no posee ninguna membrana o barrera con el nucleoplasma, por lo que el direccionamiento de moléculas hacia este subcompartimento no parece conllevar un proceso de transporte activo. La hipótesis más aceptada actualmente es que la localización nucleolar de proteínas se debe a interacciones directas o indirectas con alguno de los componentes del nucleolo como los rDNA, los transcritos o componentes proteicos (Carmo-Fonseca et al., 2000).

Recientemente, en las secuencias de algunas proteínas nucleolares se han descrito motivos que parecen estar involucrados en la localización nucleolar, motivos conocidos como señales de localización nucleolar (*nucleolar localization signal*, NoLS). Estas señales, en vez de actuar como motivos de reconocimiento de receptores de una maquinaria de transporte, actuarían como motivos de interacción con proteínas o ácidos nucleicos presentes en el nucleolo (Emmott and Hiscox, 2009).

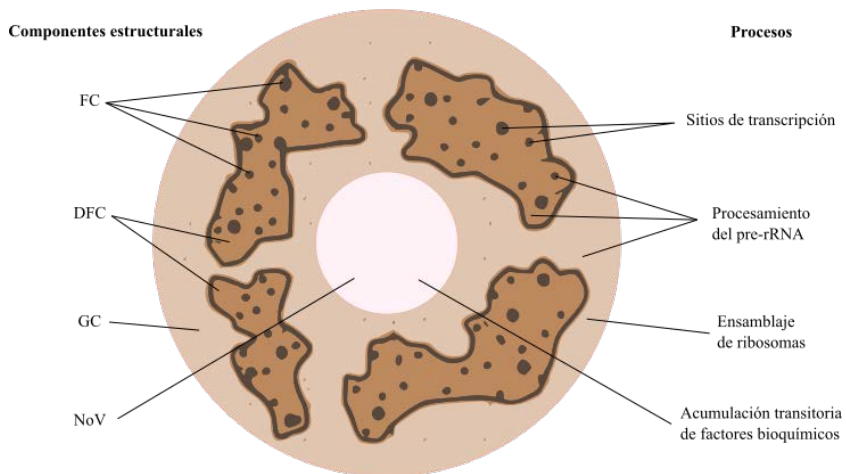


Figura 8. Organización nucleolar. En plantas, el nucleolo contiene cuatro regiones diferentes: los centros fibrilares (FC), el componente fibrilar denso (DFC), el componente granular (GC) y la cavidad nucleolar. Figura adaptada de Kalinina et al., 2018.

3.3.1. Señales de localización nucleolar

Las NoLS fueron descritas por primera vez en 1990, en un estudio donde se encontró una secuencia de cinco residuos básicos capaz de dirigir una proteína retroviral al núcleo y al nucleolo (Hatanaka, 1990). A diferencia de las NLS, las NoLS no presentan una secuencia consenso definida, aunque su composición aminoacídica es similar a las NLS y comparten algunas características comunes. Están constituidas mayoritariamente de residuos básicos, lisinas y argininas, y presentan longitudes muy diversas, encontrándose desde señales cortas de seis aminoácidos hasta señales de más de 30 residuos. Suelen estar situadas en la región N-terminal o C-terminal de la proteína, en zonas con estructura α -hélice o bucles y, principalmente, en la superficie, en regiones accesibles (Scott et al., 2010).

Recientemente, algunos estudios de proteínas con señales NoLS en su secuencia han puesto de manifiesto que la densidad de carga en la superficie de las proteínas condiciona su interacción con los componentes del nucleolo, por lo que la acumulación en el nucleolo parece estar mediada más por interacciones electrostáticas que por secuencias de aminoácidos concretos (Earley et al., 2015; Martin et al., 2015; Musinova et al., 2011). El nucleolo presenta un ambiente ácido comparado con el nucleoplasma y, por tanto, proporciona un ambiente ideal para la unión de proteínas con motivos con cargas positivas.

Por último, al igual que las NLS, la actividad de las NoLS también está condicionada por otros factores, como las modificaciones

postraduccionales o el contexto aminoacídico en el que se sitúan (Catez et al., 2002; Nemes et al., 2017; Nishimura et al., 2002).

3.4. Localización nuclear/nucleolar de proteínas virales

Como se ha mencionado anteriormente, los virus son parásitos intracelulares obligados que requieren factores celulares del huésped para poder llevar a cabo su ciclo infeccioso. A pesar de que los virus de RNA se replican en el citoplasma, algunas de las proteínas que codifican son capaces de dirigirse al núcleo celular y con frecuencia se acumulan en el nucleolo. Los virus de DNA, tanto de animales como de plantas, se replican en el núcleo por lo que la presencia de componentes de estos virus en este compartimento y, en ocasiones, en el nucleolo (accesible a través del núcleo), está justificada. Sin embargo, la necesidad de una interacción de los virus de RNA con el núcleo y/o el nucleolo no es tan obvia y en la mayoría de los casos no se conoce el significado biológico de esta localización subcelular.

Es razonable pensar que algunas proteínas virales podrían alcanzar el núcleo/nucleolo para interferir en el transporte nucleocitoplasmático de componentes celulares, para alterar procesos nucleares/nucleolares y/o para secuestrar factores del huésped y favorecer la infección viral (Rawlinson and Moseley, 2015; Taliensky et al., 2010). Algunos ejemplos de virus de RNA de animales capaces de secuestrar factores nucleolares son los poliovirus, que redistribuyen la nucleolina (una proteína multifuncional implicada en distintos procesos como la transcripción del rDNA, el metabolismo del RNA y el ensamblaje de los ribosomas) desde el nucleolo hasta el citoplasma

e inactivan un factor nucleolar que reprime la transcripción de la RNA polimerasa I en las células infectadas (Banerjee et al., 2005; Waggoner and Sarnow, 1998), o los rinovirus, que redirigen un factor nuclear implicado en procesamiento de RNA hacia el citoplasma y se ha propuesto que se asocian a él para favorecer la replicación o la morfogénesis del virión (Flather et al., 2018).

En plantas, el secuestro de factores nucleolares por algunas proteínas virales se ha relacionado, en distintos casos, con el movimiento de los virus. Algunos de los ejemplos mejor documentados están vinculados a la fibrilarina, una de las proteínas más abundantes en el nucleolo cuya función principal es el procesamiento y modificación de los rRNA. El primer trabajo que describió la participación de la fibrilarina en el movimiento viral fue realizado con el virus del rosetón del cacahuete (*Groundnut rosette virus*, GRV; género *Umbravirus*, familia *Tombusviridae*), un virus que no produce CP. La proteína de movimiento de este virus, codificada por la ORF3, es aparentemente capaz de secuestrar la fibrilarina y redirigirla al citoplasma, donde forma complejos RNP involucrados en el movimiento del virus (Kim et al., 2007a). Diversos estudios han mostrado resultados similares con proteínas de movimiento de diversas familias taxonómicas (Chang et al., 2016; Li et al., 2018; Semashko et al., 2012; Zheng et al., 2015). Sin embargo, se han descrito otras interacciones de proteínas virales con fibrilarina que no parecen estar relacionada con el movimiento viral, de modo que podrían estar interviniendo en otros procesos (González et al., 2010; Kim et al., 2007b; Qi et al., 2008; Rajamäki and Valkonen, 2009; Wang et al., 2012b).

Aunque se han descrito interacciones de proteínas de virus RNA de plantas con otras proteínas nucleolares, tales como proteínas ribosomales, factores de transcripción u otros factores implicados en el procesamiento de los mRNA (Aparicio and Pallás, 2017; Canto et al., 2006; Martínez and Daròs, 2014; Rajamäki et al., 2017), el significado biológico de estas interacciones está por determinar.

4. El virus del arabesco del *Pelargonium*

4.1. Incidencia

El geranio (*Pelargonium* spp.) ocupa una posición importante dentro de la industria floral nacional con un consumo anual de más de 20 millones de plantas. Sin embargo, su producción se ve a menudo afectada por distintos factores entre los que destacan los daños causados por diversos patógenos de tipo viral (Nameth and Adkins, 1993; Stone, 1980). Una prospección realizada en España puso de manifiesto que el virus del arabesco del *Pelargonium* (*Pelargonium line pattern virus*, PLPV; género *Pelarpovirus*, familia *Tombusviridae*) es el agente viral más frecuente en geranio, con porcentajes de incidencia que oscilan entre el 40 y el 90 % dependiendo del área geográfica examinada (Alonso and Borja, 2005). Este virus puede aparecer solo o en infecciones mixtas, principalmente junto al virus de la rotura del color de la flor del *Pelargonium* (*Pelargonium flower break virus*, PFBV; género *Carmovirus*, familia *Tombusviridae*), el CMV, el TMV o el virus del rizado de la hoja del *Pelargonium* (*Pelargonium leaf curl virus*, PLCV; género *Tombusvirus*, familia *Tombusviridae*). Una situación similar es previsible en países de nuestro entorno y, probablemente, en otros más alejados (Bouwen and Maat, 1992; Franck and Loebenstein, 1994; Stone, 1980), aunque los datos a este respecto son aún escasos.

4.2. Propiedades biológicas y modos de transmisión

El PLPV fue descrito por primera vez por Stone y Hollings (1971, 1976). Las infecciones causadas por el PLPV en *P. peltatum*, *P. glandiflorum* y *P. zonale*, sus huéspedes naturales más habituales, son frecuentemente asintomáticas, aunque esta última especie puede presentar manchas cloróticas y patrones de líneas en hojas (Alonso et al., 1999; Brunt et al., 1997) (Fig. 9). En cualquier caso, la inducción de síntomas por este virus depende del aislado particular y está altamente influenciada por las condiciones externas, pudiendo variar estacionalmente (Alonso and Borja, 2005; Bouwen and Maat, 1992).

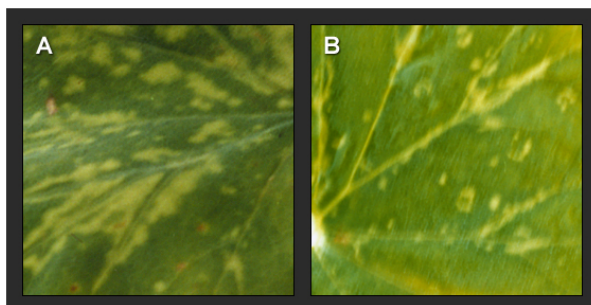


Figura 9. Síntomas inducidos por el PLPV en hojas de geranio. Fotos cedidas por M. Borja del vivero “La Veguilla”, Fundación Promiva.

Aunque de forma natural el PLPV se ha encontrado hasta el momento sólo en especies del género *Pelargonium*, su gama de huéspedes experimentales incluye al menos 37 especies distribuidas en 9 familias de plantas, incluyendo a *Beta vulgaris*, *Solanum lycopersicum*, *Ocimum basilicum*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*,

Solanum tuberosum o *Vicia faba*, entre otros. La especie utilizada como huésped para el diagnóstico de este virus suele ser *Chenopodium quinoa* y los huéspedes más empleados para su mantenimiento y propagación son *Nicotiana clevelandii* y *Nicotiana benthamiana* (Brunt et al., 1997). El PLPV se transmite por inoculación mecánica, por injerto y por contacto entre plantas. Hasta la fecha no se ha descrito su transmisión por medio de ningún vector biológico (Brunt et al., 1997).

4.3. Propiedades moleculares

El PLPV es un virus muy resistente (punto de inactivación térmica de 85 °C) que presenta partículas isométricas de 30 nm y un pequeño genoma monopartido de ssRNA(+) (Brunt et al., 1997), características que comparte con miembros de la familia *Tombusviridae* (Rochon et al., 2012). Esta familia está integrada por más de 50 especies virales que se encuentran distribuidas en dieciséis géneros distintos: *Alphacarmovirus*, *Alphanecrovirus*, *Aureusvirus*, *Avenavirus*, *Betacarmovirus*, *Betanecrovirus*, *Dianthovirus*, *Gallantivirus*, *Gammacarmovirus*, *Macanavirus*, *Machlomovirus*, *Panicovirus*, *Pelarspovirus*, *Tombusvirus*, *Umbravirus* y *Zeavirus* (Adams et al., 2016; Rochon et al., 2012). Excepto los miembros del género *Dianthovirus*, que poseen un genoma de RNA segmentado bipartido, el resto de virus de la familia tienen un genoma monopartido lineal de ssRNA(+) de entre 3.7 y 4.8 kb. La organización genómica difiere entre los géneros de esta familia, pero en todos los casos codifican dos proteínas esenciales para la

replicación, al menos una MP y una CP, a excepción de los umbravirus que no codifican proteína de cubierta (Rochon et al., 2012).

La determinación de la secuencia completa y de la organización genómica del PLPV ha permitido confirmar la adscripción del virus a la familia *Tombusviridae* (Castaño and Hernández, 2005; Castaño et al., 2009) y su inclusión dentro del género *Pelarspovirus* (Scheets et al., 2015). La creación de este género es bastante reciente e incluye, hasta el momento, al PLPV y a otros cuatro pequeños virus isométricos: el virus de las manchas anulares del *Pelargonium* (*Pelargonium ringspot virus*, PeIRSV), el virus de los anillos cloróticos del *Pelargonium* (*Pelargonium chlorotic ring pattern virus*, PCRPV), el virus latente de la baya del saúco (*Elderberry latent virus*, ELV) y el virus de las hojas distorsionadas del rosal (*Rosa rugosa leaf distortion virus*, RrLDV). El PLPV es el miembro tipo del género y, con diferencia, el mejor caracterizado desde un punto de vista molecular. Su genoma está compuesto por 3883 nt y contiene 5 ORF flanqueadas por una región no traducible (*unstranlated region*, UTR) en 5' inusualmente corta, con solo 6 nt, y una 3' UTR de 246 nt (Castaño and Hernández, 2005; Castaño et al., 2009). Como otros miembros de la familia *Tombusviridae*, los RNA del PLPV no presentan estructura cap en el extremo 5' ni cola poliA en el extremo 3'. La ORF 5'-proximal, ORF1, codifica una proteína de 27 kDa (p27) que termina en un codón ámbar cuya lectura a través permite la traducción de la ORF2, dando lugar a una proteína de 87 kDa (p87), la RDR viral. Las dos proteínas mencionadas están implicadas en la replicación del RNA del virus. En la región central

del genoma se encuentran las ORF 3 y 4, que codifican dos pequeñas proteínas de 7 y 9.7 kDa (p7 y p9.7) implicadas en el movimiento del virus, mientras que la ORF 3'-proximal codifica una CP de 37 kDa (p37) (Fig. 10).

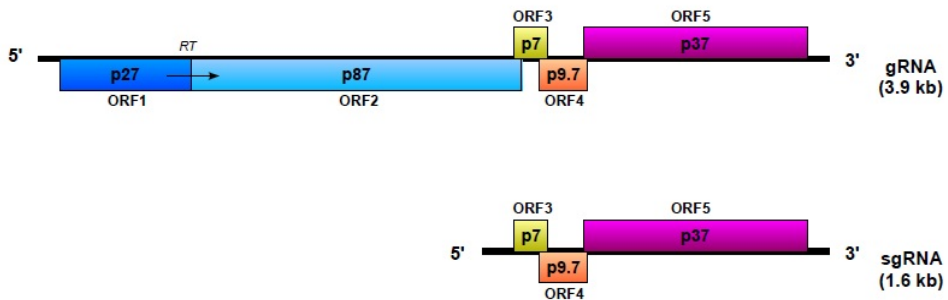


Figura 10. Representación de la organización genómica del PLPV. Las distintas ORF se representan con recuadros coloreados dependiendo de la función de las proteínas que codifican. Las ORF 1 y 2 (en azul) codifican proteínas implicadas en replicación (p27 y p87) y se expresan a partir del gRNA. Las ORF 3 y 4 (amarillo y naranja) codifican proteínas implicadas en movimiento (p7 y p9.7). La ORF5 (rosa) codifica la CP (p37). Estas tres últimas proteínas se traducen a partir del sgRNA.

Por lo que respecta a la expresión génica del PLPV, mientras que las ORF 1 y 2 son traducidas a partir del gRNA, las ORF 3, 4 y 5 lo hacen a partir de un sgRNA de 1.6 kb que es 3'-coterminal con el gRNA y que se genera en el curso de la infección con la asistencia de la RDR viral (Fig. 10) (Castaño and Hernández, 2005; Castaño et al., 2009). Estudios recientes han puesto de manifiesto que el sgRNA del PLPV se produce, muy probablemente, por un mecanismo de terminación prematura en el que participa una interacción RNA-RNA

a larga distancia que actúa en *cis* en el gRNA de polaridad positiva y que, al bloquear el avance del complejo replicativo, dirige específicamente la formación del sgRNA de polaridad negativa (Blanco-Pérez and Hernández, 2016). Este último servirá a su vez de molde para la síntesis del sgRNA de polaridad positiva. La traducción de tres proteínas distintas a partir de este sgRNA está mediada por procesos de escape al rastreo ribosomal (*leaky-scanning*) que están favorecidos por el contexto de secuencia subóptimo del codón de inicio de la ORF3, la presencia de un codón de inicio no-AUG (GUG) en la ORF4 y la ausencia de codones AUG entre el codón de inicio de la ORF3 y de la ORF5 (Castaño et al., 2009). Por otra parte, se ha descrito la presencia de un estimulador traduccional independiente de cap (*cap independent translation enhancer*, CITE) en la 3' UTR del PLPV que es fundamental para la traducción de las proteínas virales (Blanco-Pérez et al., 2016). La funcionalidad de este CITE se ha corroborado tanto en el contexto del gRNA como del sgRNA y, además, su interacción con una estructura en horquilla del extremo 5' de estas moléculas parece ser esencial para la infectividad del virus.

Por último señalar que las características genómicas de otros pelarspovirus son muy similares a las del PLPV y cabe esperar que sus estrategias de expresión génica sean muy parecidas, aunque estas no han sido evaluadas experimentalmente (Scheets et al., 2015).

OBJETIVOS

Como se ha comentado en la Introducción, el silenciamiento por RNA actúa como un potente mecanismo de defensa antiviral en las plantas. Para poder establecer infecciones con éxito, los virus codifican supresores (VSR) que inhiben este mecanismo antiviral empleando estrategias muy diversas. Estas proteínas no solo son fundamentales para el ciclo infeccioso de los virus, sino que, además, tienen un gran interés como herramientas para diseccionar rutas de silenciamiento en plantas y, también, como herramientas biotecnológicas.

Los objetivos de esta Tesis se han encaminado a seguir profundizando en el estudio de la respuesta antiviral en plantas y de los mecanismos de acción de los supresores de silenciamiento. Para ello, hemos empleado el virus del arabesco del *Pelargonium* o PLPV, un virus de ssRNA(+) que pertenece al nuevo género *Pelarsposvirus* dentro de la amplia familia *Tombusviridae*. El pequeño tamaño de su genoma unido a su organización genómica sencilla y a su capacidad para infectar huéspedes experimentales diversos como *N. benthamiana*, una especie modelo para el análisis de interacciones planta-patógeno (Goodin et al., 2008), hacen de este virus en un sistema muy adecuado para estudiar aspectos básicos de la interacción virus-planta a nivel molecular. Concretamente, los puntos que se han abordado en este trabajo han sido:

1. Identificar y caracterizar el VSR codificado por el PLPV, estudiando requerimientos estructurales e interacciones moleculares que pudieran ser importantes para su función supresora con el fin de intentar determinar su mecanismo de acción.

OBJETIVOS

2. Ahondar en el estudio de la localización subcelular del supresor del PLPV, tratando de obtener datos acerca de determinantes estructurales y de factores del huésped implicados en dicha localización y, además, desarrollando estrategias que permitan evaluar la relevancia de la compartimentalización subcelular de la proteína en el ciclo infeccioso del virus.

3. Analizar la contribución de componentes de la ruta de silenciamiento en la defensa de *N. benthamiana* frente al PLPV, para identificar actividades de esta ruta que están implicadas en la respuesta frente al virus.

CAPÍTULO 1

**Key Importance of Small RNA Binding for the
Activity of a Glycine/Tryptophan (GW) Motif-
Containing RNA Silencing Suppressor***

Miryam Pérez-Cañamás and Carmen Hernández

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-
Universidad Politécnica de Valencia). Ciudad Politécnica de la
Innovación, Ed. 8E. Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain*

**Running Title: Main relevance of sRNA binding in a GW motif-
containing RSS*

To whom correspondence should be addressed: Carmen Hernández,
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, (Consejo Superior
de Investigaciones Científicas-Universidad Politécnica de Valencia),
Ciudad Politécnica de la Innovación, Ed. 8E. Camino de Vera s/n,
46022 Valencia, Spain, Phone: 34-96-3877869, Fax: 34-96-3877859,
E-mail: cahernan@ibmcp.upv.es

**The Journal of Biological Chemistry (2015)
Volume 290, Number 5, Pages 3106-3120**

Background: GW/WG motif-containing viral suppressors of RNA silencing (VSRs) have been proposed to act through interaction with Argonaute (AGO) proteins.

Results: The activity of a GW motif-containing VSR was found to rely on small RNA binding capability rather than on AGO interaction.

Conclusion: Overlapping signals in VSRs may lead to misinterpretation of relevant molecular traits.

Significance: Knowing primary target(s) of VSRs is critical for better understanding of the host-virus arms race.

ABSTRACT

Viruses express viral suppressors of RNA silencing (VSRs) to counteract RNA silencing-based host defenses. Although virtually all stages of the antiviral silencing pathway can be inhibited by VSRs, small RNAs (sRNAs) and Argonaute (AGO) proteins seem to be the most frequent targets. Recently, GW/WG motifs of some VSRs have been proposed to dictate their suppressor function by mediating interaction with AGO(s). Here we have studied the VSR encoded by *Pelargonium* line pattern virus (family Tombusviridae¹). The results show that p37, the viral coat protein, blocks RNA silencing. Site-directed mutagenesis of some p37 sequence traits, including a conserved GW motif, allowed generation of suppressor-competent and -incompetent molecules and uncoupling of the VSR and particle

¹ La revista JBC no sigue las normas habituales del Código Internacional de Clasificación y Nomenclatura de Virus, por eso las categorías taxonómicas no aparecen en cursiva.

assembly capacities. The engineered mutants were used to assess the importance of p37 functions for viral infection and the relative contribution of diverse molecular interactions to suppressor activity. Two main conclusions can be drawn: (i) the silencing suppression and encapsidation functions of p37 are both required for systemic *Pelargonium* line pattern virus infection, and (ii) the suppressor activity of p37 relies on the ability to bind sRNAs rather than on interaction with AGOs. The data also caution against potential misinterpretations of results due to overlap of sequence signals related to distinct protein properties. This is well illustrated by mutation of the GW motif in p37 that concurrently affects nucleolar localization, efficient interaction with AGO1, and sRNA binding capability. These concomitant effects could have been overlooked in other GW motif-containing suppressors, as we exemplify with the orthologous p38 of turnip crinkle virus.

INTRODUCTION

RNA silencing refers to several mechanistically related pathways that result in sequence-specific regulation of gene expression. These pathways are conserved in most eukaryotes and play an essential role in developmental programs, stress responses, and maintenance of genome integrity (1, 2). In plants, as well as in invertebrates and, to a lesser extent, in fungi and probably in vertebrates (3–8), RNA silencing acts as a potent antiviral system. This system is triggered by double-stranded RNAs (dsRNAs)³ that, in the case of single-stranded RNA (ssRNA) viruses, may correspond to dsRNA replicative intermediates, self-complementary regions of the viral genome, or products of the

action of host RNA-dependent RNA polymerases on viral templates (9). The dsRNA triggers are cleaved by Dicer-like (DCL) RNase III-related enzymes into small RNAs (sRNAs) of 21–24 nt (4). These small duplexes are unbound by an RNA helicase, and one strand is incorporated into an RNA-induced silencing complex (RISC), whose core component is an Argonaute (AGO) protein that is endowed with RNA slicer activity (10–12). After integration into the RISC, the sRNA strand guides annealing and endonucleolytic cleavage of complementary RNA molecules (1). The sRNAs that bind to their cognate RNAs do not only trigger RNA cleavage, but they may also serve as primers for RNA-dependent RNA polymerase activity, which generates additional dsRNA targets for DCL enzymes. This results in the production of a new wave of sRNAs, thus leading to amplification of the silencing signal (13–15). In plants, studies with the model organism *Arabidopsis thaliana* indicate that DCL4 and DCL2 are the most important DCLs involved in virus-induced RNA silencing and that AGO1 is the major antiviral effector molecule, although other AGOs might also participate in viral clearance (16–22).

In order to counteract RNA silencing-mediated host defenses, viruses have evolved a vast array of proteins called viral suppressors of RNA silencing (VSRs) (23, 24). VSRs are very diverse in sequence and additional function(s), and no correlation among VSR types and viral phylogeny can be established (25). Moreover, differences in VSR activity have been found among viruses of the same genus (26–28) or even among isolates of the same virus species (29, 30). Although many questions remain to be answered, the growing knowledge about the mechanism of action of several VSRs reveals that virtually all stages of the antiviral silencing pathway can be targeted by these viral products

and that a given VSR may inhibit or inactivate one or more components of the silencing machinery (31, 32). One of the best studied VSRs is the tombusvirus p19 protein that binds sRNAs, the key mediators of RNA silencing, preventing their incorporation into RISC (33, 34). Distinct unrelated VSRs have adopted the same strategy to block RNA silencing (35–38), and some of them have been reported to bind dsRNAs in a size-independent manner (38–40). Inhibition of the 2'-*O*-methylation that protects sRNAs from degradation or blockage of biogenesis of 21-nt sRNAs would be other examples of the mode of action of VSRs (16, 41). Besides RNAs, protein components of the silencing pathways may be also affected by VSRs. For instance, several VSRs seem to target AGO proteins, such as the 2b protein of cucumber mosaic virus, which was proposed to inhibit RISC activity via physical interaction with the PAZ domain of AGO1 (42). In addition, the polerovirus-encoded F-box protein P0 targets AGO proteins for ubiquitination and subsequent degradation, thereby precluding RISC assembly (43–45). Moreover, ipomovirus P1 protein and protein p38 of turnip crinkle virus (TCV; genus *Carmovirus*, family Tombusviridae) were recently shown to bind directly and specifically AGO1, affecting the activity of this RISC component (46, 47). In the latter cases, such binding was proposed to be achieved through mimicry of host-encoded GW/WG motif-containing proteins normally required for RISC assembly/function in diverse organisms (48).

Pelargonium line pattern virus (PLPV) belongs to the large and diverse family Tombusviridae and harbors a monopartite, positive-sense ssRNA genome that is encapsidated into isometric viral particles of about 30 nm in diameter (49). The 3,883-nt genomic RNA (gRNA) lacks a 5' cap structure and a 3' poly(A) tail and contains five open

reading frames (ORFs) (Fig. 1A). The two 5'-proximal ORFs encode two proteins involved in replication, the essential accessory factor p27 and its read-through product p87, which corresponds to the viral RNA-dependent RNA polymerase. Two centrally located, small ORFs encode the movement proteins p7 (MP1) and p9.7 (MP2), and the 3'-proximal ORF encodes a coat protein (CP or p37) (50, 51). PLPV genomic organization and derived proteins closely resemble those of members of the genus *Carmovirus*. However, whereas carmoviruses generate two subgenomic RNAs (sgRNAs) that serve as mRNAs for expression of the MPs and the CP, respectively, PLPV produces only one. In addition, PLPV lacks any AUG codon between the MP1 AUG and CP AUG initiation codons, whereas carmoviruses have 1–8 AUGs in the equivalent region. Moreover, the PLPV MP2 gene contains a non-AUG initiation codon contrary to the canonical AUG present in the MP2 gene of carmoviruses (50, 51). These distinguishing characteristics are shared by other related, poorly characterized, small isometric ssRNA viruses, which has prompted the proposal of their inclusion into a new genus, tentatively named *Pelarspovirus*, within the family Tombusviridae (50–52).

So far, VSR activity has been identified in four of the 12 genera currently included in the family Tombusviridae, particularly *Aureusvirus*, *Carmovirus*, *Dianthovirus*, and *Tombusvirus*. Despite their phylogenetic closeness, the available information indicates that different genera employ distinct proteins and/or strategies to inhibit RNA silencing. Whereas the CPs of several carmoviruses have been reported to act as VSRs (27, 53, 54), tombusviruses and aureusviruses encode small, unrelated proteins (p19 and p14, respectively) that perform such specific tasks (40, 55). The dianthoviral

suppressor seems unique in that it consists of multiple components, including the replication proteins (p27 and p88) and the viral RNA templates (56). Moreover, the dianthoviral MP probably functions as a secondary VSR (57). To further explore the diversity of silencing suppression within Tombusviridae, our first goal in the present work was to identify the PLPV VSR, a role that was found to be played by p37, the viral CP. Investigations to understand the molecular bases of the suppressor function of p37 were subsequently undertaken. Through site-directed mutagenesis of distinct sequence motifs in the protein, including a conserved GW motif at the N terminus, a series of suppressor-competent and -incompetent forms of p37 was generated, some of which retained the particle assembly capacity, whereas others did not. This series was used to analyze the relevance of p37 functions for viral infection and the relative contribution of diverse protein properties (binding to dsRNAs, virion formation, subcellular localization, self-interaction, and interaction with certain AGO proteins) to the suppressor activity. The results have provided valuable insights into the mode of action of p37 that seems to rely on the ability to bind sRNAs rather than on interaction with AGOs, despite the protein having an apparently *bona fide* GW motif. Moreover, the obtained data reveal considerable overlap of sequence signals in p37 related to distinct protein properties. This situation can be present in other GW motif-containing VSRs, as we illustrate with the orthologous TCV p38, and can lead to misinterpretations of results or to deficient understanding of the molecular bases of VSR activity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

DNA constructs

Individual PLPV ORFs (p27, p87, p7, p9.7, and p37) were PCR-amplified from a plasmid containing a full-length PLPV infectious cDNA (58) using specific primer pairs and the Expand High Fidelity PCR System (Roche Applied Science). The amplification of ORF p87 was performed from plasmid p27tyr, a full-length PLPV clone in which the amber stop codon of ORF1 was mutated to a tyrosine codon (51). The amplification products, containing proper restriction sites at the 5' ends, were inserted between the cauliflower mosaic virus 35S promoter and the terminator sequence of the *Solanum tuberosum* proteinase inhibitor II gene (PoPit) and cloned into the binary vector pMOG800 (59).

Distinct mutations were introduced by PCR with the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) into the p37 gene of (i) a PLPV infectious cDNA inserted into pUC18 just downstream from a T7 RNA polymerase promoter (58) and (ii) the same PLPV infectious cDNA flanked by the cauliflower mosaic virus 35S promoter and the PoPit and cloned into pMOG800 (51). Such mutations led to the replacement by Ala of the following p37 amino acid residues: Trp at position 28 (mutant p37-W₂₈), two Arg residues at positions 15 and 16 (mutant p37-2R₁₅), Lys at position 26 (mutant p37-K₂₆), or three Arg residues at positions 67, 68, and 70 (mutant p37-3R₆₇). The mutagenized full-length PLPV clones were used as templates for PCR amplification of the mutant p37 genes that were cloned individually into pMOG800 as described above for the wild-type (WT) p37 gene. In addition, similar pMOG800-based constructs, which

allowed expression of WT and mutant p37 molecules tagged at their C termini with the hemagglutinin (HA) peptide, were generated by standard PCR and cloning procedures (60). Binary constructs carrying a green fluorescent protein (GFP) inverted repeat (GFP-IR) or allowing expression of GFP, tombusviral p19, or TCV p38 have been described earlier (27, 61). Mutations in sequences encoding the GW motifs of TCV p38 were introduced with the QuikChange site-directed mutagenesis kit and proper oligonucleotides.

To analyze protein subcellular localization, WT p37 gene and mutant versions were PCR-amplified, and the amplification products, bearing proper restriction sites at the ends, were fused in frame to the 5' end or the 3' end of the GFP gene. Such fusions were inserted between the cauliflower mosaic virus 35S promoter and the PoPit and cloned into plasmid pMOG800.

For bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays, WT and mutant p37 genes were PCR-amplified using oligonucleotides with appropriate restriction sites and cloned into vectors pROK-sYFPN and pROK-sYFPC to allow expression of the p37 protein fused to the yellow fluorescent protein (YFP) N- and C-terminal halves (amino acids 1–154 and 155–238, respectively) (62). In addition, pROK2-based constructs that allowed expression of AGO1 and AGO4 tagged with sYFP halves were used in some BiFC experiments (62). A pROK2-based construct for expression of fibrillarin fused to monomeric red fluorescent protein (mRFP) has been described elsewhere (63).

All constructs were routinely sequenced with an ABI PRISM DNA sequencer 377 (PerkinElmer Life Sciences) to avoid unwanted

modifications. The primers used to generate the distinct recombinant plasmids are listed in Table 1.

Agrobacterium-mediated transient gene expression and virus inoculation

All binary plasmid constructs were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 CH32 by electroporation. *A. tumefaciens* infiltration was performed on the abaxial side of leaves from 2-week-old *Nicotiana benthamiana* plants (27). In co-infiltration assays, equal volumes of the corresponding bacterial cultures ($OD_{660} = 0.5$) were mixed before infiltration.

PLPV was agroinoculated to plants using the pMOG800-based constructs with full-length PLPV cDNAs and the procedure described above. Alternatively, virus mechanical inoculation was performed. With this aim, RNA transcripts were synthesized *in vitro* from the pUC18-derived full-length PLPV clones with T7 RNA polymerase (Thermo Scientific) following digestion of plasmids with SmaI. The resulting transcripts were gently rubbed onto carborundum-dusted leaves as reported before (51). Plants were maintained under greenhouse conditions (16-h day at 24 °C and 8-h night at 20 °C) until leaf samples were harvested.

Fluorescence imaging and microscopy

In assays aimed at identification of suppressor activity, visual detection of GFP fluorescence in agroinfiltrated leaf patches was performed using a fluorescence stereomicroscope (MZZ16F Leica).

Table 1. List of primers used in this work

Primer	Position ^a	Sequence ^b		Constructs ^c
CH358	7-17 (S)	5'-GCGGATCCATGGCACACTATTTTGG-3'	(<i>Bam</i> HI)	35S:p27
CH192	710-728 (AS)	5'-CCGGATCC ^c TATTTGACGAACTCGAAAG-3'	(<i>Bam</i> HI)	
CH358	7-17 (S)	5'-GCGGATCCATGGCACACTATTTTGG-3'	(<i>Bam</i> HI)	35S:p87
CH359	2287-2304 (AS)	5'-CCCTGCAGTTAGATTGGAATCTTTTG-3'	(<i>Pst</i> I)	
CH360	2274-2292 (S)	5'-CCGGATCCATGGATATTCATCAAAAAG-3'	(<i>Bam</i> HI)	35S:p7
CH361	2448-2465 (AS)	5'-CCCTGCAGTCAGAAAATTGAGATGGAC-3'	(<i>Pst</i> I)	
CH362	2621-2647 (S)	5'-GTGGATCCATGGCGCCAAGGATAATC-3'	(<i>Bam</i> HI)	35S:p37
CH363	3618-3637 (AS)	5'-GGCTGCAGTCACAGCTTGTGTGATAAG-3'	(<i>Pst</i> I)	
CH364	2371-2389 (S)	5'-CCGGATCCATGGAGTATCCAAGGGTAC-3'	(<i>Bam</i> HI)	35S:p9.7
CH365	2618-2637 (AS)	5'-GTCTGCAGTTATCCTTGGCCGCCATTTC-3'	(<i>Pst</i> I)	
CH377	2690-2715 (S)	5'-CAATCCAAGGGT _{gc} GGCTCTTTGTGTC-3'		35S:p37-W ₂₈
CH378	2690-2715 (AS)	5'-GACAAAGAGCC _{cgc} ACCCTTGGATTG-3'		pgPLPV (p37-W ₂₈)
CH404	2652-2679 (S)	5'-CAGCCGTGGCA _{gcAgc} GGAACAGTGGGC-3'		35S:p37-2R ₁₅
CH405	2652-2679 (AS)	5'-GCCCACTGTTCC _{gcTgc} TGCCACGGCTG-3'		pgPLPV (p37-2R ₁₅)
CH406	2683-2711 (S)	5'-CAAGCTCCAATCC _{gc} GGGTTGGGGCTCTT-3'		35S:p37-K ₂₆
CH407	2683-2711 (AS)	5'-AAGAGCCCCAACC _{gc} GGATTGGAGCTTG-3'		pgPLPV (p37-K ₂₆)
CH408	2806-2843 (S)	5'-TCCCACAAATGCG _{gcGgc} GGCGGCGGGAGAGCCGGGA-3'		35S:p37-3R ₆₇
CH409	2806-2843 (AS)	5'-TACCCGGCTCTCC _{gcCGCCgcCgc} CGCATTTGTGGGA-3'		pgPLPV (p37-3R ₆₇)

CH362	2621-2647 (S)	5'- <u>GTGGATCC</u> ATGGCGGCAAGGATAATC-3'	<i>(BamHI)</i> <i>(PstI)</i>	35S:p37-HA (wt and mutants)
CH410	3625-3634 (AS)	5'-GG <u>CTGCAGAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATG</u> CCAGCTTGTG-3'		
CH518	2807-2832 (S)	5'-CAGAAGAAGGGCGCGTCAACCCTAAC-3'		35S:p38-W ₂₆
CH519	2807-2832 (AS)	5'-GTTAGGGTTGACGCGCCCTTCTTCTG-3'		
CH520	3552-3576 (S)	5'-GGACAGCTGGGGCGGAGCACGATTG-3'		35S:p38-W ₂₈₃
CH521	3552-3576 (AS)	5'-CAATCGTGCTCCGCCCACTGTCC-3'		
CH362	2621-2647 (S)	5'- <u>GTGGATCC</u> ATGGCGGCAAGGATAATC-3'	<i>(BamHI)</i>	sYFPN:p37 (wt and mutants)
CH381	3618-3637 (AS)	5'-GGG <u>GAGCTCT</u> CACAGCTTGTGATGTAAG-3'	<i>(SacI)</i>	sYFPC:p37 (wt and mutants)
CH362	2621-2647 (S)	5'- <u>GTGGATCC</u> ATGGCGGCAAGGATAATC-3'	<i>(BamHI)</i>	35S:p37wt:GFP
CH385	3615-3634 (AS)	5'-CC <u>GATCC</u> AGCTTGTGATGTAAGCTC-3'	<i>(BamHI)</i>	(wt and mutants)

^a Positions of the PLPV or the TCV genome (CH518, CH519, CH520 and CH521) covered by the primers. (S) and (AS): sense and antisense.

^b Restriction sites introduced for cloning purposes are underlined, lowercase indicate nucleotide substitutions to PLPV and TCV wt sequence and sequence encoding an HA-tag is in italics.

^c pgPLPV refers to both pUC18-based and pMOG800-based constructs bearing full-length PLPV cDNAs.

Pictures were taken with a digital camera DFC300 FX Leica. In BiFC and subcellular localization assays, GFP, mRFP, or reconstituted sYFP fluorophores of tagged proteins were monitored in epidermal cells of *N. benthamiana*-infiltrated tissue at 72 h postinfiltration using a Leica TCS SL confocal microscope with an HCX PL APO $\times 40/1.25-0.75$ oil CS objective. GFP and sYFP fluorescence was recorded by excitation with a 488-nm argon laser line with emission being collected through a band pass filter from 505 to 550 nm. In the case of mRFP, excitation was performed by means of a 543-nm green neon laser line, and fluorescence emission was collected at 610–630 nm.

RNA extraction, virion purification, and Northern blot analysis

Total RNA was extracted from plant tissue with buffer-saturated phenol and then fractionated with 2 M LiCl (64). Virions were purified by pelleting through a sucrose cushion (65). For detection of GFP mRNA or PLPV RNAs, Northern blot analyses were performed as reported previously (50), using radioactive DNA probes corresponding to the GFP gene or to nt 3095–3883 of the PLPV genome, respectively. Virion preparations were resolved in non-denaturing agarose gels and subjected to Northern blot analysis with the PLPV probe. In order to check the presence of GFP-specific sRNAs, the RNA fraction soluble in 2 M LiCl was electrophoresed in denaturing polyacrylamide gels (20%), electroblotted to Hybond-XL membranes (GE Healthcare), and subjected to hybridization with a radioactive GFP-specific riboprobe (27). Hybridization signals were visualized by

autoradiography or with a PhosphorImager (Fujifilm FLA-5100, GE Healthcare).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Preparation of crude protein extracts from agroinfiltrated tissue, labeling of synthetic double-stranded sRNAs or of long dsRNAs, binding reactions, and electrophoresis in polyacrylamide gels were performed as described earlier (27, 38). For generation of long dsRNAs, transcripts of opposite polarity produced with T7 and T3 RNA polymerase, respectively, from a pBluescript KS(+)-based plasmid with a 250-bp DNA insert were used. Detection of HA-tagged proteins was done through Western blot (66), using 10 μ l of each protein extract and an anti-HA antibody (Roche Applied Science). Signals from EMSAs or Western blots were recorded by autoradiography or with a PhosphorImager (Fujifilm FLA-5100, GE Healthcare).

RESULTS

PLPV p37 efficiently inhibits RNA silencing

To identify potential PLPV-encoded suppressor(s), we tested the ability of the distinct PLPV proteins to block the silencing of a GFP reporter gene transiently expressed from a binary T-DNA vector agroinfiltrated in *N. benthamiana*. This type of assay has been widely employed to recognize both plant and animal suppressors (55, 67). In the absence of a functional VSR, GFP expression from the Ti-plasmid is recognized as exogenous by the host and is silenced within 3 days postinfiltration (dpif). If the VSR is operative, the expression level of

GFP is stabilized for a considerably larger period. Leaf patches infiltrated with the GFP plasmid in combination with an empty vector or with constructs allowing expression of PLPV replication (p27 and p87) or movement (p7 and p9.7) proteins showed high expression of GFP at 2 dpif (data not shown), which was almost completely silenced at 5 dpif according to observations of GFP fluorescence (Fig. 1B). In contrast, co-expression of GFP with PLPV p37 maintained high levels of fluorescence at 5 dpif and beyond, similar to that found with the tombusviral p19 that was used as a positive control of suppressor activity in parallel assays (Fig. 1B).

To confirm the visual observations, Northern blot analysis of RNA extracted from the infiltrated tissue was carried out with a GFP probe. The results corroborated that the fluorescence patterns reflected changes in the steady state levels of GFP mRNA. Similar GFP mRNA accumulation was detected at 2 dpif in the patches infiltrated with any of the plasmid combinations (data not shown). However, at 5 dpif, GFP mRNA accumulation was very low in patches expressing GFP alone or in combination with p27, p87, p7, and p9.7, whereas GFP mRNA levels in patches co-expressing GFP and p37 were high and comparable with those found with p19 (Fig. 1C, *top*). As expected from a silencing process, the reduced levels of GFP mRNA observed at 5 dpif in tissue expressing GFP either alone or together with any PLPV protein but p37 correlated with elevated levels of GFP sRNAs. Conversely, GFP sRNAs were hardly detected in the patches co-expressing GFP and p37 or p19 (Fig. 1C, *bottom*). Collectively, the results allowed identification of p37 as the VSR encoded by PLPV.

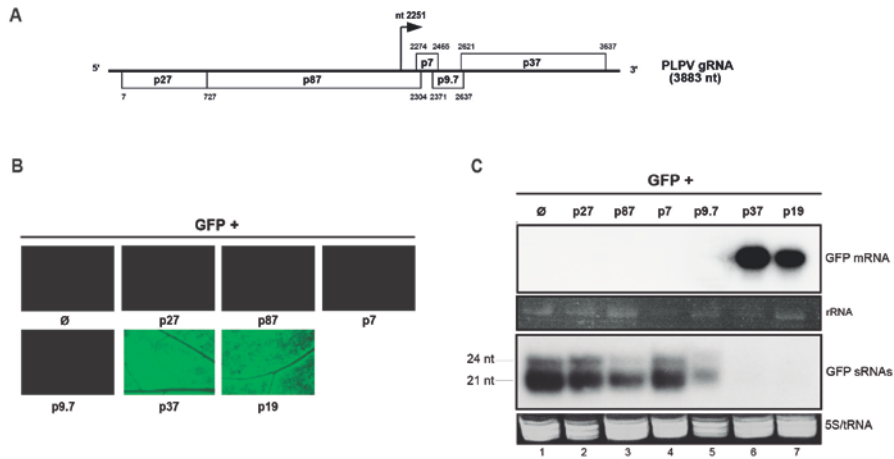


FIGURE 1. Evaluation of suppressor activity of PLPV proteins. *N. benthamiana* plants were agroinfiltrated with constructs for expression of GFP either alone (Ø) or in combination with PLPV p27, p87, p7, p9.7, p37, or the tombusviral p19. **A**, schematic representation of the PLPV genome. Open boxes, ORFs; arrow, transcription start site of the sgRNA. **B**, GFP fluorescence at 5 dpif in infiltrated leaf patches. **C**, Northern blot hybridization for detection of the GFP mRNA or derived sRNAs in infiltrated tissues harvested at 5 dpif. Ethidium bromide staining of RNA is shown as loading control.

Mutations in a GW or an arginine-rich motif at the N-terminus of p37 abolish the suppressor function of the protein

As reported in distinct studies, one or few point mutations may severely impair the suppressor function of a VSR (27, 46, 68). In order to obtain suppressor-competent and -incompetent forms of p37 that would allow us to investigate properties of the protein critical for its role as VSR, several mutant versions were generated, and their ability to inhibit RNA silencing was subsequently evaluated. One of the mutants harbored a Trp to Ala change that affected a GW motif present at the N terminus of the protein (mutant p37-W₂₈; Fig. 2A). Such a motif

is conserved in the homologous proteins of pelarspoviruses and of several carmoviruses (Fig. 2A, *inset*), and its relevance for the suppressor function of TCV p38 (which possesses another relevant, non-conserved GW motif at its C terminus) has been recently highlighted (46). Three additional mutant proteins bearing Ala replacements in basic residues at the N terminus were also engineered: mutant p37-2R₁₅, mutant p37-K₂₆, and mutant p37-3R₆₇ (Fig. 2A). Co-expression of the mutant proteins with GFP in transient assays revealed that p37-2R₁₅ and p37-K₂₆ maintained a suppressor activity comparable with that of the WT protein, whereas such activity was abolished by the Ala replacements present in p37-W₂₈ and p37-3R₆₇ (Fig. 2B). These results revealed a pivotal role of the N-terminal GW motif and of an arginine-rich motif for the silencing suppressor function of p37.

Uncoupling of the VSR and the encapsidation functions of p37 reveals that both are required for effective systemic spread of the virus

In order to test whether abolishing the suppression function had effects on PLPV infectivity, the above p37 mutations were introduced into the viral genome context. *N. benthamiana* plants were inoculated mechanically using transcripts derived from pUC18-based (WT and mutant) PLPV constructs. Local and systemic leaves were harvested at 7 and 30 days postinoculation, respectively. Northern blot analysis revealed the presence of viral RNAs in local samples of plants inoculated with WT PLPV and with PLPV mutants p37-2R₁₅ and p37-K₂₆, whereas the accumulation level of such RNAs in samples from plants inoculated with PLPV mutants p37-W₂₈ and p37-3R₆₇ was

negligible (Fig. 3A, *left*). Equivalent results were obtained when *N. benthamiana* plants were virus-inoculated through infiltration of *A. tumefaciens* strains carrying the corresponding pMOG800-based (WT and mutant) full-length PLPV constructs (data not shown). These results indicated that the suppressor function is critical for viral infectivity. In accordance with the lack of local infection, the suppressor-deficient PLPV mutants p37-W₂₈ and p37-3R₆₇ were not detected in systemic leaves (Fig. 3A, *right*). Remarkably, whereas the suppressor-competent virus PLPV p37-K₂₆ became systemic, the likewise suppressor-competent PLPV p37-2R₁₅ did not. This suggested that p37 amino acid replacements in the latter mutant affected protein function(s) other than RNA silencing suppression that could be crucial for systemic viral dispersion. One possibility was that the encapsidation function was impaired in mutant p37-2R₁₅ because particle assembly has been reported to be required and dispensable, respectively, for the systemic and local spread of distinct Tombusviridae in different hosts (69, 70). To test this possibility, an attempt to purify viral particles from all of the assayed mutants was done. To this end, *N. benthamiana* leaves agroinoculated with the distinct PLPV constructs were harvested at 3 days postinoculation. We reasoned that, at this early time, the triggering of RNA silencing would be just getting started, and, thus, suppressor-deficient mutants could still accumulate at detectable levels. Northern blot hybridization confirmed this assumption (Fig. 3B, *left*), and the infected tissues were employed for virion purification. Viral particle preparations could be readily obtained from tissue infected with the WT virus, PLPV p37-K₂₆ (suppressor-competent and able to systemically infect), or PLPV p37-W₂₈ (suppressor-incompetent and unable to systemically infect), whereas attempts to purify viral particles from

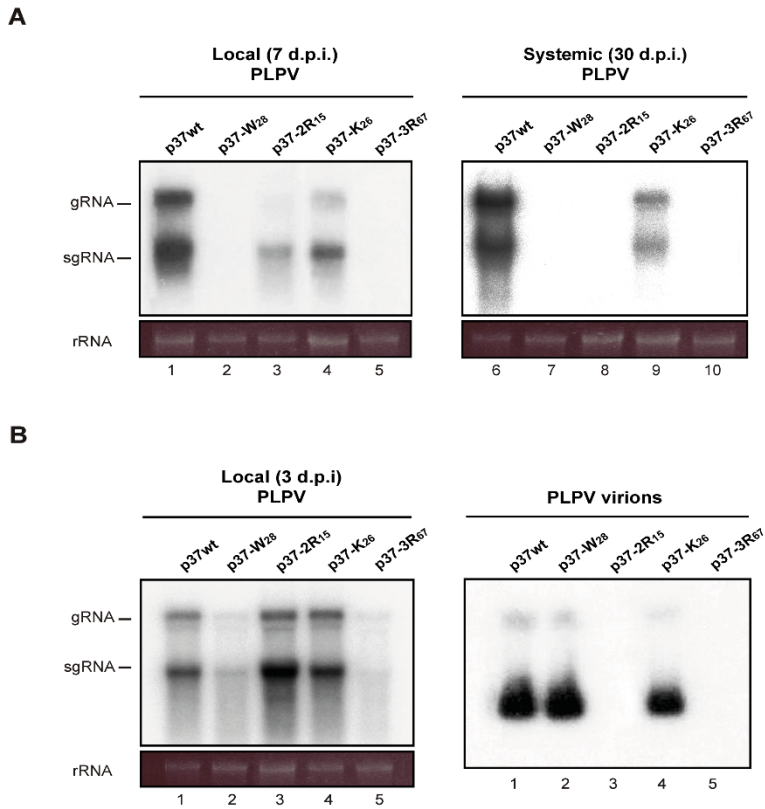


FIGURE 3. Evaluation of infectivity and virion formation of PLPV mutants. *A*, detection of PLPV by Northern blot hybridization in total RNAs from local (7 dpif) and systemic tissue (30 days postinoculation (*d.p.i.*)) of *N. benthamiana* plants mechanically inoculated with WT and mutant PLPV transcripts. *B*, detection of PLPV by Northern blot hybridization in local leaves of *N. benthamiana* plants agroinoculated with WT and mutant constructs and collected at 3 dpif. Detection was performed on total RNA extracts (*left*) or on virion preparations (*right*). Virus titers, estimated from the autoradiogram on the *left*, were considered to normalize the loading of the virion preparations. In all *panels*, the positions of the genomic (*g*) and subgenomic (*sg*) PLPV RNAs are indicated at the *left*. Ethidium bromide staining of RNA was used as a loading control of total RNA samples.

plant tissue infected with mutant PLPV p37-2R₁₅ (suppressor-competent and unable to systemically infect) or p37-3R₆₇ (suppressor-incompetent and unable to systemically infect) were unsuccessful (Fig. 3B, *right*). Altogether, the results indicated that the p37 VSR function is required but not sufficient for effective PLPV systemic infection and that the encapsidation function must be also preserved. In addition, we cannot discard the possibility that particle formation, although not strictly required for local infection, somehow promotes stability and/or cell to cell movement of the virus because the accumulation level of PLPV mutant p37-2R₁₅ in inoculated leaves was usually lower than that observed for WT PLPV or for mutant p37-K₂₆ (Fig. 3A, *left*). It should also be mentioned that local and systemic infections established by PLPV p37-K₂₆ were generally delayed with respect to that of the WT virus (compare accumulation levels of mutant p37-K₂₆ *versus* WT in Fig. 3A), suggesting that the engineered mutation has slight detrimental effects on virus fitness.

PLPV p37 is able to bind sRNAs and this ability correlates with its suppressor function

As indicated in the Introduction, the ability to bind sRNA duplexes seems to be crucial for the function of distinct VSRs (33, 37, 38, 40, 71). To assess whether PLPV p37 shares this ability, first, the WT and mutant versions of the protein were fused to an HA tag and transiently co-expressed with GFP in *N. benthamiana* leaves. The HA-tagged proteins exhibited exactly the same behavior as the unfused partners in these suppressor assays: the WT and mutant proteins p37-2R₁₅ and p37-K₂₆ showed equivalent, high suppressor

activity, whereas mutants p37-W₂₈ and p37-3R₆₇ were incapable of preventing silencing (data not shown). Next, *N. benthamiana* leaves were separately agroinfiltrated with the constructs of the HA-tagged proteins to prepare crude protein extracts that, at 3 dpif, showed comparable accumulation levels of the corresponding p37 molecules (Fig. 4A), indicating that the engineered mutations did not affect protein stability. These crude extracts were employed to perform EMSAs with sRNAs. A shift in sRNA mobility was observed when extracts from leaves expressing HA-tagged p37 WT were used (Fig. 4B), indicating that the protein is able to bind sRNAs. Interestingly, extracts containing p37-2R₁₅ and p37-K₂₆, both functional in silencing suppression, also showed sRNA binding activity, whereas those containing p37-W₂₈ and p37-3R₆₇, which had no detectable suppressor function, failed to form complexes with sRNAs (Fig. 4B). Subtle differences in the mobility of the protein-sRNA complexes were detected among suppressor-competent p37 variants, suggesting small conformational alterations probably caused by the introduced mutations.

Some VSRs have been reported to bind dsRNAs irrespective of their size (5, 38–40). Such VSRs may compromise DCL-mediated processing of long dsRNAs (38). To further explore dsRNA binding capabilities of PLPV p37, we thus tested whether this protein was also able to bind large dsRNAs. In contrast with the results with double-stranded sRNAs (Fig. 4B), no shift in long dsRNA mobility was observed when p37 WT extracts were used (Fig. 4C). Indeed, the outcome of such an EMSA was identical to that observed with extracts from tissue agroinfiltrated with an empty vector (negative control), whereas a clear shift was detected when extracts from tissue expressing TCV p38, a VSR that is able to bind dsRNAs in a size-independent

manner (38), were employed (Fig. 4C). To rule out the possibility that the *in vitro* conditions for dsRNA binding could substantially differ from those found *in vivo*, we tested whether PLPV p37 was able to prevent sRNA generation from hairpin transcripts transiently expressed in plants. To this end, *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with GFP-IR (72) together with the constructs that allowed expression of WT or mutant p37 molecules. TCV p38 and tombusviral p19 (able and unable, respectively, to bind long dsRNAs) (33, 34, 38) were used as controls in parallel assays (Fig. 4D). As expected, hairpin transcripts were detected in GFP-IR- and TCV p38-coinfiltrated leaves, whereas sRNAs could not be found. Conversely, hairpin transcripts could not be detected in GFP-IR- and p19-coinfiltrated samples, whereas sRNAs accumulated to high levels. The latter situation was observed in GFP-IR- and PLPV (WT or mutant) p37-coinfiltrated leaves, thus confirming that the PLPV VSR lacks the ability to bind long dsRNAs. Globally, the results indicated that p37 is able to bind small, but not long, dsRNAs and supported a direct relationship between the sRNA binding capability of the protein and its ability to inhibit RNA silencing.

Investigations on p37 subcellular localization, self-interaction, and interaction with AGO proteins in plants; assessment of the potential contribution of these protein properties to suppressor activity

Although binding to sRNAs seems fundamental for the activity of many VSRs, other properties, such as dimerization, specific subcellular localization, or interaction with AGO proteins, have been proposed to be important in some instances (34, 42, 46, 47, 73–75).

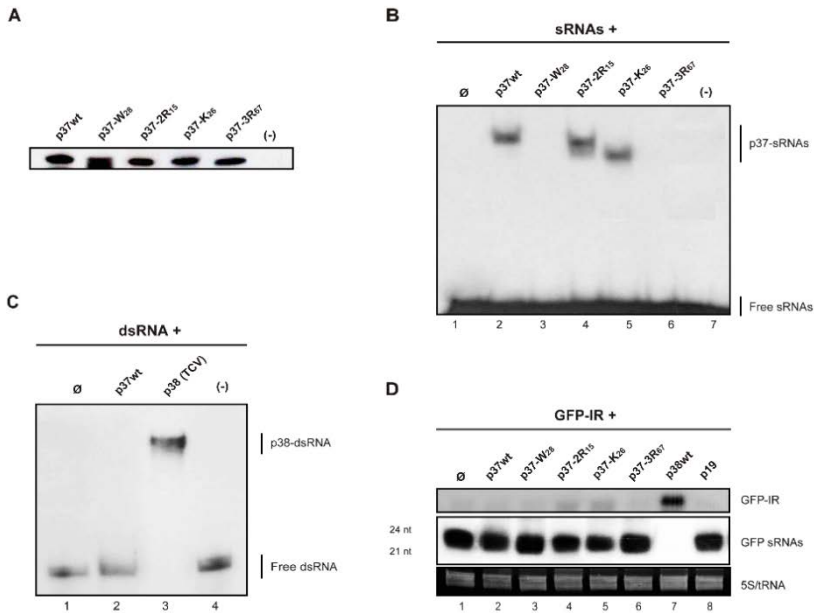


FIGURE 4. Analysis of the ability of p37 to bind dsRNAs. *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with an empty vector (negative control) or with constructs for expression of HA-tagged PLPV p37, p37-W₂₈, p37-2R₁₅, p37-K₂₆, or p37-3R₆₇. Samples were collected at 3 dpif to prepare crude protein extracts. **A**, Western blot analysis of protein extracts using an anti-HA antibody. **B**, EMSA performed with ³²P-labeled synthetic 21-nt sRNA (19-nt duplex region and 2-nt 3' overhangs) and no extract (Ø) or extracts from leaves agroinfiltrated with an empty vector (-) or expressing distinct HA-tagged PLPV p37 molecules. The positions of free sRNAs and of p37-sRNA complexes are indicated on the *right*. **C**, EMSA performed with a ³²P-labeled long (250-bp) dsRNA and no extract (Ø) or extracts from leaves agroinfiltrated with an empty vector (-) or expressing HA-tagged PLPV p37 variants. In this experiment, an extract from leaves expressing TCV p38 was used as a positive control. The positions of free long dsRNA and of TCV p38-long dsRNA complex are indicated on the *right*. **D**, Northern blot analyses to evaluate the effect of PLPV p37 molecules on the accumulation of hairpin transcripts and hairpin-derived sRNAs. *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with GFP-IR (-) or with GFP-IR together with WT and mutant p37 forms. TCV p38 and tombusviral p19 were used in parallel assays as control VSRs able and unable, respectively, to bind hairpin transcripts. Samples were taken at 4 dpif.

Thus, experiments were conducted to assess the potential relevance of the latter features in p37 suppressor function.

To investigate the subcellular localization of p37 in plant cells, this PLPV product was tagged at its N or C terminus with GFP and transiently expressed in *N. benthamiana* leaves via agroinfiltration. The green fluorescence derived from the p37 WT:GFP (or GFP:p37 WT; data not shown) fusion was evenly distributed through the cytoplasm and the nucleus (Fig. 5, *A panels*). Within the latter organelle, a central region showed a bright fluorescence, which corresponded to the nucleolus, as confirmed by the use of an mRFP-tagged fibrilarine as nucleolar marker (Fig. 5, *A2–A4*). The distribution pattern of p37 tagged with GFP differed from that of an unfused GFP, used as control, which showed the typical cytoplasmic and nuclear distribution but was excluded from the nucleolus (Fig. 5, *F panels*). The same approach was employed to analyze the subcellular localization of p37 mutants. Intracellular distribution of mutants p37-K₂₆ and p37-3R₆₇ was essentially identical to that of the WT protein (Fig. 5, *D and E panels*), whereas mutants p37-W₂₈ and p37-2R₁₅ maintained the cytoplasmic and nuclear localization but had lost the nucleolar one (Fig. 5, *B and C panels*). These results indicated that targeting of PLPV p37 to the nucleolus is apparently dispensable for its suppressor function, because mutant p37-2R₁₅, which is capable of inhibiting RNA silencing, does not retain nucleolar localization.

Next, the potential of p37 to self-interact was analyzed through BiFC assays. To this end, constructs allowing transient expression of p37 fused to the N- or C-terminal part of the sYFP protein were generated. Co-expression of the two resulting fusion proteins, sYFPN-

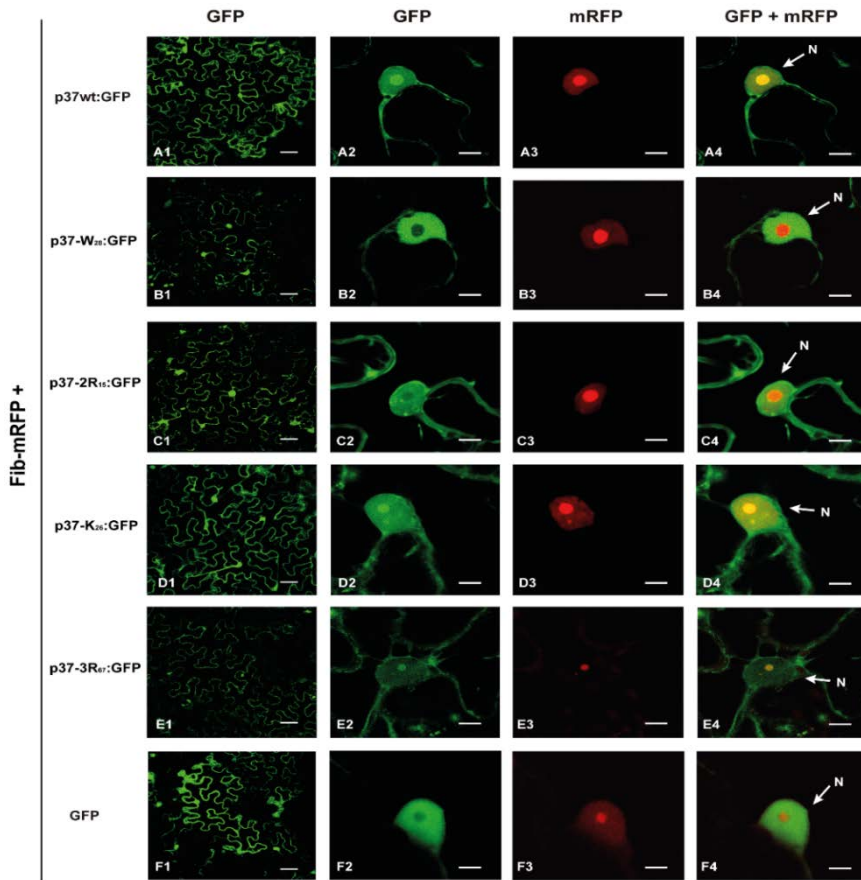


FIGURE 5. Subcellular distribution of p37 molecules with a C-terminal GFP tag. *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with constructs that allowed transient expression of unfused GFP or GFP-tagged p37 proteins together with mRFP-tagged fibrilarin (*Fib-mRFP*, nucleolar marker). The tombusviral p19 was also included in these co-infiltration experiments to compensate for the lack of suppressor activity of some p37 molecules. Confocal laser-scanning microscopy was used for observation of fluorescence at 3 dpif. Micrographs of the *first column* (A-F, panels 1; starting from the left) show a general view of GFP-derived fluorescence in epidermal cells expressing the distinct protein combinations. Micrographs of the *second and third columns* (A-F, panels 2 and 3) show a *close-up view* of GFP- and mRFP-derived fluorescence, respectively, in individual cells, and micrographs of the *fourth column* show merged images of GFP and mRFP signals in such individual cells. The nucleus (N) is marked by an *arrow* in the *fourth column panels* (A-F, panels 4). The *inset scale bar* corresponds to 40 μm in the *first column panels* and to 8 μm in all remaining *panels*.

p37 WT and sYFPC-p37 WT, in *N. benthamiana* leaves gave rise to clear YFP-derived fluorescence within the plant cells, indicating reconstitution of the YFP and, thus, demonstrating that p37 is able to dimerize (Fig. 6, *A panels*). The same approach was employed to evaluate the dimerization capability of p37 mutants, and the results showed that, like the WT protein, all of them were able to interact with themselves (Fig. 6, *B–E*). For most p37 molecules, the distribution of fluorescence in these assays was essentially identical to that displayed by the corresponding GFP-tagged protein, the p37-K₂₆ self-interaction being the only exception, with no nucleolar signal. Control experiments in which the distinct fusion proteins were co-expressed with unfused sYFP halves (*e.g.* in Fig. 6*F*) did not yield significant fluorescence signals, substantiating the reliability of the fluorescence observations.

BiFC assays were also used to assess potential interactions of p37 with some AGO proteins, particularly AGO1 and AGO4, two RISC components whose interaction with other VSRs has been reported previously (42, 46, 62, 76). Co-expression of sYFPN-p37 WT and sYFPC-AGO1 (Fig. 7*A*) or the reverse combination sYFPC-p37 WT and sYFPN-AGO1 (data not shown) led to equivalent results and supported interaction of the two assayed proteins, with the resulting reconstituted fluorescence being detected through the cytoplasm and nucleus of the agroinfiltrated *N. benthamiana* cells. Similarly, co-expression of sYFPN-p37 WT and sYFPC-AGO4 (or sYFPC-p37 WT and sYFPN-AGO4; data not shown) indicated that p37 is also able to associate with AGO4 (Fig. 7*G*), although, in this case, fluorescence was mainly detected in the cell nucleus, suggesting that the interaction essentially takes place in this cellular organelle. Next, we investigated whether p37 mutants maintained the capability of interacting with

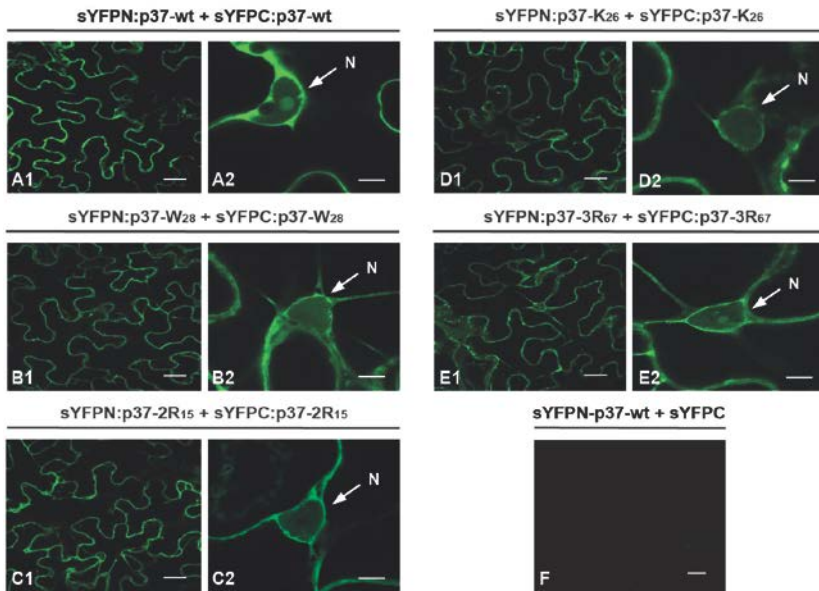


FIGURE 6. In vivo analysis of p37 self-interaction. WT (A) and mutant p37 molecules (B) were tagged at their N terminus with YFP halves (*sYFPN* and *sYFPC*) and transiently co-expressed in *N. benthamiana* leaves to study self-interaction through a BiFC assay. The tombusviral p19 was also included in these co-infiltration experiments to compensate for the lack of suppressor activity of some p37 molecules. Confocal laser-scanning microscopy was used for the observation of fluorescence at 3 dpif. For each protein combination, the micrograph at the *left* shows a general view of YFP-derived fluorescence in epidermal cells (*inset scale bar*, 20 μm), and the micrograph at the *right* shows a *close-up* view of individual cells (*inset scale bar*, 8 μm) with the nucleus (N) marked by an *arrow*. A negative control combination (*sYFPN-p37 WT + sYFPC*) is displayed in F.

AGO1 and AGO4 as the WT protein. The results of the corresponding BiFC assays showed that all mutants were able to interact with both AGO1 (Fig. 7, B–E) and AGO4 (Fig. 7, H–K), although the intensity of the reconstituted fluorescence was considerably lower in the case of mutant p37-W₂₈ and AGO1 (Fig. 7B). No fluorescence was observed in control experiments in which the distinct YFPC-tagged proteins were

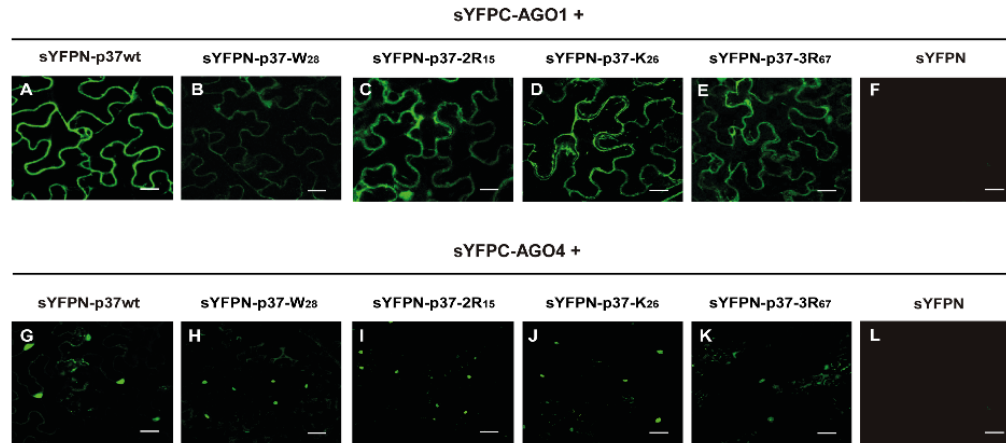


FIGURE 7. *In vivo* analysis of p37 interaction with AGO proteins. WT and mutant p37 molecules and Argonaute proteins (AGO1 and AGO4) were tagged at their N terminus with YFP halves (*sYFPN* and *sYFPC*) and transiently co-expressed in *N. benthamiana* leaves to study protein-protein interactions through a BiFC assay. Confocal laser-scanning microscopy was used for the observation of fluorescence at 3 dpif. The *top* and *bottom* micrographs show a general view of YFP-derived fluorescence in epidermal cells expressing sYFPN-AGO1 and sYFPN-AGO4, respectively, in combination with sYFPC-tagged p37 molecules. Equivalent images were obtained with reverse combinations (sYFPC-AGO1 or sYFPC-AGO4 co-expressed with sYFPN-tagged p37 molecules) (data not shown). A negative control combination is displayed in the top (*sYFPC-AGO1 + sYFPN*) and bottom (*sYFPC-AGO4 + sYFPN*) raw. *Inset scale bar*, 20 μ m in all panels.

co-expressed with unfused YFPN or *vice versa* (e.g. in Fig. 7, *F* and *L*), thus supporting that the fluorescence signals detected corresponded to true interactions.

Collectively, the results of the BiFC assays showed, on one hand, that p37 is able to self-associate. However, such a property is not sufficient by itself to sustain the suppressor function because dimerization of mutants p37-W₂₈ and p37-3R₆₇ was detected despite the fact that these p37 molecules do not block RNA silencing. On the other hand, the obtained data indicated that p37 can interact with AGO1 and AGO4 proteins. Nevertheless, no clear correlation among this capability and the silencing inhibition function of the protein could be established because the observed interactions were fully (p37-3R₆₇ with any AGO) or partially (p37-W₂₈ with AGO1) preserved in suppressor-incompetent p37 molecules.

DISCUSSION

Distinct genera in the family Tombusviridae use different proteins as VSRs. In this study, the existence of suppressor(s) of RNA silencing encoded by PLPV, a member of the proposed new genus *Pelarspovirus*, has been investigated. As reported for several species of the related genus *Carmovirus* (27, 53, 54, 77), none of the PLPV non-structural proteins exhibited suppressor activity in co-infiltration assays of *N. benthamiana* plants, whereas p37, the viral CP, strongly inhibited RNA silencing of a GFP reporter gene.

The available information on VSRs indicates that such viral products may inhibit one or more of the silencing machinery actors,

although the primary or most relevant target of a given VSR is often unclear. Distinct analyses performed with engineered p37 variants have allowed the establishment of a direct correlation among the ability of the protein to bind sRNAs and its competence to inhibit RNA silencing (summary in Table 2), suggesting that, as proposed for other VSRs (33, 34, 37, 38, 78), sequestering of sRNAs is a hallmark feature of the p37 suppressor function. This functional feature most likely precludes slicing of target RNAs by preventing sRNA loading into RISC. In addition, it may hinder amplification of the silencing signal, as suggested by the negligible detection of sRNAs in samples in which sense RNA-triggered RNA silencing was inhibited by suppressor-competent p37 molecules (as by p19) (Fig. 2). The contribution of other properties, such as nucleolar localization, dimerization, or interaction with AGOs, to the suppressor activity of p37 might be disparate (Table 2). Sorting to the nucleolus has been considered as a relevant trait in some VSRs (62, 73, 74), but this supposition has become questionable after broader evaluations (78–80). The observation that p37, besides being targeted to the cytoplasm and nucleus, is targeted to the nucleolus was unexpected. Programs for subcellular localization prediction did not recognize any conventional nucleolar localization signal (or even nuclear localization signal) in the p37 molecule (data not shown), and, to our best knowledge, nucleolar localization has not been reported previously for any p37 ortholog. In any case, such subcellular localization seems to be dispensable for suppressor activity, as deduced from results with mutant p37-2R₁₅ that is able to inhibit RNA silencing despite being excluded from the nucleolus. On the other hand, dimerization has been shown to be a requirement for distinct VSRs, including the well characterized tombusviral p19 (33, 39, 71, 75, 81).

Table 2. Properties of p37 variants

p37 variant	RNA silencing suppression	dsRNA binding			Interaction with			
		sRNAs	long dsRNA ^a	Nucleolar localization	Dimerization	AGO1	AGO4	Encapsidation
p37wt	+	+	-	+	+	+++	+	+
p37-W ₂₈	-	-	n/a	-	+	+	+	+
p37-2R ₁₅	+	+	n/a	-	+	+++	+	-
p37-K ₂₆	+	+	n/a	+	+	+++	+	+
p37-3R ₆₇	-	-	n/a	+	+	+++	+	-

^a Not applicable

Although we have shown here that PLPV p37 is able to interact with itself, all of the assayed protein mutants retained this capacity, and, thus, we could not critically assess whether this property is a prerequisite for the suppressor function. The relevance of dimer formation for the VSR role of some p37 relatives has been anticipated (27, 46), although, as for p37, formal demonstration has yet to be achieved. Finally, we cannot rule out the possibility that the detected interactions of p37 with AGO1 and AGO4 contribute to its suppressor function. However, such interactions by themselves seem to be insufficient to sustain the VSR activity of p37 because the interaction with AGO4 was maintained by all the assayed p37 variants, and the interaction with AGO1, although notably diminished regarding p37-W₂₈, was retained at WT levels in the case of the loss-of-function form p37-3R₆₇. The great importance of the sRNA binding capability over other protein properties is in agreement with recent reports on other VSRs, such as cucumber mosaic virus 2b, which, like p37, exhibits nucleolar localization, self-interaction, and interaction with AGO1 and AGO4 proteins (42, 62, 75, 78, 82).

Distinct studies with variant experimental systems led to different models for the mechanism of silencing suppression of TCVP38, a VSR structurally and phylogenetically related to PLPV p37. For instance, TCVP38 has been postulated to exert its action through binding and sequestering of sRNAs (38), inhibition of sRNA methylation (83), interference with DCL4 (16, 38), or induction of stress and defense pathways (84). In a recent study, the N-terminal and C-terminal GW motifs of TCVP38 have been implicated in interaction with AGO1 which, in turn, has been proposed to dictate the suppressor activity of the protein (46). Mutation of the unique, conserved N-terminal GW motif of PLPV p37 notably reduced (suggesting that it is

a *bona fide* GW protein) but did not completely abolish its interaction with AGO1 despite the fact that the engineered amino acid replacement was equivalent to one reported to abrogate TCV p38-AGO1 interaction. These discrepancies probably reflect distinct characteristics of the corresponding proteins. Nevertheless, they could also be due to the fact that the interaction of TCV p38 with AGO1 was tested *in vitro* using an AGO1 antibody to direct immunoprecipitation of peptides containing either of the two GW motifs of the VSR, whereas we have used an *in vivo*, BiFC assay with the entire PLPV p37 protein. Although both approaches have limitations, the former one might be more prone to inaccuracies because it obviates the influence of the protein conformation and protein compartmentalization in the tested molecular interaction. In any case, the dsRNA binding capability of TCV p38 molecules bearing mutations in the GW motifs was not analyzed, and an effect of the mutations on this capacity of the protein, similar to that observed for PLPV p37, could not be discarded. Indeed, we have performed EMSAs with the TCV p38-GW mutant forms and have corroborated that such mutants have lost the ability to bind to both small and long dsRNAs (Fig. 8). The lack of sRNA binding capability could actually provide an alternative or complementary explanation to the recovery of infectivity of TCV carrying p38-GW mutations in *dcl2–dcl4* plants (46). The knockdown of the two main anti-TCV DCLs (16) in these plants precludes the generation of virus-derived sRNAs (vsRNAs), and, thus, hijacking of vsRNAs by the VSR to prevent viral RNA degradation would be dispensable. Similarly, the TCV p38-GW mutants could show infection recovery in *ago1–27* plants (46) because the absence of AGO1 effector protein would make the vsRNAs useless for antiviral defense. Whether the loss of sRNA binding capability

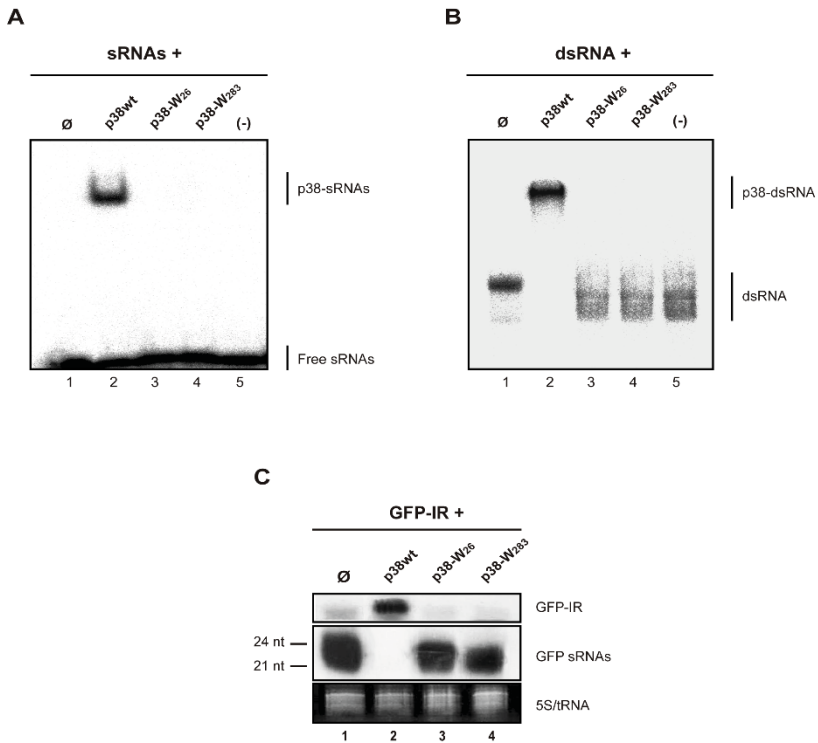


FIGURE 8. Analysis of the ability of TCV p38 to bind dsRNAs. *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with an empty vector (negative control) or with constructs for the expression of TCV p38 either in its WT version or with mutations in the N-terminal (p38-W₂₆) or C-terminal (p38-W₂₈₃) GW motif, as described previously (46). The agroinfiltrated tissue was collected at 3 dpif to prepare crude protein extracts. **A**, EMSA performed using ³²P-labeled synthetic 21-nt sRNA (19-nt duplex region and 2-nt 3' overhangs) and no extract (Ø) or extracts from leaves agroinfiltrated with an empty vector (-) or expressing TCV p38 variants. The positions of free sRNAs and of p38-sRNAs complexes are indicated on the *right*. **B**, EMSA performed with a ³²P-labeled long (250 bp) dsRNA and extracts from leaves agroinfiltrated with an empty vector (-) or expressing TCV p38 variants. **C**, Northern blot analyses to evaluate the effect of TCV p38 molecules on the accumulation of hairpin transcripts and hairpin-derived sRNAs. *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with GFP-IR (-) or with GFP-IR together with WT and mutant TCV p38 forms. Samples were taken at 4 dpif.

provoked by mutation of GW motif(s) contributes, to any extent, to impairment of the suppressor function of p38 has yet to be explored.

In the context of PLPV infection, the need to counteract RNA silencing for effective viral multiplication and dispersion was underlined by viruses bearing mutations that abolished the p37 suppressor activity not being viable. Remarkably, some of the engineered mutations successfully uncoupled the VSR function of p37 from its particle assembly function, and such genetic uncoupling has allowed us to find out that both are strictly required for PLPV systemic spread in *N. benthamiana*. The requirement of assembled virions for long distance movement seems to be variable in distinct Tombusviridae and hosts (69, 85–90). A recent report on the TCV-*A. thaliana* pathosystem has demonstrated the key importance of virus particles for egress of the TCV genome from the vasculature of systemic leaves (70). Although this question has not been specifically tackled in this work, a similar scenario seems likely for PLPV in *N. benthamiana*.

The expression of VSRs during viral infections often results in severe damage of the host. Indeed, many VSRs were initially identified as viral pathogenicity determinants (55, 91). The molecular bases of such an effect might be diverse and seem mostly to be related with viral accumulation enhancement and/or interference with silencing pathways affecting regulation of host gene expression (55, 92, 93). Strikingly, PLPV usually causes asymptomatic infections in their natural hosts (*Pelargonium* spp.) as well as in experimental hosts, such as *N. benthamiana* or *Nicotiana clevelandii* (58, 94). Moreover, PLPV titers are considerably low in infected tissue (65), which could suggest that

either the virus lacks an efficient VSR or the expression/activity of such a VSR is modulated during infection. We have shown that PLPV p37 behaves as a strong VSR, at least in transient expression assays. Thus, it seems more plausible that the virus has evolved strategies to minimize the impact that its infection may have on the host because such an impact may adversely affect virus reproduction and/or transmission. One of these strategies may be related to the production of a single, tricistronic sgRNA for the expression of internal and 3'-proximal genes. As we have previously reported (51), the translation of p7, p9.7, and p37 proteins from the sole PLPV sgRNA is accomplished through leaky scanning processes that are facilitated by specific genomic traits (weak context of the AUG initiation codon of the MP1 gene, non-AUG initiation codon of the MP2 gene, and lack of AUG codons in any frame between the initiation codons and the MP1 and CP gene). However, the expression of the 3'-terminal gene, which encodes p37, is probably more inefficient from the tricistronic mRNA than, for instance, the monocistronic sgRNA that typically directs translation of CP in carmoviruses. Down-regulation of p37 expression through this mechanism might contribute to alleviate potential side effects caused by the VSR on host expression.

In conclusion, we have shown here that the PLPV p37 protein inhibits RNA silencing and that this GW motif-containing VSR probably exerts its action mainly through sequestration of sRNAs. The obtained data also caution against potential misinterpretations of results due to overlap of sequence signals related to distinct protein properties. This is well illustrated by the GW motif mutation in p37 that concurrently affects its nucleolar localization, its efficient interaction with AGO1, and its sRNA binding capability. These concomitant

effects could have been overlooked in other GW motif-containing suppressors, as we have exemplified with the orthologous p38 protein of TCV. Some other interesting questions derived from the results remain to be investigated. One of them refers to the biological meaning of the nuclear/nucleolar localization of p37, a protein whose known functions (RNA silencing suppression and encapsidation) are expected to be executed essentially in the cellular cytosol. None of these functions is apparently affected by defective nucleolar localization, as indicated by the suppressor-incompetent, virion assembly-competent mutant p37-W₂₈ or the suppressor-competent, virion assembly-incompetent mutant p37-2R₁₅. Such subcellular targeting could be related to still uncovered functions of p37. On the other hand, we have found that distinct p37 variants exhibit similar interactions with AGO1 or AGO4, irrespective of their suppressor capability. This observation raises doubts about the significance of such interactions for the suppressor function of p37, although the involvement of other AGO proteins (not assayed in the present study) in anti-PLPV defense cannot be ruled out. Further studies are being designed in an attempt to shed new light on these outstanding issues.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Tomas Canto (CIB, CSIC, Spain) for the kind gift of pROK2-based plasmids for BiFC. We are also indebted to Steven A. Lommel (North Carolina State University) for providing a binary construct for expression of TCV p38.

FOOTNOTES

*This work was supported by grants BFU2012-36095 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, Spain) to C. H. M. P.-C. was the recipient of a predoctoral contract from MINECO.

REFERENCES

1. Baulcombe, D. (2005) RNA silencing. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 290-293
2. Pickford A. S., and Cogoni C. (2003) RNA-mediated gene silencing. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 871–882
3. Bivalkar-Mehla, S., Vakharia, J., Mehla, R., Abreha, M., Kanwar, J. R., Tikoo, A., Chauhan, A. (2011) Viral RNA silencing suppressors (RSS): novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system. *Virus Res.* **155**, 1–9
4. Ding ,S. W., and Voinnet, O. (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**, 413-426
5. Lu, R., Maduro, M, Li, F., Li ,H. W., Broitman-Maduro, G., Li, W. X., and Ding, S. W. (2005) Animal virus replication and RNAi mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **436**, 1040–1043
6. Segers ,G. C., Zhang, X., Deng, F., Sun, Q., Nuss, D. L. (2007) Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 12902-12906

7. Wang, X. H., Aliyari, R., Li, W. X., Li, H. W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P., and Ding, S. W. (2006) RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* **312**, 452-454
8. Wu, Q., Wang, X., and Ding, S. W. (2010) Viral suppressors of RNA-based viral immunity: host targets. *Cell Host Microbe* **8**, 12–15
9. Ding, S. W. (2010) RNA based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 632-644
10. Baumberg, N., and Baulcombe, D. C. (2005) Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 11928-11933
11. Qi Y., Denli A. M., and Hannon G. J. (2005) Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. *Mol. Cell* **19**, 421-428
12. Vaucheret, H. (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci.* **13**, 350–358
13. Ghildiyal, M., and Zamore, P. D. (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 94-108.
14. Lipardi, C., Wei, Q., and Paterson, B. M. (2001) RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* **107**, 297–307

15. Moissiard, G., Parizotto, E. A., Himber, C., and Voinnet, O. (2007) Transitivity in *Arabidopsis* can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA* **13**, 1268-1278
16. Deleris, A., Gallego-Bartolomé, J., Bao, J. S., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., and Voinnet, O. (2006) Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* **313**, 68–71
17. García-Ruiz, H, Takeda, A., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Fahlgren, N., Brempelis, K. J., and Carrington, J. C. (2010) *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during *Turnip mosaic virus* infection. *Plant Cell* **22**, 481-496
18. Harvey, J. J., Lewsey, M. G., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J. P., and Baulcombe, D. C. (2011) An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PloS One* **6**, e14639
19. Jaubert, M. J., Bhattacharjee, S., Mello, A. F., Perry, K. L., and Moffett, P. (2011) ARGONAUTE2 mediates RNA silencing antiviral defenses against *Potato virus X* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **156**, 1556–1564
20. Qu, F., Ye, X., and Morris, T. J. (2008) *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 14732–14737

21. Scholthof, H. B., Alvarado, V. Y., Vega-Arreguin, J. C., Ciomperlik, J., Odokonyero, D., Brosseau, C., Jaubert, M., Zamora, A., and Moffett, P. (2011) Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* **156**, 1548-1555
22. Wang, X. B., Jovel, J., Udomporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W. X., Gascioli, V., Vaucheret, H., and Ding, S. W. (2011) The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative Argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**, 1625-1638
23. Li, F., and Ding, S. W. (2006) Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 503–531
24. Alvarado, V., and Scholthof, H. B. (2009) Plant responses against invasive nucleic acids: RNA silencing and its suppression by plant viral pathogens. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 1032–1040
25. Qu, F., and Morris, T. J. (2005) Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *FEBS Lett.* **579**, 5958-5964
26. Mangwende, T., Wang, M. L., Borth, W., Hu, J., Moore, P. H., Mirkov, T. E., and Albert, H. H. (2009) The P0 gene of *Sugarcane yellow leaf virus* encodes an RNA silencing suppressor with unique activities. *Virology* **384**, 38-50

27. Martínez-Turiño, S., and Hernández, C. (2009) Inhibition of RNA silencing by the coat protein of *Pelargonium flower break virus*: distinctions from closely related suppressors. *J. Gen Virol.* **90**, 519-525
28. Senshu, H., Ozeki, J., Komatsu, K., Hashimoto, M., Hatada, K., Aoyama, M., Kagiwada, S., Yamaji Y., and Namba, S. (2009) Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection. *J. Gen. Virol.* **90**, 1014-1024
29. Cuellar, W. J., Tairo, F., Kreuze, J.F., and Valkonen, J. P. T. (2008) Analysis of gene content in sweet potato chlorotic stunt virus RNA1 reveals the presence of the p22 RNA silencing suppressor in only a few isolates: implications for viral evolution and synergism. *J. Gen. Virol.* **89**, 573-582
30. Marques, N. T., Costa, A. A., Lopes, D., Silva, G, and Nolasco, G. (2012) Comparing p20's RNA silencing suppressing activity among five phylogenetic groups of *Citrus tristeza virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* **133**, 229-235
31. Burgyan, J., and Havelda, Z. (2011) Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* **16**, 265-272
32. Pumplin, N., and Voinnet, O. (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 745-760

33. Vargason, J. M., Szittyá, G., Burgyán, J., and Hall, T. M. (2003) Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* **15**, 799-811
34. Ye, K., Malinina, L., and Patel, D. J. (2003) Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* **426**, 874–878
35. Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T., and Burgyán, J. (2007) The p122 subunit of *Tobacco mosaic virus* replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J. Virol.* **81**, 11768-11780
36. Hemmes, H., Lakatos, L., Goldbach, R., Burgyan, J., and Prins, M. (2007) The NS3 protein of Rice hoja blanca tenuivirus suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *RNA* **13**, 1079–1089
37. Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y. P., Dolja, V. V., Calvino, L. F., López-Moya, J. J., and Burgyán, J. (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* **25**, 2768-2780
38. Mérai, Z., Kerényi, Z., Kertész, S., Magna, M., Lakatos, L., and Silhavy, D. (2006) Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J. Virol.* **80**, 5747-5756

39. Chao, J. A., Lee, J. H., Chapados, B. R., Debler, E. W., Schneemann, A., and Williamson, J. R. (2005) Dual modes of RNA-silencing suppression by *Flock house virus* protein B2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 952-957
40. Mérai, Z., Kerényi, Z., Molnár, A., Barta, E., Válóczy, A., Bisztray, G., Havelda, Z., Burgyán, J., and Silhavy, D. (2005) Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J. Virol.* **79**, 7217-7226
41. Haas, G., Azevedo, J., Moissiard, G., Geldreich, A., Himber, C., Bureau, M., Fukuhara, T., Keller, M., and Voinnet, O. (2008) Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J.* **27**, 2102-2112
42. Zhang, X., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., Patel, D. J., and Chua, N. H. (2006) *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute 1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* **20**, 3255-3268
43. Baumberger, N., Tsai, C. H., Lie, M., Havecker, E., and Baulcombe, D. C. (2007) The polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr. Biol.* **17**, 1609-1614
44. Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P., and Ziegler-Graff, V. (2007) The polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr. Biol.* **17**, 1615-1621

45. Csorba, T., Lózsa, R., Hutvágner, G., and Burgyán, J. (2010) Ploverovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J.* **62**, 463-472
46. Azevedo, J., García, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., García, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M. A., Lagrange, T., and Voinnet, O. (2010) Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev.* **24**, 904-915
47. Giner, A., Lakatos, L., García-Chapa, M., López-Moya, J. J., and Burgyán, J. (2010). Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathog.* **6**, e1000996
48. El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M. A., Jacobsen, S.E., Cooke, R., and Lagrange T. (2007) Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE- binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev.* **21**, 2539–2544
49. Rochon, D., Lommel, S., Martelli, G. P., Rubino, L., and Russo, M. (2012) Family *Tombusviridae*. In: *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, San Diego, CA. pp 1111-1138
50. Castaño, A., and Hernández, C. (2005) Complete nucleotide sequence and genome organization of Pelargonium line pattern virus and its relationship with the family *Tombusviridae*. *Arch. Virol.* **150**, 949-465

51. Castaño, A., Ruiz, L., and Hernández, C. (2009) Insights into the translational regulation of biologically active open reading frames of *Pelargonium line pattern virus*. *Virology* **386**, 417-426
52. Kinard, G. R., and Jordan, R. (2002) Genome organization of pelargonium chlorotic ring pattern virus: further implications for *Tombusviridae* taxonomy. *Acta Hortic.* **568**, 17-27
53. Qu, F., Ren, T., and Morris, T. J. (2003) The coat protein of *Turnip crinkle virus* suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J. Virol.* **77**, 511-522
54. Meng, C., Chen, J., Peng, J., and Wong, S. M. (2006) Host-induced avirulence of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* mutant correlates with reduced gene-silencing suppression activity. *J. Gen. Virol.* **87**, 451-459
55. Voinnet, O., Pinto, Y. M., and Baulcombe, D. C. (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 14147-14152
56. Takeda, A., Tsukuda, M., Mizumoto, H., Okamoto, K., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. (2005) A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO J.* **24**, 3147-3157
57. Powers, J. G., Sit, T.L., Heinsohn, C., George, C. G., Kim, K. H., and Lommel, S. A. (2008a) The *Red clover necrotic mosaic virus* RNA-2 encoded movement protein is a second suppressor of RNA silencing. *Virology* **381**, 277-286

58. Castaño, A., and Hernández, C. (2007) Biological activity of transcripts from cDNA of *Pelargonium line pattern virus*. *Acta Virol.* **51**, 271-274
59. Knoester, M., van Loon, L. C., van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J. F., and Linthorst, H. J. M. (1998) Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 1933–1937
60. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (3rd ed.)
61. Powers, J. G., Sit, T. L., Qu, F., Morris, T. J., Kim, K. H., and Lommel, S. A. (2008b) A versatile assay for the identification of RNA silencing suppressors based on complementation of viral movement. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21**, 879-890
62. González, I., Martínez, L., Rakitina, D. V., Lewsey, M. G., Atencio, F. A., Llave, C., Kalinina, N. O., Carr, J. P., Palukaitis, P., and Canto, T. (2010) *Cucumber mosaic virus* 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**, 294-303
63. Kim, S., MacFarlane, S., Kalinina, N., Rakitina, D., Ryabov, E., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J., and Taliansky, M. (2007) Interaction of a plant virus encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 11115-11120

64. Verwoerd, T. C., Dekker, M. M., and Hoekema, A. (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* **17**, 2362
65. Ivars, P., Alonso, M., Borja, M., and Hernández, C. (2004) Development of a non-radioactive dot-blot hybridisation assay for the detection of *Pelargonium flower break virus* and *Pelargonium line pattern virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* **110**, 275-283
66. Martínez-Turiño, S., and Hernández, C. (2011) A membrane-associated movement protein of *Pelargonium flower break virus* shows RNA binding activity and contains a biologically relevant leucine zipper-like motif. *Virology* **413**, 310-319
67. Johansen, L. K., and Carrington, J. C. (2001) Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* **126**, 930-938
68. Chen, H. Y., Yang, J., Lin, C., and Yuan, Y. A. (2008) Structural basis for RNA-silencing suppression by *Tomato aspermy virus* protein 2b. *EMBO Rep.* **9**, 754-760
69. Vaewhongs, A. A., and Lommel S. A. (1995) Virion formation is required for the long-distance movement of *Red clover necrotic mosaic virus* in movement protein transgenic plants. *Virology* **212**, 607-613
70. Cao, M., Ye, X., Willie, K., Lin, J., Zhang, X., Redinbaugh, M. G., Simon, A. E., Morris, T. J., and Qu, F. (2010) The capsid

- protein of *Turnip crinkle virus* overcomes two separate defense barriers to facilitate systemic movement of the virus in *Arabidopsis*. *J. Virol.* **84**, 7793-7802
71. Valli, A., Dujovny, G., and García, J. A. (2008) Protease activity, self interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor P1b from Cucumber vein yellowing ipomovirus. *J. Virol.* **82**, 974-986
72. Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S., and Okuno, T. (2002) Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Lett.* **532**, 75–79
73. Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X., and Ding, S. W. (2000) Suppression of posttranscriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.* **19**, 1672–1680
74. Wang, Y., Tzfira, T., Gaba, V., Citovsky, V., Palukaitis, P., and Gal-On, A. (2004) Functional analysis of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein: pathogenicity and nuclear localization. *J. Gen. Virol.* **85**, 3135-3147
75. Xu, A., Zhao, Z., Chen, W., Zhang, H., Liao, Q., Chen, J., Carr, J. P., and Du, Z. (2013) Self-interaction of the cucumber mosaic virus 2b protein plays a vital role in the suppression of RNA silencing and the induction of viral symptoms. *Mol. Plant Pathol.* **14**, 803-812

-
76. Hamera, S., Song, X., Su, L., Chen, X., and Fang, R. (2012) *Cucumber mosaic virus* suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J.* **69**, 104-115
 77. Thomas, C. L., Leh, V., Lederer, C., and Maule, A. J. (2003) *Turnip crinkle virus* coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* **306**, 33-41
 78. González, I., Rakitina, D., Semashko, M., Taliansky, M., Praveen, S., Palukaitis, P., Carr, J. P., Kalinina, N., and Canto, T. (2012) RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of *Cucumber mosaic virus* 2b protein than nuclear localization. *RNA* **18**, 771-782
 79. Chiba, S., Hleibieh, K., Delbianco, A., Klein, E., Ratti, C., Ziegler-Graff, V., Bouzoubaa, S., and Gilmer, D. (2013) The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* **26**, 168-181
 80. Ruiz-Ruiz, S., Soler, N., Sánchez-Navarro, J., Fagoaga, C., López, C., Navarro, L., Moreno, P., Peña, L., and Flores, R. (2013) Citrus tristeza virus p23: determinants for nucleolar localization and their influence on suppression of RNA silencing and pathogenesis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **26**, 306-318
 81. Bragg, J. N., and Jackson, A. O. (2004) The C-terminal region of the *Barley stripe mosaic virus* Υ b protein participates in

- homologous interactions and is required for suppression of RNA silencing. *Mol. Plant Pathol.* **5**, 465-481
82. Duan, C. G., Fang, Y. Y., Zhou, B. J., Zhao, J. H., Hou, W. N., Zhu, H., Ding, S. W., and Guo, H. S. (2012) Suppression of Arabidopsis ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the Cucumber mosaic virus 2b protein. *Plant Cell* **24**, 259-274.
83. Vogler, H., Akbergenov, R., Shivaprasad, P.V., Dang, V., Fasler, M., Kwon, M.O., Zhanybekova, S., Hohn, T., and Heinlein, M. (2007) Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by tobamovirus replicase protein. *J. Virol.* **81**, 10379-10388
84. Endres, M. W., Gregory, B. D., Gao, Z., Foreman, A. W., Mlotshwa, S., Ge, X., Pruss, G. J., Ecker, J. R., Bowman, L. H., and Vance, V. (2010) Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathog.* **6**, e1000729
85. Dalmay, T., Rubino, L., Burgyán, J., and Russo, M. (1992) Replication and movement of a coat protein mutant of cymbidium ringspot tobravirus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **5**, 379-383
86. Hacker, D. L., Petty, I. T., Wei, N., and Morris, T.J. (1992) Turnip crinkle virus genes required for RNA replication and virus movement. *Virology* **186**, 1-8

87. Molnár, A., Havelda, Z., Dalmay, T., Szutorisz, H., and Burgyán, J. (1997) Complete nucleotide sequence of *Tobacco necrosis virus* strain DH and genes required for RNA replication and virus movement. *J. Gen. Virol.* **78**, 1235-1239
88. Reade, R., Miller, J., Robbins, M., Xiang, Y., and Rochon, D. (2003) Molecular analysis of the *Cucumber leaf spot virus* genome. *Virus Res.* **91**, 171-179
89. Rubino, L., and Russo, M. (1997) Molecular analysis of the *Pothos latent virus* genome. *J. Gen. Virol.* **78**, 1219-1226
90. Sit, T. L., Johnston, J. C., Ter-Borg, M. G., Frison, E., McLean, M. A., and Rochon, D. (1995) Mutational analysis of the *Cucumber necrosis virus* coat protein gene. *Virology* **206**, 38-48
91. Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W., and Baulcombe, D. C. (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **16**, 6739-6746
92. Jay, F., Wang, Y., Yu, A., Taconnat, L., Pelletier, S., Colot, V., Renou, J. P., and Voinnet, O. (2011) Misregulation of AUXIN RESPONSE FACTOR 8 underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in *Arabidopsis*. *PLoS Pathog.* **7**, e1002035
93. Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., Carrington, J. C. (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev. Cell* **4**, 205-217

94. Alonso, M., and Borja, M. (2005) High incidence of *Pelargonium line pattern virus* infecting asymptomatic *Pelargonium* spp. in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* **112**, 95-100

CAPÍTULO 2

**New insights into the nucleolar localization of
a plant RNA virus-encoded protein that acts
in both RNA packaging and RNA silencing
suppression: involvement of importins alpha
and relevance for viral infection**

Miryam Pérez-Cañamás, Carmen Hernández*

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Politécnica de Valencia). Ciudad Politécnica de la Innovación, Ed. 8E. Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, (Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Politécnica de Valencia), Ciudad Politécnica de la Innovación, Ed. 8E. Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

Phone: 34-96-3877869

E-mail: cahernan@ibmcp.upv.es

Molecular Plant-Microbe Interactions (2018)

Volume 31, Number 11, Pages 1134-1144

(Cover MPMI, november 2018)

ABSTRACT

Despite replication of plus strand RNA viruses takes place in the cytoplasm of host cells, different proteins encoded by these infectious agents have been shown to localize in the nucleus, with high accumulation at the nucleolus. In most cases, the molecular determinants and/or biological significance of such subcellular localization remain elusive. Recently, we reported that protein p37 encoded by *Pelargonium line pattern virus* (family *Tombusviridae*) acts in both RNA packaging and RNA silencing suppression. Consistently with these functions, p37 was detected in the cytoplasm of plant cells though it was also present in the nucleus and, particularly, in the nucleolus. Here, we have aimed to gain further insights into factors influencing p37 nucleolar localization and into its potential relevance for viral infection. Besides mapping the protein region containing the nucleolar localization signal, we have found that p37 interacts with distinct members of the importin alpha family -main cellular transporters for nucleo-cytoplasmic traffic of proteins-, and that these interactions are crucial for nucleolar targeting of p37. Impairment of p37 nucleolar localization through down-regulation of importin alpha expression resulted in a reduction of viral accumulation, suggesting that sorting of the protein to the major subnuclear compartment is advantageous for the infection process.

INTRODUCTION

Viruses, as obligate intracellular parasites, must employ many cellular resources to establish productive infections. Despite the replication of plus strand (+) RNA viruses (either from plants or animals) occurs in the cytoplasm of host cells, distinct proteins encoded by these infectious agents have been reported to enter the nucleus showing, some of them, high accumulation at the nucleolus (Hiscox 2007; Salvetti and Greco 2014; Taliansky *et al.*, 2010). In most cases, the biological meaning of such subcellular localization remains obscure. Moreover, information on the structural determinants and/or host factors that are involved in the nuclear/nucleolar targeting of the corresponding protein is frequently scarce.

Current knowledge indicates that nucleo-cytoplasmatic trafficking of most proteins is an active process that takes place through the nuclear pore complex (NPC) and usually follows the classical import pathway. In this pathway, proteins destined for transport to the nucleus contain a so-called nuclear localization signal (NLS) within their primary sequence that is recognized by heterodimeric nuclear-cytoplasmic shuttling receptor consisting of importin alpha and importin beta. Importin alpha component plays a central role as adaptor molecule mediating interaction between the cargo and importin beta which, in turn, facilitates passage of the cargo-importin alpha transient complex through the central transporter of NPC (MacPherson *et al.*, 2015). Once inside the nucleus, some proteins remain in the nucleoplasm whereas others associate to subnuclear bodies being the nucleolus the most prominent one with a typical size that can reach up to 8 μm . Nucleolus has a well-known role in rRNA transcription,

processing and ribosome biogenesis but in the last years it has been involved in a growing number of additional functions including cell cycle regulation, gene silencing, senescence, stress responses, and biogenesis of multiple kinds of ribonucleoprotein (RNP) particles (Boisvert *et al.*, 2007; Olson and Dundr 2015; Shaw 2015). The localization of proteins to the nucleolus has not been shown to involve active transport mechanisms and is typically dictated by interaction with nucleolar core components, yet in most of the cases depends on the presence of nucleolar localization signal(s) (NoLSs) (Carmo-Fonseca *et al.*, 2000; Emmott and Hiscox, 2009; Martin *et al.*, 2015).

Pelargonium line pattern virus (PLPV) is a (+) RNA virus which belongs to a new genus *-Pelarspovirus-* within the broad family *Tombusviridae* (Castaño and Hernández 2005; Castaño *et al.*, 2009; Scheets *et al.*, 2015). Its monopartite genome encodes five proteins, one of which, with a molecular weight of 37 kDa (p37), has been reported to act as both coat protein (CP) and viral RNA silencing suppressor (VSR) (Pérez-Cañamás and Hernández 2015). Analysis of the subcellular distribution of a green fluorescent protein (GFP)-tagged p37 transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* leaves showed that p37 localizes in the cytoplasm of plant cells (Pérez-Cañamás and Hernández 2015). However, though no NLS (nor NoLS) could be predicted in the protein by *in silico* approaches, GFP-tagged p37 was also found inside the nucleus, with preponderant accumulation at the nucleolus. The biological implications of the nuclear/nucleolar targeting of p37 are so far uncertain as, apparently, it does not significantly influence either of the two identified functions of the protein, encapsidation and RNA silencing suppression (Pérez-Cañamás and Hernández 2015). Such targeting could thus be related with

unknown roles of the protein during the infection process or, alternatively, with some host defence mechanism aimed to reduce VSR impact on host endogenous pathways and/or to restrict viral infection by precluding encapsidation and antiviral silencing inhibition. Indeed, recent results suggest that the VSR activity of PLPV must be tightly regulated during infection as the virus is a very efficient target of RNA silencing (Pérez-Cañamás *et al.*, 2017).

Here we have intended to get further insights into the molecular determinants for nuclear/nucleolar localization of PLPV p37. Firstly, we have studied the subcellular distribution of untagged p37 in the context of a real viral infection. Secondly, we have attempted to delimit the boundaries of the structural motif directing p37 to nucleolus. Thirdly, we have explored, through bimolecular fluorescence complementation (BiFC) and RNA interference (RNAi) assays, the potential involvement of importins alpha in nuclear/nucleolar targeting of p37. As such participation has been confirmed, we have tackled whether down-regulation of importins alpha, leading to impairment of the nuclear/nucleolar targeting of p37, has any effect on virus accumulation. On the basis of the obtained results, presumptive roles of the subcellular partitioning of PLPV p37 are further discussed.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

N. benthamiana plants were grown from seeds in the greenhouse, under a 16 h photoperiod and temperatures of 24 °C and 20 °C during day and night, respectively.

DNA constructs

For PLPV inoculation, a pMOG800-based binary construct containing an infectious cDNA flanked by the *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter and the terminator sequence of the *Solanum tuberosum* proteinase inhibitor II gene (PoPit), was used (Castaño *et al.*, 2009).

For protein subcellular localization assays, a pMOG800-based binary construct containing an expression cassette with the p37 gene either unfused or fused in frame to the 5' end of the GFP gene and flanked by the CaMV 35S promoter and the PoPit, has been described previously (Pérez-Cañamás and Hernández 2015). Selected regions of the p37 gene were PCR amplified with KAPA HiFi DNA polymerase (Kapa Biosystems) and suitable oligonucleotide primers to generate, following standard cloning procedures, similar pMOG800-based constructs for expression of truncated versions of p37 fused to the GFP. Binary constructs for expression of fibrillarin fused to mRFP (used as nucleolar marker) or of the tombusvirus p19 (used for VSR function in some experiments), have been described somewhere else (Kim *et al.*, 2007; Martínez-Turiño and Hernández 2009).

For BiFC assays, pROK2-sYFPN and pROK2-sYFPC-based plasmids directing expression of the p37 fused to the N- and C-terminal halves of the sYFP (aa 1 to 154 and 155 to 238, respectively) have been reported previously (Pérez-Cañamás and Hernández 2015). Similar pROK2-based constructs were generated for representative members of the importin alpha family. Specifically, sequences from the five importins alpha depicted in colours in Fig. 3A (representative of subclades Ia, Ib, and Ic and clades II and III, respectively) were

retrieved from the Sol Genomics Network database (<http://solgenomics.net/>) to design specific oligonucleotide primers that were used to amplify the corresponding full-length genes through RT-PCR using SuperScript III One-Step RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific) and total RNA extracts from *N. benthamiana* as templates. The primers included appropriate restriction sites to facilitate cloning of the amplified cDNA into pROK2-sYFPN and pROK2-sYFPC plasmids.

For co-immunoprecipitation assays, the importins alpha representatives of subclade Ia and clade III were PCR amplified from the corresponding BiFC constructs using KAPA HiFi PCR kit (Kapa Biosystems) and specific oligonucleotide primers derived from the 5' and 3' gene termini. The reverse primers contained 5'-extra nucleotides encoding six His in order to fuse a His tag to the C-terminus of the gene products. In addition, forward and reverse primers harboured proper restriction sites to help cloning of the amplified genes into pMOG800 vector under the control of CaMV 35S promoter and PoPit terminator.

For RNAi assays, cDNA fragments were RT-PCR amplified from conserved regions of the importin alpha genes belonging to each phylogenetic clade/subclade (Ia, Ib, Ic, II and III). Five cDNAs were generated using specific oligonucleotides bearing proper restriction sites at their 5'-end which expedited their insertion into pHANNIBAL vector (Wesley *et al.*, 2001). After digestion with the corresponding restriction enzymes, each DNA fragment was inserted in sense and antisense orientation flanking, respectively, the pyruvate dehydrogenase kinase intron present in pHANNIBAL vector. The resulting hairpin expression cassettes, that included a CaMV 35S

promoter and an *A. tumefaciens* octopine synthase gene terminator, were cut out by NotI digestion and inserted into the unique NotI site of binary plasmid pCLEAN-G181 (Thole *et al.*, 2007). The empty pHANNIBAL NotI cassette was also inserted into pCLEAN-G181 to produce a control plasmid pChpEMPTY.

All constructs were routinely sequenced with an ABI PRISM DNA sequencer 377 (Perkin-Elmer) to corroborate the validity of the selected recombinant plasmids. The primers used to generate the distinct recombinant constructs are listed in Supplementary Table 1.

Agrobacterium-mediated transient gene expression and virus inoculation

Binary plasmid constructs were transformed into *A. tumefaciens* strain C58C1 CH32 by the freeze/thaw shock method. Cultures of *A. tumefaciens* harbouring the different Ti plasmids were infiltrated at an OD₆₆₀ of 0.5 on the abaxial side of *N. benthamiana* leaves (5 weeks old) using a 20 ml needleless syringe. When co-infiltrating distinct bacterial cultures, equal amounts of such cultures were mixed before infiltration (final OD₆₆₀ of the mixed culture = 0.5). In the case of RNAi experiments, leaves were firstly infiltrated with importin alpha hairpin constructs (individually or combined) or the empty control construct and, 5 d.p.if., the same leaves were agroinfiltrated with pMOG-derived construct for expression of either GFP-tagged or untagged p37 or for PLPV inoculation (OD₆₆₀= 10⁻⁴). The infiltrated plants were kept under greenhouse conditions and leaf samples were taken at distinct times after infiltration.

Confocal microscopy

In BiFC and subcellular localization assays, GFP, mRFP or reconstituted sYFP fluorophores of tagged proteins were monitored in epidermal cells of *N. benthamiana*-infiltrated tissue at 72 h post-infiltration using a Leica TCS SL confocal microscope with an HCX PL APO $\times 40/1.25-0.75$ oil CS objective. GFP and sYFP fluorescence was recorded by excitation with 488 nm argon laser line with emission being collected through band-pass filter from 505 to 550 nm. In the case of mRFP, excitation was performed by means of a 543-nm green-neon laser line, and fluorescence emission was collected at 610 to 630 nm.

RNA extraction and Northern blot analysis

Total RNA preparations from *N. benthamiana* leaves were obtained by phenol extraction and lithium precipitation (Verwoerd *et al.*, 1989). For Northern blot analysis, 4 μg total RNA was denatured by glyoxal-dimethyl sulfoxide treatment, electrophoresed in 1% agarose gels and blotted to nylon membranes (Hybond N+; GE Healthcare). After UV-crosslinking, membranes were incubated at 70 °C, in the presence of 50% formamide, with a ^{32}P -radioactive RNA probe for detection of PLPV RNAs. Such probe was generated by *in vitro* transcription of a pBluescript KS(+)-based construct containing the PLPV p37 gene (nt 2621–3637 of PLPV genome). After hybridization, membranes were washed at room temperature for three times (10 min each) in $2\times\text{SSC}$ plus 0.1% SDS, and once at 55 °C in $0.1\times\text{SSC}$ plus 0.1% SDS.

Semi-quantitative and RT-qPCR

Total RNA preparations with a RIN (RNA integrity number, Agilent) equal to or greater than 7 were treated with Turbo DNase (ThermoFisher). Assessment of down-regulation of importin alpha gene expression in RNAi assays through semiquantitative RT-PCR was performed as follows. One μg of treated total RNA per each sample was subjected to RT-PCR amplification with SuperScript III One-Step RT-PCR System and a pair of specific primers that yielded a cDNA embracing a region of the importin alpha gene(s) different to that cloned into the corresponding hairpin construct(s) (Supplementary Table I). The number of cycles for PCR amplification ranged from 20 to 30 and simultaneous amplification of an actin gene fragment was performed as internal control. RT-qPCR was employed in some RNAi assays to compare viral titers and to confirm silencing of importin alpha. To this aim, total RNA preparations, treated as indicated above, were reverse transcribed (1 μg per reaction) with PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time, Takara) using either an oligo-dT primer (to generate cDNAs for subsequent PCR amplification of protein phosphatase 2A -PP2A- gene, employed as internal control, and importin alpha 1 gene) or, since PLPV RNAs lack a poly(A) tail at the 3' end, a combination of an oligo-dT primer and a PLPV specific primer (to generate cDNAs for subsequent PCR amplification of PP2A gene and of a virus genome fragment, respectively). Design of primers for PCR was performed with Primer-Express 2.0 software (Applied Biosystems) using the following criteria: melting temperature ranging from 50°C to 60°C, PCR amplicon lengths of 100 to 200 bp, length of primer sequences of 19 to 25 nucleotides, and guanine-cytosine content of 40% to 60% (Supplementary Table I). Master mix for qPCR was

prepared with 5x PyroTaq EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) (Cultek Molecular Bioline). Three biological replicates (with three technical replicates each) were performed for every type of sample. The PCR reactions were run and analyzed using the ABI PRISM 7700 Sequence detection system (Applied Biosystems Inc., Life Technologies Corp.) and evaluation of the relative expression level of each gene was carried out with the relative expression software tool (REST) designed by Qiagen (Hilden, Germany).

Subcellular fractionation and Western blot analysis.

Subcellular fractionation of the leaf extracts was carried out as described previously for *Solanaceae* (Sikorskaite *et al.*, 2013). Briefly, 5 g leaf material was grinded with liquid nitrogen and the resulting leaf powder was thoroughly mixed with 5 volumes of NIB buffer (10 mM MES-KOH -pH 5.4-, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 2.5 mM EDTA, 250 mM sucrose, 0.1 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 1 mM DTT). The homogenate was filtered through three layers of Miracloth and the recovered solution (initial extract, IE) was further clarified by addition of Triton X-100 until a final concentration of 0.5 % in order to accomplish lysis of contaminating organelles. After incubation for 20 min at 4 °C, the homogenate was centrifuged at 1,000 x g for 10 min, the supernadant was removed (cytoplasmic fraction, Cit) and the pellet was gently resuspended in 10 ml NIB buffer. The crude preparation of nuclei was then loaded on a cushion formed by two layers of 2.5 M sucrose and 60 % Percoll, respectively. Following centrifugation at 1,000 x g for 10 min, the 60 % Percoll layer, that contained most of the nuclei, was collected and diluted with 5 volumes of NIB. After addition

of Triton X-10 to a final concentration of 0.5 %, the sample was incubated for 10 min at 4 °C, centrifuged at 1,000 x g for 10 min and the resulting pellet was resuspended in 5 ml of NIB. The nuclei preparation was then overlaid on a 35% Percoll cushion, and after centrifugation at 1,000 x g for 10 min, the pellet was washed with NIB and finally resuspended in nuclei storage buffer NBS (20% glycerol, 20 mM HEPES KOH, pH 7.2, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) (nuclear fraction, Nuc).

For Western blot analysis, aliquots of the obtained fractions were subjected to SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Roche) and immunoblotted with antisera against p37 (AS-0094, DSMZ) at 1:5,000 dilution, antibody against histone 3 (AS10710, Agrisera) at 1:6,000 dilution or antibody against UDP-glucose pyrophosphorylase (AS05086, Agrisera) at 1:3,000 dilution. Goat anti-rabbit HRP conjugated (AS09602, Agrisera) at 1:10,000 dilution was used as secondary antibody and immunoreactive bands were revealed with chemiluminescence ECL Plus kit following supplier's recommendations (GE Healthcare). Signals were recorded by autoradiography and quantified with the aid of a FujiFilm LAS3000 Imager.

Co-immunoprecipitation assays

N. benthamiana leaves agroinfiltrated with proper binary constructs and collected at 3-5 d.p.if. were ground to a fine powder with liquid nitrogen and homogenized in 4 ml/g IP buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM KCl, 100 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin, 25 mM PMSF and one tablet of complete

proteinase inhibitor cocktail [Roche Life Science]). Cell debris were removed by centrifugation at 12,000 x g for 15 min at 4 °C twice and clarified lysates were incubated with 4 µg/ml of His-probe antibody (H-3, Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at 4 °C and then with 100 µl/ml of protein A/G agarose beads (Roche Life Science) for 2 h with mild rotation. Beads were recovered by centrifugation at 500 x g and washed six times with IP buffer for 10 min at 4 °C. Proteins were eluted of 2X protein loading buffer (1.25 M Tris, pH 6.8, 10% SDS, 80% glycerol, 10% β-mercaptoethanol, and 0.02% bromophenol blue) after heating at 95 °C for 3 min. Western blot analysis of protein inputs and immunoprecipitates for detection of p37 was performed as indicated above. His-tagged importins were detected similarly using the mouse monoclonal His-probe antibody H-3 at 1:5,000 dilution as primary antibody and sheep anti-mouse IgG HRP conjugated (NA931, GE Healthcare) at 1:10,000 dilution as secondary antibody.

Phylogenetic and sequence analyses

The sequences for *N. benthamiana* importin alpha proteins were retrieved from the Sol Genomics Network database (<http://solgenomics.net/tools/blast/index.pl>). The Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA7) software was used for aligning sequences using the ClustalW algorithm and preparing the tree (Kumar *et al.*, 2016). Bootstrap values were calculated from 1,000 replicates of the tree. GenBank and Sol Genomics Network accession numbers are indicated on the phylogenogram.

RESULTS

PLPV p37 produced during viral infection shows cytoplasmic and nuclear/ nucleolar distribution paralleling that found for transiently expressed GFP-tagged p37

The pattern of subcellular distribution of a protein may be affected by multiple factors and can undergo substantial alterations in response to environmental conditions (Görner *et al.*, 1998; Henke *et al.*, 2011; Noiro *et al.*, 2014). Moreover, incorporation of a tag into a protein may have a significant impact in protein's actual behavior (Bouia *et al.*, 2001; Brothers *et al.*, 2003; Ledent *et al.*, 1997). As mentioned above, previous work showed that transiently expressed GFP-tagged p37 localized in the cytoplasm and the nucleus/nucleolus of plant cells (Pérez-Cañamás and Hernández 2015). We wondered whether this intracellular distribution could be extrapolated seamlessly to the unfused protein and, moreover, to that produced in the course of a real infection. To answer this question, systemic leaves from PLPV-infected *N. benthamiana* plants were used as starting material to obtain cytoplasm- and nuclei-enriched fractions. For comparison purposes, *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with constructs for transient expression of GFP-tagged or untagged p37, and, three days after infiltration (d.p.if.), this plant material was used to prepare the same type of fractions. Western blot analysis of the obtained samples using an antibody against UDP-glucose pyrophosphorylase (UDP, cytoplasmic marker) and Histone 3 (H3, nuclear marker) supported the reliability of the fractionation since the former protein was detectable in the cytoplasmic fractions but undetectable in the nuclear ones and the opposite was found for the latter (Fig. 1). Analysis of samples prepared

from leaves expressing GFP-tagged p37 with a p37-specific antibody revealed the presence of the fusion protein in both the cytoplasmic and the nuclear fractions (Fig. 1, left panel), in agreement with the results of confocal microscopy examinations (Pérez-Cañamás and Hernández 2015). Similarly, untagged p37 expressed either transiently through agroinfiltration or during viral infection was distributed between cytoplasmic and nuclear fractions (Fig. 1, central and right panels). These observations further substantiated previous results on the subcellular localization of the p37 and indicated that neither the tag nor the context of viral infection has a significant impact on the distribution of the protein within the cell.

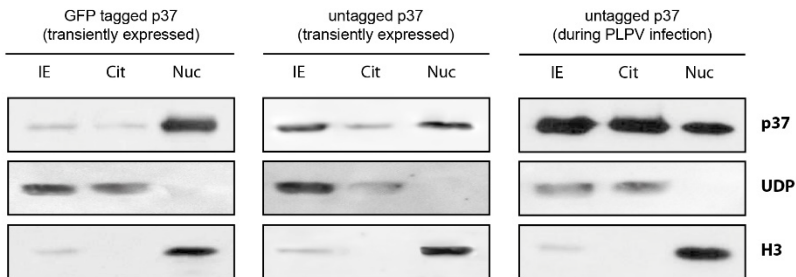
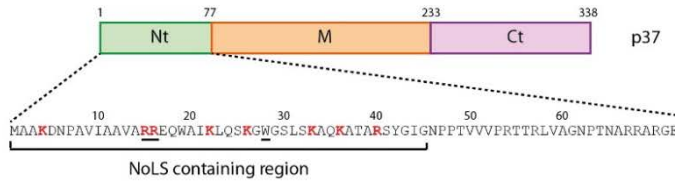


FIGURE 1. Analysis of p37 localization through subcellular fractionation and Western blot analysis. Aliquots of input extracts (IE), cytoplasmic fractions (Cit) and nuclear fractions (Nuc), were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis using either an anti-p37 (upper row), anti-UDP (middle row) or anti-H3 (lower row) antibody. Extracts were prepared from *N. benthamiana* leaves transiently expressing a GFP-tagged p37 (left panel) or an untagged p37 (central panel), or from systemic leaves (right panel) of PLPV-infected *N. benthamiana*. Positions of p37, UDP and H3 are indicated at the right.

Nucleolar targeting of p37 is directed by a short stretch of N-terminal amino acid residues

Though programs for subcellular localization prediction did not recognize any NoLS (nor NLS) in the p37 molecule, previous mutational analysis suggested that non-conventional NoLS(s) must be present at the N-terminus of the protein and identified several amino acid residues (aa) relevant for the nucleolar localization. Specifically, alanine replacement of either two arginines at positions 15 and 16, respectively, or of a tryptophan at position 28 in the GFP-tagged p37, abolished nucleolar localization of the fusion protein (Pérez-Cañamás and Hernández 2015) (Fig. 2A). In order to corroborate the involvement of the N-terminal region of p37 in nucleolar targeting and to discard the contribution of other protein segments to localization in such subnuclear compartment, the N-terminal (aa 1-77), middle (aa 78-232) and C-terminal (aa 233-338) domains of p37 were separately fused in frame to GFP. The resulting recombinant proteins were transiently expressed, along with monomeric red fluorescent protein (mRFP)-tagged fibrillarin (used as nucleolar marker; Kim *et al.*, 2007), in *N. benthamiana* leaves via agroinfiltration. Assessment of the subcellular distribution of the GFP-tagged proteins through confocal microscopy showed that only that embracing the N-terminal domain retained the nucleolar localization (p37₁₋₇₇:GFP in Fig. 2), confirming that this domain contains the signal(s) that direct p37 to nucleoli. To further delimit the p37 region that is required for nucleolar targeting, various deletions were introduced into the N-terminal domain to create a new series of GFP fusion proteins. These proteins included, respectively, aa 1-60, 1-45, 1-32 and 13-45 of the p37 molecule (Fig. 2). Inspection of the subcellular distribution of the engineered proteins showed that the

A



B

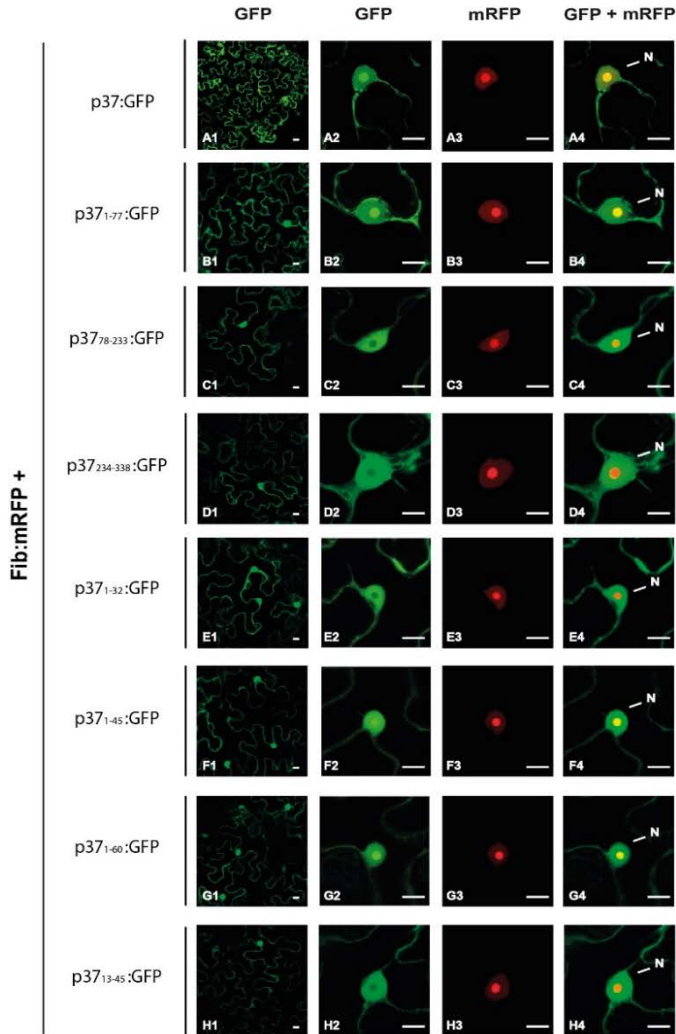


FIGURE 2. Subcellular distribution of p37-deletion derivatives with a C-terminal GFP tag. (A) Schematic representation of PLPV p37 indicating the boundaries of the N-terminal (Nt), middle (M) and C-terminal (Ct) domains. Amino acid (aa) sequence of the N-terminal domain is detailed at the bottom; the aa stretch that has been determined here as sufficient for nucleolar localization is within a square bracket, basic aa residues are in red and aa residues that were previously shown to be essential for nucleolar localization of a GFP-tagged p37 (Pérez-Cañamás & Hernández 2015) are underlined. (B) Confocal microscopy images showing the subcellular distribution of GFP-tagged p37 (p37:GFP) and deletion derivatives (p37₁₋₇₇, p37₇₈₋₂₃₂, p37₂₃₃₋₃₃₈, p37₁₋₆₀, p37₁₋₄₅, p37₁₋₃₂, and p37₁₃₋₄₅:GFP) transiently expressed in *N. benthamiana* cells. The GFP-tagged proteins were expressed along with an mRFP-tagged fibrillarin (Fib-mRFP, nucleolar marker). Micrographs of the first column (starting from the left) show a general view of GFP-derived fluorescence in epidermal cells expressing the distinct proteins. Micrographs of the second and third columns show close-up view of GFP- and mRFP-derived fluorescence, respectively, in individual cells and micrographs of the fourth column show merged images of GFP and mRFP signals in such individual cells. The nucleus (N) is marked by an arrow in fourth column panels. The *inset* scale bar corresponds to 10 μ m in all panels.

stretch harbouring the most N-terminal 45 aa was sufficient for nucleolar localization (p37₁₋₄₅:GFP in Fig. 2B). Additional deletions of N-terminal (p37₁₃₋₄₅:GFP) or C-terminal (p37₁₋₃₂:GFP) amino acids led to nucleolar exclusion (Fig. 2B). Collectively, the results allowed us to delimit the NoLS-containing region of p37 to the first N-terminal 45 aa which, moreover, was consistent with previous outcomes with p37 mutants (Pérez-Cañamás and Hernández 2015).

PLPV p37 interacts with distinct importins alpha

As indicated above, nucleo-cytoplasmatic trafficking of proteins takes place through the NPC and usually follows the classical import pathway in which members of importin alpha family play a central role. In *N. benthamiana*, this family is composed by fourteen members that can be grouped in three major phylogenetic clusters (I, II

and III), the first of which can be further subdivided into three subclusters (Ia, Ib, Ic) (Fig. 3A). In order to assess whether p37 importins alpha are able to recognize p37 to mediate its transport to the nucleus and, in turn, the nucleolus, we explored, through BiFC assays, potential interactions between p37 and representatives of the distinct clusters/subclusters of importin alpha family. To this end, constructs for transient expression of five different importins alpha (belonging to subclusters Ia, Ib and Ic, and clusters II and III, respectively) fused to the N- or C-terminal part of the superyellow fluorescent protein (sYFP) were generated. These constructs were used in proper combinations with others allowing transient expression of p37 fused to the N- or C-terminal part of sYFP (Pérez-Cañamás and Hernández 2015). *N. benthamiana* cells co-expressing sYFPN-p37 and any of the sYFPC-importin alpha members showed clear sYFP-derived fluorescence indicating reconstitution of the fluorophore and, thus, demonstrating that p37 is able to interact with members of the importin alpha family included into distinct clusters/subclusters (Fig. 3B). Similar results were obtained with reverse protein combinations, i.e., when sYFPC-p37 was co-expressed with any of the sYFPN-importin alpha fusion proteins (data not shown). Moreover, control experiments in which the distinct fusion proteins were co-expressed with unfused sYFP halves (example in row F of Fig. 3B) did not result in any significant fluorescence, reinforcing the validity of detected interactions. Interestingly, in most cases the fluorescence was essentially localized in the nucleus and particularly concentrated at the nucleolus suggesting that the interaction between the two partners, p37 and importin alpha of any type, mostly occurs and/or is maintained in this subnuclear body. The only exception corresponded to the importin alpha representative

of clade III for which the interaction with p37 was detected not only in the nucleus and nucleolus, but also in the cytoplasm (row E in Fig. 3B). In addition, the latter interaction was apparently weaker than that observed with the remaining importins alpha included in the study, though reconstituted fluorescence was clear when compared with the results of negative controls (images of row E *versus* that of row F in Fig. 3B).

Besides the BiFC approach, a co-immunoprecipitation assay was performed to further corroborate the interaction of p37 with importin alpha of clade III. To this aim, the importin alpha representative of clade III and also that of subclade Ia, used as positive control, were fused in frame to an histidine (His) tag and transiently expressed in *N. benthamiana* leaves along with p37. After protein extraction, immunoprecipitates were obtained using an antibody against the His tag. Western blot analysis with the anti-His antibody revealed the presence of importins alpha of clade III and subclade Ia in the corresponding immunoprecipitates, as expected (Fig. 3C, upper panels). Remarkably, p37 was also present in those immunoprecipitates, confirming the interaction between both types of proteins as showed by the BiFC assays (Fig. 3C, lower panels). No p37 was detected when neither importin alpha was included in the input extracts supporting the reliability of the immunoprecipitation procedure (Fig. 3C). Collectively, the results of this section indicated, on one side, that p37 is able to interact with members of all groups of importin alpha family, and, on the other, that such interaction takes place mainly at the nucleus and, especially, at the nucleolus. It is worth mentioning that mRFP-tagged importin alpha proteins, at least those corresponding to the representative members of subclades Ia and Ib (also annotated as

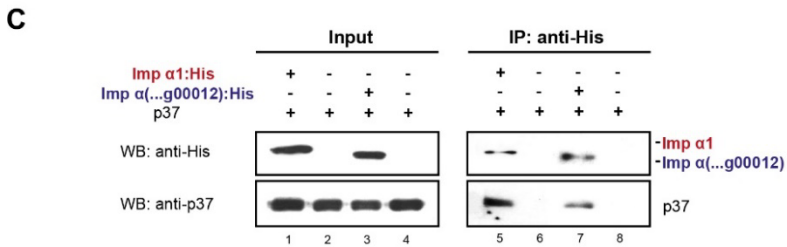
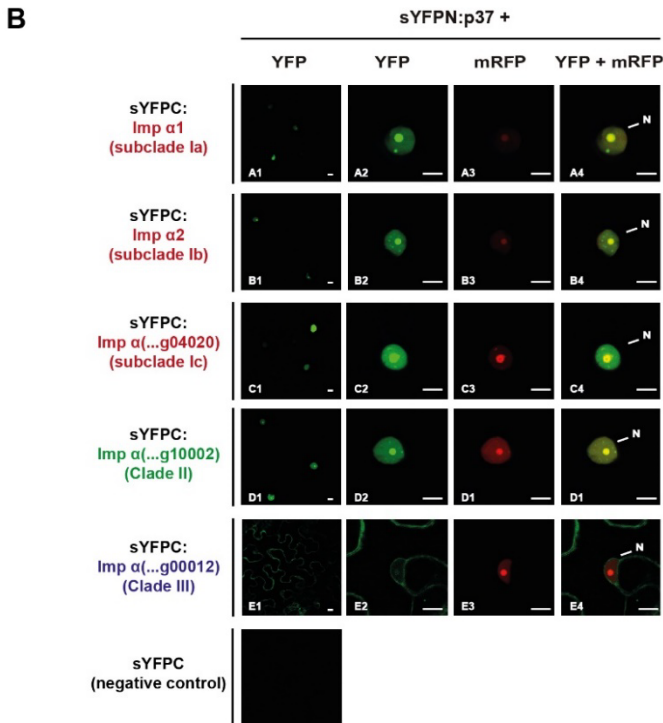
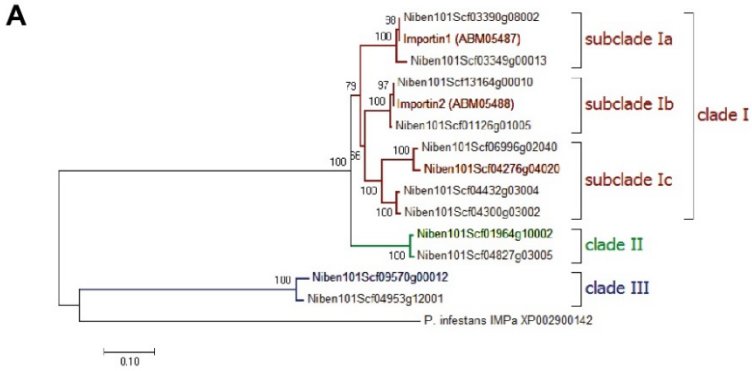


FIGURE 3. Analysis of potential interaction(s) between p37 and representative members of importin alpha family through BiFC and co-immunoprecipitation assays. A) Phylogenetic tree of the fourteen members of importin alpha family encoded by *N. benthamiana*. Alignments were made using ClustalW and the trees was generated by neighbor-joining (N-J) method using complete deletion treatments with MEGA7. Numbers at branches show the percentage bootstrap support (if >50 %) for 1,000 replicates. The scales indicate JTT amino acid distances. *Phytophthora infestans* importin alpha was used as outgroup. Numbers represent accessions from the Sol genomics database and GenBank accession numbers. The layout of the tree was essentially identical to that obtained by Lukhovitskaya *et al.*, (2016) with sequences retrieved from Sol Genomics Network though, in the present case, an updated version of the database has been used for phylogenetic analysis. Importins alpha employed in this study as representatives of clade I, II and III, respectively, are denoted in red, green and blue. B) p37 and importin alpha molecules were tagged at their N-terminus with sYFP halves (sYFPN and sYFPC) and transiently co-expressed in *N. benthamiana* leaves to study protein-protein interactions through a BiFC assay. An mRFP-tagged fibrillar (Fib-mRFP), employed as nucleolar marker, was also co-expressed. Confocal laser-scanning microscopy was used for the observation of fluorescence at 3 d.p.if. For each protein combination, micrographs at the left show a general view of YFP-derived fluorescence in epidermal cells (*inset* scale bar, 10 μ m). Micrographs of the second and third columns show close-up view of YFP- and mRFP-derived fluorescence, respectively, in individual cells and micrographs of the fourth column show merged images of YFP and mRFP signals in such individual cells (*inset* scale bar, 10 μ m). The nucleus (N) is marked by an arrow in fourth column panels. A negative control combination (sYFPN:p37 plus sYFPC) is displayed in row F. Equivalent images were obtained with the reverse combinations (YFPC:p37 co-expressed with sYFPN-tagged importins alpha) (data not shown). C) Western blot analysis of protein preparations. Importin alpha molecules of clade III and subclade Ia were fused at their C-terminus with an His-tag and expressed in *N. benthamiana* leaves either alone or in combination with p37. Input protein extracts (left panel) or immunoprecipitates (IP) (right panel) obtained with anti-His antibody were subjected to Western blot (Wb) analysis using either an anti-His antibody (for detection of importins alpha; upper blots) or an anti-p37 antisera (for detection of p37; lower blots).

importin alpha 1 and 2, respectively; Fig. 3), have been shown to have a nuclear localization with high accumulation at the nucleolus (Kanneganti *et al.*, 2007) and, thus, the distribution pattern of the interaction of p37 with importins alpha reproduces that of the latter ones.

Down-regulation of importins-alpha through RNAi severely impairs nucleolar localization of p37

In the light of the results from BiFC assays, we wondered whether importins alpha could be one of the key host factors determining localization of p37 at the nucleolus. To answer this question, we down-regulated the expression levels of importins alpha using an RNAi approach. More specifically, we designed five binary constructs with expression cassettes that, after delivery via agroinfiltration into plant leaves, would yield hairpin transcripts able to impair expression of importins alpha included in clades/subclades II, III, Ia, Ib and Ic, respectively, through RNA silencing. The gene segments for RNAi constructs of each importin alpha clade/subclade were carefully selected from specific gene regions to reasonably ensure silencing of members belonging to a given phylogenetic group/subgroup and not to other groups/subgroups. *N. benthamiana* leaves co-infiltrated with a mixture of *Agrobacterium tumefaciens* strains transformed with each of these constructs showed reduced accumulation of the distinct importin alpha members as it could be corroborated by semi-quantitative reverse transcription (RT)-PCR assays (Fig. 4A). When the RNAi constructs were assayed separately, reduction in expression levels induced by each RNAi construct was found to be clade-specific, as desired, though some cross-target silencing was observed for members of subclades within clade I (e.g. Fig 4B), most likely dictated by their high sequence conservation. Despite such cross-reaction, employment of all three subclade constructs was considered useful in the following assays, on one side, because they could reinforce silencing of importins alpha of clade I

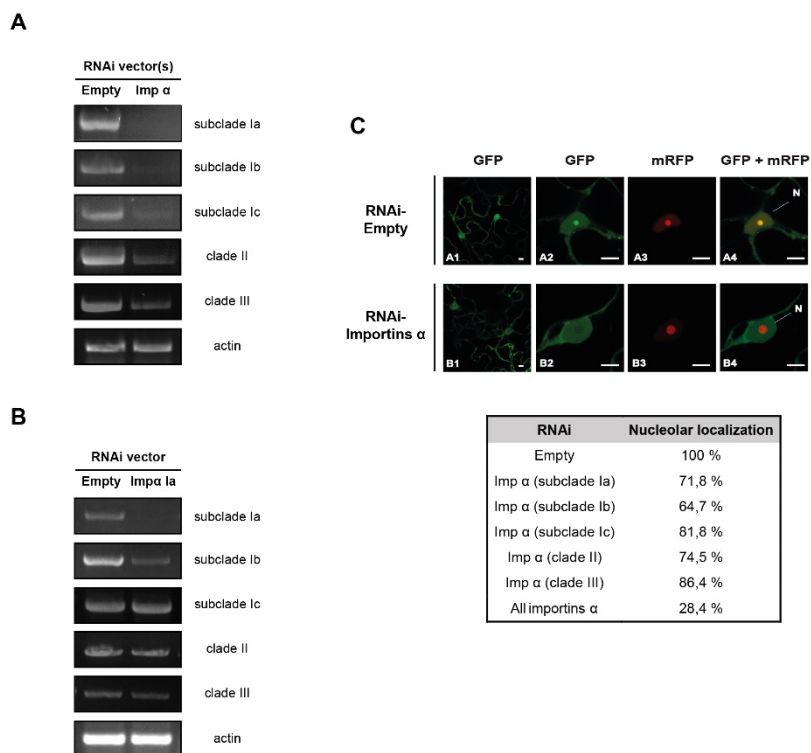


FIGURE 4. Effect of silencing of importins alpha on the nucleolar localization of p37. *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with RNAi constructs to direct silencing of importins alpha included in clades/subclades II, III, Ia, Ib and/or Ic. Leaves agroinfiltrated with an empty RNAi vector were used as controls. A) Semiquantitative RT-PCR to corroborate the reduction of importin alpha transcript levels in leaves agroinfiltrated with a mixture of RNAi constructs designed to silence importins alpha belonging to all clades/subclades (lanes "Imp α ") in comparison to leaves agroinfiltrated with an empty RNAi vector (lanes "Empty"). B) Semiquantitative RT-PCR to assess transcript levels of importins alpha of the different clade/subclades in leaves agroinfiltrated with the RNAi construct designed to silence importins alpha belonging to subclade Ia (lanes "Imp α Ia") in comparison to leaves agroinfiltrated with an empty RNAi vector (lanes "Empty"). In both panels, A and B, Samples for analysis were collected at 5 d.p.if. and the transcript accumulation levels of importins alpha of the distinct clades/subclades were evaluated using appropriate pairs of primers. C) At the top, representative confocal microscopy images showing the intracellular distribution of transiently GFP-tagged p37 in plant cells in which expression of all importins alpha was either impaired (RNAi-Imp α) or not impaired (RNAi-Empty). Fluorescence was visualized 72 h after agroinfiltration of the GFP-tagged p37

construct. Images corresponding to plant cells depleted for importins alpha of the different clades/subclades or depleted simultaneously for all of them were taken to estimate the percentage of cells in which p37 showed a nucleolar localization. The average number of cells included for counting was of 60 and the calculated percentages are shown in the table at the bottom.

when combined and, on the other, because they could provide results that should be comparable each other when used individually.

Analysis of the subcellular distribution of transiently expressed GFP-tagged p37 in plant cells with reduced expression of importins alpha of the different clades/subclades showed substantial loss of nucleolar localization (Fig. 4C). Nucleolar localization of p37 reached percentages as low as 28 % when all importins alpha were simultaneously silenced, which contrasted with the total lack of p37 nucleolar exclusion in leaves agroinfiltrated with an empty RNAi vector used as negative control for importin alpha silencing (Fig. 4C). Underlining the specificity of the assay, nucleolar localization of mRFP-tagged fibrillarlin was not affected by importin alpha depletion (Fig. 4C and data not shown), in agreement with previous results showing that targeting of fibrillarlin to the nucleus/nucleolus was independent of, at least, importins alpha 1 and 2 (Kanneganti *et al.*, 2007). Collectively, the results strongly supported that importins alpha play an essential role in the nucleolar targeting of p37.

Impairment of importin alpha expression correlates with decreased accumulation of PLPV at early stages of infection

As shown above, depletion of importins alpha negatively affected the nuclear/nucleolar localization of p37. To assess whether such depletion

had also an impact on the progress of viral infection, the RNAi approach was once more employed to silence importins alpha. The importin alpha-silenced leaves, along with mock agroinfiltrated controls, were inoculated with PLPV. Leaves were collected at 1, 2, 3, and 7 days post-inoculation (d.p.i.) and subjected to Northern blot analysis to check PLPV accumulation. The results showed a notable decrease in viral titers in the importin alpha-silenced leaves with regard the non-silenced controls at early times of infection (compare signal intensities in lanes b and c with those of lanes f and g, respectively, in Fig. 5A). Such decrease was no longer evident at 7 d.p.i., a time point in which the virus had apparently reached saturating levels in either sample (lanes d and h in Fig. 5A). Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) performed on samples collected at two time points, 3 and 7 d.p.i., corroborated, on one side, the efficient importin alpha silencing driven by the RNAi approach (Fig. 5B, right panel), and, on the other, the significant reduction of PLPV accumulation in importin alpha-silenced *versus* non-silenced leaves at 3 d.p.i. (Fig. 5B, left panel). As could be inferred by the Northern blot analysis, RT-qPCR data indicated that differences in viral accumulation were not significant at 7 d.p.i., suggesting that the virus overcomes the detrimental effect caused by importin alpha down-regulation at later stages of infection (Fig. 5). We tried to complement the results of the RNAi approach through a *Tobacco rattle virus* (TRV)-based virus induced gene silencing (VIGS) assay (Bachan and Dinesh-Kumar 2012). However, TRV infection of *N. benthamiana* plants initiated with a TRV vector either empty or with importin alpha gene fragments, precluded subsequent PLPV infection in local and/or

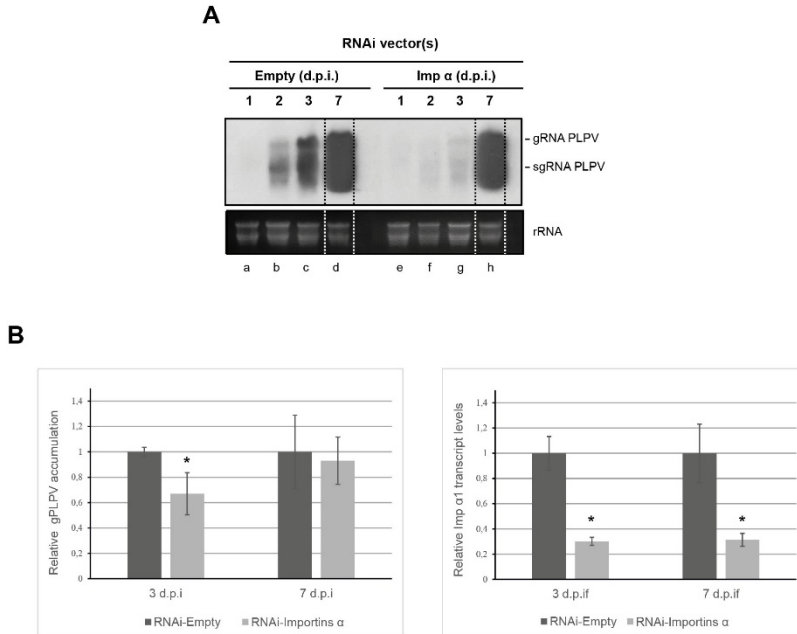


FIGURE 5. Importin alpha depletion negatively affects *in vivo* PLPV accumulation. *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with an RNAi empty construct (mock control) or with mixture of RNAi constructs to direct silencing of all importins alpha. Five days after infiltration (d.p.if.), the same leaves were agroinoculated with a full-length cDNA clone of PLPV. Leaf samples were harvested at different days after virus inoculation (d.p.i.). A) Northern blot analysis for PLPV detection in samples collected at 1, 2, 3, and 7 d.p.i. from either mock controls (lanes a-d) or importin alpha-silenced leaves (lanes e-h). The positions of the genomic (g) and subgenomic (sg) RNAs of PLPV are indicated at the right. Note that the virus was barely detectable at 1 d.p.i. in either case because its low accumulation levels. Ethidium bromide staining of rRNAs is shown below the blots as loading control. Discontinuous lines indicate lanes that were not contiguous in the original gel. B) RT-qPCR to estimate relative PLPV accumulation (left panel) and relative levels of importin $\alpha 1$ transcripts (right panel) at 3 and 7 d.p.i. In B and C, bars depict standard deviations from three independent biological replicates.

systemic leaves (data not shown) suggesting that TRV multiplication outcompetes that of PLPV. Though this prevented us from using a VIGS assay to assess the potential relevance of importins alpha in the biological cycle of PLPV, the results of the RNAi approach were clear and showed that impairment of importin alpha expression adversely affects PLPV accumulation. As such impairment hampered nucleolar localization of p37 (Fig. 4), a correlation between the loss of p37 nucleolar targeting and a decrease in PLPV titers could be established.

DISCUSSION

In this work, we have obtained new and relevant insights into determinants for nucleolar localization of PLPV p37, a viral protein with a dual role as CP and VSR. In the first place, we have delimited the NoLS-containing region to the most N-terminal 45 amino acid residues. Systematic analysis of confirmed NoLSs has revealed a great sequence diversity which makes NoLSs particularly difficult to predict. Despite such difficulty, some common traits can be noticed that are also shared by the p37 NoLS including an N-terminal location and a considerable enrichment in basic amino acids (Fig. 2) (Martin *et al.*, 2015; Scott *et al.*, 2010). As stated previously (Pérez-Cañamás and Hernández 2015), the NoLS-containing region of p37 is also involved in other relevant properties of the protein such as the capacity to bind small RNAs, which is essential for its VSR function. In addition, it forms very likely part of the so-called RNA binding domain that has been proposed to directly interact with viral ssRNA for virion formation in related CPs (Sit and Lommel 2015; Rao *et al.*, 2006). These observations emphasize once more the high overlap of motifs involved

in different functional traits of p37, as we stressed in a previous study (Pérez-Cañamás and Hernández 2015).

Besides delineating the NoLS-containing region, we have obtained results supporting that subcellular localization of p37 is not affected either by its fusion to a tag or, more importantly, in the context of a real infection. This is not a trivial issue as cellular compartmentalization of a protein –either viral or cellular- may undergo relevant alterations during cell cycle or under different environmental conditions, all the more is this the case when an active process of viral infection is ongoing (Drissi *et al.*, 2013; Alexander and Cilia 2016). The presence of other PLPV proteins besides p37, the complex network of interactions that can be established between them and host proteins and the profound effects that a replicating virus may have on host cellular functions might have resulted in significant discrepancies in the subcellular localization of a transiently expressed GFP-tagged protein and that produced during a genuine viral infection process, and our results have ruled out that possibility.

We have also shown that p37 is able to interact with different members of the importin alpha family and, moreover, that such interaction most likely dictates the nucleolar localization of the viral product. These observations suggest that the protein has evolved the mechanisms to ensure its nuclear/nucleolar import regardless changes in the level of a specific type of importin alpha. Such redundancy in the nuclear traffic of viral proteins is not unusual and has been reported previously for proteins encoded by animal, fungi as well as plant viruses such as the TGB1 of a pomovirus whose nuclear/nucleolar localization was affected by knockdown of two distinct importins alpha (Kanneganti

et al., 2007; König *et al.*, 2010; Lukhovitskaya *et al.*, 2015; Melen *et al.*, 2003; O'Neill *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997). In addition, we cannot completely discard the involvement of other nuclear import pathways, besides the classical importin alpha/importin beta pathway, in the nuclear/nucleolar targeting of p37. Indeed, though the presence of the protein in the nucleolus was strongly reduced by down-regulation of importins alpha, a non-negligible amount of the protein was still evident in the nucleoplasm of cells that showed nucleolar exclusion of p37 (Fig. 4B), suggesting that mechanisms distinct from those involving importin alpha may contribute somehow to the nuclear sorting of p37.

The ultimate reasons of the nucleolar (and/or nuclear) targeting of p37 remains elusive as occurs with other proteins that show this subcellular localization. Previous work showed that it was not strictly required for either the encapsidation or the VSR function of PLPV p37 (Pérez-Cañamás and Hernández 2015) but here we have shown that impairment of such localization through importin alpha knockdown negatively affects viral accumulation. Several scenarios can be envisioned to explain these observations. Firstly, it is possible that importin alpha-mediated transport of p37, the most abundantly produced viral protein during PLPV infection, significantly interferes with the conventional pathway for cytoplasmic-nuclear shuttling of host proteins, thus changing cellular homeostasis to favor the infectious process. Alternatively, p37 confinement in the nucleolus might help to regulate viral protein ratios, an essential issue for virus survival (Castaño *et al.*, 2009). This compartmentalization based-regulation could rely just on the removal of part of p37 molecules from the cytoplasm to maintain the required protein amounts in this cellular

compartment -where PLPV replication cycle takes place-, with the nucleolus functioning as a kind of p37 garbage disposal or even more actively contributing to p37 turnover. With regard to the latter, it is interesting to mention that a proteasome-independent pathway for protein degradation has been reported in the nucleolus of animal cells (Tao *et al.*, 2013), and the existence of a similar pathway in plant cells cannot be completely ruled out. Finally, the presence of p37 in the nucleolus could be related with an unknown function of the protein aimed to manipulate host nucleolar processes for virus own benefit such as, for instance, RNA silencing or ribosome biogenesis. The recruitment of some nucleolar component(s) by p37 that might be essential for PLPV biological cycle can neither be excluded. In this connection, one of the few plant viral proteins for which a biological significance of its nucleolar localization has been advanced is that encoded by the ORF3 of an umbravirus (*Groundnut rosette virus*), a type of plant RNA virus that does not produce a CP and that also belongs to family *Tombusviridae*. The umbravirus ORF3-encoded product is involved in virus long-distance movement and has been proposed to hijack and relocalize fibrillarin from the nucleolus to the cytoplasm to participate in formation of viral RNPs. These RNPs protect viral RNAs and move through the floem, determining the ability of umbravirus to cause systemic infection (Kim *et al.*, 2007). Interactions of some additional plant virus proteins (or RNAs) with fibrillarin and/or with other nucleolar components have been reported though their precise role during viral infectious cycle is mostly unclear (Jiang *et al.*, 2009; Rajamäki *et al.*, 2009; Semashko *et al.*, 2012; Shaw *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2015). More investigation is being carried out

in an attempt to gain further insights into the precise biological meaning of the nucleolar localization of PLPV p37.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Cristian Mares for technical assistance and Pilar Fajardo for help in generation of some constructs. This work was supported by grant BFU2015-70261 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, Spain) (to C. H). M.P.-C. was the recipient of a predoctoral contract from MINECO.

LITERATURE CITED

- Alexander, M. M., and Cilia, M. 2016. A molecular tug-of-war: global plant proteome changes during viral infection. *Current Plant Biol.* 5:13-24.
- Bachan, S., and Dinesh-Kumar, S. P. 2012. Tobacco rattle virus (TRV)-based virus-induced gene silencing. *Methods Mol. Biol.* 894:83-92.
- Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., and Lamond, A. I. 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8:574-585.
- Bouia, A., Kholi, A., Saghi, M., and Cornelis, P. 2001. In-frame fusion of a His-Cys motif into the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane OprI lipoprotein results in

increased metal binding capacity by *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 152:799-804.

Brothers, S. P., Janovick, J. A., and Conn, P. M. 2003. Unexpected effects of epitope and chimeric tags on gonadotropin-releasing hormone receptors: implications for understanding the molecular etiology of hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:6107-6112.

Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., and Campos, I. 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* 2: E107–112.

Castaño, A., and Hernández, C. 2005. Complete nucleotide sequence and genome organization of Pelargonium line pattern virus and its relationship with the family Tombusviridae. *Arch. Virol.* 150:949-965.

Castaño, A., Ruiz, L., and Hernández, C. 2009. Insights into the translational regulation of biologically active open reading frames of Pelargonium line pattern virus. *Virology* 386:417-426.

Drissi, R., Dubois, M. L., and Boisvert, F. M. 2013. Proteomics methods for subcellular proteome analysis. *FEBS J.* 280:5626-5634.

Emmott, E., and Hiscox, J. A. 2009. Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep.* 10: 231–238.

- Görner, W., Durchschlag, E., Martínez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H., and Schüller C. 1998. Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* 12:586-597.
- Henke, R. M., Dastidar, R. G., Shah, A., Cadinu, D., Yao, X., Hooda, J., and Zhang, L. 2011. Hypoxia elicits broad and systematic changes in protein subcellular localization. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301:C913-928.
- Hiscox, J. A. 2007. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:119-127.
- Jiang, Y., Li, Z., and Nagy, P. D. 2009 Nucleolin/Nsr1p binds to the 3' noncoding region of the tombusvirus RNA and inhibits replication. *Virology* 2010; 396:10-20.
- Kanneganti, T. D., Bai, X., Tsai, C. W., Win, J., Meulia, T., Goodin, M., Kamoun, S., and Hogenhout, S. A. 2007. A functional genetic assay for nuclear trafficking in plants. *Plant J.* 50:149-158.
- Kim, S. H., Macfarlane, S., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Ryabov, E. V., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J. W. S., and Taliansky, M. 2007. Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:11115-11120.

- König, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H. H., Bhattacharyya, S., Alamares, J. G., Tscherne, D. M., Ortigoza, M. B., Liang, Y., Gao, Q., Andrews, S. E., Bandyopadhyay, S., De Jesus, P., Tu, B. P., Pache, L., Shih, C., Orth, A., Bonamy, G., Miraglia, L., Ideker, T., García-Sastre, A., Young, J. A., Palese, P., Shaw, M. L., and Chanda, S. K. 2010. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463: 813–817.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870-1874.
- Ledent, P., Duez, C., Vanhove, M., Lejeune, A., Fonze, E., Charlier, P., Rhazi-Filali, F., Thamm, I., Guillaume, G., Samyn, B., Devreese, B., Van Beeumen, J., Lamotte-Brasseur, J., and Frère, J. M. 1997. Unexpected influence of a C-terminal-fused His-tag on the processing of an enzyme and on the kinetic and folding parameters. *FEBS Lett.* 413:194-196.
- Lukhovitskaya, N. I., Cowan, G. H., Vetukuri, R. R., Tilsner, J., Torrance, L., and Savenkov, E. I. 2015. Importin- α -mediated nucleolar localization of potato mop-top virus TRIPLE GENE BLOCK1 (TGB1) protein facilitates virus systemic movement, whereas TGB1 self-interaction is required for cell-to-cell movement in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* 167:738-752.

- Martin, R. M., Ter-Avetisyan, G., Herce, H. D., Ludwig, A. K., Lättig-Tünnemann, G., and Cardoso, M. C. 2015. Principles of protein targeting to the nucleolus. *Nucleus* 6:314-325.
- Martínez-Turiño, S., and Hernández, C. (2009) Inhibition of RNA silencing by the coat protein of Pelargonium flower break virus: distinctions from closely related suppressors. *J. Gen. Virol.* 90:519–525
- McPherson, A. J., Lange, A., Doetsch, P. W., and Corbett, A. H. 2015. Nuclear–cytoplasmic transport. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001351.pub3.
- Melen, K., Fagerlund, R., Franke, J., Kohler, M., Kinnunen, L., and Julkunen, I. 2003. Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J. Biol. Chem.* 278: 28193–28200.
- Noirot, E., Der, C., Lherminier, J., Robert, F., Moricova, P., Kiêu, K., Leborgne-Castel, N., Simon-Plas, F., and Bouhidel, K. 2014. Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein. *J. Exp. Bot.* 65:5011-5022.
- Olson, M. O. J., and Dundr, M. 2015. Nucleolus: Structure and Function. In: eLS. J. Wiley & sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0005975.pub3

- O'Neill, R. E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P., and Moroianu, J. 1995. Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J. Biol. Chem.* 270:22701–22704.
- Pérez-Cañamás, M., and Hernández, C. 2015. Key importance of small RNA binding for the activity of a glycine/tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *J. Biol. Chem.* 290:3106-3120.
- Pérez-Cañamás, M., Blanco-Pérez, M., Forment, J., and Hernández, C. 2017. *Nicotiana benthamiana* plants asymptotically infected by Pelargonium line pattern virus show unusually high accumulation of viral small RNAs that is neither associated with DCL induction nor RDR6 activity. *Virology* 501:136-146.
- Rajamäki, M. L., and Valkonen, J.P. 2009. Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like Potato virus A in *Nicotiana* species. *Plant Cell* 21:2485–2502.
- Rao, A. L. 2006. Genome packaging by spherical plant RNA viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:61–87.
- Salveti, A., and Greco A. 2014. Viruses and the nucleolus: the fatal attraction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1842:840-847.
- Semashko, M. A., González, I., Shaw, J., Leonova, O. G., Popenko, V. I., Taliansky, M. E., Canto, T., and Kalinina, N. O. 2012. The extreme N-terminal domain of a hordeivirusTGB1 movement

protein mediates its localization to the nucleolus and interaction with fibrillarin. *Biochimie* 94:1180-1188.

Shaw, P. J. 2015. Nucleolus. In: eLS. J. Wiley & sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001352.pub4.

Shaw, J., Love, A. J., Makarova, S. S., Kalinina, N. O., Harrison, B. D., and Talianky, M. E. 2014. Coilin, the signature protein of Cajal bodies, differentially modulates the interactions of plants with viruses in widely different taxa. *Nucleus* 5:85-94.

Scheets, K., Jordan, R., White, K.A., and Hernández, C., 2015. Pelarspovirus, a proposed new genus in the family Tombusviridae. *Arch. Virol.* 160:2385-2393.

Scott, M. S., Boisvert, F. M., McDowall, M. D., Lamond, A. I., and Barton, G. J. 2010. Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences. *Nucleic Acids Res.* 38:7388-7399.

Sikorskaite, S., Rajamäki, M. L., Baniulis, D., Stanys, V., and Valkonen, J. P. 2013. Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the Solanaceae and Rosaceae families. *Plant Methods* 26:9:31.

Sit, T. L., and Lommel, S. A. 2015. Tombusviridae. In: eLS. J. Wiley and Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000756.pub3.

Smith, H.M., Hicks, G.R., and Raikhel, N.V. 1997. Importin alpha from *Arabidopsis thaliana* is a nuclear import receptor that

- recognizes three classes of import signals. *Plant Physiol.* 114:411–417.
- Taliansky, M. E., Brown, J. W. S., Rajamäki, M. L., Valkonen, J. P., and Kalinina, N. O. 2010. Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal pathosystems. *Adv. Virus Res.* 77:119-158.
- Tao, T., Shi, H., Guan, Y., Huang, D., Chen, Y., Lane, D. P., Chen, J., and Peng, J. 2013. Def defines a conserved nucleolar pathway that leads p53 to proteasome-independent degradation. *Cell Res.* 23:620-634.
- Thole, V., Worland, B., Snape, J. W., and Vain, P. 2007. The pCLEAN dual binary vector system for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Physiol.* 145:1211-1219.
- Verwoerd, T. C., Dekker, M. M., and Hoekema, A. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17, 2362.
- Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M. B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., Robinson, S. P., Gleave, A. P., Green, A. G., and Waterhouse, P. M. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27:581-590.
- Zheng, L., Du, Z., Lin, C., Mao, Q., Wu, K., Wu, J., Wei, T., Wu, Z., and Xie, L. 2015. Rice stripe tenuivirus p2 may recruit or manipulate nucleolar functions through an interaction with

fibrillarin to promote virus systemic movement. *Mol. Plant Pathol.* 16:921-930.

CAPÍTULO 3

Dicing *versus* slicing for antiviral defense in plants: the case of *Pelargonium line pattern virus*²

ABSTRACT

In plants, RNA silencing functions as a potent antiviral mechanism. Virus-derived double-stranded RNAs (dsRNAs) trigger this mechanism, being cleaved by Dicer-like (DCL) enzymes into virus small RNAs (vsRNAs). These vsRNAs guide sequence-specific RNA degradation upon their incorporation into an RNA-induced silencing complex (RISC) that contains a slicer of the Argonaute (AGO) family. Host RNA dependent-RNA polymerases, particularly RDR6, strengthen antiviral silencing by generating more dsRNA templates from RISC-cleavage products that, in turn, are converted into secondary vsRNAs by DCLs. Previous work showed that *Pelargonium line pattern virus* (PLPV) is a very efficient inducer and target of RNA silencing as PLPV-infected *Nicotiana benthamiana* plants accumulate extraordinarily high amounts of vsRNAs that, strikingly, are independent of RDR6 activity. Several scenarios may explain these observations including a major contribution of dicing *versus* slicing for defense against PLPV, as the dicing step would not be affected by the RNA silencing suppressor encoded by the virus, a protein that acts via vsRNA sequestration. Taking advantage of the availability of lines of *N. benthamiana* with DCL or AGO2 functions impaired, here we have

² To be submitted (Authors: Miryam Pérez-Cañamás, Elizabeth Hevia, Katerina Katsarou, Carmen Hernández).

tried to get further insights into the components of the silencing machinery that are involved in anti PLPV-silencing. Results have shown that DCL4 and, to lesser extent, DCL2 contribute to restrict viral infection. Interestingly, AGO2 apparently makes even a higher contribution in the defense against PLPV, extending the number of viruses that are affected by this particular slicer. The data support that both dicing and slicing activities participate in the host race against PLPV.

INTRODUCTION

Viruses must evade the defense mechanisms of the host in order to establish a productive infection. In plants, one of the main defense responses against both DNA and RNA viruses is that based on RNA silencing (Csorba et al., 2009). This response is triggered by double-stranded (ds) RNAs that, in the case of RNA viruses, may correspond to viral replication intermediates (generated by the viral RNA dependent-RNA polymerase, RDR) or to highly-structured regions of the viral genome (Ding, 2010). These dsRNAs are recognized by RNase III type enzymes, called Dicer- like (DCL), that cleave them into primary small RNAs (sRNAs) of 21-24 nt (Ding and Voinnet, 2007; Llave, 2010). One strand of the small duplex is incorporated into an RNA silencing induced complex (RISC) whose effector component is an endonuclease of the Argonaute (AGO) family (Carbonell and Carrington, 2015; Mallory and Vaucheret, 2010). The sRNA guides RISC to cognate RNA usually leading to its degradation through AGO-mediated slicing (Baulcombe, 2005) Host RDRs may participate in the generation of the initial dsRNA triggers and are also involved in the amplification of the silencing process by catalyzing sRNA-primed

generation of new dsRNAs from RISC-cleaved (or other aberrant) products that, in turn, are converted into secondary sRNAs by DCLs (Wassenegger and Krczal, 2006). Besides the involvement of sRNAs in cell autonomous silencing, these small molecules can move both short and long distances and thereby also trigger non-cell autonomous local and systemic silencing (Pyott and Molnar, 2015).

Studies mainly performed with the model organism *Arabidopsis thaliana* have shed light on the particular silencing components that participate in antiviral defence. Among the four DCLs encoded by this plant species (DCL1-4), three of them, DCL4, DCL2 and DCL3, seem to function in a hierarchical fashion to yield viral sRNAs (vsRNAs) of 21, 22 and 24 nt, respectively (Blevins et al., 2006; Deleris et al., 2006; Liu et al., 2009). Concerning AGO and RDR proteins, *A. thaliana* encodes ten distinct AGOs and six different RDRs, with AGO1, AGO2 and RDR6 being particularly important in the fight against viruses (Díaz-Pendón et al., 2007; Harvey et al., 2011; Morel et al., 2002; Qu et al., 2008). The identity of the host components participating in antiviral silencing in other plant species has been comparatively less well explored (Pumplin and Voinnet, 2013).

In order to survive, viruses have developed strategies to counteract antiviral silencing, prominent among which is the production of proteins, called viral suppressors of RNA silencing (VSRs), that interfere at different stages of the silencing pathway (Pumplin and Voinnet, 2013). For instance, a common strategy adopted by many unrelated VSRs consists on sRNA binding which will impair both RISC loading and amplification of silencing, thus weakening host defense (Lakatos et al., 2006; Mérai et al., 2006; Vargason et al., 2003;

Ye et al., 2003). Long dsRNAs may be also targets of VSRs as well as protein components of the silencing machinery (Csorba et al., 2015).

From a theoretical point of view, dicing would be sufficient to clear or diminish virus accumulation in infected cells. Upon onset of an active infection, vsRNAs are both generated and used to target viral RNAs leading, as mentioned above, to their degradation. However, if the infection can be adequately controlled, the necessity to sort viral vsRNAs into RISC might conceivably become less critical. Indeed, dicing, rather than slicing, has been reported to play a main role in the latency of some animal viruses in persistently infected cells (Flynt et al., 2009). In the case of plant viruses, the mere existence of antiviral RISCs was also a matter of debate for some time (Ding and Voinnet 2007), though the debate has largely been settled once the first evidences of vsRNA-RISCs were obtained (Omarov et al., 2007; Pantaleo et al., 2007). Nevertheless, the possibility of Dicer-mediated processing of viral dsRNAs being enough to impede multiplication of, at least, some plant viruses cannot be completely ruled out, particularly in the case of viruses with lifestyles that present resemblances with those of persistent viruses (Roossinck, 2010).

Pelargonium line pattern virus (PLPV) is the type member of the new genus *Pelarspovirus* in the family *Tombusviridae* (Scheets et al., 2015). PLPV possesses a single-stranded positive RNA genome of about 4 kb that encodes two proteins involved in replication (p27 and p87), two small movement proteins (p7 and p9.7) and a protein (p37) that acts as both coat protein (CP) and VSR (Castaño and Hernández, 2005; Castaño et al., 2009; Pérez-Cañamás et al., 2015). Recently, we have shown that *Nicotiana benthamiana* plants infected by PLPV

accumulate the highest percentage of vsRNAs reported so far for a plant virus (90% of vsRNAs with regard total RNAs), which illustrates the strong defense that the host deploys against the virus. Such strong antiviral silencing was proposed to be a key factor in determining the low viral titers that characterize PLPV infections that, moreover, use to be asymptomatic (Pérez-Cañamás et al., 2017). It was also suggested that the elevated amount of vsRNAs could reflect the importance of dicing *versus* slicing in anti-PLPV host response, particularly taking into account that the PLPV-encoded VSR exerts its action mainly through vsRNA sequestration (Pérez-Cañamás and Hernández, 2015) which would prevent RISC assembly (and thus slicing). Reinforcing this possibility, the amount of vsRNAs detected in PLPV-infected *N. benthamiana* was independent from RDR6 activity which could be influenced by the absence of AGO-cleaved RNAs that serve as RDR substrates. Here we have pursued to assess the relative contribution of DCL and AGO proteins in anti-PLPV silencing. To this aim, we have used *N. benthamiana* plants with DCL or AGO functions impaired either by downregulation of expression through an RNA silencing (also called RNA interference, RNAi) approach (DCL1-4) or by protein inactivation through a CRISPR/Cas9 strategy (AGO2) (Dadami et al., 2013; Katsarou et al., 2016; Ludman et al., 2017). Results have shown that DCL4 and, to lesser extent, DCL2 contribute to restrict viral infection. Interestingly, AGO2 was also found to be a key factor in the host defense against PLPV, highlighting the importance of slicing in anti-PLPV silencing on one side, and extending the number of viruses that are affected by this particular slicer on the other. Taken together, the data support that both dicing and slicing activities participate in the host race against PLPV.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and viral inoculation

Different lines of *N. benthamiana* plants were used for PLPV inoculation: i) wild- type (wt) *N. benthamiana*, ii) *N. benthamiana* transgenic plants in which the different DCL genes were down-regulated, either individually or in double or triple combinations, by expressing hairpin constructs (lines DCL1.13i, DCL2.11i, DCL3.10i, DCL4.9i, DCL2/4.5i, and DCL3.10 x 2/4.5i, that corresponds to the heterozygous progeny that results from crossing DCL3.10i as a female and DCL2/4.5i as a male) (Dadami et al., 2013; Katsarou et al., 2016) and, iii) *N. benthamiana* transformant line with a CRISPR/Cas9 modified AGO2 allele leading to dysfunctional AGO2 protein (Ludman et al., 2017). All plants were grown until four-to-six leaf stage under greenhouse conditions (16 h days at 24 °C, 8 h nights at 20 °C) and then mock or virus-inoculated (see below).

Virus inoculation

N. benthamiana plants were agroinoculated with binary plasmids containing either a wt PLPV cDNA or a mutated PLPV cDNA (hereinafter PLPV-mutp37) carrying three nucleotide replacements in the p37 gene leading to an aminoacid (aa) substitution (W28A). As described previously (Pérez-Cañamás and Hernández, 2015), such aa substitution affects a GW motif in p37 that is critical for its VSR function but not for its encapsidation function. In the mentioned plasmids, that are based on the binary vector pMOG800 (Castaño et al., 2009), the PLPV cDNA is flanked by the *Cauliflower mosaic virus* 35S

promoter and the terminator sequence of the *Solanum tuberosum* proteinase inhibitor II gene. The plasmids were used to transform *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 CH32 by freeze/thaw shock method. Cultures of *A. tumefaciens* harbouring the corresponding plasmid were infiltrated at an OD₆₆₀ of 0.5 on the abaxial side of *N. benthamiana* leaves (two leaves per plant) using a 20 ml needleless syringe. Mock inoculated plants were used as controls. All inoculated plants were kept under greenhouse conditions. Local leaves were collected at 7 days post-inoculation (d.p.i.) and systemic leaves at 42 d.p.i. Plant batches for each experiment included 4-6 plants and experiments were repeated at least three times.

Analysis of viral infection through Northern blot and tissue printing hybridization

Total RNA preparations from *N. benthamiana* leaves were obtained by phenol extraction and lithium precipitation (Verwoerd et al., 1989). For Northern blot analysis, 4 µg of total RNA were denatured by glyoxal-dimethyl sulfoxide treatment, electrophoresed in 1 % agarose gels and blotted to nylon membranes (Hybond N+, GE Healthcare). For tissue printing hybridization, stems or leaf blades were directly imprinted onto nylon membranes. After UV-crosslinking, membranes were incubated with a ³²P-radioactive RNA probe for detection of PLPV RNAs. Such probe was generated by *in vitro* transcription of a pBluescript KS(+)-based construct containing the PLPV p37 gene (nt 2621 to 3637 of PLPV genome). Hybridization signals were visualized by autoradiography or with a PhosphorImager (Fujifilm FLA-5100).

RESULTS

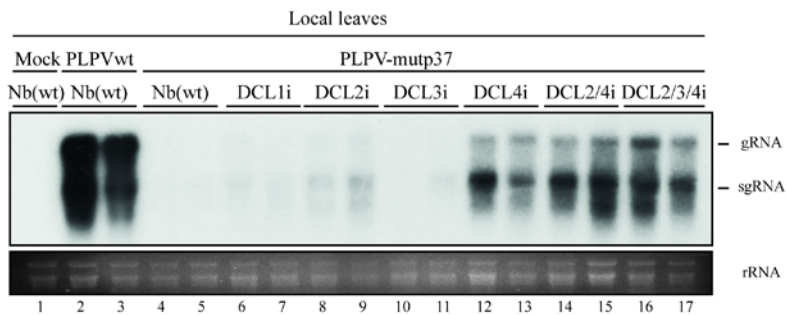
DCL4 and, to lesser extent, DCL2 are the main DCL players in *N. benthamiana* anti-PLPV defense

As *A. thaliana*, *N. benthamiana* encodes four DCL-type RNases (Nakasugi et al., 2013). Previous characterization of vsRNAs in PLPV-infected *N. benthamiana* plants showed that those of 21 and 22 nt are the most abundant ones in the vsRNA population with percentages of 41.65% and 32.90%, respectively, while the fraction of vsRNAs of 24 nt is much lower (0.82%) as well as those of other size classes (Pérez-Cañamás et al., 2017). These results suggested a main involvement of DCL4 and DCL2 in anti-PLPV silencing as reported in other plant-virus combinations (Deleris et al., 2006; Donaire et al., 2008; Garcia-Ruiz et al., 2010). In order to confirm, or refute, this possibility, we used a genetic approach by taking advantage of the recent creation of a collection of *N. benthamiana* transgenic lines in which the different DCL genes were downregulated, either individually or in combinations, through an RNAi approach (Dadami et al., 2013; Katsarou et al., 2016). This collection included either single DCL RNAi lines (henceforth DCL1i, DCL2i, DCL3i or DCL4i) or double (DCL2/4i) and triple (DCL2/3/4i) DCL RNAi combinations. As the presence of an active VSR may mask the effect of silencing components involved in the host defense against a virus (García-Ruiz et al., 2010; Ludman et al., 2017), we employed a VSR-deficient PLPV mutant, PLPV-mutp37, to study the influence of DCL downregulation on the progression of PLPV infection. This mutant carried the W28A aa replacement in p37 that impaired its VSR activity but preserved its packaging function (Pérez-Cañamás and Hernández, 2015). Inoculation

of wt *N. benthamiana* plants with this PLPV mutant and analysis of viral infection by Northern blot hybridization showed that viral accumulation was barely detectable at 7 d.p.i. in local leaves, in agreement with previous results (Pérez-Cañamás and Hernández, 2015) (Fig. 1A, lanes 4-5). Consistently with this deficient local infection, analysis of the inoculated plants at 42 d.p.i. revealed that the mutant virus was unable to become systemic (Fig. 1B).

In contrast with the results obtained in wt *N. benthamiana* plants, local leaves of several DCL RNAi lines inoculated in parallel with PLPV-mutp37 exhibited from moderate to elevated virus accumulation levels. In single DCL RNAi lines, the higher increase was observed in DCL4i line whereas a modest increase was recorded in the DCL2i line (Fig. 1A, lanes 13-14 and 8-9, respectively). PLPV-mutp37 accumulation in DCL1i or DCL3i lines (Fig. 1B, lanes 6-7 and 10-11, respectively) was very low and comparable to that detected in wt *N. benthamiana* (lanes 4-5) (Fig. 1A). The augmentation of PLPV-mutp37 titers was also remarkable in double DCL2/4 and triple DCL2/3/4 RNAi lines (Fig. 1A, lanes 14-17); indeed, it was frequently higher than that recorded in DCL4i or DCL2i lines (Fig. 1A and data not shown), pointing to an additive effect of the DCLs involved in anti-PLPV silencing. Nevertheless, titers of PLPV-mutp37 in local leaves of single, double or triple DCL RNAi lines were below those reached by wt PLPV in local leaves of wt *N. benthamiana* (Fig. 1A, lanes 2-3), indicating that downregulation of DCLs may compensate, though not totally, the absence of VSR activity in the virus. In line with this view, the VSR-deficient PLPV was not detected in systemic leaves of any of the DCL RNAi lines, while the wt virus became systemic in all inoculated wt *N. benthamiana* plants (Fig. 1B).

A



B

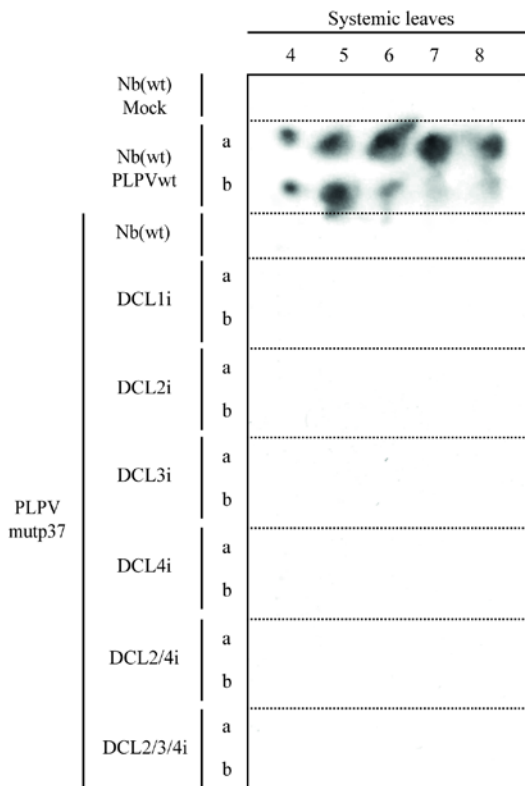


FIGURE 1. Accumulation of a VSR-deficient PLPV mutant in lines of *N. benthamiana* with downregulated DCL content. PLPV-mutp37 was agroinoculated in wt and in single (DCL1-4), double (DCL2/4) and triple (DCL2/3/4) RNAi lines and local and systemic leaves were harvested at 7 d.p.i and 42 d.p.i, respectively, for further analysis. For comparison purposes, wt PLPV was inoculated in parallel on wt *N. benthamiana* plants and local and systemic leaves were collected at the same times. A) Northern blot analysis of local leaves of different *N. benthamiana* lines (as shown above the lanes) inoculated with either wt PLPV (lanes 2-3) or PLPV-mutp37 (lanes 4-17). Leaves from mock inoculated plants (lane 1) were used as negative controls. An antisense ³²P-labeled riboprobe covering the p37 gene was used for hybridization. Positions of the PLPV genomic (g) RNA and of the subgenomic (sg) RNA that the virus produces for expression of 3'-proximal genes, are indicated on the right. Duplicate samples are shown for each virus-plant line combination. Ethidium bromide staining of rRNAs is included below the blots as loading controls. B) Representative tissue printing hybridization of systemic leaves from mock (M) and PLPV (wt or mutp37)-inoculated plants using a PLPV-specific ³²P-labeled riboprobe as above. Results from two plants (a and b) are shown for every virus-plant line combination but the outcome was identical for other plants of each series.

In order to check whether the effects of DCL downregulation were also apparent in an infection initiated with a VSR-competent virus, the same DCL RNAi lines were inoculated with the wt PLPV. Analysis of local and systemic leaves collected at 7 d.p.i. and 42 d.p.i., respectively, did not revealed significant differences in viral titers when compared with wt *N. benthamiana* plants (Fig. 2), underlining the desirability of using a VSR-disabled virus when analysing participation of silencing factors in the host response against the infectious agent.

Collectively, the results of this section provide genetic evidence on the major role of DCL4 and, to lesser extent, DCL2 in anti-PLPV defence.

AGO2 plays a key role in the race against PLPV in *N.****benthamiana***

The first definitive evidence on the involvement of an AGO protein in antiviral defence was obtained with AGO1 of *A. thaliana* (Morel et al., 2002). However, later on, studies with both *A. thaliana* and *N. benthamiana* supported the participation of AGO2 in the defence against distinct types of viruses (Harvey et al., 2011; Jaubert et al., 2002; Ludman et al., 2017; Scholthof et al., 2011; Odokonyero et al., 2015; 2017). Recently, it has been reported the generation of *N. benthamiana* lines in which AGO2 was inactivated through a CRISPR/Cas9 approach (Ludman et al., 2017) and we decided to use one of these lines, hereafter AGO2-Cr, to evaluate the relevance of this slicer in anti-PLPV silencing. Hence, PLPV-mutp37 was inoculated onto *N. benthamiana* AGO2-Cr plants along with wt *N. benthamiana* plants and virus accumulation in local leaves was analysed at 7 d.p.i. through a Northern blot assay. The results showed very low accumulation of the VSR-deficient virus in leaves of wt *N. benthamiana*, as expected (Fig. 3A, lanes 4-5). However, the disabled virus reached high levels in leaves of *N. benthamiana* AGO2-Cr (Fig. 3A, lanes 6-7) that were indeed almost comparable with those usually detected for the wt virus in wt *N. benthamiana* (Fig. 3A, lanes 2-3). Despite the increment in the titers of PLPV-mutp37 in the local leaves of *N. benthamiana* AGO2-Cr, the virus could not be detected in systemic leaves at 42 d.p.i. (Fig. 3B), indicating that inactivation of AGO2 is not sufficient to fully restore the infection capabilities of the VSR-deficient PLPV.

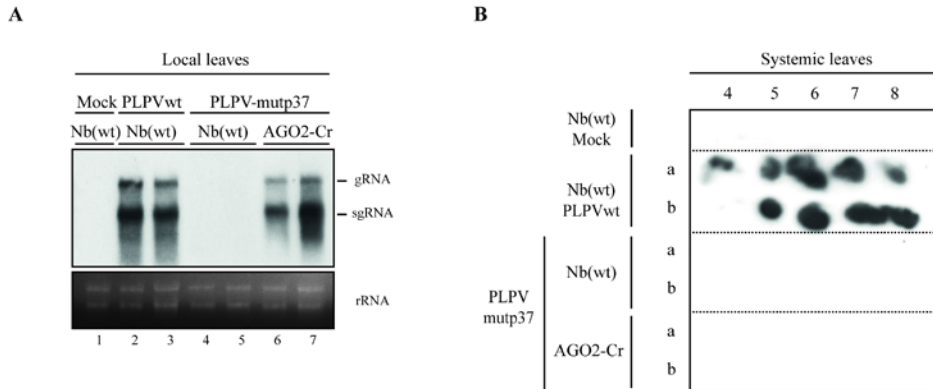


FIGURE 3. Accumulation of a VSR-deficient PLPV mutant in an AGO2-inactivated *N. benthamiana* line. PLPV-mutp37 was agroinoculated in wt *N. benthamiana* and in *N. benthamiana* AGO2-Cr line (with AGO2 inactivated through a CRISPR/Cas9 approach) and local and systemic leaves were harvested at 7 d.p.i and 42 d.p.i, respectively, for further analysis. For comparison purposes, wt PLPV was inoculated in parallel on wt *N. benthamiana* plants and local and systemic leaves were collected at the same times. A) Northern blot analysis of local leaves of different *N. benthamiana* plants (as shown above the lanes) inoculated with either wt PLPV (lanes 2-3) or PLPV-mutp37 (lanes 4-7). Leaves from mock inoculated plants (lane 1) were used as negative controls. Hybridization was performed with a 32P-labeled PLPV-specific riboprobe for detection of PLPV genomic (g) and subgenomic (sg) RNAs whose positions are indicated at the right. Duplicate samples are shown for each virus-plant line combination. Ethidium bromide staining of rRNAs is included below the blots as loading controls. B) Representative tissue printing hybridization of systemic leaves from mock (M) and PLPV-inoculated plants using a PLPV-specific riboprobe as above. Results from two plants (a and b) are shown for every virus-plant line combination but the outcome was identical for other plants of each series.

Similarly to the experimental schedule followed in the previous section, we wanted to check whether the effects of AGO2 inactivation could also be appreciated in viral infections launched with wt PLPV. Northern blot analysis did not reveal significant differences in wt PLPV titers between local leaves of wt *N. benthamiana* and *N. benthamiana*

AGO2-Cr plants (Fig. 4A). However, wt PLPV accumulation levels in systemic leaves of *N. benthamiana* AGO2-Cr plants were clearly above those detected in systemic leaves of wt *N. benthamiana* (Fig. 4B) and, thus, effects of AGO2 impairment were evident even with an entirely functional virus. Collectively, the obtained data unambiguously show that AGO2 plays a fundamental role in *N. benthamiana* anti-PLPV fight.

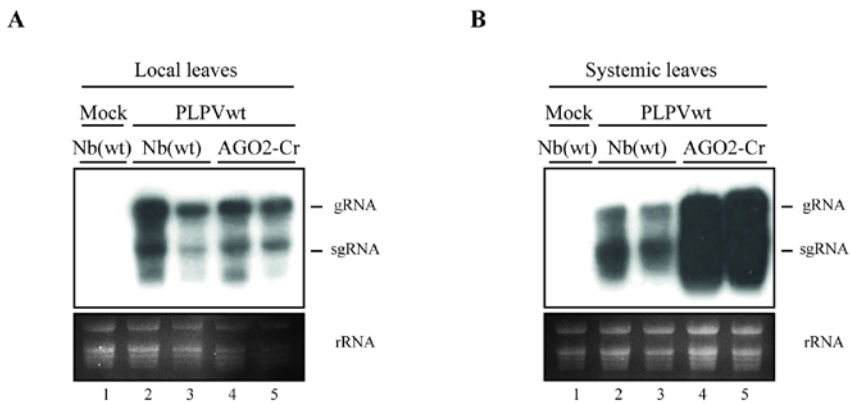


FIGURE 4. Accumulation of wt PLPV in an AGO2-inactivated *N. benthamiana* line. The wt PLPV was agroinoculated in wt *N. benthamiana* and in *N. benthamiana* AGO2-Cr line (with AGO2 inactivated through a CRISPR/Cas9 approach). Northern blot analysis of local (A) and systemic (B) leaves collected at 7 d.p.i and 42 d.p.i, respectively, was performed with a PLPV-specific riboprobe. Positions of the PLPV genomic (g) and subgenomic (sg) RNAs are indicated at the right of the blots and ethidium bromide staining of rRNAs is included below the blots as loading controls. Duplicate samples are shown for each virus-plant line combination.

DISCUSSION

In this work, the importance of dicing and slicing activities in the *N. benthamiana* response against PLPV has been evaluated following a genetic approach. In a previous work, the high proportion of vsRNAs detected in PLPV infected plants together with their RDR6-independent production as well as the balanced presence of plus and minus vsRNA strands, suggested that most of these sRNA species corresponded to primary vsRNAs efficiently produced from viral dsRNA replication intermediates (Pérez-Cañamás et al., 2017). Such efficient targeting of viral replication forms could be sufficient by itself to restrain infection, keeping viral titers at low levels and making the participation of slicing activities dispensable. However, through the employment of *N. benthamiana* lines with DCL or AGO2 functions impaired, here we have clearly shown that both types of activities, dicing and slicing, contribute to viral clearance.

The genetic evidence obtained on the relative degree of involvement of DCL4 and DCL2 in anti-PLPV defence is consistent with the distribution of vsRNA size classes in PLPV-infected *N. benthamiana* plants (Pérez-Cañamás et al., 2017) and is also in agreement with data obtained in other plant-virus combinations (Blevins et al., 2006; Deleris et al., 2006; Donaire et al., 2008; García-Ruiz et al., 2010). No clear evidence for involvement of DCL3 in the combat against PLPV was achieved though, from previous data, it could already be anticipated a very minor role for that enzyme (Pérez-Cañamás et al., 2017).

The finding of the participation of AGO2 in anti-PLPV silencing extends the number of viruses that are affected by this

particular slicer. For some time, studies performed in *A. thaliana* pointed to AGO1 as the main effector in antiviral defence (Morel et al., 2002; Qu et al., 2008; Wang et al., 2011). However, subsequent studies with such model plant species revealed that AGO2 also plays an important role in the plant race against viruses, especially, though not only, when facing viruses that are not known to target AGO1 (Carbonell et al., 2012; García-Ruiz et al., 2015; Harvey et al., 2011; Jaubert et al., 2011; Ma et al., 2015; Zhang et al., 2012). Information about this topic in other plant species is, comparatively, much less known and essentially restricted to *Oryza sativa* and *N. benthamiana* (Carbonell and Carrington, 2015). In the latter case, evidence for the involvement of AGO1 in the response against tomato ringspot virus has been obtained (Ghoshal and Sanfaçon, 2014). In addition, *N. benthamiana* AGO2 has been reported to be involved in the fight against distinct types of viruses (Ludman et al., 2017; Odokonyero et al., 2015; 2017; Paudel et al., 2018; Scholthof et al., 2011), suggesting that this specific AGO is a key antiviral factor in this plant species. However, more studies are needed to evaluate the relative importance of AGO1 and AGO2, or of other AGOs, in *N. benthamiana* antiviral silencing. As in other hosts, such importance is likely to be virus-dependent. This dependency may be influenced by the way of action of the corresponding VSR and, also, by the characteristics of the vsRNAs present in infected tissue. More specifically, the identity of the 5'-terminal nucleotide is known to determine, to great extent, sRNA loading in a particular AGO (Mi et al., 2008; Takeda et al., 2008). Interestingly, AGO2 has preferred binding affinities by sRNAs with a 5'-terminal A and PLPV sRNAs with such terminal residue were the most abundant in infected plants (29.96%; Pérez-Cañamás et al., 2017).

Nevertheless, they were closely followed by vsRNAs with a 5'-terminal U (29.76%) that are presumably loaded into AGO1 and, thus, this AGO (or even additional AGOs since non-negligible amounts of PLPV sRNAs with 5'-terminal C or G were found in infected tissue) could likewise be taking part in the contest against PLPV. It is also worth noting that PLPV p37 has been shown to interact with AGO1 (Pérez-Cañamás and Hernández, 2015) and, on the assumption that AGO1 function is effectively undermined by this interaction, AGO2 could be acting as a second defense layer against PLPV, as proposed in other instances (Harvey et al., 2011). In any case, the participation of AGO1 and/or other AGOs in cooperation with AGO2 in the *N. benthamiana* struggle against PLPV may be critically assessed when plant lines with other slicers inactivated become available.

In agreement with that observed in other plant-virus interactions (e.g. Morel et al., 2002; Qu et al., 2008; Ludman et al., 2017), the effects of the impairment of silencing components on PLPV infection were particularly obvious when a VSR-defective virus was employed. Strikingly, such effects were also apparent in systemic leaves of *N. benthamiana* AGO2-Cr plants infected by the wt virus in contrast with that observed with the distinct DCL RNAi lines. Though these differences may be due to several reasons, a likely possibility is that, whereas inactivation of AGO2 through CRISPR/Cas9 is complete, downregulation of DCL factors through RNAi is only partial and, thus, the remaining DCL amounts may still contribute to limit infection. In addition, RNAi may be weakened by the PLPV VSR, raising DCL levels. The paradox of studying components of RNA silencing by using RNAi techniques has been already pointed out by some authors (Scholthof et al., 2011; Ludman et al., 2017), as this approach relies on

those molecules that are intended to be knocked down. Hence, it is reasonable to assume that CRISPR/Cas9 approaches are much more suitable when analyzing the role of RNA silencing components in any biological process and, especially, in antiviral defence.

The lack of systemic infection by the PLPV-mutp37 in double/triple DCL RNAi or AGO2-Cr lines is puzzling, as this virus mutant accumulates at considerably high levels in local leaves of the modified plants. The ultimate reasons of this observation are unclear but they could be related with the need to reach a defined threshold level for efficient virus exit from the local leaves to the vascular system and/or a defined concentration of “circulating” virus in the vascular system to efficiently enter systemic leaves (Gutiérrez et al., 2012). In these scenarios, minor downward variations in virus titers may preclude any of these processes. In addition, the silencing components could be somehow involved in virus systemic movement, as has been recently suggested for DCL4 (Cordero et al., 2017). Another alternative that cannot be ruled out concerns the particular mutant virus that has been employed in this study. As indicated before, that mutant harbors a single aa replacement in p37 that abolishes its VSR function but preserves its encapsidation capability. Such mutation also impairs the nucleolar localization of the protein which, according to our recent results, may be detrimental for virus accumulation (Pérez-Cañamás and Hernández, 2018). More investigation will be required to ascertain which and how many host factors have to be knocked out for a VSR-disabled PLPV behave as a fully functional virus.

Finally, there are some examples reported in which the impairment of silencing components led to an increment in wt virus

accumulation that, even when being small and/or transient, had drastic consequences on viral symptoms (Harvey et al., 2011; Ludman et al., 2017). Conversely, no phenotypic effects were observed in any of the engineered *N. benthamiana* lines infected by wt PLPV, despite the considerable increase in wt virus titers observed in systemic leaves of AGO2-Cr plants (Fig. 4B). This observation suggests that the virus has robustly evolved to pass unnoticed, likely because its asymptomatic condition favours its prevalence. Whether higher augmentations in wt PLPV titers may result in plant disease remains to be seen.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant BFU2015-70261 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, Spain)-FEDER (to C. H). M.P.-C. and E. H.were recipients of contracts from MINECO-FEDER.

REFERENCES

- Baulcombe, D. 2005. RNA silencing. *Trends Biochem. Sci.* 30, 290-293.
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, Jr F., Hohn, T., Pooggin, M.M. 2006. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res.* 34, 6233–6246.

- Carbonell, A., Carrington, J.C. 2015. Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27, 111-117.
- Carbonell, A., Fahlgren, N., García-Ruiz, H., Gilbert, K.B., Montgomery, T.A., Nguyen, T., Cuperus, J.T., Carrington, J.C. 2012. Functional analysis of three Arabidopsis ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell* 24, 3613-3629.
- Castaño, A., Hernández, C. 2005. Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pelargonium line pattern virus* and its relationship with the family *Tombusviridae*. *Arch Virol.* 150, 949-965.
- Castaño, A., Ruiz, L., Hernández, C. 2009. Insights into the translational regulation of biologically active open reading frames of *Pelargonium line pattern virus*. *Virology* 386, 417-426.
- Cordero, T., Cerdán, L., Carbonell, A., Katsarou, K., Kalantidis, K., Daròs, J.A. 2017. Dicer-Like 4 Is Involved in Restricting the Systemic Movement of Zucchini yellow mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 30, 63-71.
- Csorba, T., Pantaleo, V., Burgyán, J. 2009. RNA silencing: an antiviral mechanism. *Adv. Virus Res.* 75, 35-71.
- Csorba, T., Kontra, L., Burgyán, J. 2015. Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* 479-480, 85-103.

- Dadami, E., Boutla, A., Vrettos, N., Tzortzakaki, S., Karakasilioti, I., Kalantidis, K. 2013. DICER-LIKE 4 but not DICER-LIKE 2 may have a positive effect on potato spindle tuber viroid accumulation in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant.* 6, 232-234.
- Deleris, A., Gallego-Bartolomé, J., Bao, J. S., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Voinnet, O. 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68–71.
- Diaz-Pendon, J.A., Li F., Li, W.X., Ding, S.W. 2007. Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* 19, 2053-2063.
- Ding, S.W., Voinnet, O. 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426.
- Ding, S.W. 2010. RNA based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 632-644.
- Donaire, L., Barajas, D., Martínez-García, B., Martínez-Priego, L., Pagán, I., Llave, C. 2008. Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *J. Virol.* 82, 5167-5177.
- Flynt, A., Liu, N., Martin, R., Lai, E.C. 2009. Dicing of viral replication intermediates during silencing of latent *Drosophila* viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 5270-5275.

- García-Ruiz, H., Carbonell, A., Hoyer, J.S., Fahlgren, N., Gilbert, K.B., Takeda, A., Giampetruzzi, A., García-Ruiz, M.T., McGinn, M.G., Lowery, N., Martínez-Badalejo M.T., Carrington, J.C. 2015. Roles and programming of Arabidopsis ARGONAUTE proteins during turnip mosaic virus infection. *PLoS Pathog.* 11:e1004755.
- García-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E. J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Brempelis, K.J., Carrington, J.C. 2010. Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip mosaic virus infection. *Plant Cell* 22, 481-496.
- Ghoshal, B., Sanfaçon, H. 2014. Temperature-dependent symptom recovery in *Nicotiana benthamiana* plants infected with tomato ringspot virus is associated with reduced translation of viral RNA2 and requires ARGONAUTE 1. *Virology* 456-457, 188-197.
- Gutiérrez, S., Yvon, M., Pirolles, E., Garzo, E., Fereres, A., Michalakis, Y., Blanc, S. 2012. Circulating virus load determines the size of bottlenecks in viral populations progressing within a host. *PLoS Pathog.* 8, e1003009.
- Harvey, J.J., Lewsey, M.G., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J.P., Baulcombe, D.C. 2011. An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One* 6, e14639.
- Jaubert, M.J., Bhattacharjee, S., Mello, A.F., Perry, K.L., Moffett, P. 2011. ARGONAUTE2 mediates RNA silencing antiviral

defenses against Potato virus X in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 156, 1556–1564

Katsarou, K., Mavrothalassiti, E., Dermauw, W., Van Leeuwen, T., Kalantidis, K. 2016. Combined activity of DCL2 and DCL3 is crucial in the defense against potato spindle tuber viroid. *PLoS Pathog.* 12, e1005936.

Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y.P., Dolja, V.V., Calvino, L.F., López-Moya, J.J., Burgyán, J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* 25, 2768-2780.

Liu, Q., Feng, Y., Zhu, Z. 2009. Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Funct. Integr. Genomics* 9, 277–286.

Llave, C. 2010. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci.* 15, 701-707.

Ludman, M., Burgyán, J., Fátýol, K. 2017. CRISPR/Cas9 mediated inactivation of Argonaute 2 reveals its differential involvement in antiviral responses. *Sci. Rep.* 7, 1010.

Ma, X., Nicole, M.C., Meteignier, L.V., Hong, N., Wang, G., Moffett, P. 2015. Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants. *J. Exp. Bot.* 66, 919-932.

Mallory, A., Vaucheret, H. 2010. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* 22, 3879-3889.

- Mérai, Z., Kerényi, Z., Kertész, S., Magna, M., Lakatos, L., Silhavy, D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J. Virol.* 80, 5747-5756.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G.J., Qi, Y. 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133, 116–127.
- Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., Vaucheret, H. 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* 14, 629-639.
- Nakasugi, K., Crowhurst, R.N., Bally, J., Wood, C.C., Hellens, R.P., Waterhouse, P.M. 2013. *De novo* transcriptome sequence assembly and analysis of RNA silencing genes of *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One* 8, e59534.
- Odokonyero, D., Mendoza, M.R., Alvarado, V.Y., Zhang, J., Wang, X., Scholthof, H.B. 2015. Transgenic down-regulation of ARGONAUTE2 expression in *Nicotiana benthamiana* interferes with several layers of antiviral defenses. *Virology* 486, 209-218.
- Odokonyero, D., Mendoza, M.R., Moffett, P., Scholthof, H.B. 2017. Tobacco rattle virus (TRV)-mediated silencing of *Nicotiana benthamiana* ARGONAUTES (N) reveals new antiviral candidates and dominant effects of TRV-NbAGO1. *Phytopathology* 107, 977-987.

- Omarov, R.T, Ciomperlik, J.J., Scholthof, H.B. 2007. RNAi-associated ssRNA-specific ribonucleases in tombusvirus P19 mutant-infected plants and evidence for a discrete siRNA-containing effector complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 1714-1719
- Pantaleo, V., Szittyá, G., Burgyan, J. 2007. Molecular bases of viral RNA targeting by viral siRNA programmed RISC. *J. Virol.* 81, 3797-3806.
- Paudel, D.B., Ghoshal, B., Jossey, S., Ludman, M., Fatyol, K., Sanfaçon, H. 2018. Expression and antiviral function of ARGONAUTE 2 in *Nicotiana benthamiana* plants infected with two isolates of tomato ringspot virus with varying degrees of virulence *Virology* 524, 127-139
- Pérez-Cañamás, M., Blanco-Pérez, M., Forment, J., Hernández, C. 2017. *Nicotiana benthamiana* plants asymptotically infected by *Pelargonium line pattern virus* show unusually high accumulation of viral small RNAs that is neither associated with DCL induction nor RDR6 activity. *Virology* 501, 136-146.
- Pérez-Cañamás, M., Hernández, C. 2015. Key importance of small RNA binding for the activity of a glycine-tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *J. Biol. Chem.* 290, 3106-3120 .
- Pérez-Cañamás, M., Hernández, C. 2018. New insights into the nucleolar localization of a plant RNA virus-encoded protein that acts in both RNA packaging and RNA silencing suppression: involvement of importins alpha and relevance for viral infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* 31, 1134-1144.

- Pyott, D.E., Molnar A. 2015. Going mobile: non-cell-autonomous small RNAs shape the genetic landscape of plants. *Plant Biotechnol. J.* 13, 306-318.
- Pumplin, N., Voinnet, O. 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 745-760.
- Qu, F., Ye, X., Morris, T.J. 2008. *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 14732–14737.
- Roossinck, M.J. 2010. Lifestyles of plant viruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 1899–1905.
- Scheets, K., Jordan, R., White, K.A., Hernández, C. 2015. *Pelarspovirus*, a proposed new genus in the family *Tombusviridae*. *Arch. Virol.* 160, 2385-2393.
- Scholthof, H.B., Alvarado, V.Y., Vega-Arreguin, J.C., Ciomperlik, J., Odokonyero, D., Brosseau, C., Jaubert, M., Zamora, A., Moffett, P. 2011. Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* 156, 1548-1555.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., Watanabe, Y. 2008. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol.* 49, 493–500.

- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyán, J., Hall, T.M. 2003. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115, 799-811.
- Verwoerd, T.C., Dekker, M.M., Hoekema, A. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17, 2362.
- Wang, X.B., Jovel, J., Udomporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W.X., Gascioli, V., Vaucheret, H., Ding, S.W. 2011. The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 1625-1638.
- Wassenegger, M., Krczal, G. 2006. Nomenclature and functions of RNA directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.* 11, 142-151.
- Ye, K., Malinina, L., Patel, D.J. 2003. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 426, 874-878
- Zhang, X., Zhang, X., Singh, J., Li, D., Qu, F. 2012. Temperature-dependent survival of Turnip crinkle virus-infected *Arabidopsis* plants relies on an RNA silencing-based defense that requires dcl2, AGO2, and HEN1. *J. Virol.* 86, 6847-6854.

DISCUSIÓN GENERAL

El PLPV (género *Pelarspovirus*, familia *Tombusviridae*) es uno de los agentes virales con mayores porcentajes de incidencia en especies del género *Pelargonium*. Estudios previos con este virus han permitido conocer la organización de su genoma, obtener información sobre su variabilidad molecular, disponer de un clon infeccioso, identificar funciones de sus proteínas y recabar datos acerca de sus estrategias de transcripción y traducción. Puesto que, como otros virus, el PLPV es inductor y diana de los procesos de silenciamiento por RNA, en este trabajo se ha analizado la posible actividad VSR de las proteínas que codifica. Los resultados obtenidos en esta tesis han aportado, además, información sobre el mecanismo de acción y sobre ciertas características del supresor del PLPV, y han desvelado otros aspectos de la interacción planta-virus relacionados con los procesos de silenciamiento.

La proteína de cubierta p37 del PLPV: un potente VSR con un motivo GW cuya actividad se basa fundamentalmente en su capacidad de unir sRNA

En este trabajo, el análisis de la capacidad supresora de las proteínas codificadas por el PLPV, mediante ensayos de agroinfiltración en *N. benthamiana* y usando un gen delator, nos ha permitido conocer que la CP del PLPV, la proteína p37, actúa como un VSR muy potente. Entre los distintos géneros de la familia *Tombusviridae*, existe cierta variabilidad en lo que respecta a la proteína que actúa como supresor. En este aspecto, el PLPV, miembro tipo del nuevo género *Pelarspovirus*, se asemejaría a los miembros del género *Carmovirus*, cuya CP también actúa como inhibidor del PTGS

(Martínez-Turiño and Hernández, 2009; Meng et al., 2006; Qu et al., 2003; Thomas et al., 2003). Puesto que los VSR pueden emplear estrategias distintas para bloquear la ruta de silenciamiento, nos propusimos identificar el mecanismo por el cual la proteína p37 inhibe esta ruta. En el Capítulo 1, el diseño de mutantes de p37 y el estudio de propiedades de cada variante proteica que pudieran ser relevantes para su función supresora, han permitido conocer que p37, pese a tener un motivo GW que parece mediar su interacción con, al menos, AGO1, emplea el secuestro de sRNA como estrategia principal. De esta forma, la unión a sRNA impediría su carga en RISC, evitando el corte de los RNA diana. Además, la baja detección de sRNA derivados del gen delator en plantas donde se había expresado p37 de forma transitoria, sugiere que la asociación a sRNA por parte de este supresor también podría estar interfiriendo en la ruta de amplificación del silenciamiento. El secuestro de sRNA es la estrategia más recurrente entre VSR distintos, aunque no compartan similitud de secuencia ni estén relacionados estructural ni filogenéticamente (Lakatos et al., 2006; Mérai et al., 2006; Vargason et al., 2003; Ye et al., 2003). Los mutantes generados también nos han permitido desacoplar la función de supresión y la función de encapsidación de la proteína, y hemos podido determinar que ambas funciones son esenciales para la infectividad del virus.

La proteína p37 del PLPV es homóloga a la proteína p38 del carmovirus TCV, un VSR que había sido objeto de distintos estudios en trabajos previos al nuestro. Como se ha indicado en Capítulo 1, en dichos estudios se habían propuesto diferentes modos de acción para este supresor (Deleris et al., 2006; Endres et al., 2010; Mérai et al., 2006; Vogler et al., 2007). Sin embargo, la presencia de dos motivos

GW en p38 llevó a pensar que este VSR podría estar interfiriendo con el ensamblaje de RISC mediante interacción con AGO, un supuesto que pareció confirmarse al comprobar que los motivos GW de p38 estaban involucrados en la interacción con AGO1 y que su mutación anulaba, simultáneamente, dicha interacción y la función supresora de la proteína (Azevedo et al., 2010). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo han mostrado que, al igual que ocurre en el caso de p37, la mutación de motivos GW en p38 no solo afecta a su interacción con AGO1, sino que también elimina la capacidad de la proteína de secuestrar sRNA. Esto sugería que esta última capacidad, más que la asociación a AGO, es la que determina la función VSR de p38, cuestionando el modelo propuesto por Azevedo et al. (2010). Estos mismos autores han re-evaluado dicho modelo en un trabajo reciente (Iki et al., 2017), llegando, al igual que nosotros, a la conclusión de que p38 ejerce su acción fundamentalmente a través de la unión de sRNA. Los resultados subrayan la dificultad que entraña el análisis de relaciones estructura-función en estos y, probablemente, otros VSR dada su naturaleza multifuncional y el frecuente solapamiento de señales en la secuencia de estos productos virales. El establecimiento de sus dianas primarias debe pues realizarse con cautela y utilizando una batería adecuada de mutantes y de ensayos para evitar interpretaciones erróneas o inexactas de los resultados.

La presencia de VSR durante las infecciones virales se ha relacionado en muchos casos con la inducción de síntomas en los huéspedes (Brigneti et al., 1998; Jay et al., 2011; Kasschau et al., 2003; Koseki et al., 2005). A pesar de que el PLPV codifica un supresor muy potente, este virus causa normalmente infecciones asintomáticas, tanto en sus huéspedes naturales como en huéspedes experimentales (Alonso

and Borja, 2005; Castaño and Hernández, 2007). Esto parece indicar que el virus podría estar empleando alguna estrategia para minimizar el impacto de su infección sobre la planta, ya que efectos muy negativos sobre la misma podrían afectar a la supervivencia del virus. Una de las estrategias podría ser la regulación a la baja de la expresión del VSR, tal y como se ha discutido en el Capítulo 1, lo que podría contribuir a reducir los posibles efectos adversos de este supresor sobre la expresión génica del huésped. Otras estrategias podrían ser la compartimentalización subcelular del VSR o la modulación de su actividad mediante interacción con otras proteínas y/o mediante modificaciones post-traduccionales. Predicciones *in silico* muestran que la proteína p37 podría sufrir modificaciones como fosforilación, O-glicosilación, ubiquitinación o sulfatación en algunos de sus residuos (datos no mostrados), aunque la validez de estas predicciones está por confirmar. Serán necesarias investigaciones adicionales para poder aportar más luz a este respecto.

Relacionado con el punto anterior, es interesante señalar que en un estudio realizado en el curso de este trabajo en el que se caracterizaron los sRNA en plantas de *N. benthamiana* infectadas por el PLPV, se observó que la infección viral induce cambios en la acumulación de algunos miRNA (Pérez-Cañamás et al., 2017). Aunque la variación en los niveles de miRNA se ha relacionado, como se ha indicado en la Introducción general, con la actividad VSR y con la inducción de síntomas en algunas combinaciones virus-huésped (Jay et al., 2011; Kasschau et al., 2003), en el caso del PLPV estas alteraciones no presentan consecuencias a nivel fenotípico. En este contexto, cabe mencionar que, como ya se ha comentado anteriormente, un trabajo reciente cuestiona que el desarrollo de síntomas durante una infección

viral esté causado por el secuestro de miRNA por parte del VSR (Kontra et al., 2016). En este trabajo se pudo observar que la cantidad de miRNA asociados a la proteína p19 en una infección por tobusvirus es insignificante y difícilmente podría justificar la aparición de síntomas. En este mismo trabajo se pudo constatar que en el curso de una infección, p19 se asocia fundamentalmente con vsRNA. Aunque el tipo de sRNA que une p37 durante la infección por el PLPV está por determinar, es muy posible que también corresponda esencialmente a vsRNA lo que, por una parte, protegerá al virus del silenciamiento antiviral y, por otra, bloqueará la posible acción de los vsRNA sobre genes endógenos, minimizando los efectos sobre el huésped.

Por último, la generación de clones virales sin la capacidad supresora de p37 nos ha permitido conocer que la pérdida de la función VSR disminuye muy drásticamente la infectividad del PLPV, impidiendo su acumulación a partir de los 3-4 días de la inoculación incluso en hojas inoculadas. En estudios con otros virus en los que se ha empleado este tipo de mutantes, la disminución de los títulos virales no fue tan acusada y el genoma viral era fácilmente detectable incluso a 7 días post-inoculación, a pesar de que el silenciamiento por RNA en esa ventana de tiempo ya se ha activado (Omarov et al., 2006; Qu et al., 2008). Más aún, algunos virus con la función VSR anulada son incluso capaces de establecer infecciones sistémicas aunque con menor eficacia que el virus silvestre (Landeo-Ríos et al., 2016b; Wang et al., 2010). En el caso del PLPV, sus infecciones se caracterizan por presentar un bajo título viral lo que podría explicar el marcado efecto que tiene la anulación de la capacidad supresora del virus sobre su acumulación, ya que dicha acumulación podría caer por debajo del umbral mínimo

requerido para el progreso de la infección (Gutiérrez et al., 2012). Es interesante mencionar también que, además del PTGS, en plantas existen otras rutas de degradación de RNA que, normalmente, se encargan de reconocer moléculas defectuosas para su eliminación. Una de estas rutas, conocida como *RNA decay*, depende de exonucleasas y es crucial para el control de la calidad y la cantidad de los mRNA en el citoplasma (Zhang and Guo, 2017). Esta ruta, al parecer, también puede actuar como un mecanismo antiviral, procesando los RNA exógenos para facilitar su degradación a través de la ruta de silenciamiento o degradando los RNA cuando el PTGS está bloqueado (Moon and Wilusz, 2013). También se ha descrito que las infecciones virales aumentan la expresión de las proteínas implicadas en este proceso degradativo (Li and Wang, 2018). Además, al parecer algunos VSR no solo suprimen el silenciamiento por RNA sino que también son capaces de inhibir esta ruta adicional de degradación mediante el secuestro de factores (Li and Wang, 2018). En este trabajo nos hemos centrado en el silenciamiento por RNA frente al PLPV. Desconocemos, pues, si la ruta mencionada de degradación del RNA afecta a la infección viral y si p37 ejerce algún efecto sobre la misma. En tal caso, las modificaciones introducidas en p37 en este trabajo podrían anular también la capacidad de la proteína para interferir con dicha ruta, contribuyendo a reducir la eficacia de los virus mutantes.

La localización nucleolar de p37 está determinada por una NoLS en la región N-terminal de la proteína y por su interacción con importinas α y tiene, aparentemente, un efecto positivo sobre la acumulación del virus

Una de las características más intrigantes de la proteína p37 es su localización nuclear/nucleolar. Esta localización nuclear/nucleolar de p37 era difícilmente previsible, puesto que las dos funciones conocidas de la proteína, encapsidación y supresión del silenciamiento, se espera que sean desarrolladas en el citoplasma. Como se ha mencionado en el Capítulo 1, otros VSR también muestran una localización nuclear y/o nucleolar y, aunque esta característica se relacionó en algunos casos con la función supresora, este punto no se ha podido confirmar de forma inequívoca (Chiba et al., 2013; González et al., 2012; Lucy et al., 2000; Ruiz-Ruiz et al., 2013). En el Capítulo 2, nos planteamos explorar varios aspectos relacionados con este tema, específicamente, qué rasgos estructurales de la proteína y qué factores del huésped están involucrados en la localización nucleolar de p37 y, más aún, si dicha localización confiere alguna ventaja o, por el contrario, interfiere con el proceso infeccioso.

Los resultados de este apartado han permitido acotar la presencia de una NoLS en el extremo N-terminal de la proteína, concretamente, en un segmento que abarca los 45 primeros aminoácidos. Entre estos, los aminoácidos básicos se encuentran en proporción relativamente elevada (18%), lo que suele ser una característica de los NoLS (y también de NLS) aunque, a pesar de ello, programas computacionales diseñados para tal fin no permitieron identificar *in silico* ningún NoLS en la molécula de p37. Esto subraya

la dificultad, ya apuntada por distintos autores, que supone la predicción de NoLS por la considerable diversidad de motivos que desempeñan esta función (Scott et al., 2010). Además, el análisis de la localización subcelular de versiones truncadas de la proteína nos ha permitido conocer que los tres dominios estructurales de p37 (N-terminal, intermedio y C-terminal, también conocidos como R, S y P; Rochon et al., 2012) localizan en el núcleo, sugiriendo la posibilidad de que existan diversas NLS en la secuencia de la proteína. Aunque, como se ha mencionado anteriormente, análisis *in silico* de la proteína p37 no revelaron la presencia de ninguna NLS o NoLS en la molécula, los programas bioinformáticos sí que predijeron la presencia de una señal de exportación nuclear (*nuclear export signal*, NES) en el dominio S de la proteína, sugiriendo que la entrada y/o salida de p37 en el núcleo/nucleolo de la célula podría ser un proceso dinámico y regulado. Sin embargo, experimentos llevados a cabo en el laboratorio no han permitido corroborar la funcionalidad de esta NES potencial (Fajardo Flores, 2014), una cuestión que quizá requeriría una exploración más detallada.

En el presente trabajo también hemos podido determinar que p37 emplea la clásica ruta de importinas para alcanzar el núcleo y el nucleolo. Los resultados indican que p37 interacciona con distintos miembros de la familia de las importinas α y que esta interacción interviene en la localización nucleolar de la proteína. Curiosamente, el silenciamiento de las importinas α en *N. benthamiana*, aunque redujo considerablemente la presencia de p37 en el núcleo, no anuló completamente esta localización. Tal y como se ha apuntado en el Capítulo 2, no podemos descartar que otras rutas de transporte nuclear estén implicadas en la localización de p37. Por otro lado, estudios

recientes sobre el transporte de macromoléculas al núcleo han mostrado que el NPC actúa como una barrera “blanda” para la difusión pasiva (Timney et al., 2016). Hasta ahora, siempre se había considerado que la difusión macromolecular pasiva a través del NPC disminuía drásticamente a partir del umbral de tamaño de 30–60 kD. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que las proteínas relativamente grandes, más grandes del corte establecido, a menudo se reparten por igual entre el núcleo y el citoplasma, de forma similar a como lo hacen las proteínas más pequeñas (Timney et al., 2016; Wühr et al., 2015). En el modelo descrito en estos estudios, los dominios fenilalanina-glicina (FG) de las nucleoporinas ocupan el canal central del NPC pero, debido a su naturaleza química y desordenada, este canal todavía es permeable a las macromoléculas. Para que estas macromoléculas pasen a través del NPC, han de ser capaces de desplazar estos dominios, competir por el volumen disponible y restringir las conformaciones de los dominios FG. La difusión pasiva es un proceso lento, de modo que, cuando se requiere rapidez, especificidad y/o altos niveles de transporte, se necesita la intervención de los transportes nucleares. Estos transportadores parecen inhibir la difusión pasiva al competir por la interacción con las nucleoporinas (Timney et al., 2016). Así pues, en ausencia de importinas, no podemos descartar que la localización nuclear de p37 se deba a esta difusión pasiva, que podría actuar al no ser inhibida por los transportadores.

Parece claro, en base a los resultados obtenidos, que la interacción importina α -p37 determina la presencia de esta última en nucleolo. Además, hemos detectado que existe una correlación entre la pérdida de localización nucleolar, a través del silenciamiento de importinas α , y la acumulación del virus (al menos en estadios

tempranos) lo que sugiere que la entrada en nucleolo de la proteína confiere alguna ventaja durante el ciclo infeccioso. La naturaleza de esta ventaja está por desentrañar pero podría obedecer a razones diversas, tal como se ha comentado en el Capítulo 2, entre las que se podrían incluir: a) la retirada de parte de la proteína del citoplasma para mantener proporciones óptimas de los productos virales en el compartimento celular donde tiene lugar la replicación, b) la alteración del transporte nucleocitoplasmático que conduzca a un cambio en la homeostasis celular que favorezca la multiplicación viral, c) la interferencia con funciones del nucleolo, o, d) el reclutamiento de un componente nucleolar que facilite alguna de las etapas del ciclo reproductivo. En esta última dirección, se calcula que el nucleolo, en plantas, puede tener unas 200 proteínas y un número indeterminado de RNA (Hiscox et al., 2010), de modo que la red de interacciones nucleolares de p37 podría ser muy extensa y sus consecuencias difíciles de prever.

Algunos estudios recientes con proteínas virales que presentan localización nucleolar han mostrado interacciones con proteínas de este cuerpo subnuclear y, en algunos casos, se han obtenido datos acerca de su posible papel en el ciclo infeccioso del virus. Un ejemplo es la interacción de proteínas virales con la fibrilarina, una de las proteínas más abundantes del nucleolo, para formar complejos que facilitan el movimiento del virus (Chang et al., 2016; Kim et al., 2007; Li et al., 2018). Sin embargo, estudios con otros virus han mostrado que la interacción con este factor nucleolar no está relacionada con el movimiento del virus y se ha sugerido que podría estar interviniendo en otros procesos como la replicación viral, la supresión del silenciamiento, la transcripción del huésped o el procesamiento de los mRNA

(Rajamäki and Valkonen, 2009; Wang et al., 2012). Resultados recientes obtenidos en el laboratorio muestran que p37 es capaz de interactuar con algunas proteínas nucleolares (datos no mostrados), pero serán necesarios estudios adicionales para esclarecer el posible significado biológico de esta observación.

Recientemente también se ha descrito la interacción en el nucleolo de un VSR con una proteína relacionada con la ruta citoplasmática del *RNA decay* (Li and Wang, 2018). Como se ha comentado anteriormente, los RNA virales no solo inducen el PTGS sino que también son sustratos de esta ruta de degradación, que parece tener una función secundaria al silenciamiento por RNA en la defensa antiviral (Moon and Wilusz, 2013; Zhang and Guo, 2017). Esta ruta también puede ser bloqueada por VSR mediante el secuestro de factores. Concretamente, la proteína VPg del TuMV, con función VSR, es capaz de interactuar con DCP2, una proteína que forma el complejo encargado de eliminar la estructura 5' cap de los mRNA para que sean posteriormente degradados. Esta interacción, detectada en el nucleolo, impide que DCP2 se acumule en el citoplasma, donde forma un complejo con DCP1 y otras proteínas para ejercer su función. Se ha sugerido que este VSR podría secuestrar DCP2 y mantenerla en el nucleolo para bloquear la ruta de degradación (Li and Wang, 2018).

Por otra parte, algunas proteínas virales podrían dirigirse al nucleolo para secuestrar y/o alterar las estructuras ribosomales que se forman en este compartimento. De este modo, los virus podían favorecer la traducción de sus propias proteínas o inhibir la traducción de proteínas del huésped en su propio beneficio. En algunas infecciones virales, tanto de virus de plantas como de animales, se ha observado un

aumento de acumulación de proteínas ribosomales (Rajamäki et al., 2017; Yang et al., 2007, 2009) y, además, también se han descrito interacciones de factores virales con estas proteínas que podrían ser relevantes en el ciclo infeccioso de los virus (Kalinina et al., 2018; Martínez and Daròs, 2014; Rajamäki et al., 2017).

Como se ha señalado anteriormente, el nucleolo también podría desempeñar una función de confinamiento de supresores virales. Esto podría representar una estrategia viral para modular la actividad de los VSR y conseguir un balance adecuado para preservar la integridad de la célula. Un VSR con localización citoplasmática, nuclear y nucleolar es la proteína 2b del CMV. En un trabajo realizado con esta proteína, se ha correlacionado el enriquecimiento de 2b en núcleo/nucleolo con un aumento de la virulencia del virus y con una aparición temprana de síntomas (necrosis), a pesar de que esta localización compromete la función supresora de la proteína y no causa un aumento sustancial de los títulos virales. Por el momento se desconoce el mecanismo por el cual la localización nucleolar afecta a la virulencia del virus, pero se ha sugerido que la distribución de 2b entre el citoplasma, núcleo y nucleolo podría contribuir a la patogénesis del CMV mediante la interferencia con la transcripción de genes del huésped que controlan el desarrollo de la planta y la muerte celular programada. El balance de proteína entre el citoplasma y el núcleo/nucleolo podrían permitir al CMV regular el equilibrio entre el daño celular y la acumulación viral para favorecer la infección del virus (Du et al., 2014). Recientemente se han identificado dos sitios de fosforilación en la secuencia de 2b que intervienen en el transporte de la proteína entre en citoplasma y núcleo y permiten regular la proporción de la proteína en los dos compartimentos y modular su actividad supresora (Nemes et al., 2017).

Por último mencionar que, a pesar de la alta acumulación observada de p37 en nucleolo, las plantas infectadas por el PLPV son indistinguibles desde un punto de vista fenotípico de plantas control no infectadas, lo que sugiere que este cuerpo subnuclear es capaz de albergar cantidades relevantes de una proteína exógena sin que se desarrolle una enfermedad en la planta.

DCL4, DCL2 y AGO2 intervienen en la defensa de *N. benthamiana* frente al PLPV

El empleo de mutantes de *N. benthamiana* afectados en la expresión de componentes de la ruta de silenciamiento, nos ha permitido sacar conclusiones acerca de actividades concretas de esta ruta que están involucradas en la defensa de la planta frente al virus. Un estudio previo en el que se caracterizaron los sRNA derivados del PLPV en plantas de *N. benthamiana* infectadas por el virus sugirió que dichos vsRNA corresponden a sRNA primarios producidos por el corte de los intermediarios replicativos de dsRNA mediado por las enzimas DCL (Pérez-Cañamás et al., 2017). Esto, unido a la acumulación inusualmente alta de dichos vsRNA, abría la posibilidad de que la actividad DCL fuera suficiente, o la más relevante, en el proceso de silenciamiento antiviral. Sin embargo, en este trabajo hemos mostrado que la actividad endonucleasa de AGO, concretamente de AGO2, desempeña también un papel clave en este proceso.

Como se ha indicado en Capítulo 3, los datos obtenidos sobre la contribución relativa de las distintas DCL en la defensa frente al PLPV, son consistentes con el perfil de tamaños de vsRNA encontrado en plantas infectadas (Pérez-Cañamás et al., 2017) y con lo descrito en

otras combinaciones virus-planta (Dadami et al., 2013; Donaire et al., 2008; García-Ruiz et al., 2010). Es curioso señalar que los resultados de este trabajo indican que DCL2 tiene un efecto menor frente al PLPV, a pesar de que la proporción de sRNA de 22 nt derivados del virus en plantas infectadas no está tan alejada (32.90%) de la de vsRNA de 21 nt (41.65%) (Pérez-Cañamás et al., 2017). Una posible explicación podría estar relacionada con la existencia de requisitos distintos en la defensa antiviral a nivel local y sistémico. En este sentido, se ha descrito que mientras que DCL4 es suficiente para el silenciamiento antiviral del TuMV en hojas inoculadas de *A. thaliana*, DCL2 y DCL4 son necesarias para el silenciamiento en tejidos sistémicos (García-Ruiz et al., 2010). Este asunto también ha sido abordado en un estudio más reciente, donde los resultados han mostrado que la acción de DCL2 es necesaria para generar las señales móviles para establecer un PTGS sistémico, mientras que DCL4 parece inhibirlo (Qin et al., 2017). Puesto que en la caracterización de los sRNA del PLPV se usó material sistémico y en este trabajo se ha podido constatar el efecto de las DCL a nivel local, esto podría ser la razón de por qué observamos una baja contribución de DCL2 a la respuesta antiviral, a pesar de la considerable cantidad de vsRNA de 22 nt que se detectaron en plantas de *N. benthamiana* infectadas por el virus.

Con respecto a las otras DCL, tanto DCL1 como DCL3 no parecen tener ningún efecto sobre la infección por el PLPV. Aunque se ha descrito que DCL1 regula negativamente el silenciamiento antiviral iniciado por DCL4 (Qu et al., 2008), la principal función de esta DCL está relacionada con la producción de los miRNA. Además, es complicado sacar conclusiones con respecto al efecto de DCL1, puesto que la reducción de la expresión de este gen en la línea transgénica

empleada es baja (Katsarou et al., 2016), ya que su supresión parece ser letal en *N. benthamiana*, tal y como ocurre en *A. thaliana* (Schauer et al., 2002). En cuanto a DCL3, esta proteína está asociada a la ruta de metilación del DNA mediada por RNA y al TGS y, aunque se ha descrito que podría desempeñar un papel crítico en la defensa de las plantas frente a la infección por viroides (Katsarou et al., 2016), DCL3 no parece ser un factor clave en las infecciones causadas por virus de RNA.

En este trabajo no se han analizado los vsRNA derivados del PLPV en cada una de las líneas transgénicas de *N. benthamiana*. Sin embargo, cabe esperar que la acumulación de los sRNA derivados de cada DCL se reduzca en las líneas donde la expresión de dicha DCL esté alterada, en consonancia con lo observado con otros agentes virales/subvirales (Donaire et al., 2008; Katsarou et al., 2016). También es esperable que los sRNA producidos por las DCL no afectadas aumenten, puesto que al eliminar la acción de una DCL, las enzimas restantes tendrán menos competencia para alcanzar y procesar los sustratos. Experimentos en marcha actualmente en el laboratorio permitirán confirmar (o refutar) estos supuestos.

El hallazgo de que AGO2 está involucrada en la defensa de *N. benthamiana* frente a PLPV, extiende el conjunto de virus que están afectados por esta endonucleasa particular que, hasta el momento, incluía a miembros de los géneros *Carmovirus*-, *Nepovirus*-, *Potexvirus*-, *Potyvirus*-, *Tobamovirus*-, *Tobravirus*- y *Tombusvirus* (Ludman et al., 2017; Odokonyero et al., 2015, 2017; Paudel et al., 2018; Scholthof et al., 2011). Estos resultados siguen abundando en la importancia de este efector en la respuesta antiviral de esta especie vegetal. Un estudio reciente llevado

a cabo en *N. benthamiana* con la proteína P1 del SPMMV, un VSR con tres motivos GW que interacciona con AGO1, ha relacionado la inhibición de AGO1 por parte del supresor con una mayor acumulación del mRNA de AGO2. Estudios anteriores ya habían mostrado que AGO1 actúa como un regulador negativo de AGO2, a través de la acción del miR403, y que AGO1 y AGO2 no tienen funciones solapantes, sino que actúan de forma sinérgica (Mallory and Vaucheret, 2010; Wang et al., 2011). Así pues, se ha sugerido que P1 podría estar inhibiendo los complejos de AGO1 cargados con el miR403, provocando un aumento de AGO2 en las células infectadas que estaría ejerciendo una función antiviral secundaria frente al SPMMV (Kenesi et al., 2017). En este trabajo, hemos podido observar un aumento de la acumulación del PLPV en plantas AGO2-Cr tanto con el virus silvestre como con el virus defectivo para el VSR. Puesto que este último debe ser, en principio, incapaz de interferir con AGO1, nuestros datos sugieren que AGO2 desempeña una función primaria en la lucha frente a este agente infeccioso.

El empleo de virus defectivos en función supresora permite establecer, de forma más evidente, la implicación de factores del huésped en silenciamiento antiviral, tal como hemos podido comprobar en este trabajo y como se ha puesto de manifiesto con otros virus (Ludman et al., 2017; Morel et al., 2002; Qu et al., 2008). En el caso del PLPV, resulta curiosa la falta de infección sistémica del virus mutante en las líneas transgénicas que presentan títulos virales considerablemente altos a nivel local. Aunque en el Capítulo 3 se han planteado distintos escenarios que podrían explicar esto, otra alternativa podría ser el VSR del PLPV bloqueara no solo el PTGS, sino también la ruta del *RNA decay* a través del secuestro de alguno de sus

componentes, tal como se ha propuesto para la proteína VPg del TuMV (Li and Wang, 2018). Como se ha indicado, esta última proteína secuestra y conduce a un factor de la ruta del *RNA decay* al nucleolo. Asumiendo que p37 se pueda comportar de la misma manera, este modo de actuación estaría anulado en el mutante viral empleado en nuestros ensayos cuya p37 no conserva la localización nucleolar. La incapacidad de este producto viral de interferir con la ruta del *RNA decay* podría estar afectando a la infección sistémica del virus mutante.

En este trabajo se han empleado líneas transgénicas de *N. benthamiana* creadas mediante dos estrategias distintas, RNAi y CRISPR/Cas9. Aunque, como ya se ha discutido en el Capítulo 3, esta última técnica puede ser particularmente adecuada para analizar la influencia de componentes de la ruta de silenciamiento sobre las infecciones virales, no hay que olvidar que puede causar letalidad en los mutantes generados si se anula la expresión de genes que son esenciales en alguna etapa del desarrollo. Por ejemplo, como se ha comentado anteriormente, el bloqueo de DCL1 es letal tanto en *A. thaliana* como en *N. benthamiana* (Katsarou et al., 2016; Schauer et al., 2002). En este caso, la generación de un mutante de DCL1 por RNAi es, sin duda, más conveniente, aunque la reducción en el nivel de expresión no sea muy acusada (Katsarou et al., 2018). La estrategia más adecuada para afectar la actividad de un determinado factor dependerá, pues, de las características concretas del factor en cuestión.

Para concluir, los resultados obtenidos en este trabajo (y otros obtenidos en paralelo en el laboratorio donde se ha desarrollado) han puesto de manifiesto que la CP del PLPV actúa como un VSR muy potente en ensayos de supresión *ad hoc*. La expresión/actividad de este

supresor es probablemente modulada en el curso de la infección ya que, pese a la efectividad del VSR, el virus es reconocido de forma muy eficiente por la maquinaria de silenciamiento del huésped, como revela la extraordinariamente elevada acumulación de vsRNA en plantas infectadas. Esta alta acumulación sugería la posibilidad de que el procesamiento de dsRNA viral por DCL fuera suficiente para limitar la infección por el virus. Sin embargo, los datos recabados han puesto de manifiesto que no solo DCL, sino que también AGO2 desempeñan un papel en la defensa del huésped (*N. benthamiana*) frente al PLPV. Finalmente, los datos de la localización nucleolar de p37 y del aparente efecto de esta localización sobre la acumulación del virus, sugieren que la proteína puede tener funciones adicionales a las ya descritas de encapsidación y VSR, una cuestión que subraya la naturaleza multifuncional de la mayoría de proteínas virales y que merecerá ser investigada en un futuro.

CONCLUSIONES

1. La proteína de cubierta, p37, del PLPV actúa como un potente supresor del silenciamiento inducido por RNA. Aunque p37 es capaz de interactuar con las proteínas AGO4 y AGO1, con esta última a través de un motivo GW, este producto viral parece desempeñar su función como supresor mediante el secuestro de sRNA, inhibiendo así la carga de estas moléculas en RISC.
2. Las dos funciones conocidas de p37, supresión del silenciamiento y encapsidación, son esenciales para que el PLPV alcance una infección sistémica. Esto sugiere que el virus debe combatir la respuesta antiviral y, también, formar viriones para promover su movimiento a larga distancia, de forma similar a lo descrito para distintos miembros de la familia *Tombusviridae*.
3. A pesar de que las funciones identificadas de p37 deben ser desempeñadas esencialmente en el citoplasma celular, esta proteína se localiza en citoplasma y núcleo, con gran acumulación en nucleolo. La señal que determina la localización nucleolar de p37 se sitúa en los primeros 45 aa de la proteína, una región rica en aminoácidos básicos y accesible para ser reconocida por los transportadores.
4. El transporte de p37 hacia el núcleo y nucleolo se produce a través de la clásica ruta de importinas. Concretamente, p37 interactúa con distintos miembros de la familia de las importinas alfa. El silenciamiento de estas importinas en *N.*

benthamiana, provoca la pérdida de localización nucleolar de p37 y afecta negativamente a la infectividad del PLPV.

5. DCL4, y en menor medida DCL2, son las principales enzimas involucradas en la degradación de dsRNA del PLPV durante la infección en *N. benthamiana*, en concordancia con los datos obtenidos en otras interacciones virus-huésped.
6. AGO2 es un factor clave en la respuesta de *N. benthamiana* frente al PLPV, lo que subraya la importancia de esta molécula efectora en defensa antiviral y extiende el número de virus afectados por la misma. Los datos obtenidos apuntan a que esta Argonauta podría desempeñar una función primaria en la lucha frente a este agente infeccioso.
7. La falta de sintomatología en las infecciones causadas por el PLPV, pese al potente supresor viral que codifica y a los elevados títulos virales que se obtuvieron tras el silenciamiento de AGO2 en plantas de *N. benthamiana*, indican que el PLPV parece haber evolucionado para pasar desapercibido, favoreciendo así su prevalencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Achkar, N.P., Cambiagno, D.A. and Manavella, P.A. (2016).** miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. *Trends Plant Sci.* 21, 1034–1044.
- Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., Harrach, B., Harrison, R.L., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Mushegian, A.R., et al. (2016).** Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). *Arch. Virol.* 161, 2921–2949.
- Adkar-Purushothama, C.R., Brosseau, C., Giguère, T., Sano, T., Moffett, P. and Perreault, J.P. (2015).** Small RNA Derived from the Virulence Modulating Region of the *Potato spindle tuber viroid* Silences callose synthase Genes of Tomato Plants. *Plant Cell* 27, 2178–2194.
- Adkar-Purushothama, C.R., Iyer, P.S. and Perreault, J.P. (2017).** *Potato spindle tuber viroid* infection triggers degradation of chloride channel protein CLC-b-like and Ribosomal protein S3a-like mRNAs in tomato plants. *Sci. Rep.* 7, 8341.
- Ahlquist, P. (2006).** Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 371–382.
- Alazem, M., He, M.H., Moffett, P. and Lin, N.S. (2017).** Abscisic Acid Induces Resistance against *Bamboo Mosaic Virus* through Argonaute2 and 3. *Plant Physiol.* 174, 339–355.
- Alonso, M. and Borja, M. (2005).** High incidence of *Pelargonium line pattern virus* infecting asymptomatic *Pelargonium* spp in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 95–100.

- Alonso, M., Gisbert, E., Fraga, M. and Borja, M. (1999).** Sintomatología de los virus que infectan geranio (Libro de resúmenes del VI Congreso Nacional de Virología).
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., and Vance, V.B. (1998).** A viral suppressor of gene silencing in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. 95(22), 13079-13084.
- Andrade, M.A., Petosa, C., O'Donoghue, S.I., Müller, C.W. and Bork, P. (2001).** Comparison of ARM and HEAT protein repeats. J. Mol. Biol. 309, 1–18.
- Aparicio, F. and Pallás, V. (2017).** The coat protein of *Alfalfa mosaic virus* interacts and interferes with the transcriptional activity of the bHLH transcription factor ILR3 promoting salicylic acid-dependent defence signalling response. Mol. Plant Pathol. 18, 173–186.
- Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M.A., Lagrange, T., et al. (2010).** Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. Genes Dev. 24, 904–915.
- Banerjee, R., Weidman, M.K., Navarro, S., Comai, L. and Dasgupta, A. (2005).** Modifications of both selectivity factor and upstream binding factor contribute to poliovirus-mediated inhibition of RNA polymerase I transcription. J. Gen. Virol. 86, 2315–2322.
- Baumberger, N. and Baulcombe, D.C. (2005).** Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. 102, 11928–11933.

- Baumberger, N., Tsai, C.H., Lie, M., Havecker, E. and Baulcombe, D.C. (2007).** The polerovirus silencing suppressor P0 targets argonaute proteins for degradation. *Curr. Biol.* 17, 1609–1614.
- Bayne, E.H., Rakitina, D.V., Morozov, S.Y. and Baulcombe, D.C. (2005).** Cell-to-cell movement of *Potato Potexvirus X* is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J.* 44, 471–482.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001).** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363–366.
- Bies-Etheve, N., Pontier, D., Lahmy, S., Picart, C., Vega, D., Cooke, R. and Lagrange, T. (2009).** RNA-directed DNA methylation requires an AGO4-interacting member of the SPT5 elongation factor family. *EMBO Rep.* 10, 649–654.
- Bisaro, D.M. (2006).** Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology* 344, 158-168.
- Blanco-Pérez, M. and Hernández, C. (2016).** Evidence supporting a premature termination mechanism for subgenomic RNA transcription in *Pelargonium line pattern virus*: identification of a critical long-range RNA-RNA interaction and functional variants through mutagenesis. *J. Gen. Virol.* 97, 1469–1480.
- Blanco-Pérez, M., Pérez-Cañamás, M., Ruiz, L. and Hernández, C. (2016).** Efficient Translation of *Pelargonium line pattern virus* RNAs Relies on a TED-Like 3'-Translational Enhancer that Communicates with the Corresponding 5'-Region through a Long-Distance RNA-RNA Interaction. *PloS One* 11, e0152593.
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.S.,**

- Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F. Jr, Hohn, T. and Pooggin, M.M. (2006).** Four plant Dicercs mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res.* 34, 6233–6246.
- Boisvert, F.M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J. and Lamond, A.I. (2007).** The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 574–585.
- Bollman, K.M., Aukerman, M.J., Park, M.Y., Hunter, C., Berardini, T.Z. and Poethig, R.S. (2003).** HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development* 130, 1493–1504.
- Bologna, N.G. and Voinnet, O. (2014).** The diversity, biogenesis and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 473–503.
- Borges, F. and Martienssen, R.A. (2015).** The expanding world of small RNAs in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 727–741.
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P. and Ziegler-Graff, V. (2007).** The Plovervirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr. Biol.* 17, 1615–1621.
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M. and Ziegler-Graff, V. (2008).** Viral suppression of RNA silencing by destabilisation of ARGONAUTE 1. *Plant Signal Behav.* 3, 657-659.
- Bouwen, I. and Maat, D.Z. (1992).** *Pelargonium flower-break* and *Pelargonium line pattern* viruses in the Netherlands; purification, antiserum preparation, serological identification and detection in pelargonium by ELISA. *Neth. J. Plant Pathol.* 98, 141-156.

- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. and Baulcombe, D.C. (1998).** Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* 16, 6739-6746.
- Brosnan, C.A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N.A., Waterhouse, P.M. and Carroll, B.J. (2007).** Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 14741-14746.
- Brosseau, C., El Oirdi, M., Adurogbangba, A., Ma, X. and Moffett, P. (2016).** Antiviral Defense Involves AGO4 in an Arabidopsis-Potexvirus Interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 29, 878-888.
- Brown, J.W.S. and Shaw, P.J. (1998).** Small Nucleolar RNAs and Pre-rRNA Processing in Plants. *Plant Cell* 10, 649-657.
- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, J.E. (1997).** *Pelargonium flower break virus* and *Pelargonium line pattern virus*. *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database.* Version: 16th January. URL: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>.
- Canto, T., Uhrig, J.F., Swanson, M., Wright, K.M. and MacFarlane, S.A. (2006).** Translocation of *Tomato bushy stunt virus* P19 protein into the nucleus by ALY proteins compromises its silencing suppressor activity. *J. Virol.* 80, 9064-9072.
- Carbonell, A. (2017).** Plant ARGONAUTES: Features, Functions and Unknowns. *Methods Mol. Biol.* 1640, 1-21.

- Carbonell, A. and Carrington, J.C. (2015).** Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27, 111–117.
- Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Gilbert, K.B., Montgomery, T.A., Nguyen, T., Cuperus, J.T. and Carrington, J.C. (2012).** Functional analysis of three Arabidopsis ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell* 24, 3613–3629.
- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L. and Campos, I. (2000).** To be or not to be in the nucleolus. 2, 107–112.
- Castaño, A. and Hernández, C. (2005).** Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pelargonium line pattern virus* and its relationship with the family *Tombusviridae*. *Arch. Virol.* 150, 949–965.
- Castaño, A. and Hernández, C. (2007).** Biological activity of transcripts from cDNA of *Pelargonium line pattern virus*. *Acta Virol.* 51, 271–274.
- Castaño, A., Ruiz, L. and Hernández, C. (2009).** Insights into the translational regulation of biologically active open reading frames of *Pelargonium line pattern virus*. *Virology* 386, 417–426.
- Catez, F., Erard, M., Schaerer-Uthurralt, N., Kindbeiter, K., Madjar, J.J. and Diaz, J.J. (2002).** Unique motif for nucleolar retention and nuclear export regulated by phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 22, 1126–1139.
- Chang, C.H., Hsu, F.-C., Lee, S.C., Lo, Y.S., Wang, J.D., Shaw, J., Taliansky, M., Chang, B.Y., Hsu, Y.H. and Lin, N.S. (2016).** The Nucleolar Fibrillarin Protein Is Required for Helper Virus-Independent Long-Distance Trafficking of a Subviral Satellite RNA in Plants. *Plant Cell* 28, 2586–2602.

- Chang, C.W., Couñago, R.L.M., Williams, S.J., Bodén, M. and Kobe, B. (2012).** Crystal structure of rice importin- α and structural basis of its interaction with plant-specific nuclear localization signals. *Plant Cell* 24, 5074–5088.
- Cheng, X. and Wang, A. (2017).** The Potyvirus Silencing Suppressor Protein VPg Mediates Degradation of SGS3 via Ubiquitination and Autophagy Pathways. *J. Virol.* 91, e01478-16.
- Chiba, S., Hleibieh, K., Delbianco, A., Klein, E., Ratti, C., Ziegler-Graff, V., Bouzoubaa, S. and Gilmer, D. (2013).** The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 168–181.
- Chitwood, D.H. and Timmermans, M.C.P. (2010).** Small RNAs are on the move. *Nature* 467, 415–419.
- Chiu, M.H., Chen, I.H., Baulcombe, D.C. and Tsai, C.H. (2010).** The silencing suppressor P25 of *Potato virus X* interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol. Plant Pathol.* 11, 641–649.
- Christie, M., Chang, C.-W., Róna, G., Smith, K.M., Stewart, A.G., Takeda, A.A.S., Fontes, M.R.M., Stewart, M., Vértessy, B.G., Forwood, J.K., et al. (2016).** Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *J. Mol. Biol.* 428, 2060–2090.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. and Müller, C.W. (1999).** Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* 399, 221–229.

- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. and Kuriyan, J. (1998).** Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* 94, 193–204.
- Conti, E., Müller, C.W. and Stewart, M. (2006).** Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 237–244.
- Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T. and Burgyán, J. (2007).** The p122 subunit of *Tobacco mosaic virus* replicase is a potent silencing suppressor and compromises both siRNA and miRNA mediated pathways. *J. Virol.* 81, 11768–11780.
- Csorba, T., Pantaleo, V. and Burgyán, J. (2009).** RNA silencing: an antiviral mechanism. *Adv. Virus Res.* 75, 35–71.
- Csorba, T., Kontra, L. and Burgyán, J. (2015).** Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* 479, 85–103.
- Cuellar, W.J., Kreuze, J.F., Rajamaki, M.L., Cruzado, K.R., Untiveros, M. and Valkonen, J.P. (2009).** Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 10354–10358.
- Curaba, J. and Chen, X. (2008).** Biochemical activities of Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase 6. *J. Biol. Chem.* 283, 3059–3066.
- Dadami, E., Boutla, A., Vrettos, N., Tzortzakaki, S., Karakasilioti, I. and Kalantidis, K. (2013).** DICER-LIKE 4 but not DICER-LIKE 2 may have a positive effect on potato spindle tuber viroid accumulation in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant* 6, 232–234.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (2000).** An RNA-dependent RNA

polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101, 543–553.

Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H. and Baulcombe, D.C. (2001). SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *EMBO J.* 20, 2069-2078.

Dang, C.V. and Lee, W.M. (1988). Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol. Cell. Biol.* 8, 4048–4054.

Deleris, A., Gallego-Bartolomé, J., Bao, J.S., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. and Voinnet, O. (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68–71.

Díaz-Pendón, J.A., Li, F., Li, W.X. and Ding, S.W. (2007). Suppression of Antiviral Silencing by *Cucumber Mosaic Virus* 2b Protein in Arabidopsis Is Associated with Drastically Reduced Accumulation of Three Classes of Viral Small Interfering RNAs. *Plant Cell* 19, 2053–2063.

Ding, S.W. (2010). RNA based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 632–644.

Ding, S.W. and Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413–426.

Donaire, L., Barajas, D., Martínez-García, B., Martínez-Priego, L., Pagan, I. and Llave, C. (2008). Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *J. Virol.* 82, 5167-5177.

Donaire, L., Wang, Y., González-Ibeas, D., Mayer, K.F., Aranda, M.A. and Llave, C. (2009). Deep-sequencing of

plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology* 392, 203–214.

- Dougherty, W.G., Lindbo, J.A., Smith, H.A., Parks, T.D., Swaney, S. and Proebsting, W.M. (1994).** RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7, 544–552.
- Du, Z., Xiao, D., Wu, J., Jia, D., Yuan, Z., Liu, Y., Hu, L., Han, Z., Wei, T., Lin, Q., et al. (2011).** p2 of rice stripe virus (RSV) interacts with OsSGS3 and is a silencing suppressor. *Mol. Plant Pathol.* 12, 808–814.
- Du, Z., Chen, A., Chen, W., Liao, Q., Zhang, H., Bao, Y., Roossinck, M.J. and Carr, J.P. (2014).** Nuclear-cytoplasmic partitioning of cucumber mosaic virus protein 2b determines the balance between its roles as a virulence determinant and an RNA-silencing suppressor. *J. Virol.* 88, 5228–5241.
- Dunoyer, P., Himber, C. and Voinnet, O. (2005).** DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat. Genet.* 37, 1356–1360
- Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J.C. and Voinnet, O. (2010).** Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science* 328, 912–916.
- Earley, L.F., Kawano, Y., Adachi, K., Sun, X.-X., Dai, M.S. and Nakai, H. (2015).** Identification and characterization of nuclear and nucleolar localization signals in the adeno-associated virus serotype 2 assembly-activating protein. *J. Virol.* 89, 3038–3048.

- Ebhardt, H.A., Thi, E.P., Wang, M.B. and Unrau, P.J. (2005).** Extensive 3' modification of plant small RNAs is modulated by helper component proteinase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13398–13403.
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M.A., Jacobsen, S.E., Cooke, R. and Lagrange, T. (2007).** Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev.* 21, 2539–2544.
- Emmott, E. and Hiscox, J.A. (2009).** Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep.* 10, 231–238.
- Endres, M.W., Gregory, B.D., Gao, Z., Foreman, A.W., Mlotshwa, S., Ge, X., Pruss, G.J., Ecker, J.R., Bowman, L.H. and Vance, V. (2010).** Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathog.* 6, e1000729.
- Fajardo Flores, M. (2014).** Análisis de determinantes de localización subcelular en el supresor del silenciamiento por RNA codificado por el virus del arabesco del *Pelargonium*. <http://hdl.handle.net/10251/46235>. (Trabajo final de grado, Universidad Politécnica de Valencia).
- Flather, D., Nguyen, J.H.C., Semler, B.L. and Gershon, P.D. (2018).** Exploitation of nuclear functions by human rhinovirus, a cytoplasmic RNA virus. *PLoS Pathog.* 14, e1007277.
- Fontes, M.R., Teh, T. and Kobe, B. (2000).** Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J. Mol. Biol.* 297, 1183–1194.

- Franck, A. and Loebenstein, G. (1994).** Virus and virus-like diseases of *Pelargonium* in Israel. *Acta Hortic.* 377, 31-40.
- Frizzi, A. and Huang, S. (2010).** Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology. *Plant Biotechnol. J.* 8, 655–677.
- Fukudome, A. and Fukuhara, T. (2017).** Plant dicer-like proteins: double-stranded RNA-cleaving enzymes for small RNA biogenesis. *J. Plant Res.* 130, 33–44.
- Fukunaga, R. and Doudna, J.A. (2009).** dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *EMBO J.* 28, 545–555.
- Gallet, R., Michalakos, Y. and Blanc, S. (2018).** Vector-transmission of plant viruses and constraints imposed by virus-vector interactions. *Curr. Opin. Virol.* 33, 144–150.
- García, J.A. and Pallás, V. (2015).** Viral factors involved in plant pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* 11, 21–30.
- García-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Brempelis, K.J. and Carrington, J.C. (2010).** Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during *Turnip Mosaic Virus* infection. *Plant Cell* 22, 481–496.
- García-Ruiz, H., Carbonell, A., Hoyer, J.S., Fahlgren, N., Gilbert, K.B., Takeda, A., Giampetruzzi, A., Garcia Ruiz, M.T., McGinn, M.G., Lowery, N., et al. (2015).** Roles and programming of Arabidopsis ARGONAUTE proteins during *Turnip mosaic virus* infection. *PLoS Pathog.* 11, e1004755.
- Ghildiyal, M. and Zamore, P.D. (2009).** Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 10, 94–108.

- Ghoshal, B. and Sanfaçon, H. (2014).** Temperature-dependent symptom recovery in *Nicotiana benthamiana* plants infected with tomato ringspot virus is associated with reduced translation of viral RNA2 and requires ARGONAUTE 1. *Virology* 456, 188–197.
- Giner, A., Lakatos, L., García-Chapa, M., López-Moya, J.J. and Burgyán, J. (2010).** Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathog.* 6, e1000996.
- Glazov, E., Phillips, K., Budziszewski, G.J., Jr, M., F. and Levin, J.Z. (2003).** A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for post-transcriptional silencing in Arabidopsis. *Plant J.* 34, 342–349.
- Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, D., Belausov, E., Citovsky, V. and Gafni, Y. (2008).** Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by *Tomato yellow leaf curl virus* V2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 157–161.
- González, I., Martínez, L., Rakitina, D.V., Lewsey, M.G., Atencio, F.A., Llave, C., Kalinina, N.O., Carr, J.P., Palukaitis, P. and Canto, T. (2010).** *Cucumber mosaic virus* 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 294–303.
- González, I., Rakitina, D., Semashko, M., Taliansky, M., Praveen, S., Palukaitis, P., Carr, J.P., Kalinina, N. and Canto, T. (2012).** RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of *Cucumber mosaic virus* 2b protein than nuclear localization. *RNA* 18, 771–782.

- Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A. and Lommel, S.A. (2008).** *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 1015–1026.
- Görlich, D., Prehn, S., Laskey, R.A. and Hartmann, E. (1994).** Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* 79, 767–778.
- Görlich, D., Panté, N., Kutay, U., Aebi, U. and Bischoff, F.R. (1996).** Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.* 15, 5584–5594.
- Gutiérrez, S., Yvon, M., Pirolles, E., Garzo, E., Fereres, A., Michalakis, Y. and Blanc, S. (2012).** Circulating Virus Load Determines the Size of Bottlenecks in Viral Populations Progressing within a Host. *PLoS Pathog.* 8, e1003009.
- Haas, G., Azevedo, J., Moissiard, G., Geldreich, A., Himber, C., Bureau, M., Fukuhara, T., Keller, M. and Voinnet, O. (2008).** Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J.* 27, 2102–2112.
- Haasen, D. and Merkle, T. (2002).** Characterization of an *Arabidopsis thaliana* Homologue of the Nuclear Export Receptor CAS by its Interaction with Importin α . *Plant Biol.* 4, 432–439.
- Haasen, D., Köhler, C., Neuhaus, G. and Merkle, T. (1999).** Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 20, 695–705.

- Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999).** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950–952.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D. (2002).** Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21, 4671–4679.
- Hao, L., Wang, H., Sunter, G. and Bisaro, D.M. (2003).** Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell* 15, 1034–1048.
- Harries, P. and Ding, B. (2011).** Cellular factors in plant virus movement: at the leading edge of macromolecular trafficking in plants. *Virology* 411, 237–243.
- Hatanaka, M. (1990).** Discovery of the nucleolar targeting signal. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 12, 143–148.
- He, X.J., Hsu, Y.F., Zhu, S., Wierzbicki, A.T., Pontes, O., Pikaard, C.S., Liu, H.-L., Wang, C.S., Jin, H. and Zhu, J.K. (2009).** An effector of RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis* is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell* 137, 498–508.
- Heinlein, M. (2015a).** Plant virus replication and movement. *Virology* 479–480, 657–671.
- Heinlein, M. (2015b).** Plasmodesmata: channels for viruses on the move. *Methods Mol. Biol.* 1217, 25–52.
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K. and Fukuhara, T. (2005).** Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 57, 173–188.

- Hiscox, J.A., Whitehouse, A. and Matthews, D.A. (2010).** Nucleolar proteomics and viral infection. *Proteomics* 10, 4077–4086.
- Hull, R. (2014).** Chapter 7- Replication of Plant Viruses. *Plant Virology* (Fifth Edition), 341–421.
- Hunter, C.A., Aukerman, M.J., Sun, H., Fokina, M. and Poethig, R.S. (2003).** PAUSED encodes the Arabidopsis exportin-t ortholog. *Plant Physiol.* 132, 2135–2143.
- Iki, T., Tschopp, M.A. and Voinnet, O. (2017).** Biochemical and genetic functional dissection of the P38 viral suppressor of RNA silencing. *RNA* 23, 639–654.
- Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W. and Görlich, D. (1997).** The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.* 16, 6535–6547.
- Jay, F., Wang, Y., Yu, A., Taconnat, L., Pelletier, S., Colot, V., Renou, J.P. and Voinnet, O. (2011).** Misregulation of AUXIN RESPONSE FACTOR 8 underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in Arabidopsis. *PLoS Pathog.* 7, e1002035.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D. and Smith, A.E. (1984).** A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509.
- Kalinina, N.O., Makarova, S., Makhotenko, A., Love, A.J. and Taliansky, M. (2018).** The Multiple Functions of the Nucleolus in Plant Development, Disease and Stress Responses. *Front. Plant Sci.* 9, 132.
- Kapoor, M., Arora, R., Lama, T., Nijhawan, A., Khurana, J.P., Tyagi, A.K. and Kapoor, S. (2008).** Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of

Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice. *BMC Genomics* 9, 451.

Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95, 461–470.

Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A. and Carrington, J.C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell* 4, 205–217.

Katsarou, K., Mavrothalassiti, E., Dermauw, W., Leeuwen, T.V. and Kalantidis, K. (2016). Combined Activity of DCL2 and DCL3 Is Crucial in the Defense against *Potato Spindle Tuber Viroid*. *PLoS Pathog.* 12, e1005936.

Katsarou, K., Mitta, E., Bardani, E., Oulas, A., Dadami, E. and Kalantidis, K. (2018). DCL-suppressed *Nicotiana benthamiana* plants: Valuable tools in research and biotechnology. *Mol. Plant Pathol.* doi: 10.1111/mpp.12761.

Kenesi, E., Carbonell, A., Lózsza, R., Vértessy, B. and Lakatos, L. (2017). A viral suppressor of RNA silencing inhibits ARGONAUTE 1 function by precluding target RNA binding to pre-assembled RISC. *Nucleic Acids Res.* 45, 7736–7750.

Kim, V.N. (2008). Sorting out small RNAs. *Cell* 133, 25–26.

Kim, S.H., Macfarlane, S., Kalinina, N.O., Rakitina, D.V., Ryabov, E.V., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J.W.S. and Taliansky, M. (2007a). Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein

fibrillar in is required for systemic virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 11115–11120.

Kim, S.H., Ryabov, E.V., Kalinina, N.O., Rakitina, D.V., Gillespie, T., MacFarlane, S., Haupt, S., Brown, J.W.S. and Taliansky, M. (2007b). Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. EMBO J. 26, 2169–2179.

Köhler, A. and Hurt, E. (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 761–773.

Köhler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F.R., Prehn, S., Haller, H., Görlich, D. and Hartmann, E. (1999). Evidence for Distinct Substrate Specificities of Importin α Family Members in Nuclear Protein Import. Mol. Cell. Biol. 19, 7782–7791.

Kontra, L., Csorba, T., Tavazza, M., Luciola, A., Tavazza, R., Moxon, S., Tisza, V., Medzihradzsky, A., Turina, M. and Burgyán, J. (2016). Distinct Effects of p19 RNA Silencing Suppressor on Small RNA Mediated Pathways in Plants. PLoS Pathog. 12, e1005935.

Koseki, M., Goto, K., Masuta, C. and Kanazawa, A. (2005). The star-type color pattern in *Petunia hybrida* “red Star” flowers is induced by sequence-specific degradation of chalcone synthase RNA. Plant Cell Physiol. 46, 1879–1883.

Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M. and Yanagawa, H. (2009). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. J. Biol. Chem. 284, 478–485.

- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y.P., Dolja, V.V., Calvino, L.F., Lopez-Moya, J.J. and Burgyan, J. (2006).** Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* 25, 2768–2780.
- Landeo-Ríos, Y., Navas-Castillo, J., Moriones, E. and Cañizares, M.C. (2016a).** The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* preferentially binds long dsRNAs preventing them from cleavage. *Virology* 488, 129–136.
- Landeo-Ríos, Y., Navas-Castillo, J., Moriones, E. and Cañizares, M.C. (2016b).** The p22 RNA Silencing Suppressor of the Crinivirus *Tomato chlorosis virus* is Dispensable for Local Viral Replication but Important for Counteracting an Antiviral RDR6-Mediated Response during Systemic Infection. *Viruses* 8.
- Li, F. and Wang, A. (2018).** RNA decay is an antiviral defense in plants that is counteracted by viral RNA silencing suppressors. *PLoS Pathog.* 14, e1007228.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J. and Chen, X. (2005).** Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 15, 1501–1507.
- Li, Z., Zhang, Y., Jiang, Z., Jin, X., Zhang, K., Wang, X., Han, C., Yu, J. and Li, D. (2018).** Hijacking of the nucleolar protein fibrillarin by TGB1 is required for cell-to-cell movement of *Barley stripe mosaic virus*. *Mol. Plant Pathol.* 19, 1222–1237.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M. and Dougherty, W.G. (1993).** Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for

regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5, 1749–1759.

Liu, L. and Chen, X. (2018). Intercellular and systemic trafficking of RNAs in plants. *Nat. Plants* 4, 869–878.

Liu, L., Grainger, J., Canizares, M.C., Angell, S.M. and Lomonosoff, G.P. (2004). *Cowpea mosaic virus* RNA-1 acts as an amplicon whose effects can be counteracted by a RNA-2-encoded suppressor of silencing. *Virology* 323, 37–48.

Llave, C. (2010). Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci.* 12, 701–707.

Lozsa, R., Csorba, T., Lakatos, L. and Burgyan, J. (2008). Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. *Nucleic Acids Res.* 36, 4099–4107.

Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X. and Ding, S.W. (2000). Suppression of posttranscriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.* 19, 1672–1680.

Ludman, M., Burgyán, J. and Fátýol, K. (2017). Crispr/Cas9 Mediated Inactivation of Argonaute 2 Reveals its Differential Involvement in Antiviral Responses. *Sci. Rep.* 7, 1010.

Luo, Y., Wang, Z., Ji, H., Fang, H., Wang, S., Tian, L. and Li, X. (2013). An Arabidopsis homolog of importin β 1 is required for ABA response and drought tolerance. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 75, 377–389.

- Ma, Z. and Zhang, X. (2018).** Actions of plant Argonautes: predictable or unpredictable? *Curr. Opin. Plant Biol.* 45, 59–67.
- Ma, J.B., Ye, K. and Patel, D.J. (2004).** Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429, 318–322.
- MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D. and Doudna, J.A. (2006).** Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311, 195–198.
- Mallory, A. and Vaucheret, H. (2010).** Form, function and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* 22, 3879–3889.
- Martin, R.M., Ter-Avetisyan, G., Herce, H.D., Ludwig, A.K., Lättig-Tünnemann, G. and Cardoso, M.C. (2015).** Principles of protein targeting to the nucleolus. *Nucleus* 6, 314–325.
- Martínez, F. and Daròs, J.A. (2014).** *Tobacco etch virus* protein P1 traffics to the nucleolus and associates with the host 60S ribosomal subunits during infection. *J. Virol.* 88, 10725–10737.
- Martínez-Turiño, S. and Hernández, C. (2009).** Inhibition of RNA silencing by the coat protein of *Pelargonium flower break virus*: distinctions from closely related suppressors. *J. Gen. Virol.* 90, 519–525.
- Meier, I. and Brkljacic, J. (2010).** The Arabidopsis nuclear pore and nuclear envelope. *Arab. Book* 8, e0139.
- Melnyk, C.W., Molnar, A. and Baulcombe, D.C. (2011).** Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.* 30, 3553–3563.

- Meng, C., Chen, J., Peng, J. and Wong, S.M. (2006).** Host-induced avirulence of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* mutant correlates with reduced gene-silencing suppression activity. *J. Gen. Virol.* 87, 451–459.
- Meng, Y., Shao, C., Wang, H. and Chen, M. (2011).** The regulatory activities of plant microRNAs: a more dynamic perspective. *Plant Physiol.* 157, 1583–1595.
- Merai, Z., Kerenyi, Z., Molnar, A., Barta, E., Valoczi, A., Bisztray, G., Havelda, Z., Burgyan, J. and Silhavy, D. (2005).** Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J. Virol.* 79, 7217–7226.
- Merai, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L. and Silhavy, D. (2006).** Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J. Virol.* 80, 5747–5756.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., et al. (2008).** Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133, 116–127.
- Mineur, P., Jennane, A., Thiry, M., Deltour, R. and Goessens, G. (1998).** Ultrastructural distribution of DNA within plant meristematic cell nucleoli during activation and the subsequent inactivation by a cold stress. *J. Struct. Biol.* 123, 199–210.
- Mingot, A., Valli, A., Rodamilans, B., San León, D., Baulcombe, D. C., García, J. A., and López-Moya, J. J. (2016).** The PIN-PISPO trans-frame gene of sweet potato feathery mottle potyvirus is produced during virus infection and functions as an RNA silencing suppressor. *J. Virol.* 90, 3543–3557.

- Mingot, J.M., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E. and Görlich, D. (2001).** Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J.* 20, 3685–3694.
- Miyamoto, Y., Yamada, K. and Yoneda, Y. (2016).** Importin α : a key molecule in nuclear transport and non-transport functions. *J. Biochem.* 160, 69–75.
- Moissiard, G. and Voinnet, O. (2006).** RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four *Arabidopsis* Dicer-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 103, 19593–19598.
- Molnár, A., Csorba, T., Lakatos, L., Varallyay, E., Lacomme, C. and Burgyan, J. (2005).** Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol.* 79, 7812–7818.
- Molnár, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R. and Baulcombe, D.C. (2010).** Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328, 872–875.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E. and Carrington, J.C. (2008).** Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133, 128–141.
- Moon, S.L. and Wilusz, J. (2013).** Cytoplasmic Viruses: Rage against the (Cellular RNA Decay) Machine. *PLoS Pathog.* 9, e1003762.
- Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F. and Vaucheret, H. (2002).**

Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* 14, 629–639.

Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., et al. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101, 533-542.

Musinova, Y.R., Lisitsyna, O.M., Golyshev, S.A., Tuzhikov, A.I., Polyakov, V.Y. and Sheval, E.V. (2011). Nucleolar localization/retention signal is responsible for transient accumulation of histone H2B in the nucleolus through electrostatic interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 27–38.

Nakazawa, Y., Hiraguri, A., Moriyama, H. and Fukuhara, T. (2007). The dsRNA-binding protein DRB4 interacts with the Dicer-like protein DCL4 in vivo and functions in the trans-acting siRNA pathway. *Plant Mol. Biol.* 63, 777–785.

Nameth, S.T. and Adkins, S.T. (1993). Viral diseases (En Geraniums IV, *The Grower's Manual*. Ball Publishing (US)).

Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M.E., Delgado, S., Flores, R. and Di Serio, F. (2012). Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast-replicating viroid guide the degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. *Plant J.* 70, 991–1003.

Nemes, K., Gellért, Á., Almási, A., Vági, P., Sáray, R., Kádár, K. and Salánki, K. (2017). Phosphorylation regulates the subcellular localization of *Cucumber Mosaic Virus 2b* protein. *Sci. Rep.* 7, 13444.

- Nishimura, Y., Ohkubo, T., Furuichi, Y. and Umekawa, H. (2002).** Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2239–2242.
- Odokonyero, D., Mendoza, M.R., Alvarado, V.Y., Zhang, J., Wang, X. and Scholthof, H.B. (2015).** Transgenic down-regulation of ARGONAUTE2 expression in *Nicotiana benthamiana* interferes with several layers of antiviral defenses. *Virology* 486, 209–218.
- Odokonyero, D., Mendoza, M.R., Moffett, P. and Scholthof, H.B. (2017).** *Tobacco rattle virus* (TRV)-Mediated Silencing of *Nicotiana benthamiana* ARGONAUTES (NbAGOs) Reveals New Antiviral Candidates and Dominant Effects of TRV-NbAGO1. *Phytopathology* 107, 977–987.
- Omarov, R., Sparks, K., Smith, L., Zindovic, J. and Scholthof, H.B. (2006).** Biological Relevance of a Stable Biochemical Interaction between the Tombusvirus-Encoded P19 and Short Interfering RNAs. *J. Virol.* 80, 3000–3008.
- Ogawa, Y., Miyamoto, Y., Oka, M. and Yoneda, Y. (2012).** The interaction between importin- α and Nup153 promotes importin- α/β -mediated nuclear import. *Traffic Cph. Den.* 13, 934–946.
- Olson, M.O.J. and Dundr, M. (2005).** The moving parts of the nucleolus. *Histochem. Cell Biol.* 123, 203–216.
- Pallás, V. and García, J.A. (2011).** How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J. Gen. Virol.* 92, 2691–2705.

- Paudel, D.B., Ghoshal, B., Jossey, S., Ludman, M., Fatyol, K. and Sanfaçon, H. (2018).** Expression and antiviral function of ARGONAUTE 2 in *Nicotiana benthamiana* plants infected with two isolates of tomato ringspot virus with varying degrees of virulence. *Virology* 524, 127–139.
- Pérez-Cañamás, M., Blanco-Pérez, M., Forment, J. and Hernández, C. (2017).** *Nicotiana benthamiana* plants asymptotically infected by *Pelargonium line pattern virus* show unusually high accumulation of viral small RNAs that is neither associated with DCL induction nor RDR6 activity. *Virology* 501, 136–146
- Pertermann, R., Tamilarasan, S., Gursinsky, T., Gambino, G., Schuck, J., Weinholdt, C., Lilie, H., Grosse, I., Golbik, R.P., Pantaleo, V., et al. (2018).** A Viral Suppressor Modulates the Plant Immune Response Early in Infection by Regulating MicroRNA Activity. *MBio.* 9, e00419-18.
- Pollard, V.W., Michael, W.M., Nakielny, S., Siomi, M.C., Wang, F. and Dreyfuss, G. (1996).** A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* 86, 985–994.
- Powers, J.G., Sit, T.L., Heinsohn, C., George, C.G., Kim, K.H. and Lommel, S.A. (2008).** The *Red clover necrotic mosaic virus* RNA-2 encoded movement protein is a second suppressor of RNA silencing. *Virology* 381, 277–286.
- Qi, D., Omarov, R.T. and Scholthof, K.B.G. (2008).** The complex subcellular distribution of satellite panicum mosaic virus capsid protein reflects its multifunctional role during infection. *Virology* 376, 154–164.

- Qi, X., Bao, F.S. and Xie, Z. (2009).** Small RNA deep sequencing reveals role for *Arabidopsis thaliana* RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. *PLoS ONE* 4, e4971.
- Qi, Y., Denli, A.M. and Hannon, G.J. (2005).** Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. *Mol. Cell* 19, 421–428.
- Qin, C., Li, B., Fan, Y., Zhang, X., Yu, Z., Ryabov, E., Zhao, M., Wang, H., Shi, N., Zhang, P., et al. (2017).** Roles of Dicer-Like Proteins 2 and 4 in Intra- and Intercellular Antiviral Silencing1. *Plant Physiol.* 174, 1067–1081.
- Qu, F., Ren, T. and Morris, T.J. (2003).** The coat protein of *Turnip crinkle virus* suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J. Virol.* 77, 511–522.
- Qu, F., Ye, X. and Morris, T.J. (2008).** *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7 and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 14732–14737.
- Radu, A., Moore, M.S. and Blobel, G. (1995).** The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell* 81, 215–222.
- Rajamäki, M.-L. and Valkonen, J.P.T. (2009).** Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like *Potato virus A* in *Nicotiana species*. *Plant Cell* 21, 2485–2502.
- Rajamäki, M.-L., Xi, D., Sikorskaite-Gudziuniene, S., Valkonen, J.P.T. and Whitham, S.A. (2017).** Differential Requirement of the Ribosomal Protein S6 and Ribosomal Protein S6 Kinase for Plant-Virus

Accumulation and Interaction of S6 Kinase with Potyviral VPg. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 30, 374–384.

Ramachandran, V. and Chen, X. (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in *Arabidopsis*. *Science* 321, 1490–1492.

Ratcliff, F., Harrison, B.D. and Baulcombe, D.C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276, 1558–1560.

Rawlinson, S.M. and Moseley, G.W. (2015). The nucleolar interface of RNA viruses. *Cell. Microbiol.* 17, 1108–1120.

Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. and Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64, 615–623.

Robles Luna, G., Reyes, C.A., Peña, E.J., Ocolotobiche, E., Baeza, C., Borniego, M.B., Kormelink, R. and García, M.L. (2017). Identification and characterization of two RNA silencing suppressors encoded by ophioviruses. *Virus Res.* 235, 96–105.

Rochon, D., Lommel, S., Martelli, G.P., Rubino, L. and Russo, M. (2012). Family *Tombusviridae* (Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses). Elsevier Academic Press, San Diego, CA.

Rogers, K. and Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell* 25, 2383–2399.

Rosenblum, J.S., Pemberton, L.F., Bonifaci, N. and Blobel, G. (1998). Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein. *J. Cell Biol.* 143, 887–899.

- Ruiz-Ferrer, V. and Voinnet, O. (2009).** Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 485–510.
- Ruiz-Ruiz, S., Soler, N., Sánchez-Navarro, J., Fagoaga, C., López, C., Navarro, L., Moreno, P., Peña, L. and Flores, R. (2013).** *Citrus tristeza virus* p23: determinants for nucleolar localization and their influence on suppression of RNA silencing and pathogenesis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 306–318.
- Schauer, S.E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W. and Ray, A. (2002).** DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci.* 7, 487–491.
- Scheets, K., Jordan, R., White, K.A. and Hernández, C. (2015).** *Pelarspovirus*, a proposed new genus in the family *Tombusviridae*. *Arch. Virol.* 160, 2385–2393.
- Scholthof, H.B., Alvarado, V.Y., Vega-Arreguin, J.C., Ciomperlik, J., Odokonyero, D., Brosseau, C., Jaubert, M., Zamora, A. and Moffett, P. (2011).** Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* 156, 1548–1555.
- Schwach, F., Vaistij, F.E., Jones, L. and Baulcombe, D.C. (2005).** An RNA-Dependent RNA Polymerase Prevents Meristem Invasion by *Potato Virus X* and Is Required for the Activity But Not the Production of a Systemic Silencing Signal. *Plant Physiol.* 138, 1842–1852.
- Scott, M.S., Boisvert, F.M., McDowall, M.D., Lamond, A.I. and Barton, G.J. (2010).** Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences. *Nucleic Acids Res.* 38, 7388–7399.
- Semashko, M.A., González, I., Shaw, J., Leonova, O.G., Popenko, V.I., Taliansky, M.E., Canto, T. and**

- Kalinina, N.O. (2012).** The extreme N-terminal domain of a hordeivirus TGB1 movement protein mediates its localization to the nucleolus and interaction with fibrillar. *Biochimie* 94, 1180–1188.
- Shimura, H., Pantaleo, V., Ishihara, T., Myojo, N., Inaba, J., Sueda, K., Burgyán, J. and Masuta, C. (2011).** A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathog.* 7, e1002021.
- Shriram, V., Kumar, V., Devarumath, R.M., Khare, T.S. and Wani, S.H. (2016).** MicroRNAs As Potential Targets for Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Front. Plant Sci.* 7, 817.
- Silhavy, D., Molnár, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M., and Burgyán, J. (2002).** A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21-to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* 21, 3070-3080.
- Singh, A., Gautam, V., Singh, S., Sarkar Das, S., Verma, S., Mishra, V., Mukherjee, S. and Sarkar, A.K. (2018).** Plant small RNAs: advancement in the understanding of biogenesis and role in plant development. *Planta* 248, 545–558.
- Smith, N.A., Eamens, A.L. and Wang, M.B. (2011).** Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathog.* 7, e1002022.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L. (2004).** Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434–1437.

- Stone, O.M. (1980).** Nine viruses isolated from Pelargonium in the United Kingdom. *Acta Hort.* 110, 177–182.
- Stone, O.M. and Hollings, M. (1971).** Annual Report Glasshouse Crops Research Institute for 1970, Littlehampton, UK, 153-155.
- Stone, O.M. and Hollings, M. (1976).** Annual Report Glasshouse Crops Research Institute for 1975, Littlehampton, UK, 119–120.
- Sun, X., Lin, L. and Sui, N. (2018).** Regulation mechanism of microRNA in plant response to abiotic stress and breeding. *Mol. Biol. Rep.* doi: 10.1007/s11033-018-4511-2.
- Takeda, A., Tsukuda, M., Mizumoto, H., Okamoto, K., Kaido, M., Mise, K. and Okuno, T. (2005).** A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO J.* 24, 3147–3157.
- Taliansky, M.E., Brown, J.W.S., Rajamäki, M.L., Valkonen, J.P.T. and Kalinina, N.O. (2010).** Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal pathosystems. *Adv. Virus Res.* 77, 119–158.
- Tamura, K. and Hara-Nishimura, I. (2014).** Functional insights of nucleocytoplasmic transport in plants. *Front. Plant Sci.* 5, 118.
- Thomas, C.L., Leh, V., Lederer, C. and Maule, A.J. (2003).** *Turnip crinkle virus* coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 306, 33–41.
- Timney, B.L., Raveh, B., Mironska, R., Trivedi, J.M., Kim, S.J., Russel, D., Went, S.R., Sali, A. and Rout, M.P. (2016).** Simple rules for passive diffusion through the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 215, 57–76.

- Tolia, N.H. and Joshua-Tor, L. (2007).** Slicer and the argonautes. *Nat. Chem. Biol.* 3, 36–43.
- Tomari, Y. and Zamore, P.D. (2005).** Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* 19, 517–529.
- Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Akbergenov, R., Oakeley, E.J., Veluthambi, K., Hohn, T. and Pooggin, M.M. (2005).** Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2 correlates with transactivation of host genes. *J. Virol.* 79, 2517–2527.
- Untiveros, M., Olspert, A., Artola, K., Firth, A. E., Kreuze, J. F., and Valkonen, J. P. (2016).** A novel sweet potato potyvirus open reading frame (ORF) is expressed via polymerase slippage and suppresses RNA silencing. *Mol. Plant Pathol.* 17, 1111-1123.
- Urayama, S., Moriyama, H., Aoki, N., Nakazawa, Y., Okada, R., Kiyota, E., Miki, D., Shimamoto, K. and Fukuhara, T. (2010).** Knock-down of OsDCL2 in rice negatively affects maintenance of the endogenous dsRNA virus, *Oryza sativa* endornavirus. *Plant Cell Physiol.* 51, 58–67.
- Várallyay, É., Válóczy, A., Ágyi, Á., Burgyán, J., and Havelda, Z. (2010).** Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO J.* 29, 3507-3519.
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyán, J. and Hall, T.M.T. (2003).** Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115, 799–811.
- Vaucheret, H. (2006).** Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* 20, 759–771.
- Vinutha, T., Kumar, G., Garg, V., Canto, T., Palukaitis, P., Ramesh, S.V. and Praveen, S. (2018).** Tomato

geminivirus encoded RNAi suppressor protein, AC4 interacts with host AGO4 and precludes viral DNA methylation. *Gene* 678, 184–195.

- Vogler, H., Akbergenov, R., Shivaprasad, P.V., Dang, V., Fasler, M., Kwon, M.O., Zhanybekova, S., Hohn, T. and Heinlein, M. (2007).** Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by tobamovirus replicase protein. *J. Virol.* 81, 10379–10388.
- Voinnet, O. (2005).** Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* 6, 206–220.
- Voinnet, O. (2008).** Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci.* 13, 317–328.
- Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. (1997).** Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389, 553.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M. and Baulcombe, D.C. (1999).** Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14147–14152.
- Waggoner, S. and Sarnow, P. (1998).** Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocalization of nucleolin in poliovirus-infected cells. *J. Virol.* 72, 6699–6709.
- Wang, M.-B. and Metzlaff, M. (2005).** RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 216–222.
- Wang, B., Yang, X., Wang, Y., Xie, Y. and Zhou, X. (2018).** *Tomato Yellow Leaf Curl Virus V2* Interacts with Host Histone Deacetylase 6 To Suppress Methylation-Mediated Transcriptional Gene Silencing in Plants. *J. Virol.* 92, e00036-18.

- Wang, H., Buckley, K.J., Yang, X., Buchmann, R.C. and Bisaro, D.M. (2005).** Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J. Virol.* 79, 7410–7418.
- Wang, M.B., Bian, X.Y., Wu, L.-M., Liu, L.X., Smith, N.A., Isenegger, D., Wu, R.M., Masuta, C., Vance, V.B., Watson, J.M., et al. (2004).** On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3275–3280.
- Wang, M.B., Masuta, C., Smith, N.A. and Shimura, H. (2012a).** RNA silencing and plant viral diseases. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25, 1275–1285.
- Wang, X., Zhang, Y., Xu, J., Shi, L., Fan, H., Han, C., Li, D. and Yu, J. (2012b).** The R-rich motif of *Beet black scorch virus* P7a movement protein is important for the nuclear localization, nucleolar targeting and viral infectivity. *Virus Res.* 167, 207–218.
- Wang, X.B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W.X., Chen, X., Yu, J.L. and Ding, S.W. (2010).** RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 484–489.
- Wang, X.B., Jovel, J., Udomporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W.X., Gascioli, V., Vaucheret, H. and Ding, S.W. (2011).** The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 1625–1638.
- Wassenegger, M. and Krczal, G. (2006).** Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.* 11, 142–151.

- van Wolfswinkel, J.C. and Ketting, R.F. (2010).** The role of small non-coding RNAs in genome stability and chromatin organization. *J. Cell Sci.* 123, 1825–1839.
- Wu, J., Yang, Z., Wang, Y., Zheng, L., Ye, R., Ji, Y., Zhao, S., Ji, S., Liu, R., Xu, L., et al. (2015).** Viral-inducible Argonaute18 confers broad-spectrum virus resistance in rice by sequestering a host microRNA. *ELife* 4, doi: 10.7554/eLife.05733.
- Wühr, M., Güttler, T., Peshkin, L., McAlister, G.C., Sonnett, M., Ishihara, K., Groen, A.C., Presler, M., Erickson, B.K., Mitchison, T.J., et al. (2015).** The Nuclear Proteome of a Vertebrate. *Curr. Biol.* 25, 2663–2671.
- Xia, Z., Zhao, Z., Jiao, Z., Xu, T., Wu, Y., Zhou, T. and Fan, Z. (2018).** Virus-Derived Small Interfering RNAs Affect the Accumulations of Viral and Host Transcripts in Maize. *Viruses* 10, E664.
- Yang, Z. and Li, Y. (2018).** Dissection of RNAi-based antiviral immunity in plants. *Curr. Opin. Virol.* 32, 88–99.
- Yang, C., Guo, R., Jie, F., Nettleton, D., Peng, J., Carr, T., Yeakley, J.M., Fan, J.B. and Whitham, S.A. (2007).** Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to *Turnip mosaic virus* infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 358–370.
- Yang, C., Zhang, C., Dittman, J.D. and Whitham, S.A. (2009).** Differential requirement of ribosomal protein S6 by plant RNA viruses with different translation initiation strategies. *Virology* 390, 163–173.
- Yang, M., Xu, Z., Zhao, W., Liu, Q., Li, Q., Lu, L., Liu, R., Zhang, X. and Cui, F. (2018).** *Rice stripe virus*-derived siRNAs play different regulatory roles in rice and in the

- insect vector *Laodelphax striatellus*. BMC Plant Biol. 18, 219.
- Ye, K., Malinina, L. and Patel, D.J. (2003).** Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. Nature 426, 874-878.
- Yoshida, K. and Blobel, G. (2001).** The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins. J. Cell Biol. 152, 729–740.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R. and Chen, X. (2005).** Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. Science 307, 932–935.
- Zhang, C., Wu, Z., Li, Y. and Wu, J. (2015).** Biogenesis, Function and Applications of Virus-Derived Small RNAs in Plants. Front. Microbiol. 6, 1237.
- Zhang, X. and Guo, H. (2017).** mRNA decay in plants: both quantity and quality matter. Curr. Opin. Plant Biol. 35, 138–144.
- Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J. and Chua, N.H. (2006).** *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute 1 cleavage activity to counter plant defense. Genes Dev. 20, 3255–3268.
- Zhang, X., Lai, T., Zhang, P., Zhang, X., Yuan, C., Jin, Z., Li, H., Yu, Z., Qin, C., Tör, M., et al. (2019).** Mini review: Revisiting mobile RNA silencing in plants. Plant Sci. 278, 113–117.
- Zhao, J.H., Hua, C.L., Fang, Y.Y. and Guo, H.S. (2016).** The dual edge of RNA silencing suppressors in the virus-host interactions. Curr. Opin. Virol. 17, 39–44.

- Zheng, L., Du, Z., Lin, C., Mao, Q., Wu, K., Wu, J., Wei, T., Wu, Z. and Xie, L. (2015).** *Rice stripe tenuivirus* p2 may recruit or manipulate nucleolar functions through an interaction with fibrillarin to promote virus systemic movement. *Mol. Plant Pathol.* 16, 921–930.
- Ziemienowicz, A., Haasen, D., Staiger, D. and Merkle, T. (2003).** Arabidopsis transportin1 is the nuclear import receptor for the circadian clock-regulated RNA-binding protein AtGRP7. *Plant Mol. Biol.* 53, 201–212.
- Zipprich, J.T., Bhattacharyya, S., Mathys, H. and Filipowicz, W. (2009).** Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA* 15, 781–793.
- Zrachya, A., Glick, E., Levy, Y., Arazi, T., Citovsky, V. and Gafni, Y. (2007).** Suppressor of RNA silencing encoded by *Tomato yellow leaf curl virus-Israel*. *Virology* 358, 159–165.
- Zvereva, A.S. and Pooggin, M.M. (2012).** Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. *Viruses* 4, 2578–2597.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera darle las gracias a Carmen Hernández, mi directora, por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo. El laboratorio de Carmen fue el primer laboratorio que pisé, y siempre me he sentido como en casa. Ha sido un placer trabajar allí y sentirme tan cómoda. Gracias por dirigirme durante todo este tiempo, por toda la dedicación y, sobre todo, por su paciencia pese a las meteduras de pata.

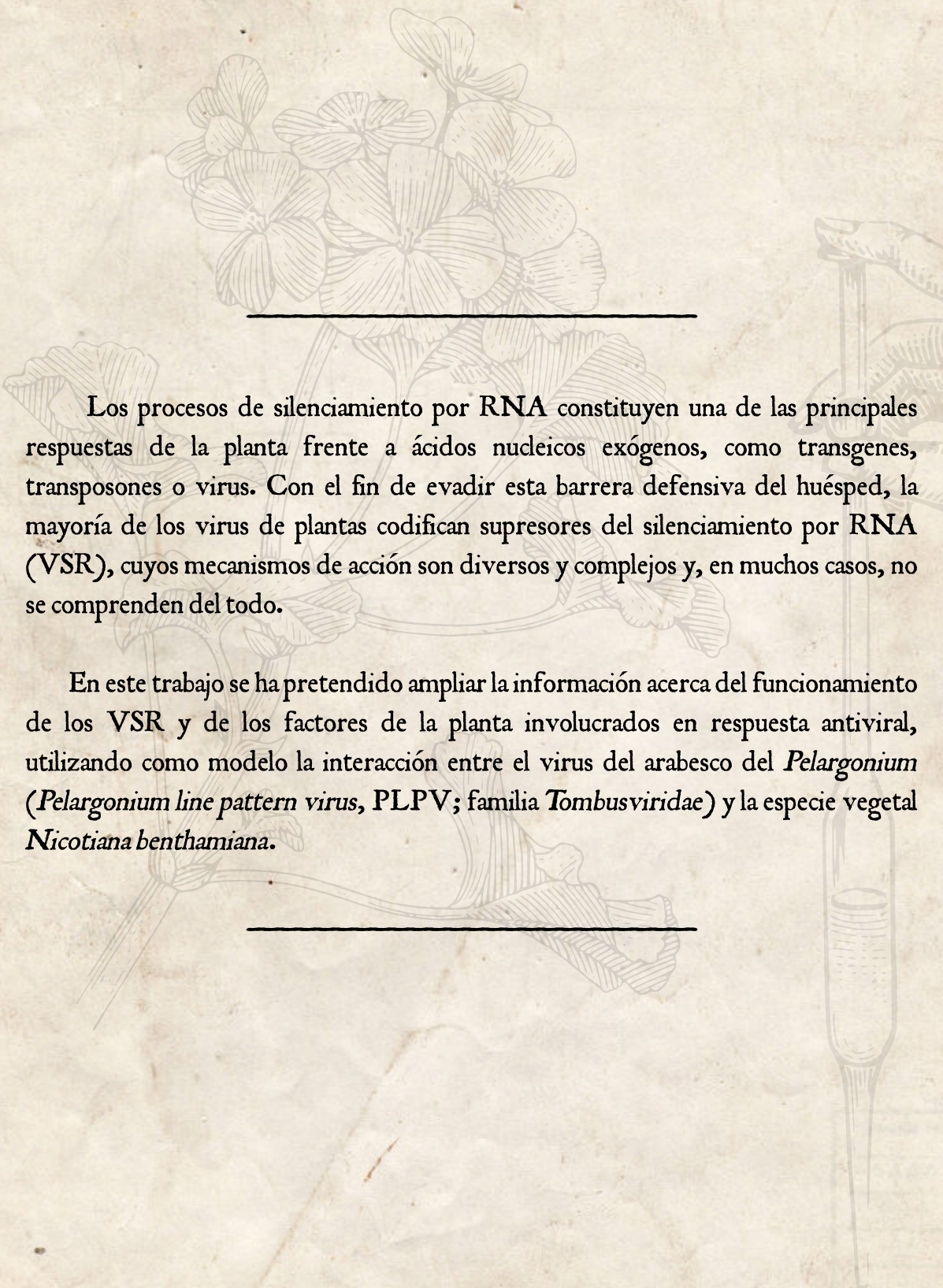
Gracias a toda la gente maravillosa que he conocido en el IBMCP, que hacen que ir a trabajar y las malas rachas no sean más que una pequeña nube en un día de sol. En especial a mis chicas de las escaleras, Tere, Vero, Eszter y Arantxa, compañeras que se han convertido en amigas y con las que he compartido momentos, confesiones y risas inolvidables. A Edu, una de las personas más optimistas que conozco. Gracias por animarme siempre y por obligarme a ir al gimnasio, sin ti mi operación bikini habría fracasado. Y también a toda la gente de Servicios que siempre me han ayudado y aconsejado cuando han surgido problemas.

Gracias a toda mi familia, por su ayuda todos estos años. Habéis sido un pilar y un referente para mí. Siempre estamos gritando, discutimos a veces y otras acabamos hasta el gorro, pero nuestras comidas y reuniones son sobre todo divertidas y nunca me cansaré de ellas. En especial a mis padres, que siempre han confiado en mí a pesar de los disgustos que les he dado. Me habéis dado lo mejor que se le puede dar a una hija, una casa feliz con una familia feliz. Ojalá llegara a vuestra edad como vosotros. A mi hermana, mi referente durante toda

mi vida. No podemos ser más diferentes y sé que ha sido difícil aguantar a una hermana pequeña engorrosa, pero se te echa mucho de menos en casa. Estamos deseado tenerte de vuelta. A mis tíos y tías, en especial a mi tía favorita, Mercedes. Siempre estás para todos, aunque a veces no nos lo merezcamos. Y, como no, a mi familia política. Gracias por aceptarme en vuestra casa como una más.

Gracias a todas mis amigas y amigos del pueblo, por todos esos momentos de evasión donde no hay problemas, solo risas, comilonas y cervezas los viernes. Tengo la suerte de tener a mi alrededor gente maravillosa con la que contar en cualquier momento. Sobre todo a Maite y Almu. Creo que con vosotras la palabra “amiga” se queda corta. Estáis en todos mis mejores recuerdos y espero crear muchísimos más nuevos con vosotras.

Y, por último, a mi compañero de vida, a Abraham. Nunca hacemos las cosas como se espera, y posiblemente eso nos haga especiales. No puedo imaginar compartir mi vida con otra persona. He crecido contigo, nos hemos hecho mejores juntos y hemos formado una familia con Orió, mi personita favorita de este mundo. Nunca me cansaré de decir lo guapo que es y la suerte que tengo de teneros.



Los procesos de silenciamiento por RNA constituyen una de las principales respuestas de la planta frente a ácidos nucleicos exógenos, como transgenes, transposones o virus. Con el fin de evadir esta barrera defensiva del huésped, la mayoría de los virus de plantas codifican supresores del silenciamiento por RNA (VSR), cuyos mecanismos de acción son diversos y complejos y, en muchos casos, no se comprenden del todo.

En este trabajo se ha pretendido ampliar la información acerca del funcionamiento de los VSR y de los factores de la planta involucrados en respuesta antiviral, utilizando como modelo la interacción entre el virus del arabesco del *Pelargonium* (*Pelargonium line pattern virus*, PLPV; familia *Tombusviridae*) y la especie vegetal *Nicotiana benthamiana*.
