

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular



Tesis doctoral

Estudio de las modificaciones post-traduccionales que afectan a la proteína de la cápsida del *Plum pox virus* y su papel en el desarrollo del ciclo viral

Memoria presentada por Marta Hervás García
para optar al Título de Doctor

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular



Tesis doctoral

**Estudio de las modificaciones post-traduccionales que afectan a
la proteína de la cápsida del *Plum pox virus* y su papel en el
desarrollo del ciclo viral**

Memoria presentada por Marta Hervás García
para optar al Título de Doctor

*Esta tesis se ha realizado en el Departamento de Genética Molecular de Plantas del
Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la dirección del Dr. Juan Antonio
García Álvarez y la Dra. Sandra Martínez Turiño, y bajo la tutela del Dr. José María
Almendral del Río*

*El trabajo presentado en esta memoria ha sido posible gracias al disfrute de una beca
predoctoral para la formación de doctores (FPI-MICINN)*

Madrid, 2019

A mi yayo Santiago

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis por toda su dedicación, esfuerzo y compromiso con este trabajo. Al Dr. Juan Antonio García Álvarez porque siempre me ha recibido amablemente para debatir cualquier cuestión el tiempo que hiciera falta, y a la Dra. Sandra Martínez Turiño por compartir conmigo sus extensos conocimientos científico-técnicos y enseñarme a tratar con humor las frustraciones derivadas de la ciencia.

También quería agradecer a mis compañeros del laboratorio 313 todos los ánimos que me han dado y los buenos momentos que hemos pasado juntos. A Frida, Araiz, Carlos, HongYing, Adrián, Leonor, María, y especialmente a Bea, Bernardo y Alfonso, que hicieron que los últimos meses fueran mucho más llevaderos.

A todas las personas del Centro Nacional de Biotecnología que de una forma u otra hicieron posible la realización de esta tesis, pero sobre todo a Rosana, Sergio, Mónica, Beatriz y Cristina que me ayudaron a desenvolverme un poquito mejor con técnicas que consideraba muy complejas.

A mis compañeros inseparables de la Universidad Complutense de Madrid, Dani, Rocío, Flor, María y Adri, y a todos los profesores que sembraron el gusanillo de mi interés por la investigación, fundamentalmente al Dr. Juan Luis Santos Coloma y a la Dra. Mónica Pradillo Orellana, con quienes comencé a investigar en plantas, y al Dr. Mauricio García Mateu, quien me mostró el mundo de los virus.

Finalmente quiero agradecer a mi familia y amigos todo el ánimo que me han transmitido durante estos años, sin olvidar hacer una mención honorífica a mi madre por su inquebrantable confianza y a Alberto por ser mi gran apoyo.

ABSTRACT

O-GlcNAcylation and phosphorylation are two of the most widespread post-translational modifications (PTMs) in eukaryotes. In animals, it has been seen that both PTMs share the same protein targets, being common to act together in the regulation of common processes and even affect each other (cross-talk). In plants, the best-studied target of *O*-GlcNAcylation is the capsid protein (CP) of the potyvirus *Plum pox virus* (PPV), which is modified by SECRET AGENT (SEC) in its N-terminal region. Previous laboratory results suggested that PPV CP, in addition to being *O*-GlcNAcylated, is also phosphorylated. In this work, we have demonstrated by mass spectrometry (MS) that the CP of the Rankovic isolate of PPV (PPV-R) assembled in virions is phosphorylated *in vivo* at the N-terminus (S25, S81 and S101) and the core región (S118, T254 and T313), in residues that do not coincide with *O*-GlcNAcylation targets. Our findings show that PPV-R CP can be concurrently *O*-GlcNAcylated and phosphorylated at nearby aminoacids. However, a differential proteomic approach based on isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) showed a significant enhancement of phosphorylation at S25 in virions recovered from *O*-GlcNAcylation-deficient plants (SEC-b2), suggesting that a cross-talk between *O*-GlcNAcylation and phosphorylation in PPV-R CP takes place.

A combination of proteomic approaches plus protein immunodetection techniques were applied to study the phosphorylation and *O*-GlcNAcylation patterns of PPV virions purified from different hosts and corresponding to several PPV strains. We found both PTMs occur in a variety of hosts (including the natural host *Prunus persica*) and modify PPV strains as different as Dideron (D), Cherry (C) and Recombinant (Rec). However, mapping of phosphorylated residues showed that not all the targets of this modification concur in different PPV strains. In addition, the study of PPV mutants affected in the threonine of a CK2 motif, which is phosphorylated in the CP of the potyvirus *Potato virus A* (PVA) and mostly conserved in this viral genus, revealed that the function of phosphorylation in potyviral infection is not conserved. On the other hand, also using immunodetection techniques and a battery of mutants and PPV subviral constructs, we found that *O*-GlcNAcylation and phosphorylation of CP can take place independently of the viral infection, but a correct folding of the protein is necessary to be *O*-GlcNAcylated.

While preventing PPV-R CP phosphorylation only had a limited impact on viral infection, permanent emulation of this modification by mutating one or several of the phospho-targets to aspartic acid affected the *in vitro* CP stability and its ability to form virions, as was shown by electron microscopy and sucrose gradient sedimentation. We propose that the joint and opposite action of *O*-GlcNAcylation and phosphorylation on the CP N-terminal region regulates the protein stability, while phosphorylation in the core region controls the assembly of viral particles.

Finally, although we have not been able to find proteins other than SEC that are involved in the modification of PPV CP, we have generated *Arabidopsis thaliana* transgenic plants expressing a functional version of a tagged SEC protein, with the aim of using them to trap SEC interactors that could participate in the dynamic modifications of the CP.

RESUMEN

La *O*-GlcNAcilación y la fosforilación son dos de las modificaciones post-traduccionales (MPT) más extendidas en eucariotas. En animales, se ha visto que ambas MPT actúan sobre las mismas proteínas, siendo habitual que desempeñen un papel conjunto en la regulación de procesos comunes, llegando incluso a afectarse la una a la otra (*cross-talk*). En plantas, la diana de *O*-GlcNAcilación mejor estudiada es la proteína de la cápsida (CP) del potyvirus *Plum pox virus* (PPV), la cual se *O*-GlcNAcila por la enzima SECRET AGENT (SEC) en su región N-terminal. Resultados previos del laboratorio sugerían que la CP del PPV, además de ser diana de *O*-GlcNAcilación, también lo es de fosforilación. En este trabajo hemos demostrado mediante análisis por espectrometría de masas (MS), que la CP del aislado Rankovic del PPV (PPV-R) ensamblada en viriones se fosforila *in vivo* en la región N-terminal (S25, S81 y S101) y en el núcleo central de la proteína (S118, T254 y T313), en residuos que no coinciden con las dianas de *O*-GlcNAcilación. Nuestros resultados revelan que la CP de PPV-R puede encontrarse simultáneamente *O*-GlcNAcilada y fosforilada. Sin embargo, un análisis de cuantificación absoluta y relativa por marcaje isobárico (iTRAQ) reveló un incremento significativo en la fosforilación de la S25 en los viriones procedentes de plantas de *Nicotiana benthamiana* deficientes en *O*-GlcNAcilación (SEC-b2), lo cual sugiere la existencia de un *cross-talk* entre la *O*-GlcNAcilación y la fosforilación en la CP de PPV-R.

Utilizando una combinación de técnicas proteómicas y de inmunodetección de proteínas, encontramos que tanto la fosforilación como la *O*-GlcNAcilación tienen lugar en distintos huéspedes (incluyendo al hospedador natural *Prunus persica*), y en cepas del PPV tan diferentes como Dideron (D), Cherry (C) y Recombinant (Rec). Sin embargo, el mapeo de los residuos fosforilados mostró que no todas las dianas de esta modificación coinciden en las distintas cepas del virus. Además, el estudio de mutantes afectados en la treonina de un motivo CK2 altamente conservado entre los potyvirus, cuya equivalente en la CP del potyvirus *Potato virus A* (PVA) se encuentra fosforilada, reveló que la función de la fosforilación en las infecciones potyvirales no está conservada. Por otro lado, también utilizando técnicas de inmunodetección y una batería de mutantes y construcciones subvirales del PPV, encontramos que la *O*-GlcNAcilación y la fosforilación de la proteína pueden tener lugar independientemente de la infección viral, pero se necesita un correcto plegamiento de la CP para que ésta sea *O*-GlcNAcilada.

Mientras que impedir la fosforilación de la CP de PPV-R solo tuvo un impacto limitado en la infección viral, emularla de forma permanente mediante la mutación a ácido aspártico de uno o varios de los residuos fosforilables afecta a la estabilidad de la proteína *in vitro* y a su capacidad de formar viriones, como se muestra por microscopía electrónica y sedimentación en gradiente de sacarosa. Proponemos que la acción conjunta y contraria de la *O*-GlcNAcilación y la fosforilación de la CP en la región N-terminal regula la estabilidad de la proteína, mientras que la fosforilación en el núcleo central controla el ensamblaje de las partículas virales.

Finalmente, aunque no hemos sido capaces de encontrar proteínas distintas a SEC que estén implicadas en la modificación de la CP del PPV, hemos generado plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan una versión funcional de la proteína SEC etiquetada, con el objetivo de utilizarlas para atrapar interactores de SEC que pudieran participar en las modificaciones dinámicas de la CP.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS	11
VIRUS CITADOS.....	15
I. INTRODUCCIÓN	19
I.1. Modificaciones post-traduccionales.....	19
I.1.1. Glicosilación de proteínas	20
<i>I.1.1.1. O-GlcNAcilación de proteínas.....</i>	<i>22</i>
<i>I.1.1.2. Enzimas que regulan la O-GlcNAcilación de proteínas.....</i>	<i>23</i>
<i>I.1.1.3. Enzimas del ciclo de la O-GlcNAcilación en plantas.....</i>	<i>25</i>
<i>I.1.1.4. O-GlcNAcilación de proteínas virales.....</i>	<i>26</i>
I.1.2. Fosforilación de proteínas.....	27
<i>I.1.2.1. Enzimas que regulan la fosforilación de proteínas.....</i>	<i>28</i>
<i>I.1.2.2. Fosforilación de proteínas virales.....</i>	<i>30</i>
I.1.3. Cross-talk entre O-GlcNAcilación y fosforilación de proteínas.....	31
I.2. Plum pox virus	34
I.2.1. Organización y expresión genómica del PPV, y función de sus productos génicos.....	34
I.2.2. Etapas de la infección viral de los potyvirus.....	35
<i>I.2.2.1. Replicación del RNA viral.....</i>	<i>36</i>
<i>I.2.2.2. Movimiento a corta y larga distancia.....</i>	<i>38</i>
<i>I.2.2.3. Ensamblaje de las partículas virales.....</i>	<i>40</i>
<i>I.2.2.4. Propagación a nuevos huéspedes</i>	<i>43</i>
I.2.3. La CP de los potyvirus y sus MPT	44
II. OBJETIVOS.....	49
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
III.1. Material Biológico	53
III.1.1. Plantas.....	53
III.1.2. Bacterias	54
III.1.3. Clones de cDNA que codifican el genoma completo o parcial del PPV	54
III.1.4. Viriones.....	55
III.2. Uso del material biológico	56
III.2.1. Inoculación viral	56
<i>III.2.1.1. Inoculación biolística</i>	<i>56</i>
<i>III.2.1.2. Inoculación manual utilizando cDNA viral.....</i>	<i>56</i>
<i>III.2.1.3. Inoculación manual utilizando extractos de plantas infectadas</i>	<i>56</i>
<i>III.2.1.4. Inoculación manual utilizando partículas virales</i>	<i>56</i>
<i>III.2.1.5. Inoculación por agroinfiltración</i>	<i>56</i>

III.2.2. Generación de plantas transgénicas	57
III.3. Manipulación de ácidos nucleicos	58
III.3.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos	58
III.3.1.1. Obtención de DNA plasmídico	58
III.3.1.2. Obtención de DNA genómico de planta	58
III.3.1.3. Obtención de RNA total de planta	58
III.3.2. Amplificación de ácidos nucleicos	58
III.3.2.1. Amplificación de DNA mediante PCR	58
III.3.2.2. Obtención de cDNA a partir de RNA total de planta	59
III.3.2.3. Amplificación de la hebra negativa del RNA viral mediante RT-qPCR	59
III.3.2.4. Amplificación del RNA viral mediante IC-RT-PCR	59
III.3.3. Tratamientos enzimáticos durante los procesos de clonaje	60
III.3.4. Electroforesis en geles de agarosa, extracción y purificación de fragmentos de DNA separados por electroforesis	60
III.3.5. Secuenciación de DNA	60
III.4. Herbicida y antibióticos	60
III.5. Plásmidos	61
III.5.1. Creación de plásmidos con mutaciones puntuales o múltiples en la secuencia codificante de la CP	61
III.5.2. Obtención de plásmidos que expresan la CP de PPV-BOR-3 en ausencia de movimiento, replicación o de otras proteínas virales	63
III.5.3. Construcción de plásmidos para expresar proteínas de <i>A. thaliana</i>	64
III.6. Producción y manipulación de proteínas	65
III.6.1. Expresión transitoria de proteínas en plantas por agroinfiltración	65
III.6.2. Análisis de la estabilidad de la CP	67
III.6.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida y detección de proteínas por <i>Western Blot</i> o tinción con azul de <i>Coomassie</i>	67
III.6.4. Inmunoprecipitación de la CP	68
III.6.5. Detección de fluorescencia	68
III.7. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa	69
III.8. Microscopía electrónica	69
III.9. Estudios proteómicos	70
III.9.1. Análisis por 2D-PAGE	70
III.9.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF	70
III.9.3. Espectrometría de masas LC-MS/MS	70
III.10. Modelado de la CP y el oligómero del PPV	72
III.11. Búsqueda de secuencias y alineamientos	73
IV. RESULTADOS	77

IV.1. La CP del PPV está fosforilada en múltiples residuos, que no coinciden con los O-GlcNAcildados.....	77
IV.1.1. La CP de PPV-R puede fosforilarse en los aminoácidos S25, S81, S101 y S118	77
IV.1.2. El nivel de O-GlcNAcildación afecta, aunque moderadamente, a la fosforilación de la CP de PPV-R.....	78
IV.1.3. Alterar la capacidad de la CP de PPV-R de ser fosforilada, sobre todo en la S118, afecta notablemente a la infección viral.....	86
<i>IV.1.3.1. Emular la fosforilación en la mitad N-terminal de la CP causa fuertes efectos deletéreos en la infección por PPV-R en N. benthamiana</i>	<i>86</i>
<i>IV.1.3.2. Emular la fosforilación en la mitad N-terminal de la CP de PPV-R resulta deletéreo para la infección en otras especies herbáceas y es letal en el huésped natural P. persica</i>	<i>89</i>
<i>IV.1.3.3. Impedir la fosforilación en las dianas específicas de serina de la CP de PPV-R reduce la eficacia biológica del virus.....</i>	<i>91</i>
<i>IV.1.3.4. Mimetizar la fosforilación en la posición 118 de la CP de PPV-R es especialmente deletéreo para la infección viral, y este efecto se ve reforzado cuando además se emula la fosforilación en otras fosfo-dianas</i>	<i>94</i>
IV.1.4. No permitir la fosforilación estándar de la CP de PPV-R parece afectar, aunque levemente, a los niveles de O-GlcNAcildación de la proteína	96
IV.1.5. La CP de PPV-R se encuentra fosforilada en un número mayor de residuos que los detectados inicialmente	98
<i>IV.1.5.1. Emular una fosforilación constitutiva en los residuos T254 o T313 de la CP resulta deletéreo para la infección por PPV-R.....</i>	<i>100</i>
<i>IV.1.5.2. El residuo T304 de la CP de PPV-R, que forma parte de un motivo CK2 conservado mayoritariamente en los potyvirus, no parece ser diana de fosforilación.....</i>	<i>103</i>
IV.2. La fosforilación y O-GlcNAcildación de la CP se conserva en diferentes aislados y huéspedes del PPV.....	105
IV.2.1. La fosforilación y O-GlcNAcildación de la CP de PPV-R se conserva en distintos huéspedes herbáceos experimentales, así como en un huésped natural del patógeno	105
<i>IV.2.1.1. El patrón de fosforilación de la CP de PPV-R es similar en distintos huéspedes experimentales herbáceos.....</i>	<i>105</i>
<i>IV.2.1.2. El patrón de fosforilación de la CP de PPV-R en un huésped natural de este virus es similar al observado en los huéspedes herbáceos experimentales</i>	<i>106</i>
<i>IV.2.1.3. La CP de PPV-R se O-GlcNAcila en un huésped natural del virus, incluso a niveles superiores a los detectados en un huésped herbáceo experimental.....</i>	<i>107</i>
IV.2.2. La fosforilación y O-GlcNAcildación de la CP del PPV se conserva en distintas cepas del virus, en las cuales se detectan residuos fosforilables comunes y específicos	108
<i>IV.2.2.1. La CP de PPV-SwCM (cepa C) se encuentra fosforilada, además de en sitios compartidos con PPV-R, en el motivo CK2 conservado en el género Potyvirus.....</i>	<i>109</i>
<i>IV.2.2.2. La CP de PPV-BOR-3 (cepa Rec) comparte dianas de fosforilación con otros aislados y, además, puede fosforilarse específicamente en la S62</i>	<i>113</i>
<i>IV.2.2.3. La CP de los aislados PPV-SwCM (cepa C) y PPV-BOR-3 (cepa Rec) se modifica por O-GlcNAcildación</i>	<i>114</i>

IV.3. Emular una fosforilación permanente en residuos específicos de la región central distal de la CP de PPV-R afecta negativamente al movimiento viral	115
IV.4. Emular la fosforilación permanente en diferentes residuos de la CP de PPV-R afecta la estabilidad de la proteína y la formación de viriones.....	118
IV.5. Las fosforilaciones en las regiones central proximal y central distal de la CP de PPV-R pueden establecer vínculos funcionales.....	122
IV.5.1. La mutación T254K surgida en el contexto de un mutante 4SD, no mejora la competitividad del virus en ausencia de fosfo-emulación en la posición 118	122
IV.5.2. La inestabilidad de la CP provocada por fosfo-mimetizaciones en su mitad N-terminal, puede compensarse parcialmente por mutaciones en la región central distal de la proteína	124
IV.5.3. El modelado de la estructura del virión de PPV-R sugiere que fosfo-dianas de la CP participan en las interacciones proteína-proteína entre monómeros.....	126
IV.6. Las modificaciones post-traduccionales de la CP del PPV pueden tener lugar fuera de un ambiente de infección viral, pero la O-GlcNAcilación depende de una estructura apropiada de la proteína	130
IV.6.1. La O-GlcNAcilación y la fosforilación de la CP del PPV también afectan a la proteína no ensamblada en partículas virales completas	131
IV.6.2. La O-GlcNAcilación de la CP del PPV no precisa de la participación de otras proteínas virales	132
IV.6.3. La CP del PPV es capaz de fosforilarse fuera del contexto de la infección viral.....	135
IV.6.4. Una mutación en un aminoácido implicado en el plegamiento y en el ensamblaje de la CP del PPV perturba su O-GlcNAcilación.....	136
IV.7. Búsqueda de factores virales y del huésped, distintos a SEC, que participan en la O-GlcNAcilación y/o fosforilación de la CP del PPV.....	139
IV.7.1. Las hexosaminidasas HEXO1, HEXO2 y HEXO3 no eliminan los grupos O-GlcNAc de la CP del PPV.....	139
<i>IV.7.1.1. Identificación de HEXO1, HEXO2 y HEXO3 como posibles candidatos de ser la OGA vegetal.....</i>	<i>139</i>
<i>IV.7.1.2. La infección de A. thaliana por PPV-R no se ve alterada por mutaciones en los genes hexo1, hexo 2 y/o hexo 3 de la planta.....</i>	<i>140</i>
<i>IV.7.1.3. Los niveles de O-GlcNAcilación de la CP de PPV-R, de incrementarse en plantas de A. thaliana mutadas en los genes HEXO1, HEXO2 y HEXO3, lo harían muy ligeramente.....</i>	<i>140</i>
<i>IV.7.1.4. La expresión transitoria de las proteínas HEXO1, HEXO2 y/o HEXO3 en N. benthamiana no afecta sustancialmente a la O-GlcNAcilación de la CP de PPV-R.....</i>	<i>142</i>
IV.7.2. Obtención de una versión funcional de la proteína SEC etiquetada para su utilización en el aislamiento de complejos proteicos relacionados con la modificación de la CP del PPV	144
<i>IV.7.2.1. La expresión transitoria del gen SEC, fusionado o no a una etiqueta TAP, es capaz de restablecer la O-GlcNAcilación de la CP de PPV-R in vivo en plantas de N. benthamiana SEC-b2.....</i>	<i>145</i>
<i>IV.7.2.2. Generación de plantas transgénicas de A. thaliana en fondo silvestre y sec-2 que expresan de forma estable el gen SEC fusionado a una etiqueta.....</i>	<i>147</i>

V. DISCUSIÓN	157
V.1. La fosforilación de la CP del PPV es mucho más compleja de lo que se pensaba	157
V.2. Algunas MPT de la CP del PPV parecen regular la estabilidad de la proteína y la formación de las partículas virales.....	164
V.3. Las hexosaminidasas HEXO1, HEXO2 y HEXO3 no están implicadas en el ciclo de la O-GlcNAcilación de la CP del PPV	174
V.4. La proteína SEC etiquetada expresada en plantas transgénicas podrá utilizarse en la búsqueda de enzimas que participan en la MPT de la CP del PPV	176
VI. CONCLUSIONES	181
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	185
VIII. ANEXOS.....	207

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

A

aa:	Aminoácidos
Amp:	Ampicilina
Ara:	L-arabinosa

B

BacAc₂:	Di- <i>N</i> -acetil bacilosamina
---------------------------	-----------------------------------

C

Cepa An:	Cepa Albania
Cepa C:	Cepa Cherry
Cepa CR:	Cepa Cherry Russian
Cepa CV:	Cepa Cherry volga
Cepa D:	Cepa Dideron
Cepa EA:	Cepa El Amar
Cepa M:	Cepa Marcus
Cepa Rec:	Cepa Recombinant
Cepa T:	Cepa Turkey
Cepa W:	Cepa Winona
CID:	Disociación inducida por colisión
CP:	Proteína de la cápsida
<i>Cross-talk:</i>	Interrelación entre MPT
Ct:	Región C-terminal

D

DO₆₀₀:	Densidad óptica a 600 nm
dpi:	Días después de la inoculación
dsRNA:	RNA de doble banda
2D-PAGE:	Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

E

ESI:	Ionización electrospray
Esp:	Espectinomicina
ETD:	Disociación por transferencia de electrones

F

Fuc:	L-fucosa
Fuc-1-P:	L-fucosa-1-fosfato
FucNAc:	<i>N</i> -acetil-L-fucosamina

G

Gal:	D-galactosa
GalNAc:	<i>N</i> -acetil-D-galactosamina
Gen:	Gentamicina
GFP:	Proteína fluorescente verde
Glc:	D-glucosa
GlcNAc:	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina
1-GlcNAc:	Mono- <i>O</i> -GlcNAcilo
2-GlcNAc:	Di- <i>O</i> -GlcNAcilo
GlcNAc-1-P:	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina-1-fosfato
GW:	<i>Gateway</i>

H

HEXO:	β -hexosaminidasas
--------------	--------------------------

I

IC-RT-PCR:	Inmunocaptura seguida de RT-PCR
IMAC:	Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados
ISEM:	Microcopía electrónica precedida por inmuno-adsorción
iTRAQ:	Cuantificación relativa y absoluta por marcaje isobárico

K

Kan:	Kanamicina
-------------	------------

L

LC:	Cromatografía líquida
LTQ:	Trampa iónica lineal cuadrupolo de confinamiento lineal

M

MALDI-TOF:	Desorción e ionización mediante láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo
-------------------	---

Man:	D-manosa
Man-1-P:	D-manosa-1-fosfato
Man-6-P-EthN:	D-manosa-6-fosfato-etilamina
MGEA5:	<i>Homo sapiens Meningioma-Expressed Antigen 5</i>
mOGT:	Isoforma mitocondrial de la OGT
MPT:	Modificación post-traducciona
MS:	Espectrometría de masas
MS/MS:	Espectrometría de masas en tándem
m/z:	Relación masa/carga

N

NCAP:	<i>Non-Cell-Autonomous Proteins</i>
ncOGT:	Isoforma nucleocitoplásmica de la OGT
N.M.:	Péptidos no modificados
Nt:	Región N-terminal

O

OGA:	<i>O</i> - β - <i>N</i> -acetil-D-glucosaminidasa u <i>O</i> -GlcNAcase
OGA-L:	Isoforma larga de la OGA
OGA-S:	Isoforma corta de la OGA
O-GlcNAc:	Grupo <i>O</i> -GlcNAcilo
OGT:	<i>O</i> - β - <i>N</i> -acetil-D-glucosaminiltransferasa u <i>O</i> -GlcNAc transferasa
ORF:	Fase de lectura abierta

P

PAP:	<i>Peroxidase Anti-Peroxidase</i>
PD:	Plasmodesmos
PDB:	<i>Protein Data Bank</i>
PEST:	Dominios proteicos ricos en prolina, glutamina, serina y treonina
poli A:	Poliadenilado
PPO:	Fosfoinosítidos
Pseudo-HAT:	Región pseudo-histona acetil transferasa

Q

QTOF:	Analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo
--------------	---

R

RE:	Retículo endoplásmico
RFP:	Proteína roja fluorescente
Rha:	L-ramnosa
Rif:	Rifampicina
RNP:	Ribonucleoproteínas
RuBisCO:	Proteína ribulosa-1,5-bisfosfato-carboxilasa/oxigenasa

S

SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SEC:	SECRET AGENT
SEC-b2:	Plantas transgénicas de <i>Nicotiana benthamiana</i> en las que la expresión del gen <i>SECRET AGENT</i> se encuentra reducida mediante la tecnología de interferencia de RNA
sOGT:	Isoforma corta de la OGT
SPY:	SPINDLY
ssRNA:	Genoma de RNA de banda sencilla
ssRNA-:	Genoma de RNA de banda sencilla y polaridad negativa
ssRNA+:	Genoma de RNA de banda sencilla y polaridad positiva

T

TAP:	<i>Tandem affinity purification</i>
TPR:	Repeticiones de tetratricopéptidos

U

UDP-GlcNAc:	Uridina-difosfato-GlcNAc
--------------------	--------------------------

X

Xyl:	D-xilosa
Xyl-1-P:	D-xilosa-1-P

VIRUS CITADOS

AcNPV	<i>Autographa californica nuclearpolyhedrosis virus</i>
Adv-2 y 5	<i>Adenovirus type 2 y 5</i>
AMV	<i>Alfalfa mosaic virus</i>
BaMV	<i>Bamboo mosaic virus</i>
BBSV	<i>Beet black scorch virus</i>
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>
BPV-1	<i>Bobine papillomavirus 1</i>
BSMV	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
BTV	<i>Bluetongue virus</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CNV	<i>Cucumber necrosis virus</i>
CVYV	<i>Cucumber vein yellowing virus</i>
HBV	<i>Hepatitis B virus</i>
HCMV	<i>Human cytomegalovirus</i>
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus type 1</i>
HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
JGMV	<i>Johnsongrass mosaic virus</i>
KSHV	<i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus</i>
PLRV	<i>Potato leafroll virus</i>
PMTV	<i>Pop mop-top virus</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>
PPV-BOR-3	Aislado BOR-3 del <i>Plum pox virus</i>
PPV-R	Aislado Rankovic del <i>Plum pox virus</i>
PPV-SwCM	Aislado Sweet Cherry del <i>Plum pox virus</i>
PVA	<i>Potato virus A</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
RVA	<i>Rotavirus A</i>
SFV	<i>Semliki Forest virus</i>
SMV	<i>Soybean mosaic virus</i>
SV40	<i>Simian virus 40</i>
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
TYMV	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>
VZV	<i>Varicella-zoster virus</i>
WMV	<i>Watermelon mosaic virus</i>

I. INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

I.1. Modificaciones post-traduccionales

Las proteínas son los actores principales del funcionamiento y la dinámica celular. Sus propiedades físicas y químicas determinan las actividades específicas que pueden llevar a cabo en un lugar y momento determinado. La diversidad de isoformas proteicas detectadas en la naturaleza, ampliamente superior a la directamente codificada en el genoma, se debe principalmente a dos mecanismos: el procesamiento alternativo del RNA mensajero (mRNA) durante la transcripción y la modificación post-traducciona (MPT) de las proteínas (Deribe *et al.*, 2010; Santos & Lindner, 2017; Walsh *et al.*, 2005).

La denominación de MPT se refiere a la unión covalente, en muchos casos reversible, de grupos funcionales a las cadenas laterales de los aminoácidos o a los extremos N- y C-terminal de las proteínas, que puede estar catalizada o no por enzimas (Santos & Lindner, 2017; Yang *et al.*, 2018). En un sentido más amplio, también incluyen otro tipo de alteraciones, como la maduración del producto primario por procesamiento proteolítico. Las MPT pueden afectar a uno o a varios residuos de la proteína, y tener lugar durante la síntesis del polipéptido o en algún momento después de la traducción (Jefferis, 2016; Walsh *et al.*, 2005). En general, una misma proteína puede ser diana de múltiples MPT, dándose casos en los que un mismo residuo puede ser alternativamente modificado por diferentes tipos de grupos funcionales, y otros en los que la modificación por una MPT influye positiva o negativamente en la ejecución de una segunda modificación (Friso & van Wijk, 2015; Walsh *et al.*, 2005). Este complejo mecanismo, conocido comúnmente como interrelación o *cross-talk*, será abordado más adelante. Se han descrito una amplia variedad de procesos biológicos regulados por las MPT de sus protagonistas proteicos. Esta regulación puede estar mediada por cambios en la actividad enzimática, la estabilidad, la interacción con otras moléculas, la localización subcelular, etc., de la proteína diana (Reinders & Sickmann, 2007).

Hasta hoy se ha conseguido identificar más de 400 MPT distintas gracias al avance de nuevas tecnologías como la espectrometría de masas (MS) (Ma & Hart, 2014). Generalmente las MPT se producen con la ayuda de enzimas, pero son también abundantes los casos en que ocurren mediante reacciones químicas espontáneas (Harmel & Fiedler, 2018). En la **Tabla I.1** se muestra un resumen de las MPT más frecuentes en eucariotas superiores y los aminoácidos comúnmente modificados por ellas, así como, en el caso de MPT enzimáticas, de las enzimas involucradas (Santos & Lindner, 2017).

Las MPT pueden ser reversibles, y esta reversibilidad es especialmente útil durante procesos rápidos de regulación o señalización dinámica, donde la relación con el entorno es fundamental, ya que el tiempo requerido para que se produzcan alteraciones en los niveles proteicos mediante cambios en los procesos de transcripción o traducción es mucho mayor (Mijakovic & Macek, 2012).

La importancia de las MPT reversibles enzimáticas queda evidenciada por el hecho de que alrededor del 5 % del genoma de los eucariotas superiores está destinado a la producción de las enzimas que llevan a cabo dichas modificaciones (Santos & Lindner, 2017; Walsh *et al.*, 2005). Además, hay múltiples ejemplos en la literatura que muestran alteraciones en los patrones de MPT reversibles enzimáticas en las proteínas asociadas a procesos degenerativos como el envejecimiento y a numerosas enfermedades humanas importantes (Santos & Lindner, 2017).

Tabla I.1. Ejemplos de MPT, sus residuos diana habituales y las enzimas o proteínas involucradas en cada modificación. Adaptado de Santos & Lindner (2017)

MPT	Residuos diana	Enzimas o proteínas involucradas
Fosforilación	K, S, T	Quinasas, fosfatasas
N-glicosilación	N	Glicosiltransferasas, deglicosilasas
O-glicosilación	S, T	
Acetilación	K	Acetiltransferasas, deacetilasas
Metilación	K, R	Metiltransferasas, demetilinasas
Ubiquitinación	K	Enzimas activadoras de ubiquitina, enzimas conjugadoras de ubiquitina, ubiquitin ligasas, deubiquitinasas
Sumoilación	K	
Miristoilación	G	N-miristoiltransferasas
Prenilación	C	Farnesiltransferasas, geranyl-geranyl transferasas
Palmitoilación	C	Aciltransferasas de la familia DHCC, acil-tioesterasas
Sulfatación	Y	Sulfatasas, desulfatasas
S-nitrosilación	C, M	-
Glicación	K	-
Nitración	Y	Denitrasas
Oxidación/reducción	C	Peroxidasas, oxidasas, glutatión, tiorredoxina
Carbonilación	K, P, R, T	-

En el grupo de MPT reversibles enzimáticas destacan la glicosilación y la fosforilación, que han sido ampliamente estudiadas en eucariotas superiores debido a su abundancia e importancia biológica (Bah & Forman-Kay, 2016; Corfield, 2017). A continuación, ahondaré en la revisión de las características de ambas MPT por ser el objeto de estudio de esta tesis.

I.1.1. Glicosilación de proteínas

La glicosilación de proteínas, que supone la unión covalente de uno o más glicanos a la cadena polipeptídica, es una de las MPT más frecuentes, estando implicada en multitud de procesos biológicos (Varki & Kornfeld, 2017). Aunque la glicosilación de proteínas tiene una gran relevancia en organismos tanto procarióticos como eucarióticos (Corfield, 2017; Spiro, 2002), su importancia parece ser mayor en este segundo grupo, donde no menos del 50 % y probablemente más del 80 % de sus proteínas se encuentran glicosiladas, ya sea por la adición de monosacáridos simples o

cadena de oligosacáridos que pueden alcanzar gran complejidad (Gomord *et al.*, 2010; Hart & Copeland, 2010; Ma & Hart, 2014).

Los glicanos se clasifican en base al tipo de enlace que forman con el polipéptido. Hasta el momento se han identificado 6 tipos de uniones proteína-glicano, las cuales aparecen esquematizadas en la **Fig. I.1**, siendo los enlaces *N*- y *O*- los más extendidos y estudiados en eucariotas superiores (Varki & Kornfeld, 2017).

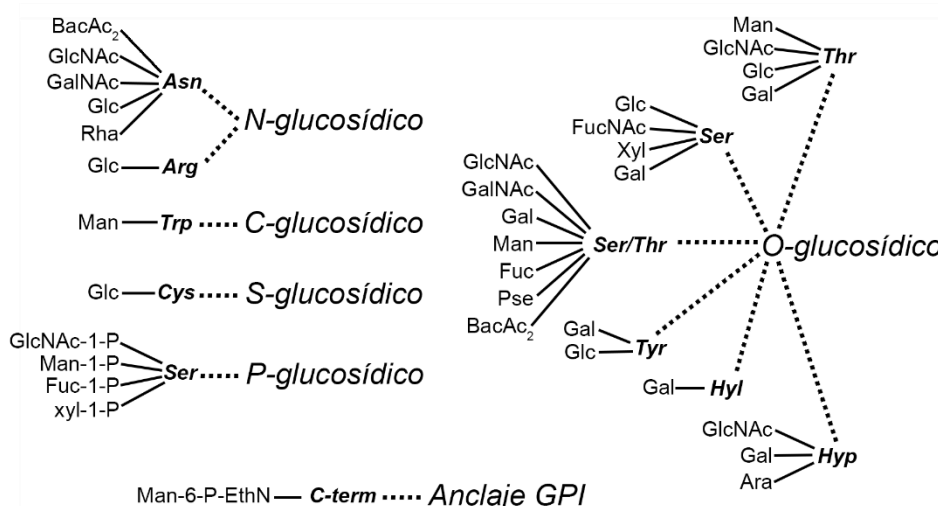


Figura I.1. Representación esquemática de los 6 tipos de uniones carbohidrato-péptido encontrados hasta hoy en la naturaleza. Los nombres completos de los monosacáridos pueden consultarse en la sección “Acrónimos y anglicismos”. (Hyl) hidroxilisina; (Hyp) hidroxiprolina; (C-term) extremo carboxi-terminal del péptido. La glicosilación es el proceso por el cual el glicosilfosfatidilinositol (GPI) se ancla a la proteína. Para obtener más detalles, incluyendo los enlaces anoméricos, ver Spiro (2002). Adaptado de Varki & Kornfeld (2017).

En la N-glicosilación el glicano suele unirse a la proteína a través de un enlace entre una molécula de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y un residuo de asparagina, generalmente en el contexto N-X-S/T y N-X-C, aunque también se ha encontrado N-glicosilación en residuos de arginina (Friso & van Wijk, 2015; Spiro, 2002). Este grupo contiene las glicosilaciones más variadas y de mayor complejidad, habiéndose encontrado más de 500 estructuras de oligosacáridos diferentes (Jefferis, 2016). En la O-glicosilación, lo más habitual es que ésta comience con un enlace (generalmente de tipo α) entre una molécula de *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc) y un residuo de serina, treonina, tirosina, hidroxiprolina o hidroxilisina (Spiro, 2002; Varki & Kornfeld, 2017), produciéndose habitualmente cadenas de oligosacáridos más cortas y sencillas que las de las N-glicoproteínas (Walsh *et al.*, 2005). Hace ya varios años, se descubrió que muchas proteínas pueden ser modificadas por un tipo particular de O-glicosilación que liga un único residuo de GlcNAc a residuos de serina o treonina mediante un enlace de tipo β . Esta modificación recibe el nombre de *O*-GlcNAcilación (Zachara *et al.*, 2017) y será tratada más extensamente en el siguiente apartado, por ser una de las dos MPT estudiadas en esta tesis.

1.1.1.1. O-GlcNAcilación de proteínas

La O-GlcNAcilación, al añadir un solo residuo de GlcNAc, puede considerarse la glicosilación más sencilla (Biwi *et al.*, 2018). Debido a su simplicidad, este tipo de glicosilación resulta fácilmente reversible y altamente dinámica, características que le confieren una función esencialmente regulatoria (Zachara *et al.*, 2017).

La O-GlcNAcilación no fue descubierta hasta principios de la década de los 80, debido por una parte a que no se acomoda a los dogmas generales preestablecidos de la glicómica clásica y por otra a la dificultad de su detección (Zachara *et al.*, 2017). Desde entonces el estudio de la O-GlcNAcilación ha avanzado mucho, esencialmente gracias a la mejora de las técnicas de MS (Ma & Hart, 2014; Zachara *et al.*, 2017), lo que ha permitido comprobar que esta MPT está muy extendida en la naturaleza, habiéndose detectado en organismos tan distintos como hongos filamentosos, protistas, insectos, mamíferos, plantas y, especialmente relevante para esta tesis, diferentes tipos de virus (Hart *et al.*, 2011; Zachara *et al.*, 2017). Además, se sabe que la O-GlcNAcilación de proteínas es esencial para la vida animal, ya que desempeña un papel crítico durante su desarrollo embrionario (Shafi *et al.*, 2000), y su alteración contribuye a importantes enfermedades humanas como trastornos neurodegenerativos, diabetes o cáncer (Biwi *et al.*, 2018). A pesar de haberse identificado experimentalmente más de 1000 sitios O-GlcNAcilados, por el momento no se ha encontrado ninguna secuencia consenso que determine con exactitud qué residuos de serina o treonina van a ser modificados, y los diferentes algoritmos que se han desarrollado para predecir sitios de O-GlcNAcilación (como *YinOYang*, *OGlcNAcScan*, *GlycoEP*, *O-GlcNAcPRED* u *O-GlcNAcPRED-II*) no son muy certeros (Britto-Borges & Barton, 2017; Jia *et al.*, 2018). Lo que sí se ha visto es que en ocasiones los sitios O-GlcNAcilados se sitúan cercanos a motivos PVS (prolina-valina-serina) y a regiones PEST (prolina-ácido glutámico-serina-treonina). Es importante destacar que los dominios PEST son motivos asociados con la degradación rápida de proteínas; y en relación a esto, hay varios estudios que sugieren que la O-GlcNAcilación de los mismos previene la degradación de la proteína diana (Hart & Akimoto, 2009; Zachara *et al.*, 2017).

En mamíferos, múltiples estudios han demostrado la implicación de la O-GlcNAcilación en la respuesta frente a diferentes estímulos externos, regulando variados procesos celulares como la transcripción y la traducción a través de cambios no solo en la estabilidad de la proteína diana, sino también en su disponibilidad y capacidad de interactuar con otras proteínas (Hart *et al.*, 2011; Yang & Qian, 2017; Zachara *et al.*, 2017). Algunos ejemplos clásicos de proteínas animales O-GlcNAciladas son la RNA polimerasa II, los factores de transcripción Sp1 y c-Myc, las chaperonas HSP27 y HSP90, las histonas H2B y H3 o la proteína tau del citoesqueleto (Bond & Hanover, 2013).

Se conoce menos acerca del papel de la O-GlcNAcilación en las proteínas de plantas; sin embargo, de un estudio proteómico a gran escala realizado recientemente se desprende que las dianas de

O-GlcNAcilación son similares a las de las proteínas O-GlcNAciladas de animales (Xu *et al.*, 2017).

Las primeras evidencias de O-GlcNAcilación en plantas se encontraron en proteínas del poro nuclear y proteínas asociadas al núcleo, ambas procedentes de tabaco (Heese-Peck & Raikhel, 1998; Heese-Peck *et al.*, 1995 citados en Thornton *et al.*, 1999). Años más tarde se comprobó que algunas proteínas del floema de *Cucurbita maxima* podían ser fosforiladas y O-GlcNAciladas, identificándose varias *Non-Cell-Autonomous Proteins* (NCAP) y la *Non-Cell-Autonomous Pathway Protein 1 of Nicotiana tabaccum* (Nt-NCAPP1) modificadas (Taoka *et al.*, 2007). Posteriormente, se observó en *Triticum aestivum* que la O-GlcNAcilación de la proteína de unión a RNA, TaGRP2, controla la interacción con la lectina VER2, regulando de esta forma la respuesta a la vernalización (Xiao *et al.*, 2014; Xing *et al.*, 2009). En esta misma línea, se demostró que la lectina Nictaba de *Nicotiana tabacum*, que se induce en condiciones de estrés, interaccionaba con histonas O-GlcNAciladas, sugiriéndose que dicha interacción podría actuar como modulador de la transcripción (Delporte *et al.*, 2014; Schoupe *et al.*, 2011). En relación con la MPT de histonas, también se ha demostrado que la O-GlcNAcilación de la histona lisina metiltransferasa (HKMT) *Arabidopsis homolog of Trithorax1* (ATX1) está involucrada en procesos epigenéticos que estimulan la expresión del gen *Flowering Locus C (FLC)* y reprimen la floración en *Arabidopsis* (Xing *et al.*, 2018). También recientemente en *Arabidopsis* se ha demostrado que la O-GlcNAcilación de la proteína *Repressor of GA1-3 (RGA)*, perteneciente a la familia de factores de transcripción DELLA, reprime su actividad inhibiendo su unión con proteínas involucradas en la regulación de las rutas de señalización en respuesta a estímulos luminosos y hormonas vegetales (Zentella *et al.*, 2016). Estos ejemplos no son más que la punta del iceberg del papel de la O-GlcNAcilación en las plantas. El estudio proteómico citado más arriba ha identificado en *A. thaliana* más de 200 proteínas O-GlcNAciladas, incluyendo algunas con funciones similares a las de las proteínas O-GlcNAciladas de animales (Xu *et al.*, 2017). Una investigación aún más reciente acerca de la vernalización de *T. aestivum* (Xu *et al.*, 2019) ha detectado 168 proteínas O-GlcNAciladas, principalmente relacionadas con procesos de respuesta a estímulos abióticos y hormonas, regulación del metabolismo y expresión génica, muchas de las cuales se ven afectadas por la exposición prolongada a bajas temperaturas.

1.1.1.2. Enzimas que regulan la O-GlcNAcilación de proteínas

Mientras que en otras MPT pueden estar implicadas familias enzimáticas múltiples, la modificación por la adición de un grupo O-GlcNAcilo (O-GlcNAc) está controlada fundamentalmente por dos enzimas: la O- β -N-acetil-D-glucosaminiltransferasa (O-GlcNAc transferasa, OGT) y la O- β -N-acetil-D-glucosaminidasa (O-GlcNAcasa, OGA). La OGT cataliza la transferencia del grupo GlcNAc desde el sustrato uridina-difosfato-GlcNAc (UDP-GlcNAc) a la cadena lateral de residuos de serina o treonina, mientras que la OGA se encarga de su hidrólisis (Biwi *et al.*, 2018).

El gen de la OGT se encuentra conservado en los eucariotas incluyendo, por ejemplo, a levaduras, hongos filamentosos, gusanos, insectos, plantas y humanos, y también se ha detectado en organismos procariontes (Aquino-Gil *et al.*, 2017; Olszewski *et al.*, 2010; Zachara & Hart, 2004). La OGT mejor caracterizada es la de mamíferos. Presenta dos dominios: el N-terminal, que contiene repeticiones de tetratricopeptidos (TPR) que reconocen a las proteínas que van a ser modificadas, y el C-terminal, que contiene el dominio catalítico y un dominio de unión a fosfoinosítidos (PPO) (**Fig. 1.2A**) (Bond & Hanover, 2015). Se han descrito tres isoformas de la enzima OGT que difieren en el número de TPR y en su localización subcelular: nucleocitoplásmica (ncOGT), mitocondrial (mOGT) y corta (sOGT) (Bond & Hanover, 2015; Yang & Qian, 2017). Existe también una OGT conocida como *Epidermal growth factor domain-specific OGT* (EOGT) mucho menos estudiada, que reside en el retículo endoplásmico (RE) (Aquino-Gil *et al.*, 2017; Biwi *et al.*, 2018; Zachara *et al.*, 2017). La EOGT se caracterizó inicialmente en *Drosophila melanogaster* y posteriormente en jabalí, y no parece ser homóloga de la OGT, de la que también se diferencia en que es capaz de añadir residuos *O*-GlcNAc dando lugar a glicanos más complejos.

Dada la variedad e importancia de los procesos en los que está implicada la *O*-GlcNAcilación, no es de extrañar que la actividad de la OGT esté regulada en animales a múltiples niveles. Estos incluyen la modulación del procesamiento alternativo de su transcrito primario, el control de su expresión específica en distintos órganos y tejidos y de su localización subcelular, la modificación de sí misma por fosforilación y *O*-GlcNAcilación, y la regulación metabólica de su actividad enzimática, principalmente ligada a la disponibilidad del sustrato donador UDP-GlcNAc, que depende a su vez del estado nutricional de la célula (Biwi *et al.*, 2018; Bond & Hanover, 2015).

El gen de la OGA (*MGEA5*, *Homo sapiens Meningioma-Expressed Antigen 5*) se encuentra relativamente conservado en eucariotas, pero solo se observa un grado de conservación alto entre mamíferos (Zachara & Hart, 2004). La OGA de mamíferos consta de un dominio glicosido hidrolasa en la región N-terminal y una región de unión a OGT compartida por las dos isoformas de la proteína, la larga (OGA-L) y la corta (OGA-S) (**Fig. 1.2B**) (Bond & Hanover, 2015). La OGA-L tiene en su extremo C-terminal una región pseudo-histona acetil transferasa (pseudo-HAT), mientras que la OGA-S carece de esta secuencia, pero ambas isoformas incluyen un dominio de unión a OGT. Las regiones N- y C-terminal están unidas por un sitio de corte de la caspasa-3, inducida durante la apoptosis, lo que podría estar relacionado con la regulación de la actividad OGA (Bond & Hanover, 2015; Zachara *et al.*, 2017).

Por el momento no se conoce mucho acerca de la regulación de la OGA, aunque probablemente esté tan regulada como la OGT (Zachara *et al.*, 2017).

A pesar de que tanto la OGT como la OGA tienen una única subunidad catalítica, hay datos que indican que ambas enzimas pueden interactuar con una amplia variedad de cofactores. Esto

genera una multitud de complejos holoenzimáticos que funcionan en la célula de manera dinámica regulando la *O*-GlcNAcilación de una amplia variedad de polipéptidos, bajo distintas condiciones y en diferentes tipos celulares (Zachara *et al.*, 2017). En particular, entre las proteínas que se han encontrado en células humanas formando parte de complejos con OGA hay chaperonas, histonas, proteínas del citoesqueleto, factores de transcripción, proteínas del proteasoma y quinasas (Groves *et al.*, 2017).

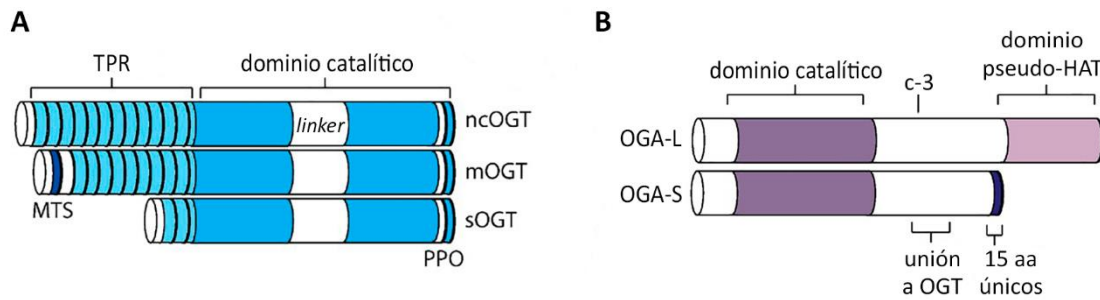


Figura 1.2. Estructura de las isoformas de la OGT (A) y la OGA (B) de mamíferos generadas por procesamiento alternativo. **(A)** En color azul claro se muestran las TPR y en azul oscuro la señal de localización mitocondrial (MTS). El dominio catalítico *O*-glicosil transferasa se compone de dos segmentos marcados en azul claro y una región de unión (*linker*, en blanco). En el extremo C-terminal se representa un sitio de unión a membranas celulares con lípidos ricos en PPO. **(B)** En color morado se representa el dominio catalítico glicósido hidrolasa y en el centro (en blanco) la región de interacción con la OGT y el sitio de reconocimiento de la caspasa-3 (c-3). El dominio pseudo-HAT se marca en rosa. Una secuencia de 15 aminoácidos (aa) presente en la OGA-S, y ausente en la OGA-L, se muestra en morado oscuro. Adaptado de Bond & Hanover (2015).

1.1.1.3. Enzimas del ciclo de la *O*-GlcNAcilación en plantas

En base a similitudes de secuencia, se dedujo que en plantas existían al menos dos genes distintos que codificaban una OGT, denominados en *A. thaliana* *SPINDLY* (*SPY*) y *SECRET AGENT* (*SEC*), (Olszewski *et al.*, 2010). Aunque la estructura de las enzimas SEC y SPY es similar a la de la OGT animal, conteniendo en la región N-terminal las TPR encargadas del reconocimiento de las proteínas diana y en la C-terminal el dominio catalítico *O*-glicosil transferasa y el sitio de unión a PPO, los análisis filogenéticos de los dominios catalíticos revelaban una proximidad mayor de SEC a las OGT de metazoos, mientras SPY estaba más cercana a posibles OGT de bacterias (Olszewski *et al.*, 2010). Por otro lado, la actividad OGT de SEC había sido verificada en distintos estudios, mientras que la de SPY nunca había sido probada de una manera convincente (Steiner *et al.*, 2016). Finalmente, un estudio reciente ha demostrado que SPY, más que una *O*-GlcNAc transferasa es una *O*-fucosil transferasa, que, al menos en cuanto a la modificación de la proteína DELLA RGA, tiene un efecto contrario al de SEC (Zentella *et al.*, 2017). Una de las razones por las que se suponía que SEC y SPY tenían funciones al menos parcialmente redundantes era que, mientras que mutaciones en cualquiera de estas dos OGT teóricas causan solo defectos moderados, mutaciones simultáneas en ambos genes resulta letal (Hartweck *et al.*, 2002). En este momento, la razón del efecto sinérgico de las mutaciones en SEC y

SPY es materia de especulación (Zentella *et al.*, 2017). Aunque no se puede descartar que la existencia de alguna otra proteína de *A. thaliana*, además de SEC, con actividad OGT sea la causa de que los mutantes nulos de SEC sean viables, parece más probable que el contraste entre la naturaleza dispensable de SEC y esencial de la OGT de mamíferos se deba a que las funciones de O-GlcNAcilación en plantas, aunque importantes, no lo son tanto como en animales.

Mientras que la caracterización de SEC deja claro cuál es la actividad que añade los residuos O-GlcNAc a las proteínas de plantas, aún no se ha identificado una enzima que los elimine como lo hace la OGA en mamíferos. Ni siquiera se ha demostrado que la O-GlcNAcilación en plantas sea un proceso reversible como lo es en animales, y en caso de serlo, no se sabe si los residuos se escinden de forma pasiva o si la hidrólisis está catalizada por una enzima específica. Asimismo, tampoco se conoce nada acerca de los mecanismos que regulan la acción de SEC en las células vegetales. Es probable que SEC actúe formando complejos como los que se han encontrado asociados a OGT y OGA en mamíferos. Sin embargo, aunque el conocimiento de la O-GlcNAcilación en plantas ha avanzado mucho en la última década, todavía no hay datos acerca de las interacciones de SEC con otros factores celulares que puedan condicionar su actividad (Xu *et al.*, 2017; Zentella *et al.*, 2016).

1.1.1.4. O-GlcNAcilación de proteínas virales

A diferencia de la cantidad de ejemplos descritos en la literatura de proteínas animales y más recientemente de plantas modificadas por O-GlcNAcilación, aún se conoce muy poco acerca de las proteínas virales o del huésped cuya función en la infección viral se vea afectada por esta modificación (Angelova *et al.*, 2015; Jochmann *et al.*, 2013), aunque hay algunos estudios que han relacionado la O-GlcNAcilación con el ensamblaje/formación de la envoltura viral (Greis *et al.*, 1994; Mullis *et al.*, 1990; Pérez *et al.*, 2013) y con la replicación (Angelova *et al.*, 2015; González & Burrone, 1991; Jochmann *et al.*, 2009; Jochmann *et al.*, 2013; Ko *et al.*, 2012; Medina *et al.*, 1998).

Algunos ejemplos de proteínas virales modificadas por O-GlcNAcilación en virus DNA son la fosfoproteína básica BPP mayoritaria del tegumento del *Human cytomegalovirus* (HCMV) (Benko *et al.*, 1988; Greis *et al.*, 1994), la proteína de la fibra de la cápsida en los *Adenovirus type 2 y 5* (AdV-2 y 5) (Caillet-Boudin *et al.*, 1989; Mullis *et al.*, 1990), la proteína del tegumento gp41 del *Autographa californica nuclearpolyhedrosis virus* (AcNPV) (Whitford & Faulkner, 1992), el antígeno T del *Simian virus 40* (SV40) (Medina *et al.*, 1998) y al menos 18 de las proteínas virales codificadas por el *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus* (KSHV) (Jochmann *et al.*, 2013; Ko *et al.*, 2012). Por el momento hay menos ejemplos descritos de proteínas de virus RNA modificadas por O-GlcNAcilación, siendo dos de ellos la proteína no estructural NS26 del *Rotavirus A* (RVA) (González & Burrone, 1991) y la proteína de la cápsida (CP) del potyvirus *Plum pox virus* (PPV) (Chen *et al.*, 2005; Fernández-Fernández *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2013), de la cual se hablará más adelante. También se han descrito unos pocos casos en los que la O-GlcNAcilación de proteínas del huésped afecta directamente al ciclo del virus,

como son la MPT de la proteína *Host Cell Factor 1* (HCF-1) en la infección del *Herpes simplex virus* (HSV) (Angelova *et al.*, 2015) o la del factor de transcripción Sp1 en la infección por *Human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1) (Jochmann *et al.*, 2009).

Al igual que ocurre con muchas de las proteínas comentadas en apartados anteriores, las proteínas virales que son diana de *O*-GlcNAcilación también suelen ser sustrato de fosforilación (Afrikanova *et al.*, 1996; Bergström Lind *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2005; Greis *et al.*, 1994; Källsten *et al.*, 2017; Medina *et al.*, 1998; Rieder *et al.*, 2017; Sotelo *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2012), la MPT que es el objeto de estudio principal de esta tesis.

I.1.2. Fosforilación de proteínas

La fosforilación es posiblemente la MPT de proteínas mejor estudiada y de mayor relevancia funcional (Zulawski & Schulze, 2015). Consiste en la unión covalente de un grupo fosfato habitualmente desde la adenosina trifosfato (ATP) al grupo hidroxilo de residuos de serina, treonina o tirosina, aunque se ha visto que los aminoácidos histidina, lisina, ácido glutámico, arginina y ácido aspártico también pueden ser modificados (van der Laarse *et al.*, 2018; Walsh *et al.*, 2005). La fosforilación es una MPT reversible y dinámica que regula una amplia variedad de procesos celulares (Trost & Kusalik, 2011). Las enzimas que catalizan la reacción de adición del grupo fosfato se conocen como quinasas, mientras que las que los eliminan se denominan fosfatasas.

La fosforilación se encuentra conservada en todos los organismos vivos y ha sido estudiada extensamente en bacterias, animales, incluidos los humanos, y también en plantas (Cozzone, 2005; Friso & van Wijk, 2015; Santos & Lindner, 2017). En particular, en humanos, aproximadamente un tercio del total de proteínas están fosforiladas, y defectos en la fosforilación de algunas de ellas se encuentran asociados a enfermedades de gran relevancia como el cáncer y la diabetes (Cohen, 2000; Cohen, 2001).

Como ocurre con otras MPT, el avance de las técnicas experimentales, en especial de las de MS, ha acelerado la identificación de dianas fosforilables en las proteínas. Pero para aquellos casos en los que estas técnicas no pueden aplicarse de manera sencilla, durante los últimos años se han desarrollado múltiples programas informáticos como *NetPhosK*, *PHOSITE*, *KinasePhos* o *PAAS* que predicen no solo los sitios fosforilables en las proteínas diana sino también las quinasas que catalizan la reacción. Debido a las especificidades de cada organismo en cuanto a su dotación de quinasas (quinoma), las herramientas de predicción desarrolladas para un determinado organismo pueden no resultar muy informativas para otro (Trost & Kusalik, 2011).

La modificación por fosforilación, en uno o múltiples sitios (**Fig. I.3**) (Grindheim *et al.*, 2017), en ocasiones induce cambios conformacionales locales en las proteínas diana. Estos cambios pueden

modificar su estabilidad, su afinidad por el sustrato o su velocidad de reacción (en el caso de enzimas) o su capacidad de interactuar con otros componentes celulares (por ejemplo proteínas o ácidos nucleicos), desencadenando alteraciones funcionales que pueden condicionar la iniciación, transmisión y culminación de vías de señalización celulares (Grindheim *et al.*, 2017; Humphrey *et al.*, 2015; Salazar & Höfer, 2009; Singh *et al.*, 2017). Los cambios conformacionales derivados de la introducción del grupo fosfato provienen de la generación de nuevos enlaces electrostáticos intra- e inter-moleculares, incluyendo puentes salinos, sobre todo con residuos de arginina, y redes de puentes de hidrógeno en los que pueden participar los cuatro átomos de oxígeno del grupo fosfato (Bah & Forman-Kay, 2016).

Como comentaré en detalle más adelante, la fosforilación en eucariotas está estrechamente relacionada con la O-GlcNAcilación, pero ha sido mucho más estudiada que ésta última. Los procesos biológicos de animales en cuya regulación la fosforilación cumple una función esencial son innumerables. Entre ellos se pueden mencionar mecanismos de reparación del DNA, respuesta frente al estrés, regulación de la transcripción, apoptosis, respuesta inmune, diferenciación celular, etc. (Trost & Kuslik, 2011). Algunos ejemplos clásicos de proteínas modificadas por fosforilación en animales son receptores de membrana (como los receptores de factores de crecimiento), las quinasas MAP y Src, la RNA polimerasa II o las histonas (Salazar & Höfer, 2009). Por su parte, la fosforilación en plantas desempeña funciones similares a las que juega en animales, encontrándose proteínas fosforiladas implicadas tanto en el metabolismo de nutrientes como en procesos de señalización celular cruciales para el crecimiento y desarrollo y la respuesta inmune frente a patógenos (Huber, 2007; Park *et al.*, 2012; Yao & Xu, 2017). Algunos ejemplos de proteínas dianas de fosforilación en plantas son el receptor de brasinoesteroides BRI1 (Wang *et al.*, 2005), la enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS) (Huber, 2007) o los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de patógenos en plantas (Park *et al.*, 2012).

1.1.2.1. Enzimas que regulan la fosforilación de proteínas

Las proteínas quinasas conforman una de las “superfamilias” más grandes de proteínas evolutivamente relacionadas y engloba uno de los grupos de genes más abundantes en humanos (1.7 % del genoma, unas 500 quinasas) (Manning, Whyte, *et al.*, 2002; Manning, Plowman, *et al.*, 2002; Sacco *et al.*, 2012). Habitualmente, en eucariotas las quinasas se clasifican en dos grupos: quinasas que presentan el dominio catalítico típico (ePK) y quinasas atípicas (aPK) (Manning, Whyte, *et al.*, 2002; Manning, Plowman, *et al.*, 2002; Miranda-Saavedra & Barton, 2007). Dentro del grupo ePK se encuentran las familias de quinasas AGC, CAMK, CK1, CMGC, RGC, STE, TK, TKL y una familia adicional que constituye un cajón de sastre, mientras que en el grupo de las aPK se sitúan las familias Alpha, PIKK, PHDK, RIO, BRD, ABC1 y TIF1, además de otras posibles quinasas sin clasificar (Miranda-Saavedra & Barton, 2007).

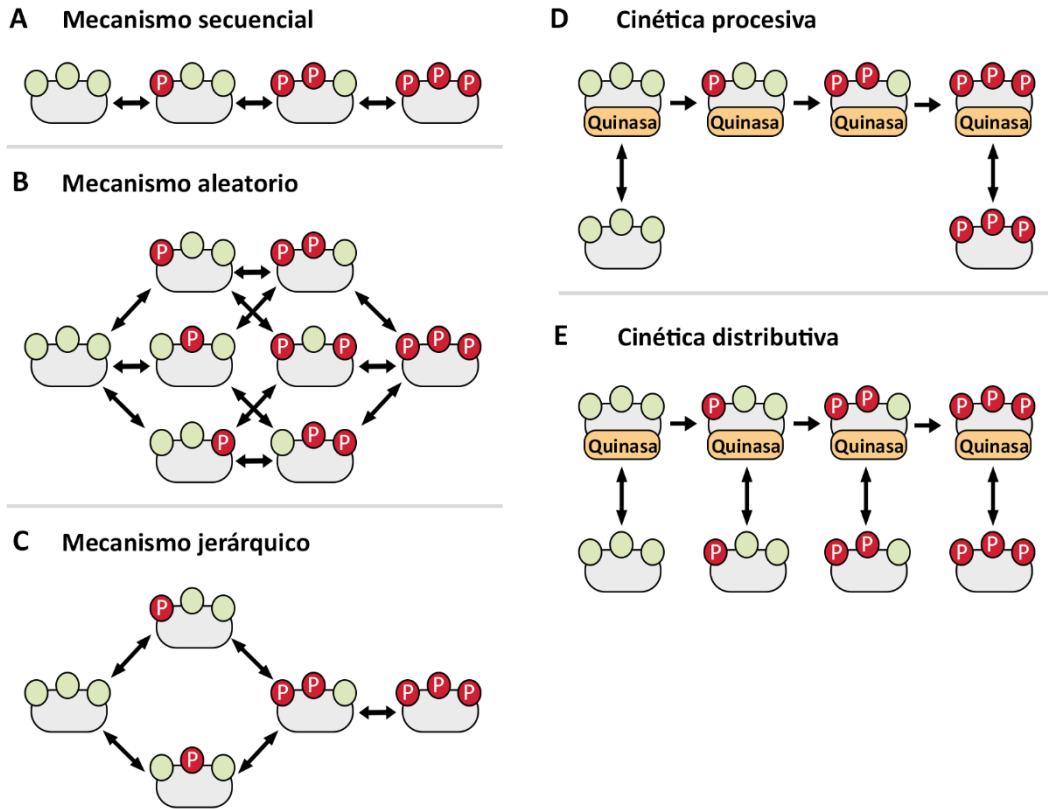


Figura 1.3. Mecanismos de fosforilación múltiple en las proteínas. La fosforilación en múltiples sitios puede ocurrir de manera estrictamente secuencial (A) o aleatoria (B). En un mecanismo jerárquico (C) uno o más sitios tienen que ser fosforilados antes de que un sitio específico esté disponible para ser modificado. Después que el complejo sustrato-quinasa se haya formado, la enzima puede fosforilar todos los sitios disponibles (D), o primero disociarse y entonces religarse al sustrato para fosforilar sucesivamente cada sitio (E). Adaptado de Grindheim *et al.* (2017).

A pesar de que las proteínas fosfatasa han sido menos estudiadas que las quinasas, estas enzimas también se encuentran en gran número en los organismos, identificándose aproximadamente 200 fosfatasa en el fosfatoma de humanos. Cuando se habla de fosfatasa, también se incluyen las enzimas que no solo eliminan grupos fosfato de proteínas sino también de lípidos, conformándose las familias PTP, PPP, PPM, HAD, LP y NUDT, las cuales son estructuralmente más diversas que las de las quinasas (Li *et al.*, 2013; Sacco *et al.*, 2012).

Es importante destacar que en cada organismo puede haber particularidades acerca del número de quinasas o fosfatasa, las familias e incluso los grupos de enzimas existentes, encontrándose por ejemplo que ciertas familias pueden estar más expandidas en humanos que en *Drosophila* debido a su relación con el sistema nervioso, o familias que se encuentran ausentes en ciertos organismos (Manning, Whyte, *et al.*, 2002; Manning, Plowman, *et al.*, 2002; Moorhead *et al.*, 2009). Un ejemplo de esto es que el quinoma humano está formado por 518 quinasas (Sacco *et al.*, 2012) mientras que el de *A. thaliana* está constituido por al menos el doble de estas enzimas (Hashiguchi & Komatsu, 2017).

Es habitual que las quinasas y las fosfatasa actúen en una compleja red junto con otras enzimas y factores de señalización regulando la fosforilación, todo esto modulado por la autofosforilación y/o fosforilación catalizada por otras quinasas (Grindheim *et al.*, 2017; Humphrey *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Manning, Whyte, *et al.*, 2002). Por ello, además del dominio catalítico, las quinasas y fosfatasa también suelen poseer dominios que regulan su actividad, dominios que permiten la modulación de la señal o el establecimiento de interacciones y dominios que indican cuál debe ser la localización subcelular de la enzima (Li *et al.*, 2013; Manning, Whyte, *et al.*, 2002; Roy & Cyert, 2009; Sacco *et al.*, 2012; Salazar & Höfer, 2009). Además, como ambos tipos de enzimas son capaces de reconocer secuencias específicas, la acción de las distintas quinasas y fosfatasa también puede ser regulada mediante sus secuencias consenso diana, de modo que una secuencia particular puede establecer el orden en el que se va a modificar un sustrato determinado (Salazar & Höfer, 2009) (**Fig. I.3**).

1.1.2.2. Fosforilación de proteínas virales

En la literatura hay una amplia variedad de ejemplos descritos de proteínas estructurales y no estructurales modificadas por fosforilación de virus DNA y RNA que afectan a animales y plantas. Las proteínas cuya actividad está regulada por fosforilación pueden estar implicadas en cualquiera de los procesos del ciclo viral, incluyendo la transcripción, traducción y replicación del genoma viral, el movimiento del virus o ensamblaje de las partículas virales (Hoover & Kao, 2016; Jakubiec & Jupin, 2007; Keating & Striker, 2012; Keck *et al.*, 2015).

Algunos ejemplos de proteínas modificadas por fosforilación en virus DNA que infectan animales son la CP del *Hepatitis B virus* (HBV) (Ning *et al.*, 2017), la proteína del tegumento UL51 del HSB (Kato *et al.*, 2018), la proteína reguladora E2 del *Bobine papillomavirus 1* (BPV-1) (Culleton *et al.*, 2017) o el regulador transcripcional IE62 del *Varicella-zoster virus* (VZV) (Eisfeld *et al.*, 2006). También se han encontrado proteínas fosforiladas en las dos familias principales de virus DNA que infectan plantas, *Caulimoviridae* y *Geminiviridae*: la CP y la pre-CP del caulimovirus *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) (Champagne *et al.*, 2007; Martínez-Izquierdo & Hohn, 1987) y la CP (Hipp *et al.*, 2019), la proteína de replicación Rep (Shen *et al.*, 2018), el factor de activación transcripcional-supresor de silenciamiento AL2 (Shen *et al.*, 2014), el regulador del ciclo celular C4 (Mei *et al.*, 2018) y el factor de patogenicidad del DNA satélite β C1 (Shen *et al.*, 2011) de diversos geminivirus.

Así mismo, son muy abundantes los casos de proteínas de virus RNA fosforiladas. En el artículo de revisión de Keck *et al.* (2015) se ofrece una amplia información acerca de la fosforilación de proteínas de virus de animales con genoma de RNA de banda sencilla (ssRNA), y también se han descrito proteínas fosforiladas de virus de animales con genoma de RNA de banda doble (dsRNA), como la proteína NS2 del orbivirus *Bluetongue virus* (BTV) (Modrof *et al.*, 2005). Entre los casos mejor estudiados de proteínas fosforiladas de virus de plantas con genoma RNA se encuentran las proteínas de replicación 2a del cucumovirus *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Kim *et al.*, 2002), p33 del tombusvirus

Cucumber necrosis virus (CNV) (Shapka *et al.*, 2005) y 66K del tymovirus *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) (Jakubiec *et al.*, 2006). También se han visto fosforiladas las proteínas de movimiento 30K del tobamovirus *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Citovsky *et al.*, 1993), 32K del alfamovirus *Alfalfa mosaic virus* (AMV) (Kim *et al.*, 2014), TGBp1 del potexvirus *Potato virus X* (PVX) (Módena *et al.*, 2008), TGB1 del hordeivirus *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) (Hu *et al.*, 2015), TGBp3 del pomovirus *Pop mop-top virus* (PMTV) (Samuilova *et al.*, 2013) y 17K del polerovirus *Potato leafroll virus* (PLRV) (Sokolova *et al.*, 1997). Dentro de las proteínas estructurales se han encontrado fosforiladas la CP del bromovirus *Brome mosaic virus* (BMV) (Hoover *et al.*, 2016), de los potexvirus PVX (Atabekov *et al.*, 2001) y *Bamboo mosaic virus* (BaMV) (Hung *et al.*, 2014) y del necrovirus del *Beet black scorch virus* (BBSV) (Zhao *et al.*, 2015). Por último, se han detectado fosforilados los supresores de silenciamiento 2b del CMV (Nemes *et al.*, 2017) y γb del BSMV (Zhang *et al.*, 2018). En el caso concreto de los potyvirus, hay evidencias de fosforilación en la proteína VPg y Nib del *Potato virus A* (PVA) (Eskelin *et al.*, 2019; Puustinen *et al.*, 2002), así como en la CP de PVA y PPV (Chen *et al.*, 2005; Fernández-Fernández *et al.*, 2002; Ivanov *et al.*, 2001; Ivanov *et al.*, 2003; Löhmus *et al.*, 2017; Pérez *et al.*, 2013). Sobre la modificación de estas últimas proteínas me extenderé en detalle más adelante.

La fosforilación es importante para las infecciones virales no solo por la modificación directa de las proteínas del virus, sino también por los abundantes cambios que se producen en el patrón de fosforilación de las proteínas del huésped asociadas a la infección, ya sea como respuesta defensiva, como consecuencia de la acción del patógeno al interferir con la defensa antiviral o para reunir proteínas celulares que formen parte de su maquinaria de amplificación (Dzananovic *et al.*, 2018; Keating & Striker, 2012; Lu *et al.*, 2019; Mohr, 2006; Schulze zur Wiesch *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2017). Es importante destacar (por afectar a virus de la familia *Potyviridae*, el objeto principal de esta tesis) el caso de la proteína S6 quinasa (S6K) que interacciona con la proteína viral VPg. Aunque la infección viral no altera aparentemente la fosforilación del sustrato mejor caracterizado de esta quinasa (la proteína ribosomal RPS6), el hecho de que el silenciamiento de S6K afecta negativamente a la infección de dos potyvirus distintos sugiere que los miembros de este género pueden requerir la fosforilación por S6K de alguna otra proteína (viral o celular) aún por identificar (Rajamäki *et al.*, 2017).

I.1.3. Cross-talk entre O-GlcNAcilación y fosforilación de proteínas

En apartados anteriores se ha indicado que la O-GlcNAcilación y fosforilación de proteínas pueden afectarse la una a la otra, proceso que se conoce generalmente como *cross-talk* entre MPT. El hecho de que ambas modificaciones compartan las dianas serina/treonina y regulen en muchas ocasiones los mismos procesos biológicos hace que prácticamente todos los sustratos O-GlcNAcilados puedan estar siendo también afectados por fosforilación (Hart *et al.*, 2011; Leney *et al.*, 2017). Hace más de diez años se pensaba que el mecanismo de *cross-talk* más extendido en las proteínas O-GlcNAciladas/fosforiladas era la ocupación recíproca del mismo residuo de serina/treonina por

ambas MPT (Hart *et al.*, 1995). Sin embargo, durante los últimos años se ha visto que esta relación recíproca, conocida como “Yin-Yang”, realmente es muy simplista, habiéndose observado en la naturaleza distintos ejemplos de *cross-talk* positivo y negativo entre *O*-GlcNAcilación/fosforilación mucho más complejos, en los que ambas MPT no solo se regulan de una forma recíproca sino que también pueden coexistir en distintos sitios (**Fig. I.4**) (Zeidan & Hart, 2010). Un ejemplo típico de relación Yin-Yang es el del factor de transcripción c-Myc en el que la T58 puede ser alternativamente *O*-GlcNAcilada o fosforilada (Kamemura *et al.*, 2002) (**Fig. I.4A**). Un segundo tipo de *cross-talk* da lugar a la actuación alternativa y recíproca de estas MPT, pero afectando a distintos aminoácidos, como en el caso del factor de transcripción C/EBP β en el que se fosforilan las T179, T184 y T188 o, alternativamente, se *O*-GlcNAcilan las S180 y S181 (Li *et al.*, 2009) (**Fig. I.4B**). En un tipo contrario de *cross-talk*, una modificación facilita otra modificación en un aminoácido distinto. Es el caso del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) en el que estimular la *O*-GlcNAcilación facilita la fosforilación de la S307, S632 y S635 (Yang *et al.*, 2008) (**Fig. I.4C**). Finalmente, se han encontrado también proteínas, como la calcio/calmodulina quinasa CaMKIV (Dias *et al.*, 2009), en las que se dan más de uno de estos tipos de *cross-talk* (**Fig. I.4D**). A pesar de que en los últimos años se han desarrollado varias herramientas bioinformáticas para tratar de predecir cuales son las secuencias diana del *cross-talk* entre *O*-GlcNAcilación/fosforilación, la multitud de combinaciones y posibilidades derivadas de esta interacción hace que por el momento su estudio haya sido muy preliminar (van der Laarse *et al.*, 2018; Leney *et al.*, 2017).

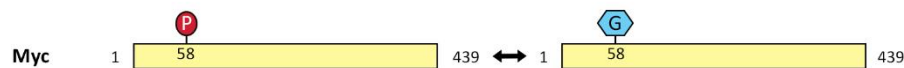
Además del *cross-talk* a nivel de modificación del sustrato (**Fig. I.4**), la *O*-GlcNAcilación y fosforilación también pueden regularse mutuamente modificando directamente a las propias enzimas que llevan a cabo ambas MPT o incluso formando complejos activos que pueden incluir las OGT, OGA, quinasas y/o fosfatasas involucradas en el proceso (van der Laarse *et al.*, 2018; Zeidan & Hart, 2010). Un ejemplo de esto lo constituye el hecho de que se ha llegado a detectar la fosfatasa PP1 en un complejo enzimático junto con la OGT, lo que sugiere que en algunos casos el mismo complejo holoenzimático puede eliminar el grupo fosfato y añadir el grupo *O*-GlcNAc (Zachara *et al.*, 2017).

Hasta ahora, en animales se han identificado multitud de proteínas en las que tienen lugar los distintos tipos de *cross-talk*, siendo las proteínas CaMKIV, p53, c-Myc o la propia OGT algunas de las más conocidas, demostrando que la interacción dinámica entre ambas MPT está muy extendida (van der Laarse *et al.*, 2018). Por su parte, aunque las proteínas *O*-GlcNAciladas en plantas suelen también ser modificadas por fosforilación, en este grupo la relación entre ambas MPT ha sido mucho menos analizada. En un primer estudio realizado en *C. maxima* con la NCAP denominada Cm-PP16-1 se sugirió que un residuo de serina que se detectaba fosforilado también podía ser diana de *O*-GlcNAcilación (Taoka *et al.*, 2007). Recientemente, en el estudio proteómico a gran escala de Xu *et al.* (2017) citado con anterioridad, se detectaron fosfopéptidos en un 87 % de las proteínas de *A. thaliana* identificadas como *O*-GlcNAciladas. Entre los péptidos que se encontraron *O*-GlcNAcilados,

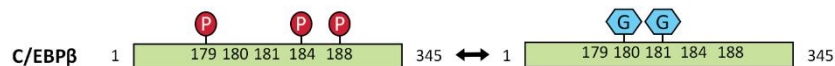
el 35 % de ellos se observaron alternativamente fosforilados, pero son pocos los péptidos que se detectaron simultáneamente modificados por fosforilación y *O*-GlcNAcilación. En el caso de la proteína EIN2 estudiada en detalle se detectaron 24 sitios de fosforilación, pero ninguno de ellos coincidía con el sitio de *O*-GlcNAcilación identificado. Por otro lado, en este estudio no se describe si alguna de las dos modificaciones tiene algún efecto sobre la otra. Es interesante que, aunque no se menciona en el texto del artículo, el análisis de los datos permite identificar varias proteínas (como ZIGA4, EIF4B2, ECT4 o LNO1) con algún péptido que puede estar *O*-GlcNAcilado o fosforilado en un mismo residuo, de acuerdo con el modelo clásico del Yin-Yang. En línea con el artículo anterior, en el estudio de *Xu et al. (2019)* los autores encontraron tanto coexistencia como ocupación competitiva de *O*-GlcNAcilación y fosforilación en 31 proteínas relacionadas con la vernalización de *T. aestivum*, siendo mucho más frecuente el patrón de coexistencia (97 %).

Como mencioné antes, las proteínas *O*-GlcNAciladas suelen estar también fosforiladas; sin embargo, la información acerca de posibles *cross-talks* entre las dos MPT en proteínas virales es escasa. El caso mejor estudiado es posiblemente el del antígeno T del SV40, cuyas dos supuestas dianas de *O*-GlcNAcilación (S111 y S112) se encuentran entre sus residuos fosforilables, acomodándose al modelo Yin-Yang (*Medina et al., 1998*).

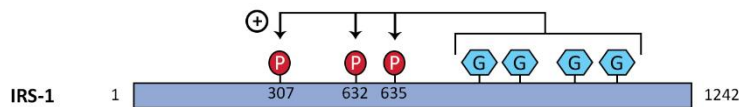
A Ocupación competitiva en el mismo sitio



B Ocupación recíproca en diferentes sitios



C Coexistencia en diferentes sitios



D Ocupación simultánea o recíproca dependiente de sitio

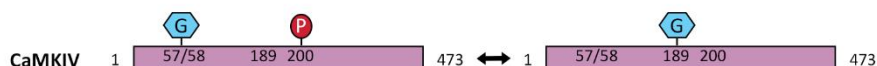


Figura I.4. Tipos diferentes de *cross-talk* entre la *O*-GlcNAcilación/fosforilación de proteínas. **(A)** Ocupación competitiva y alternativa en el mismo aminoácido, también denominada “Yin-Yang”. **(B)** Ocupación recíproca y alternativa en distintos residuos. **(C)** Modificación por una MPT que facilita otra modificación, lo que da lugar a la coexistencia de ambas MPT en distintos sitios de la proteína diana. **(D)** Ocupación simultánea o recíproca dependiente de sitio. Adaptado de *Zeidan & Hart (2010)*.

I.2. Plum pox virus

El PPV causa la sharka, una de las enfermedades virales más importantes a nivel mundial que afecta a árboles frutales del género *Prunus*. Hay distintos factores que contribuyen a esta situación, siendo algunos de ellos el difícil control de la enfermedad debido a la eficiente transmisión del virus por distintas especies de pulgones y la ausencia generalizada de genes de resistencia frente al PPV en las distintas especies de *Prunus* (García *et al.*, 2014; Rimbaud *et al.*, 2015; Scholthof *et al.*, 2011). El PPV infecta en la naturaleza árboles pertenecientes al género *Prunus* como el melocotonero, el albaricoquero o el ciruelo, aunque también hay numerosos hospedadores herbáceos como *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium foetidum* o *A. thaliana* que pueden ser infectados experimentalmente (Llácer, 2006; Rimbaud *et al.*, 2015). La enfermedad de la sharka causa, entre otros efectos, distorsión de las hojas, un moteado característico en hojas y frutos, y la caída prematura de estos últimos (Rimbaud *et al.*, 2015).

El PPV ha ido extendiéndose progresivamente por Europa, el norte y el sur de América, Asia y el norte de África, y se han obtenido datos de secuenciación de su genoma de más de 800 aislados del virus, muchos de ellos gracias al consorcio SharCo (<http://www.sharco.eu/sharco/>) financiado por la Unión Europea (Scholthof *et al.*, 2011; Šubr & Glasa, 2013). En base a sus relaciones filogenéticas, los aislados del PPV se agrupan en diez cepas denominadas Dideron (D), Marcus (M), Recombinant (Rec), Cherry (C), Cherry Russian (CR), Cherry Volga (CV), El Amar (EA), Winona (W), Turkey (T) y Albania (An), habiéndose detectado abundantes rastros de recombinación en su presunta historia evolutiva (Chirkov, Ivanov, *et al.*, 2018; Chirkov, Sheveleva, *et al.*, 2018; García *et al.*, 2014). Las diez cepas difieren en cuanto a su distribución geográfica y propiedades biológicas (principalmente el rango del hospedador), siendo las cepas D, M y Rec las que presentan una distribución geográfica más amplia y una mayor importancia económica (Clemente-Moreno *et al.*, 2014; Šubr & Glasa, 2013).

I.2.1. Organización y expresión genómica del PPV, y función de sus productos génicos

El PPV pertenece al género *Potyvirus* incluido dentro de la familia *Potyviridae*. Este género es el más numeroso de toda la familia, que es a su vez la mayor de las que agrupa virus de plantas con genoma RNA, englobando aproximadamente el 15 % de todos los virus que infectan a estos organismos (Wylie *et al.*, 2017). El genoma de los potyvirus está formado por un ssRNA de polaridad positiva (ssRNA+) de entre 9400 y 10 300 nt, poliadenilado (poli A) en su extremo 3' (Revers & García, 2015; Wylie *et al.*, 2017). En el caso del PPV, el tamaño oscila alrededor de 9700 nt (García *et al.*, 2014), excluyendo la cola poli A (Laín *et al.*, 1988). Otra característica general de los potyvirus, verificada también en el caso del PPV, es tener unida covalentemente al extremo 5' del RNA genómico la proteína viral VPg (Riechmann *et al.*, 1989). El genoma del PPV se traduce a partir del segundo codón AUG (nt 147-149) dando lugar a una poliproteína de aproximadamente 355 kDa que

es autoprocésada por tres proteasas virales codificadas por el virus (P1 y HCpro cortan en *cis*, mientras que NIapro puede cortar en *cis* y en *trans*), dando lugar al menos a 10 proteínas virales maduras: P1, HCpro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIapro, Nib y CP (García *et al.*, 2014). Al igual que se ha visto en el resto de potyvirus, el patinaje de la RNA polimerasa (Nib) del PPV en una serie de “Aes” da lugar a una variante del RNA viral que acopla la fase de lectura abierta (ORF) principal a una pequeña ORF embebida en la secuencia codificante de P3, permitiendo la síntesis de una proteína viral adicional (P3N-PIPO) (Chung *et al.*, 2008; Rodamilans *et al.*, 2015). Los productos génicos de los potyvirus son de naturaleza multifuncional como se muestra en la Fig. I.5 (Revers & García, 2015). El RNA del PPV se encapsula en partículas helicoidales flexuosas con un tamaño aproximado de 850-950 nm de longitud y 11-14 nm de anchura (Valli *et al.*, 2014 y datos del laboratorio). Extrapolando datos de otros potyvirus, se ha determinado que las partículas virales del PPV están formadas por aproximadamente 2000 unidades de CP (Kendall *et al.*, 2008; Shukla & Ward, 1989). En otros potyvirus, además de la CP y de la proteína VPg unida al extremo 5' del RNA, se han detectado en las partículas virales pequeñas cantidades de las proteínas HCpro y CI, que parecen estar asociadas al extremo de las partículas donde se une VPg (Gabrenaite-Verkhovskaya *et al.*, 2008; Manoussopoulos *et al.*, 2000; Torrance *et al.*, 2006).

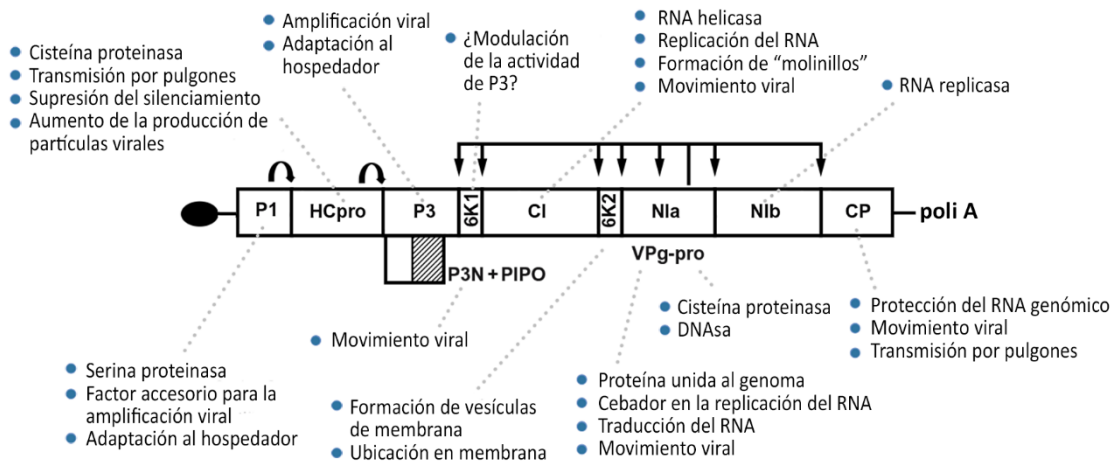


Figura I.5. Mapa genómico de los *Potyvirus*. La ORF más larga se representa como un rectángulo dividiendo los productos finales con líneas negras. La ORF PIPO se indica con un área rayada bajo la región de P3. La proteína terminal (VPg) se representa como una elipse negra. Las flechas que salen de las tres proteasas (P1, HCpro y NIa) marcan los sitios de corte en la poliproteína. Las funciones conocidas de cada proteína se indican en cada caso. Adaptado de Revers & García (2015).

I.2.2. Etapas de la infección viral de los potyvirus

Diversos potyvirus, incluido el PPV, han sido objeto de amplio estudio desde las últimas décadas del siglo pasado. En esta sección pretendo ensamblar los datos obtenidos con distintos potyvirus (incluido el PPV) para dar una visión global de grupo, aunque no se puede descartar que alguna parte de la información sea específica del potyvirus para el que se ha obtenido.

El momento en que el RNA viral es liberado en una nueva célula puede considerarse como el comienzo de la infección. El RNA viral presente en el citoplasma se traduce y las proteínas resultantes facilitan su replicación. El nuevo RNA tiene que salir fuera de la célula para propagar la infección a corta y larga distancia dentro de la planta. El final del ciclo infeccioso a nivel celular se cierra con la encapsulación del RNA progenie formando viriones, que pueden ser transmitidos a otras plantas comenzando una nueva infección (**Fig. I.6**). En todo el proceso, el virus necesita tomar medidas para evitar los mecanismos de defensa del hospedador y protegerse de factores ambientales adversos.

1.2.2.1. Replicación del RNA viral

De la misma forma que otros virus ssRNA+ de animales y plantas, los potyvirus replican su RNA en complejos anclados a vesículas formadas a partir de membranas del hospedador que han sido remodeladas por factores virales (Grangeon, Jiang, *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2018; Laliberté & Zheng, 2014). En estas vesículas, el ssRNA+ es utilizado como molde para generar las primeras copias de RNA de polaridad negativa (ssRNA-), que a su vez servirán de molde para producir más copias de ssRNA+ que se utilizarán en nuevas rondas de replicación y traducción, o se asociarán a la CP formando viriones o complejos de ribonucleoproteínas (RNP) (Buck, 1996).

En el caso de los potyvirus, la proteína 6K2 induce las vesículas donde se forman/ensamblan los complejos de replicación primarios a partir de membranas del RE (Schaad, Jensen, *et al.*, 1997; Wei, Huang, *et al.*, 2010; Wei & Wang, 2008). No se sabe exactamente cómo 6K2 reorganiza el RE en beneficio del virus, aunque sí se conoce que la formación de las vesículas de replicación es dependiente de las proteínas COPI y COPII (Grangeon, Agbeci *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2015; Lerich *et al.*, 2011; Wei & Wang, 2008). También se ha descrito recientemente que las interacciones de 6K2 con las proteínas CLC-Nt1 y RHD3 facilitan la infección modificando el pH del lumen del RE (Sun *et al.*, 2018) y la maduración de las vesículas (Movahed *et al.*, 2019), respectivamente. Las vesículas inducidas por 6K2 usan la proteína SNARE VTI11 para seguir una ruta de tráfico intracelular no convencional que elude el paso por el Golgi (García Cabanillas *et al.*, 2018), dirigiéndose a los cloroplastos a cuyas membranas se fusionan con la ayuda de la proteína SNARE Syp71 (Wei *et al.*, 2013). Más tarde, los complejos de replicación asociados a los cloroplastos se agregan en estructuras perinucleares de gran tamaño (Grangeon, Agbeci, *et al.*, 2012).

Además de 6K2, usando técnicas tradicionales, se ha encontrado que la mayoría de las proteínas potyvirales (incluyendo a P3, 6K1, CI, VPg, NIaprop y NIb) están asociadas con las vesículas de replicación (Beauchemin *et al.*, 2007; Cotton *et al.*, 2009; Cui & Wang, 2016; Dufresne *et al.*, 2008). Adicionalmente, mediante técnicas de MS se han identificado en las estructuras membranosas inducidas por 6K2 otras tres proteínas potyvirales, P1 (muy pobremente representada), CP y HCpro (Löhmus *et al.*, 2016). La actividad RNA helicasa de CI (Fernández *et al.*, 1997), la actividad RNA replicasa de NIb (Hong & Hunt, 1996) y el presunto papel de VPg como iniciador de la síntesis de RNA

(Anindya *et al.*, 2005; Puustinen & Mäkinen, 2004), son esenciales para la amplificación del RNA genómico. La función precisa de P3 y 6K1 todavía se desconoce, pero hay evidencias que indican que estas dos proteínas también son necesarias para la replicación del RNA durante la infección de los potyvirus (Cui & Wang, 2016; Cui *et al.*, 2017; Klein *et al.*, 1994). La participación de HCpro en la multiplicación de los potyvirus se explica, al menos en parte, por la protección que proporciona su actividad supresora del silenciamiento de RNA a los intermedios replicativos y al RNA genómico sin encapsidar (Kasschau & Carrington, 2001). Sin embargo, también se ha sugerido que puede tener una función más directa (Ala-Poikela *et al.*, 2011). Aunque P1 no es esencial para la replicación de los potyvirus, se ha visto que esta proteína actúa de alguna manera como un factor accesorio para la amplificación del genoma (Pasin *et al.*, 2014; Verchot & Carrington, 1995). Un artículo reciente sugiere que su contribución a la multiplicación de los potyvirus podría consistir en estimular de manera específica la traducción del RNA viral en la célula infectada (Martínez & Daròs, 2014). Se sabe que la CP, al igual que P3N-PIPO, no es esencial para la replicación de los potyvirus (Mahajan *et al.*, 1996; Wen & Hajimorad, 2010) y se cree que su presencia en los complejos de replicación virales es inespecífica, al menos parcialmente (Löhmus *et al.*, 2016). A la proteína CP le dedicaré un apartado particular de esta introducción más adelante.

Es importante destacar que es muy probable que no solo los productos virales totalmente procesados desempeñan una función en la replicación potyviral. La identificación en las vesículas de replicación de productos parcialmente procesados tales como CI-6K2 o 6K2-VPg-NIaprop (Beauchemin *et al.*, 2007; Dufresne *et al.*, 2008; Merits *et al.*, 2002; Thivierge *et al.*, 2008) sugiere que estas proteínas pueden participar activamente en el proceso. En particular, se ha hipotetizado que 6K2-VPg-pro puede servir de andamiaje para la formación de los complejos de replicación (Löhmus *et al.*, 2016).

Se conoce poco acerca de las secuencias del RNA genómico de los potyvirus necesarias *in cis* para su replicación. En el caso del PPV, se ha comprobado que los elementos necesarios del extremo 5' no sobrepasan los primeros 35 nt (Simón-Buela *et al.*, 1997); mientras que en el extremo 3' se ha caracterizado un dominio estructurado implicado en la replicación, que incluye parte de la secuencia codificante de la CP y de la región no traducida (Haldeman-Cahill *et al.*, 1998; Mahajan *et al.*, 1996).

La replicación del RNA de los potyvirus depende no solo de factores virales sino también de cofactores de la planta. Además de las proteínas requeridas para la formación y el tráfico de las vesículas de replicación, como las que he mencionado arriba, también son necesarias otras más directamente implicadas en el proceso de síntesis del RNA viral. Usando diferentes abordajes bioquímicos y de biología celular se han identificado varias proteínas del huésped que interactúan con factores virales implicados en la replicación del patógeno, y se ha demostrado su relevancia funcional. Entre estas proteínas se encuentran los factores de traducción eIF4E, eIF(iso)4E, eEF1A y

varias PABP (proteínas de unión al poli A), las RNA helicasas AtRH8 y AtRH9, la proteína ácida ribosomal PO, la proteína de choque térmico Hsc70-3 y la proteína cloroplástica PsbO1 (Cotton *et al.*, 2009; Geng *et al.*, 2017; Hafrén *et al.*, 2010; Hafrén *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2015; Jiang & Laliberté, 2011; Li *et al.*, 2016). Algunas de estas proteínas y numerosas proteínas ribosomales también se han detectado asociadas a los complejos de replicación analizados en el estudio proteómico de gran alcance descrito en Löhmus *et al.* (2016). Una de las cuestiones derivadas de estos estudios es la existencia de una estrecha relación espacial entre la replicación y la traducción del RNA genómico, sin que por el momento se haya podido determinar si los factores de traducción del huésped detectados en los complejos de replicación pueden estar participando directamente en la síntesis del RNA viral (Löhmus *et al.*, 2016; Revers & García, 2015).

1.2.2.2. Movimiento a corta y larga distancia

Para que la diseminación viral tenga lugar, el primer paso es que el “agente infeccioso” se mueva intracelularmente hasta alcanzar los plasmodesmos (PD) (Niehl & Heinlein, 2011). Se ha sugerido que las factorías virales son algo más que complejos de replicación asociados a membranas, siendo realmente estructuras que funcionarían coordinando la replicación y el movimiento viral intra- e intercelular (Liu *et al.*, 2005). De esta forma, se ha observado que las vesículas inducidas por 6K2 generadas en el RE son capaces de moverse por el citoplasma a través de microfilamentos de actina (Cotton *et al.*, 2009; Wei & Wang, 2008) tanto intracelularmente (llegando a PD) como intercelularmente, contribuyendo a la diseminación del virus (García Cabanillas *et al.*, 2018; Grangeon *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2015; Wan, García Cabanillas, *et al.*, 2015). En conformidad con este modelo, resultados de ensayos de mutagénesis dirigida en la CP sugerían que la formación de viriones no era necesaria para la propagación de la infección de célula-a-célula (Dolja *et al.*, 1995; Dolja *et al.*, 1994). Sin embargo, Rodríguez-Cerezo *et al.* (1997) encontraron estructuras de morfología lineal que parecían ser viriones unidos a, o dentro de, inclusiones cilíndricas próximas a PD de células infectadas con un potyvirus, lo que les llevó a sugerir que podían ser las partículas virales las que transmitían la infección potyviral entre células. Por tanto, por el momento se desconoce si son los complejos de replicación viral, los viriones u otras RNP los que inician la infección en células vecinas, sin descartar la posibilidad de que haya más de una ruta de transporte.

Debido a que los complejos virales son demasiado grandes para pasar a través de los PD, los virus de plantas codifican proteínas capaces de incrementar el límite de exclusión de estos canales y así permitir el tránsito de dichos complejos de célula-a-célula (Movahed *et al.*, 2017). Inicialmente se describió que las proteínas HCpro y CP podían desempeñar esta actividad (Rojas *et al.*, 1997). Aunque la relevancia funcional de esos datos no está confirmada, la contribución de la CP al movimiento entre células está firmemente aceptada (Dolja *et al.*, 1995; Dolja *et al.*, 1994; Varrelmann & Maiss, 2000).

Las otras dos proteínas virales directamente implicadas en el movimiento potyviral de célula-a-célula son CI y P3N-PIPO. Mientras que desde hace ya bastante tiempo en base a evidencias de tipo genético (Carrington *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2015; Gómez De Cedrón *et al.*, 2006) se conoce la importancia de CI en este proceso, el descubrimiento de la función de P3N-PIPO en el movimiento es más reciente (Wei, Zhang, *et al.*, 2010; Wen & Hajimorad, 2010).

Se ha propuesto que al tiempo que las vesículas de replicación generadas inicialmente en el RE, y probablemente más tarde modificadas, viajan a lo largo de microfilamentos hacia la membrana plasmática. Las proteínas virales CI y P3N-PIPO son transportadas también a la membrana, usando en este caso la vía secretora (Wei, Zhang, *et al.*, 2010). Posteriormente, P3N-PIPO y CI se asocian con los PD, la primera gracias a su interacción con una proteína celular (AtPCaP1 en *Arabidopsis*, NbDREPP en *N. benthamiana*) (Geng *et al.*, 2015; Vijayapalani *et al.*, 2012), y la segunda, por medio de su interacción con P3N-PIPO (Wei, Zhang, *et al.*, 2010). Otra proteína que parece formar parte de la maquinaria de translocación potyviral en el PD es la sinaptotagmina SYTA (Uchiyama *et al.*, 2014). La interacción entre 6K2 y CI dirige las vesículas de replicación/movimiento virales a los PD modificados por los complejos CI/P3N-PIPO/PCaP1/SYTA, que les facilitan el paso a la célula vecina (Movahed *et al.*, 2017). El principal problema de este elegante modelo, aunque no lo invalida, es que obvia la participación de la proteína CP, cuyo papel en el movimiento parece incuestionable (Dolja *et al.*, 1995; Dolja *et al.*, 1994; Varrelmann & Maiss, 2000).

Respecto al movimiento viral a larga distancia de los potyvirus, que permite la infección sistémica de la planta, hay mucha menos información. La detección en los elementos cribosos del floema y en los vasos del xilema de vesículas membranosas asociadas a 6K2 que contienen RNA viral y proteínas de replicación virales (similares a las vesículas inducidas por 6K2, supuestamente implicadas en el movimiento de célula-a-célula) sugiere que estas vesículas son también protagonistas del movimiento sistémico (Wan, García Cabanillas, *et al.*, 2015). En el mismo artículo de Wan, García Cabanillas, *et al.* (2015) se confirma mediante experimentos de anillamiento del tallo, que el potyvirus *Turnip mosaic virus* (TuMV) es capaz de establecer una infección sistémica en la planta moviéndose por los vasos del xilema. Como en el caso del modelo de movimiento entre células, habría también que tomar en consideración los datos de trabajos anteriores que indican que la CP (probablemente formando parte de viriones) desempeña un papel esencial para el movimiento sistémico del patógeno (Dolja *et al.*, 1995; Dolja *et al.*, 1994). De acuerdo con este papel, Wan, García Cabanillas, *et al.* (2015) detectaron partículas virales asociadas a las vesículas membranosas en el xilema.

A diferencia de lo observado para el movimiento de célula-a-célula, que solo precisa de la región central de la CP, se ha visto que los dominios N- y C-terminal de la proteína son fundamentales para el movimiento sistémico de los potyvirus (Andersen & Johansen, 1998; Dolja *et al.*, 1995; Dolja *et al.*,

1994; López-Moya & Pirone, 1998). Además, trabajos con potyvirus y con virus de otros géneros de la familia *Potyviridae* han mostrado que estos dos dominios condicionan la capacidad de movimiento sistémico de manera específica de huésped y de cepa viral (Carbonell *et al.*, 2013; Decroocq *et al.*, 2009; Desbiez *et al.*, 2014; Salvador *et al.*, 2008; Tatineni *et al.*, 2011; Tatineni, 2017; Tatineni & French, 2014). Es importante destacar que la región N-terminal de la CP de los potyvirus es altamente variable y admite grandes cambios sin perder su funcionalidad, por lo que no parece que su secuencia primaria esté directamente asociada con la función de movimiento. Sin embargo, lo que sí resulta particularmente relevante es su carga neta global (Arazi *et al.*, 2001; Kimalov *et al.*, 2004). También se ha observado que la región N-terminal de la CP está intrínsecamente desordenada, lo que podría favorecer su interacción con múltiples factores (Charon *et al.*, 2016; Makarov & Kalinina, 2016). El dominio N-terminal de la CP podría ser importante para el movimiento sistémico del virus, no solo contribuyendo directamente al proceso, sino también condicionando la inducción/actuación de mecanismos de defensa específicos de huésped. Este es el caso de la resistencia frente a múltiples potyvirus asociada a los genes *RTM* de *Arabidopsis* (Cosson *et al.*, 2012; Decroocq *et al.*, 2009) y podría ser también el de un hipotético mecanismo de defensa que restringe el movimiento de un aislado del PPV en *N. benthamiana* y *Nicotiana clevelandii* (Carbonell *et al.*, 2013).

Otras proteínas virales que se ha sugerido que podrían participar en el movimiento a larga distancia de los potyvirus son HCpro, VPg y la ya mencionada 6K2 (Hipper *et al.*, 2013). En el caso de HCpro, actualmente parece claro que su participación no es directa, sino que facilita la propagación sistémica del virus gracias a su actividad supresora del silenciamiento de RNA, que actúa previniendo la activación a distancia de este mecanismo antiviral (Kasschau & Carrington, 2001). La implicación de VPg y 6K2 se ha deducido a partir de la identificación de variantes de estas proteínas capaces de superar resistencias de la planta que restringen el movimiento sistémico de algún potyvirus (Rajamäki & Valkonen, 1999; Schaad, Lellis, *et al.*, 1997). Es posible, por tanto, que también en este caso, más que un papel directo en la función viral de movimiento, se trate de la participación de estas proteínas en la inducción o en la supresión del correspondiente mecanismo de resistencia. Sin embargo, no se puede descartar que VPg (posiblemente expuesta en un extremo del virión) y 6K2 (localizada en la membrana de las vesículas de replicación/movimiento) interaccionen con factores del floema y/o el xilema del huésped para potenciar la propagación a larga distancia del patógeno (Hipper *et al.*, 2013).

1.2.2.3. Ensamblaje de las partículas virales

Experimentos antiguos de susceptibilidad al tratamiento con proteasas definían tres regiones en la CP de los potyvirus. Una central, altamente conservada, que formaba el núcleo de la partícula viral y dos regiones terminales: la N-terminal, extremadamente variable en tamaño y secuencia, y la C-terminal, mayoritariamente conservada. Ambas regiones se encontraban supuestamente expuestas

en la superficie del virión, ya que podían eliminarse por proteólisis suave sin que las varillas flexuosas sufrieran alteraciones morfológicas apreciables (Shukla *et al.*, 1988). Posteriormente, se ha demostrado que aunque las regiones N- y C- terminales no sean esenciales para mantener la estructura de la partícula, sí lo son para su formación (Anindya & Savithri, 2003). De acuerdo con esto, se ha comprobado que ciertos aminoácidos cargados de la región C-terminal de la CP del potyvirus *Soybean mosaic virus* (SMV) son importantes para el establecimiento de interacciones inter-monoméricas efectivas (Kang *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2013). La delimitación de la CP de los potyvirus en tres dominios se ha visto confirmada por un trabajo reciente que revela la estructura tridimensional de los viriones del potyvirus *Watermelon mosaic virus* (WMV) con resolución cuasiatómica, a partir de datos de crio-microscopía electrónica (Zamora *et al.*, 2017). Sin embargo, la estructura resuelta no incluye lo que tradicionalmente se ha considerado como los dominios N- y C-terminales (Baratova *et al.*, 2001; Shukla *et al.*, 1988), probablemente debido a que poseen un elevado grado de desorden intrínseco. Se ha visto que la región central conservada consiste en un dominio interno rico en hélices α bordeado por dos largos brazos. En concordancia con los datos previos, la región N-terminal se orienta hacia el exterior del virión, pero, contrariamente a lo que se pensaba, la región C-terminal parece hacerlo hacia el interior de la partícula. Los dos brazos externos resueltos actúan mediando la polimerización de las subunidades de CP del virón, participando el brazo N-terminal tanto en interacciones entre monómeros contiguos como en interacciones entre subunidades de diferentes vueltas de hélice. Se ha propuesto que la flexibilidad de ambos brazos permite pequeños movimientos entre monómeros de CP, lo cual explica la naturaleza flexuosa de los viriones potyvirales.

La región central altamente conservada de la proteína, incluidos los dos brazos externos identificados por Zamora *et al.* (2017), conforman el “núcleo” de la partícula viral (Revers & García, 2015). Diversos estudios genéticos y bioquímicos habían destacado la importancia que tenían para el ensamblaje de las subunidades de CP (no necesariamente en partículas virales maduras) dos aminoácidos cargados situados en esta región, arginina y ácido aspártico, especialmente conservados entre los potyvirus. Inicialmente se supuso que estos residuos podrían estar participando en la formación de un puente salino entre las hélices α de la proteína (Dolja *et al.*, 1991), pero esta hipótesis no se pudo confirmar posteriormente (Dolja *et al.*, 1994; Jagadish *et al.*, 1993; Voloudakis *et al.*, 2004). El trabajo de Zamora *et al.* (2017) muestra que ambos aminoácidos parecen formar parte de un bolsillo de unión a RNA conservado en una amplia variedad de virus con genoma ssRNA.

Se sabe muy poco acerca de cómo se produce el ensamblaje (la que considero última etapa de la multiplicación viral dentro de la célula) y el desensamblaje (paso previo a lo que en esta sección he considerado el comienzo de la infección) de la partícula viral. Múltiples estudios han demostrado que la CP de los potyvirus es capaz de auto-ensamblarse *in vivo* en distintos sistemas heterólogos

(Edwards *et al.*, 1994; Hammond *et al.*, 1998; Jagadish *et al.*, 1991; Voloudakis *et al.*, 2004), así como en condiciones *in vitro* (McDonald *et al.*, 1976; McDonald & Bancroft, 1977), incluso en ausencia del RNA viral (McDonald *et al.*, 1976). Sin embargo, las partículas helicoidales que se forman en sistemas heterólogos son muy diferentes de las que se forman alrededor del RNA genómico durante la infección viral (Jagadish *et al.*, 1991). No existen evidencias de que el RNA de los potyvirus tenga un origen de ensamblaje específico como los que se han encontrado en otros RNA virales, y hay datos antiguos que sugieren que el ensamblaje de la partícula comienza (probablemente de manera inespecífica) en el extremo 5' del RNA viral (Simón-Buela *et al.*, 1997; Wu & Shaw, 1998).

Datos más recientes han demostrado que se requieren factores adicionales a la CP y al RNA viral para que se produzca el ensamblaje de partículas potyvirales estables. En concreto, se ha comprobado que tanto la proteína HCpro (Valli *et al.*, 2014) como un RNA viral con capacidad replicativa (Gallo *et al.*, 2018) son necesarios para la formación correcta y eficiente de los viriones. Estos y otros resultados son indicativos de que la encapsidación del RNA viral no es un proceso independiente del resto de procesos que tienen lugar durante la infección viral (Besong-Ndika *et al.*, 2015; Gallo *et al.*, 2018; Hafrén *et al.*, 2010; Ivanov & Mäkinen, 2012; Löhmus *et al.*, 2017) (**Fig. I.5**). Al inicio de la infección el RNA del virus debe estar disponible para la replicación y la traducción, por lo que es necesario impedir un ensamblaje temprano del genoma. Se ha teorizado que los niveles de acumulación de la CP podrían estar regulando la traducción viral, permitiendo así que se formen los complejos de replicación en el momento adecuado (Besong-Ndika *et al.*, 2015; Löhmus *et al.*, 2017), que a su vez facilitarían el comienzo del secuestro del RNA viral en los viriones (Gallo *et al.*, 2018). La interacción entre las proteínas NIb y CP, observada *in vivo* (Zilian & Maiss, 2011), podría ayudar a esta coordinación. También existe la posibilidad de que el acoplamiento entre la replicación y el ensamblaje ocurra fundamentalmente a nivel espacial. En este sentido, en un estudio cinético acerca de las reorganizaciones de membranas asociadas a la infección del potyvirus TuMV, se observaron a tiempos tardíos de la infección haces de partículas filamentosas asociadas a cuerpos electro densos que podrían ser los sitios de ensamblaje de las partículas virales (Wan, Basu, *et al.*, 2015). Estas estructuras se situarían adyacentes a las vesículas de replicación, formando probablemente parte de la gran amalgama globular perinuclear que previamente se ha propuesto como el sitio en el que se coordina la replicación, la traducción y la encapsidación (Grangeon, Agbeci, *et al.*, 2012). La asociación de partículas virales con las vesículas de replicación-movimiento detectadas en el xilema (mencionadas más arriba) se ha considerado como una evidencia de la posible coordinación de la encapsulación del RNA viral, no solo con su replicación, sino también con el movimiento del virus (Wan, Basu, *et al.*, 2015).

El desensamblaje de la partícula viral debería considerarse como la primera etapa de la infección a nivel de la planta, pero no necesariamente a nivel celular. Aunque en rigor la desencapsidación debería ir al comienzo de esta sección y en un apartado independiente al del ensamblaje, dada la

escasa información disponible sobre el desensamblaje he preferido no separar ambas etapas. Es muy probable que la desencapsidación del RNA potyviral sea co-traducciona, como lo es para otros virus; y se ha sugerido que la protuberancia de uno de los extremos del virión (y en particular la RNA helicasa CI localizada allí) podría desempeñar un papel relevante en este proceso (Gabrenaite-Verkhovskaya *et al.*, 2008; Torrance *et al.*, 2006).

1.2.2.4. Propagación a nuevos huéspedes

La transmisión natural de los potyvirus de una planta a otra se realiza principalmente por pulgones de manera no circulativa y no persistente, aunque hay especies que también pueden propagarse mediante semillas (Brault *et al.*, 2010; Revers & García, 2015).

En el caso de la propagación por pulgones, la transmisión se efectúa mediante la asociación temporal del virus al interior del aparato bucal del insecto sin atravesar ninguna barrera celular (Brault *et al.*, 2010). Los potyvirus utilizan una estrategia en la que la proteína HCpro colabora junto con la CP actuando como un puente que conecta la partícula viral con el vector (Blanc *et al.*, 1997; Pirone & Blanc, 1996). En algunos casos, la proteína HCpro de un potyvirus puede llevar a cabo la transmisión heteróloga de otro potyvirus, pero en otros muestra una marcada especificidad (Pirone & Blanc, 1996). Se han identificado dos motivos altamente conservados en la proteína HCpro implicados en la transmisión por pulgones de los potyvirus. El motivo PKT de la región C-terminal de HCpro interacciona con el motivo DAG altamente conservado en la región N-terminal de la CP para establecer la interacción HCpro-CP (Blanc *et al.*, 1997; Huet *et al.*, 1994; Peng *et al.*, 1998); mientras que el motivo KITC de la región N-terminal de HCpro resulta necesario para retener al virus en el estilete del vector. Un elemento esencial para que tenga lugar la transmisión del virus es la proteína receptora de HCpro localizada en el estilete del vector, sin embargo, la misma no ha podido ser identificada por el momento (Revers & García, 2015). HCpro y CP podrían no ser las únicas proteínas virales implicadas en la transmisión del virus por pulgones, aunque sea de manera indirecta. De hecho, se ha comprobado que la proteína NIapro puede manipular la fisiología de la planta ayudando al crecimiento y la reproducción del pulgón vector, promoviendo así la propagación del virus (Casteel *et al.*, 2014).

La transmisión por semillas es muy importante para la epidemiología de muchos virus, puesto que constituye una forma muy eficiente de diseminación en la naturaleza. Se han descrito unas 20 especies distintas de potyvirus como potencialmente transmisibles por semillas (Mink, 1993), pero esta forma de propagación podría ser más frecuente entre los potyvirus de lo que sugiere la evidencia experimental (Gibbs *et al.*, 2008). Aunque inicialmente se pensó que el PPV se podía transmitir por semillas, esto no se ha podido confirmar, por lo que no ha identificado ningún aislado del PPV que sea capaz de utilizar esta forma de transmisión vertical (Pasquini & Barba, 2006).

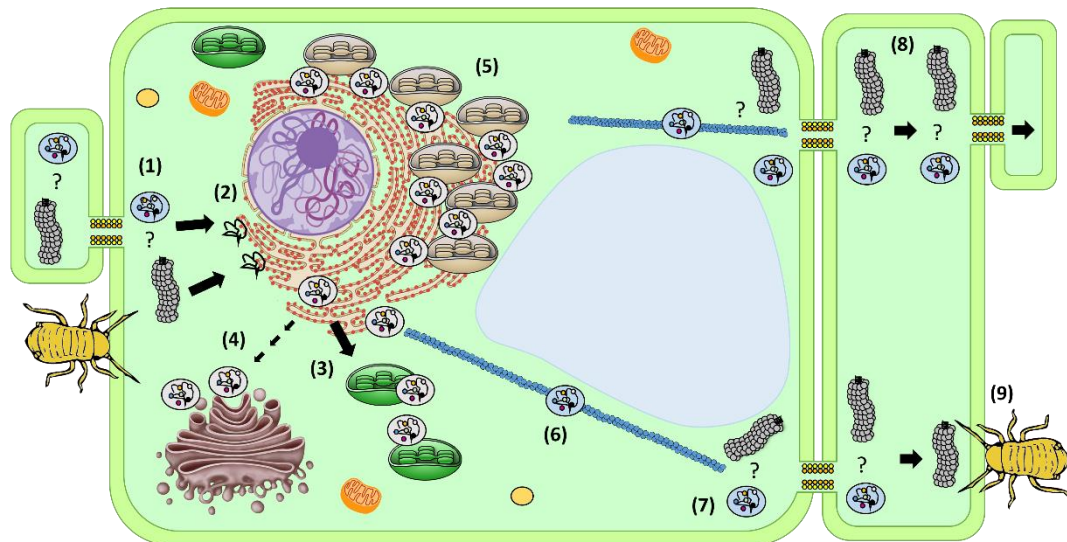


Figura I.6. Esquema de las distintas etapas de la infección viral propuesto para los potyvirus. El RNA viral es liberado de las partículas virales y/o de las vesículas de replicación en una nueva célula (1), donde comienza la traducción en el RE (2). Una vez allí y de forma paralela a la traducción, comienzan a formarse las vesículas de replicación que viajan comúnmente a los cloroplastos (3), eludiendo el Golgi (4). Estas vesículas asociadas a los cloroplastos se fusionan con membranas del RE conformando estructuras perinucleares de gran tamaño (5). Posteriormente, las vesículas de replicación (probablemente modificadas) viajan hacia los PD por los microfilamentos de actina (6) y una vez allí se desconoce si son estas vesículas y/o las partículas virales las que viajan a nuevas células con ayuda de proteínas del virus (7). Este mismo proceso se repetirá sucesivamente en otras células de la planta (8), hasta que finalmente las partículas virales sean propagadas por medio de pulgones a nuevas plantas (9), donde comenzará un nuevo ciclo infeccioso.

I.2.3. La CP de los potyvirus y sus MPT

Como he indicado antes, se asume que la CP de los potyvirus hace algo más que simplemente encapsular al genoma viral, y se piensa que el control espacio/temporal de sus niveles de acumulación ayuda a regular las distintas etapas de la infección (Besong-Ndika *et al.*, 2015; Hafrén *et al.*, 2010; Löhmus *et al.*, 2017). Existen datos experimentales que sugieren que las MPT de la CP podrían no solo contribuir al control de su acumulación sino también a su actividad reguladora (Ivanov & Mäkinen, 2012). Sin embargo, es importante tener en cuenta que estas evidencias provienen de dos únicos potyvirus, PVA y PPV, por lo que no se sabe hasta qué punto las conclusiones obtenidas son extrapolables al conjunto del género *Potyvirus*.

En el año 2001 se determinó que la CP del PVA podía ser fosforilada en múltiples sitios cuando no se encontraba formando viriones y que esta modificación reducía la afinidad de la proteína por el RNA viral (Ivanov *et al.*, 2001). Dos años más tarde, se identificaron dos sitios de fosforilación en los residuos T242 y T243, modificados por la proteín quinasa CK2, localizados en un motivo típico de reconocimiento de esta enzima conservado entre los potyvirus (Ivanov *et al.*, 2003). En este estudio, además se observó que tanto mutaciones que impedían, como mutaciones que emulaban, la fosforilación en el motivo CK2 abolían la propagación sistémica del PVA, sugiriendo que la regulación dinámica entre las formas fosforilada y no fosforilada de la CP desempeña un papel relevante en el

ciclo viral. La capacidad de infección sistémica del mutante en el motivo CK2 no fosforilable se restauraba con la aparición de una mutación espontánea que reponía la T243 original, lo cual evidencia la relevancia de las fosforilaciones reversibles en esa región de la CP (Ivanov *et al.*, 2003).

Aunque en estos primeros estudios se propuso que la fosforilación de la CP del PVA era principalmente la de regular la afinidad de la proteína por el RNA y, como consecuencia, la formación de las partículas virales maduras, posteriormente se le ha atribuido también una función relevante regulando la estabilidad de la proteína y por lo tanto su ciclo de renovación (Hafrén *et al.*, 2010; Löhmus *et al.*, 2017). En este escenario, una segunda MPT de la CP (la ubiquitinación) juega un papel esencial en un proceso mediado por la chaperona HSP70, la cochaperona CPIP (que interacciona con la CP del PVA y del *Potato virus Y* (PVY)) y la E3 ubiquitina ligasa CHIP, que conduce a la degradación de la CP por el proteasoma (Besong-Ndika *et al.*, 2015; Hafrén *et al.*, 2010; Hofius *et al.*, 2007; Löhmus *et al.*, 2017). La regulación temporal de la degradación de la CP se ha propuesto como un elemento esencial en la focalización del RNA viral hacia su traducción, replicación o encapsulación (Besong-Ndika *et al.*, 2015; Hafrén *et al.*, 2010; Löhmus *et al.*, 2017). En el modelo inicial, a tiempos tempranos de la infección el sistema CPIP/HSP70 tiene el control y la CP es dirigida mayoritariamente a su degradación, permitiendo así una traducción eficiente del RNA. Por el contrario, a tiempos tardíos, los niveles de CP van aumentando y no hay CPIP suficiente para controlarlos, así que el excedente de CP interfiere con la traducción del RNA y se ensambla activamente en viriones (Besong-Ndika *et al.*, 2015; Hafrén *et al.*, 2010).

Resultados más recientes relacionan la fosforilación de la CP del PVA por la quinasa CK2 en todo este proceso. Mientras que el modelo de Besong-Ndika *et al.* (2015) propone que las interacciones proteína-proteína entre la CP recién sintetizada y la abundante CP acumulada a tiempos tardíos de la infección liberan al RNA viral de los ribosomas y facilitan su encapsulación, el de Löhmus *et al.* (2017) plantea que la unión de CP no fosforilada al RNA viral en la proximidad de su región 3' no codificante bloquea su traducción y libera esta región de ribosomas, lo que permite el ensamblaje de complejos de replicación. La fosforilación de la CP mediada por CK2 separa a esta proteína del RNA viral y facilita su ubiquitinación y degradación por el sistema CPIP/HSP70/E3 ubiquitina ligasa CHIP/proteasoma. Sin embargo, es importante destacar que los resultados obtenidos con un mutante que emula la fosforilación en la posición 243 de la CP del PVA sugieren que esta modificación protege a la proteína de la degradación (Löhmus *et al.*, 2017), lo que plantea la posibilidad de que la fosforilación afecte a la dinámica de acumulación de la CP mediante mecanismos adicionales a los directamente relacionados con su afinidad por el RNA.

Los datos iniciales que sugirieron que la CP de otro potyvirus podía ser diana de MPT se obtuvieron al observar las propiedades atípicas que mostraba la CP del aislado BOR-3 del PPV en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), en los que la proteína se visualizaba como

un doblete (Šubr & Glasa, 1999). La primera evidencia que sugería que la CP del PPV estaba fosforilada fue su inmunoreacción con anticuerpos anti-fosfo-serina y anti-fosfo-treonina (Fernández-Fernández *et al.*, 2002), apoyada posteriormente por datos de MS (Chen *et al.*, 2005). La confirmación experimental de la fosforilación de la CP del PPV se obtuvo al comprobar que las dos formas de la CP del aislado BOR-3 con distinta movilidad en SDS-PAGE se convertían en una sola mediante un tratamiento con fosfatasa (Šubr *et al.*, 2007). Los estudios de Chen *et al.* (2005) y Šubr *et al.* (2010) parecían sugerir que, a diferencia de la fosforilación de la CP del PVA, la de la CP del PPV podría afectar a residuos localizados en la región N-terminal de la proteína. También de forma contraria a la CP del PVA (Ivanov *et al.*, 2001), la CP del PPV que se detectaba fosforilada se encontraba formando parte de partículas virales (Chen *et al.*, 2005). En cualquier caso, la información disponible al comienzo de la tesis acerca de la fosforilación de la CP del PPV era muy escasa, sin que se conocieran los residuos afectados por esta modificación, las enzimas involucradas en el proceso o su relevancia funcional en la infección viral.

Como he mencionado en apartados anteriores, la *O*-GlcNAcilación es una MPT estrechamente relacionada con la fosforilación. Por tanto, no se puede considerar extraño que la CP del PPV además de fosforilada esté *O*-GlcNAcilada (Fernández-Fernández *et al.*, 2002), aunque hasta donde llega mi conocimiento, esta es la única proteína de un virus de plantas que se conoce en este momento que está modificada por *O*-GlcNAcilación. Se han identificado numerosos residuos de la CP del PPV *O*-GlcNAcilados, todos ellos localizados en la región N-terminal de la proteína (Kim *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2006), y además se ha comprobado que esta modificación es llevada a cabo por la OGT SEC (Chen *et al.*, 2005). También se ha demostrado que, aunque la *O*-GlcNAcilación de la CP no es esencial para la viabilidad del PPV, desempeña una función importante en el proceso de infección (Chen *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2013). En el trabajo de Pérez *et al.* (2013) se concluye que la *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV podría afectar su estabilidad, ya sea de una manera directa o afectando su ensamblaje en partículas. Al comienzo de esta tesis no había información disponible acerca de posibles *cross-talks* entre la *O*-GlcNAcilación y la fosforilación de la CP del PPV similares a los detectados en muchas proteínas animales (ver sección I.1.3).

Otras funciones que se han atribuido a la CP de los potyvirus son la actividad NTPasa de la CP del PVA (Rakitina *et al.*, 2005) y la capacidad de suprimir la inmunidad inducida por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) de la CP del PPV (Nicaise & Candresse, 2017). No hay información acerca de posibles interacciones de estas actividades de las CP de PVA y PPV con sus funciones mejor caracterizadas, ni de si se ven afectadas por las MPT descritas en los párrafos anteriores. Tampoco se conoce su alcance funcional en la infección.

II. OBJETIVOS



II. OBJETIVOS

La fosforilación de la CP del PPV y su posible *cross-talk* con su *O*-GlcNAcilación es un tema de investigación de gran interés, no solo para conocer mejor cómo las MPT de proteínas virales pueden contribuir a regular la infección y descubrir nuevas dianas de acción antiviral, sino también para ayudar a desentrañar las complejas interrelaciones entre MPT que ocurren en las células vegetales. Por ello, los objetivos de esta tesis han sido los siguientes:

1. Identificar los residuos de la CP del PPV modificados por fosforilación y descifrar la posible interrelación entre la *O*-GlcNAcilación y la fosforilación en esta proteína.
2. Determinar las etapas del ciclo viral del PPV que se ven afectadas por la fosforilación y tratar de averiguar cómo esta modificación contribuye a su regulación.
3. Verificar el grado de conservación de la *O*-GlcNAcilación y fosforilación de la CP en diferentes cepas del PPV y en diferentes potyvirus, así como en distintas plantas huésped.
4. Habiéndose identificado previamente SEC como la OGT que *O*-GlcNAcila la CP del PPV, desarrollar métodos que nos permitan identificar otros factores de la planta implicados en las dinámicas de *O*-GlcNAcilación y fosforilación de la proteína.

III. MATERIALES Y MÉTODOS



III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Material Biológico

III.1.1. Plantas

Las inoculaciones del PPV y sus mutantes se realizaron en plantas de *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *C. foetidum*, *A. thaliana* y *Prunus persica*.

En aquellos experimentos en los que fue necesario disponer de plantas en las que la expresión de la OGT SEC que modifica la CP del PPV estuviera atenuada o anulada, se utilizó un *knock down* de *N. benthamiana*, irSEC-b2-4 (SEC-b2), en el que la *O*-GlcNAcilación catalizada por SEC se encuentra reducida mediante la tecnología de interferencia por RNA (Pérez, 2014), o un *knock out* de *A. thaliana*, *sec-2*, incapaz de producir la enzima SEC endógena (Hartweck *et al.*, 2002). El mutante *sec-2* y las plantas silvestres de *A. thaliana* utilizadas para estos ensayos eran del ecotipo Columbia (Col-0).

Para la búsqueda de una putativa OGA de plantas, se analizaron cuatro mutantes simples *knock out* de *A. thaliana* afectados en los genes que codifican las β -hexosaminidasas (HEXO) denominadas HEXO1 (*hexo1-1*), HEXO2 (*hexo2-1*) o HEXO3 (mutantes *hexo3-1* y *hexo3-2*). También se ensayaron mutantes múltiples: dos dobles, afectados simultáneamente en las enzimas HEXO1 y HEXO2 (*hexo1-1/hexo2-1*) o HEXO2 y HEXO3 (*hexo2-1/hexo3-2*), y uno triple, en el que no se producía ninguna de las tres enzimas (*hexo1-1/hexo2-1/hexo3-1*) (Liebminger *et al.*, 2011). Excepto el mutante *hexo3-2*, que era del ecotipo Col-3, el resto de mutantes eran del ecotipo Col-0. Todas las semillas fueron proporcionadas por el laboratorio del Dr. Richard Strasser de la *University of Natural Resources and Life Sciences* de Viena.

Las semillas de *A. thaliana* fueron vernalizadas a 4 °C y germinadas *in vitro* en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con sacarosa al 0.5 %. En el caso de las semillas recogidas directamente de las plantas sometidas a inmersión floral, y en el resto de las generadas durante la obtención de las líneas transgénicas (ver sección III.2.2), se añadió al medio de cultivo BASTA (0.01 mg/ml) y carbenicilina (0.05 mg/ml). El medio de germinación de las semillas con genotipo *sec-2* también incluyó kanamicina (Kan, 0.05 mg/ml). Las semillas/plántulas recién germinadas permanecieron aproximadamente dos semanas en un Fitotrón (Neurtek) con fotoperiodo de 14 h de luz, a 22 °C de temperatura y 50-60 % de humedad relativa. Después del transplante, las plantas crecieron en cámaras de ambiente controlado con fotoperiodo de 16 h de luz, a 19-24 °C de temperatura y 50-60 % de humedad relativa.

Los árboles de *P. persica* se obtuvieron a partir de semillas cv GF305, previamente vernalizadas a 4 °C en oscuridad, que germinaron y crecieron en las mismas condiciones descritas para *A. thaliana*.

Las plantas de *N. benthamiana*, *N. clevelandii* y *C. foetidum* crecieron en condiciones de invernadero, moderadamente controladas, con fotoperiodo de 16 h de luz, 19-23 °C de temperatura y 67-70 % de humedad relativa.

III.1.2. Bacterias

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron propagados y purificados a partir de la cepa DH5 α de *Escherichia coli* (Sambrook *et al.*, 1989), excepto en los experimentos de agroinfiltración realizados en plantas de *N. benthamiana*, *A. thaliana* y *P. persica*, para los que también se utilizaron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) (Koncz & Schell, 1986) y/o AGLO (Lazo *et al.*, 1991). Esta última cepa de *Agrobacterium* se empleó además en la obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana* WT-SEC-TAP y *sec-2*-SEC-TAP (ver sección III.2.2).

Las células competentes de *E. coli* se obtuvieron mediante el método descrito en Inoue *et al.* (1990), y se transformaron por choque térmico con plásmidos completos o fragmentos de DNA previamente ligados *in vitro* (Sambrook *et al.*, 1989). Las células competentes de *Agrobacterium* se obtuvieron y transformaron siguiendo el protocolo descrito en Höfgen & Willmitzer (1988). Las bacterias de *E. coli* se cultivaron a 37 °C y las de *Agrobacterium* a 28 °C, ambas en medio LB y LB-agar (Sambrook *et al.*, 1989). Para la selección de la cepa de *E. coli* se utilizó ampicilina (Amp, 0.1 mg/mL) y para las de *Agrobacterium* rifampicina (Rif, 0.05 mg/mL). Los cultivos de GV3130 (pMP90), también incluyeron gentamicina (Gen, 0.01 mg/mL) y tetraciclina (Tet, 0.005 mg/mL). Después de la transformación con los plásmidos de interés, las células se seleccionaron además con los antibióticos detallados en los **Anexo 1** y **Anexo 2**.

III.1.3. Clones de cDNA que codifican el genoma completo o parcial del PPV

En esta tesis se han utilizado clones de cDNA del PPV capaces de infectar especies herbáceas y/o leñosas (ver sección III.5). Algunas de estas construcciones se encontraban disponibles en el laboratorio (**Anexo 1**), mientras que otras se construyeron específicamente para este trabajo (**Anexo 2**).

En los distintos ensayos se emplearon clones infecciosos del virus que derivan del aislado original Rankovic del PPV (PPV-R), cuya secuencia completa es conocida (Laín *et al.*, 1989), y clones quiméricos de este aislado en los que la región que codifica la CP se había sustituido por la del aislado SwCM (PPV-SwCM, Calvo, Martínez-Turiño, *et al.*, 2014) o BOR-3 (PPV-BOR-3) (ver sección III.5.2). En el caso del plásmido viral que infecta eficientemente leñosas, se utilizó una construcción quimérica que incluía parte de la secuencia del aislado Diderón del PPV en combinación con una región que se extiende desde el final de la proteína NIa hasta el final de la CP de PPV-R (Salvador *et al.*, 2008).

III.1.4. Viriones

Los viriones procedentes de plantas de *Nicotiana* sp. se obtuvieron mediante el método descrito en Laín *et al.* (1988), ligeramente modificado (Chen *et al.*, 2005); mientras que los viriones procedentes de *A. thaliana*, *P. persica*, y en algunos casos de *N. benthamiana*, se purificaron siguiendo el protocolo descrito en Sheveleva *et al.* (2016), con ligeros ajustes para mejorar el rendimiento y la limpieza de las muestras. Para llevar a cabo este último método, se partió de hojas sistémicamente infectadas de 21-22 días después de la inoculación (dpi), que se trituraron y homogenizaron en un tampón de extracción compuesto por HEPES 0.02 M, sacarosa 0.2 M y dietilditiocarbamato de sodio 10 mM, pH 6.8 en un ratio 1 : 4 (g tejido fresco : mL tampón). El tejido fue homogenizado durante 10 minutos en una licuadora eléctrica y el extracto fue clarificado centrifugándolo durante 15 minutos a 6000 rpm en el rotor SLA-1500 de una centrífuga *Sorvall RC-5C* (*Thermo Fisher Scientific*). El sobrenadante se pasó a través de un filtro *Miracloth* (*Merck*) y se le añadió lentamente Tritón X-100 hasta alcanzar una concentración final del 5 %. El proceso de agitación se mantuvo durante 1 h, al cabo de la cual la mezcla anterior se dividió en cuatro partes, cada una de las cuales se aplicó sobre un colchón de sacarosa al 20 % y tampón HEPES 0.02 M, pH 6.8. Los tubos se centrifugaron en una ultracentrífuga *Beckman Coulter, Optima L-100 XP* (*Beckman Coulter*) durante 210 minutos a 28 000 rpm en un rotor 50.2 Ti. El sedimento obtenido en cada tubo se resuspendió en tampón borato sódico 0.1 M, EDTA 5 mM, pH 8.2 durante toda la noche con ayuda de un agitador magnético. Al día siguiente las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 11 400 rpm en una centrífuga *Hettich Mikro 12-24* y el contenido del sobrenadante se separó en un gradiente continuo de sacarosa (10-40 %), preparado en tampón borato sódico-EDTA, ultracentrifugándolo durante 50 minutos, a 36 000 rpm en el rotor SW41 (ver sección III.7). Las fracciones donde se suelen concentrar los viriones se diluyeron en tampón borato sódico 0.1 M, EDTA 5 mM, pH 8.2 y se les añadió Tritón X-100 hasta alcanzar una concentración final del 0.005 %. La mezcla resultante fue dializada con una membrana *SnakeSkin* de 10 kDa de exclusión (*Thermo Scientific*), durante 3 h contra un tampón que contenía borato sódico 0.05 M, pH 8.2 y Tritón X-100 al 0.005 %. La muestra se ultracentrifugó durante 180 minutos a 30 000 rpm en el rotor 50.2 Ti y el precipitado se resuspendió durante al menos 2 h en tampón borato sódico 0.005 M, pH 8.2 con ayuda de un agitador magnético.

Las preparaciones fueron chequeadas por electroforesis en geles SDS-PAGE al 12 % teñidos con azul de *Coomassie*. En los casos en los que se detectó un exceso de contaminantes de la planta, las muestras se sometieron a un paso adicional de purificación. Para ello, se repitió el proceso anteriormente descrito, diluyéndose parte de la muestra en tampón borato sódico 0.005 M, pH 8.2 y fraccionándola por centrifugación en un gradiente de sacarosa (10-40 %). Nuevamente, las fracciones que contenían los viriones se diluyeron y ultracentrifugaron, resuspendiéndose el

precipitado durante al menos 2 h en tampón borato sódico (0.005 M, pH 8.2). Todo el procedimiento descrito en este apartado, excepto la electroforesis, se llevó a cabo a 4 °C.

III.2. Uso del material biológico

III.2.1. Inoculación viral

III.2.1.1. Inoculación biolística

La inoculación biolística de plantas de *A. thaliana*, *N. benthamiana* y *P. persica* se llevó a cabo utilizando una pistola *Helios Gene Gun (Bio-Rad)*, siguiendo el protocolo anteriormente descrito por López-Moya & García (2000). La presión del disparo se ajustó a 7.5 y 10 bares para inocular los huéspedes herbáceos y leñosos, respectivamente. Se inocularon 4 hojas por planta, usando 2 cartuchos que se dispararon dos veces cada uno.

III.2.1.2. Inoculación manual utilizando cDNA viral

El plásmido pICPPV-NK-IGFP, el clon quimérico CP-SwCM-R, o los mutantes derivados de ambas construcciones, se utilizaron para inocular plantas de *N. benthamiana*, a razón de 3 hojas por planta, dispensando entre 5 y 10 µL de DNA (1 µg/µL) por hoja y utilizando carborundo como agente abrasivo.

III.2.1.3. Inoculación manual utilizando extractos de plantas infectadas

Para las inoculaciones con extractos vegetales se utilizó tejido procedente de hojas infectadas, previamente congelado y pulverizado en mortero con nitrógeno líquido, homogenizado en tampón fosfato sódico 5 mM, pH 7.2, a razón de 2 mL de tampón por cada gramo de tejido. Las hojas espolvoreadas con carborundo se inocularon manualmente utilizando 10 µL del extracto homogenizado por hoja e inoculando un total de 3 hojas por planta.

III.2.1.4. Inoculación manual utilizando partículas virales

Cuando se utilizaron viriones del PPV como inóculo, éstos se diluyeron en tampón borato sódico 0.005 M, pH 8.2 para alcanzar una concentración final de 100 ng viriones/µL. Este tipo de inóculo se utilizó en la misma forma que los extractos de plantas infectadas.

III.2.1.5. Inoculación por agroinfiltración

La agroinfiltración se empleó para infectar plantas de *N. benthamiana* y *P. persica*, con el clon infeccioso pSN-PPV-5'BD, o de *A. thaliana* con el pSN-PPV (**Anexo 1**). Para ello, las células de *A. tumefaciens* transformadas con el plásmido de interés se cultivaron a 28 °C durante 48 h en 5 mL de medio LB con los antibióticos apropiados. El cultivo anterior se diluyó mil veces e incubó durante 14-

18 h a la misma temperatura. Transcurrido ese tiempo se separaron 3 mL para purificar el plásmido transformado y comprobar su identidad e integridad. El resto del cultivo se centrifugó a 4 °C, durante 15 minutos a 4000 rpm en el rotor A-4-62 de una centrífuga *Eppendorf 5810R* (*Eppendorf*). El *pellet* bacteriano se resuspendió en una solución de sulfato de magnesio 10 mM, MES 10 mM y acetosiringona 150 µM, ajustando el volumen final hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 1. Las suspensiones de *Agrobacterium* se incubaron en oscuridad entre 2.5 y 4 h antes de agroinfiltrar el envés de 3 (en el caso de *N. benthamiana*) o 3-4 (en el caso de *A. thaliana* y *P. persica*) hojas, empleando una jeringuilla de 1 mL sin aguja.

La DO₆₀₀ de los cultivos bacterianos utilizados en los ensayos de expresión transitoria se detalla en la sección correspondiente (sección III.6.1.).

III.2.2. Generación de plantas transgénicas

Las plantas transgénicas de *A. thaliana* WT-SEC-TAP y *sec-2*-SEC-TAP se obtuvieron mediante la técnica de *floral dipping*, siguiendo el protocolo previamente descrito por *Zhang et al.* (2006), con ligeras modificaciones. Para ello, células de *A. tumefaciens* de la cepa AGLO previamente transformadas con el plásmido pCTAPi-SEC (**Anexo 2**), se cultivaron en 10 mL de medio LB con los antibióticos apropiados, durante 16 h a 28 °C. El cultivo anterior, diluido 100 veces, se continuó incubando hasta alcanzar una DO₆₀₀ de entre 0.8-1 y después se centrifugó durante 15 minutos a 5000 rpm en una centrífuga *Eppendorf 5810R* usando un rotor A-4-62. El *pellet* bacteriano se resuspendió en 300 mL de medio de transformación MS 0.5 M, sacarosa 5 %, pH 5.8 que fue suplementado con SILWET L-77 (*Lehle Seeds*) (0.03 %) justo antes de la inmersión de las flores. Las inflorescencias de las plantas de *A. thaliana* WT y *sec-2* se sumergieron en la mezcla de transformación durante 8-10 minutos, tras los cuales las plantas se colocaron en posición horizontal y se dejaron secar al aire 5 minutos. Las macetas se cubrieron con una bolsa de plástico que se retiró al día siguiente.

Las semillas de las plantas de *A. thaliana* WT y *sec-2* transformadas mediante inmersión floral (semillas F0) fueron cosechadas y germinadas *in vitro* como se ha descrito previamente (ver sección III.1.1). Al cabo de 2-3 semanas, las plántulas que sobrevivieron a la selección con BASTA (plantas F0) se trasplantaron, y al alcanzar el estadio de 4-6 hojas, algunas de ellas se genotiparon mediante PCR con oligos específicos (**Anexo 3**) para corroborar la inserción del transgén (ver sección III.3.2.1). Posteriormente, en todas las plantas F0 se evaluó la expresión de la proteína SEC-TAP mediante *Western Blot* anti-TAP (ver sección III.6.3).

Las plantas F0 se dejaron crecer y produjeron semillas por autofecundación (semillas F1) que se sometieron a una nueva ronda de selección dando lugar a las plantas F1, a partir de las cuales se determinó la segregación del transgén en las plantas F0.

III.3. Manipulación de ácidos nucleicos

III.3.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

III.3.1.1. Obtención de DNA plasmídico

Los plásmidos procedentes de cultivos bacterianos se purificaron mediante lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) o utilizando el kit comercial *NZYMiniprep* (NZYTech), partiendo de cultivos de entre 3-5 mL. Los vectores utilizados para las inoculaciones por biolística se purificaron haciendo maxi-preparaciones a partir de cultivos de mayor volumen (200 mL), e incorporando al protocolo básico pasos adicionales para mejorar la pureza de la muestra (Sambrook *et al.*, 1989). La identidad de los plásmidos purificados se analizó a través de chequeos de restricción enzimática, en algunos casos apoyados por secuenciación de regiones específicas del vector.

III.3.1.2. Obtención de DNA genómico de planta

La purificación del DNA genómico de *A. thaliana* se realizó a partir del tejido foliar de plántulas de 3-4 hojas, utilizando el kit *GenElute Plant Genomic DNA* (Merck) y según las instrucciones del fabricante.

III.3.1.3. Obtención de RNA total de planta

Para la purificación del RNA total de plantas de *N. benthamiana* y *A. thaliana* se empleó el kit *FavorPrep Plant Total RNA purification* (Favorgen Biotech), siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.3.2. Amplificación de ácidos nucleicos

III.3.2.1. Amplificación de DNA mediante PCR

Las amplificaciones de DNA mediante PCR (Saiki *et al.*, 1985) se realizaron en un termociclador PTC-100 (*MJ Research*), utilizando parejas de cebadores específicos y condiciones de reacción ajustadas a cada caso particular.

Para analizar el genotipo los mutantes de *Arabidopsis* utilizados en este trabajo, y el de las líneas transgénicas de este huésped generadas en el transcurso del mismo, se utilizó la DNA polimerasa *AmpliTaq* (*Thermo Fisher Scientific*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para comprobar la identidad de los mutantes afectados en las hexosaminidasas se utilizaron las parejas de oligonucleótidos descritos en Liebminger *et al.* (2011): para genotipar el mutante *hexo 1-1*, SM34-Hexo 1-F y SM34-Hexo 1-R; para *hexo 2-1*, SM35-Hexo 2-F y SM35-Hexo 2-R; para *hexo 3-1*, SM36-Hexo 3-1-F y SM36-Hexo 3-1-R y para *hexo 3-2*, SM37-Hexo 3-2-F y SM37-Hexo 3-2-R (**Anexo 3**). El genotipado de los mutantes múltiples afectados en dos o en las tres hexosaminidasas se hizo con la combinación correspondiente de los cebadores anteriores. Durante la generación de las plantas

transgénicas WT-SEC-TAP y *sec-2*-SEC-TAP, la inserción del transgén SEC-TAP se comprobó utilizando los oligonucleótidos NS4R y GSP33 (**Anexo 3**).

Todos los fragmentos de DNA que se amplificaron para ser clonados y/o secuenciados durante este trabajo fueron obtenidos con la DNA polimerasa de alta fidelidad *Phusion* (*Fermentas*).

III.3.2.2. Obtención de cDNA a partir de RNA total de planta

Para el clonaje de los RNA mensajeros procedentes de genes concretos de *A. thaliana*, se obtuvo cDNA a partir del RNA total de la planta empleando oligonucleótidos aleatorios y la transcriptasa reversa M-MuLV (*New England Biolabs*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de las plantas de *N. benthamiana* infectadas con PPV-BOR-3, el fragmento del cDNA viral amplificado se obtuvo utilizando el sistema de RT-PCR *Titan One Tube* (*Merck*), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo con la pareja de oligonucleótidos 2262-F y 2132-R (**Anexo 3**).

III.3.2.3. Amplificación de la hebra negativa del RNA viral mediante RT-qPCR

Para la cuantificación específica de la hebra negativa de RNA del PPV presente en plantas de *N. benthamiana* infectadas, el RNA total purificado (ver sección III.3.1.3) se utilizó para la RT con el oligonucleótido específico de hebra negativa Q29-F (**Anexo 3**) y la transcriptasa reversa *SuperScript III* (*Thermo Fisher Scientific*), como se describe en *Pasin et al. (2014)*. Para el siguiente paso, la qPCR, se empleó el kit *HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus* (*Solis BioDyne*) y la pareja de oligonucleótidos Q30-F y Q31-R (**Anexo 3**), también descritos en *Pasin et al. (2014)*. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en placas de 96 pocillos *MicroAmp Optical*, en un termociclador *7500 Real-Time PCR System* (ambos de *Applied Biosystems*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cantidad de RNA viral acumulado en hojas inoculadas con los distintos mutantes del PPV se estimó por cuantificación relativa, utilizando como referencia el valor promedio de la muestra del virus silvestre. Para ello se utilizaron los datos de seis plantas diferentes divididas en tres réplicas biológicas (n=3, dos plantas/réplica), procedentes de dos cultivos independientes de *A. tumefaciens* por cada condición. Para confirmar si existían diferencias significativas entre la cantidad de RNA viral obtenida en las distintas muestras, se realizó un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) ($P < 0.01$), seguido de un test de comparación múltiple de Bonferroni.

III.3.2.4. Amplificación del RNA viral mediante IC-RT-PCR

La inmunocaptura seguida de RT-PCR (IC-RT-PCR) se utilizó para detectar infección viral y/o analizar la secuencia de la CP del virus en extractos de plantas de *N. benthamiana* y *P. persica* infectadas con PPV, siguiendo el protocolo previamente descrito en *Pérez (2014)*. Para amplificar

fragmentos que contenían el gen de la CP desde los clones basados en el pICPPV-NK-IGFP se utilizaron los oligos SM13-GFP y 2429, para aquellos basados en el pLX-PPV o en el pICPPV-5'BD-GFP, se utilizaron los cebadores SM13-GFP y 2429 (**Anexo 3**). La CP de PPV-SwCM en los plásmidos basados en la quimera CP-SwCM-R se amplificó con los oligos 80 y 2429. Cuando fue necesario verificar la secuencia de la región amplificada, se utilizaron los oligonucleótidos SM13-IGFP/55/SM30-F-ext y 2429 en los clones basados en pICPPV-NK-IGFP; SM13-GFP/55/SM30-F-ext y 2429 en los basados en pLX-PPV y pICPPV-5'BD-GFP; o SM56-R-mut-T306A/80/SM30-R-ext y 2429 en los basados en CP-SwCM-R.

III.3.3. Tratamientos enzimáticos durante los procesos de clonaje

Para los cortes en secuencias específicas del DNA se emplearon endonucleasas de restricción (*New England Biolabs* y *Fermentas*). Cuando fue necesario eliminar un grupo fosfato del extremo 5' de un fragmento de DNA o de un plásmido linealizado, se empleó la fosfatasa alcalina de gamba SAP (*Thermo Fisher Scientific*). Para ligar fragmentos de DNA se empleó la ligasa de DNA del bacteriófago T4 (*Fermentas*). Todas las reacciones se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante y según protocolos previamente descritos (*Sambrook et al., 1989*).

III.3.4. Electroforesis en geles de agarosa, extracción y purificación de fragmentos de DNA separados por electroforesis

La separación de DNA se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de 0.5-1.5 % de agarosa, en presencia de BrEt (5 µg/mL) y tampón de carrera TBE (Tris-Borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Las fotografías de los geles se tomaron en un captador de imágenes *Gel Doc 2000* (*Bio-Rad*) con transiluminador de radiación UV. Los fragmentos de interés se purificaron a partir de bloques de agarosa escindidos del gel con un bisturí, utilizando el kit comercial *NZYGelpure* (*NZYTech*).

III.3.5. Secuenciación de DNA

La secuenciación de fragmentos lineales de DNA o de regiones concretas dentro de plásmidos se realizó a través de la compañía *Macrogen* (*Macrogen Europe*).

III.4. Herbicida y antibióticos

Los stocks concentrados de los antibióticos Amp (100 mg/ml), carbenicilina (50 mg/ml), espectinomicina (Esp, 50 mg/ml), Gen (10 mg/ml) y Kan (50 mg/ml), así como el herbicida BASTA (10 mg/ml), se prepararon disolviéndose en agua y esterilizándose por filtración. La Rif (50 mg/ml) se disolvió en dimetilsulfóxido y la tetraciclina (5 mg/ml) en etanol 100 %, y no se esterizaron en ninguno de los dos casos.

III.5. Plásmidos

Para la realización de este trabajo de tesis se han utilizado plásmidos disponibles en el laboratorio (**Anexo 1**) y otros que se han diseñado y construido en el transcurso de la misma (**Anexo 2**).

III.5.1. Creación de plásmidos con mutaciones puntuales o múltiples en la secuencia codificante de la CP

Para obtener los plásmidos en los que se emuló la fosforilación constitutiva en las serinas fosforilables de la CP de PPV-R, se utilizó el método de PCR en dos pasos (Herlitz & Koenen, 1990), como se ha descrito anteriormente (Pérez *et al.*, 2013). Para obtener cada construcción se realizaron dos PCR independientes, usando como molde el plásmido pICPPV-NK-IGFP (al introducir los cambios S25D, S101D o S118D) o pICPPV-5'BD-GFP (al introducir los cambios S81D o S118D) (**Anexo 1**). Durante la primera PCR, se utilizó el oligonucleótido 80 en todos los casos y un cebador reverso que contenía el correspondiente cambio de aminoácido: S25D-rev para S25D; S81D-rev para S81D; S101D-rev para S101D; y S118D-rev para S118D (**Anexo 3** y **Anexo 4**). La segunda PCR se llevó a cabo utilizando el amplificado obtenido en el paso anterior junto con un fragmento *BsaBI-EcoRV* procedente del mismo vector empleado como molde en cada caso y la pareja de oligonucleótidos 55 y 80 (**Anexo 3**). El producto resultante de la segunda PCR, digerido con *KpnI* y *SacI*, se utilizó para reemplazar el correspondiente fragmento en el plásmido pICPPV-NK-IGFP (generándose los clones pICPPV-NK-IGFP-S25D, pICPPV-NK-IGFP-S81D, pICPPV-NK-IGFP-S101D y pICPPV-NK-IGFP-S118D) o en pICPPV-5'BD-GFP (generándose el plásmido pICPPV-5'BD-GFP-S118D) (**Anexo 2**). Durante la obtención del vector pICPPV-NK-IGFP-S101D, la amplificación por PCR introdujo una sustitución nucleotídica no intencionada que resultó en un cambio aminoacídico aparentemente irrelevante (T74I).

Para introducir simultáneamente mutaciones en todas las dianas de serina de la CP de PPV-R, se obtuvieron fragmentos mediante síntesis química (*Bio-Basic*) en los que las serinas 25, 81, 101 y 118 se reemplazaron por alaninas (mutante 4SA) o ácidos aspárticos (mutante 4SD) (**Anexo 4**). Los fragmentos anteriores, digeridos *KpnI-SacI*, se utilizaron para reemplazar el segmento correspondiente en el plásmido pICPPV-NK-IGFP, generándose los vectores pICPPV-NK-IGFP-4SA, pICPPV-NK-IGFP-4SD, o en el pICPPV-5'BD-GFP, generándose pICPPV-5'BD-GFP-4SA y pICPPV-5'BD-GFP-4SD (**Anexo 2**).

Para obtener los plásmidos afectados en las dianas fosforilables de treonina 254 y 313 o en la treonina 304 del motivo CK2, todas de la región central distal de la CP de PPV-R, se utilizó el método de PCR en tres pasos descrito previamente (Ho *et al.*, 1989). En las dos primeras amplificaciones se utilizó como molde el vector pICPPV-NK-IGFP. En todos los casos, para la primera PCR, se empleó el oligonucleótido externo no mutador SM30-R-ext y para la segunda PCR el SM30-F-ext (**Anexo 3**). Los cebadores que completaban cada una de las parejas y que contenían los codones mutadores fueron

los siguientes: SM27-F-mut-Ala (PCR1) y SM27-R-mut-Ala (PCR2) para introducir el cambio T254A; SM28-F-mut-Asp (PCR1) y SM28-R-mut-Asp (PCR2) para T254D; SM29-F-mut-Thr* (PCR1) y SM29-R-mut-Thr* (PCR2) para T254T*; SM50-F-mut-Lys (PCR1) y SM50-R-mut-Lys (PCR2) para T254K; SM35-F-mut-Ala (PCR1) y SM35-R-mut-Ala (PCR2) para T304A; SM36-F-mut-Asp (PCR1) y SM36-R-mut-Asp (PCR2) para T304D; SM37-F-mut-Asn (PCR1) y SM37-R-mut-Asn (PCR2) para T304N; SM38-F-mut-Ala (PCR1) y SM38-R-mut-Ala (PCR2) para T313A; SM39-F-mut-Asp (PCR1) y SM39-R-mut-Asp (PCR2) para T313D; y SM40-F-mut-Asn (PCR1) y SM40-R-mut-Asn (PCR2) para T313N. Los productos de las dos primeras amplificaciones (PCR1 y PCR2) se juntaron para hacer la tercera PCR, utilizando los oligonucleótidos externos SM30-F-ext y SM30-R-ext. El producto resultante, digerido *SacI* y *XbaI*, se empleó para reemplazar el fragmento correspondiente en el vector pICPPV-NK-IGFP y obtener las construcciones finales donde se impedía (pICPPV-NK-IGFP-T254A, pICPPV-NK-IGFP-T313A o pICPPV-NK-IGFP-T304A) o emulaba (pICPPV-NK-IGFP-T254D, pICPPV-NK-IGFP-T313D o pICPPV-NK-IGFP-T304D) la fosforilación, sustituyendo respectivamente por alaninas o ácidos aspárticos las treoninas en 254, 313 o 304. Para descartar posibles efectos asociados a la alteración de algún elemento *cis-acting* del RNA viral (Haldeman-Cahill *et al.*, 1998; Mahajan *et al.*, 1996), se construyeron vectores control que portaban una mutación silenciosa en la posición 254 (pICPPV-NK-IGFP-T254T*) o en los que se sustituían los aminoácidos de las posiciones 313 o 304 por un residuo similar al ácido aspártico pero carente de carga (pICPPV-NK-IGFP-T313N o pICPPV-NK-IGFP-T304N). También se obtuvo una construcción en la que se imitaba una mutación seleccionada de forma natural en posición 254 sustituyendo la treonina de esta posición por lisina (pICPPV-NK-IGFP-T254K) (**Anexo 2** y **Anexo 4**).

Para introducir las mutaciones puntuales T254D o T313D en un vector agroinfiltrable, las construcciones pICPPV-NK-IGFP-T254D y pICPPV-NK-IGFP-T313D fueron digeridas con las enzimas *MauBI* y *SacI* y el producto generado utilizado para sustituir el fragmento correspondiente en el plásmido binario pLX-PPV y generar los vectores pLX-PPV-T254D y pLX-PPV-T313D (**Anexo 2**).

Para alterar la diana fosforilable contenida en el motivo CK2 de la CP de PPV-SwCM, la treonina 306 de esta proteína fue mutagenizada utilizando el método de PCR en tres pasos mencionado anteriormente. En las dos primeras amplificaciones se utilizó como molde el vector CP-SwCM-R (Calvo, Martínez-Turiño, *et al.*, 2014). En todos los casos, para la primera PCR, se empleó el oligonucleótido externo no mutador SM30-R-ext y para la segunda PCR el SM59-F-ext (**Anexo 3**). Los cebadores que completaban cada una de las parejas y que contenían los codones mutadores fueron los siguientes: SM56-F-mut-T306A (PCR1) y SM56-R-mut-T306A (PCR2) para introducir el cambio T306A; SM57-F-mut-T306D (PCR1) y SM57-R-mut-T306D (PCR2) para T306D y SM58-F-mut-T306N (PCR1) y SM58-R-mut-T306N (PCR2) para T306N. Los productos de las dos primeras amplificaciones (PCR1 y PCR2) se juntaron para hacer la tercera PCR, utilizando los oligonucleótidos externos SM59-F-ext y SM30-R-ext. El producto resultante, digerido *SpeI* y *XbaI*, se empleó para reemplazar el fragmento correspondiente en el vector CP-SwCM-R y obtener las construcciones finales donde se

impedía (CP-SwCM-R-T306A) o emulaba (CP-SwCM-R-T306D) la fosforilación, sustituyendo respectivamente por alanina o ácido aspártico la fosfo-diana de la posición 306. Como control negativo de una posible afectación de la actividad *cis-acting*, se construyó un vector que contenía un residuo similar al ácido aspártico pero carente de carga en esa posición (CP-SwCM-R-T306N) (**Anexo 2** y **Anexo 4**).

Para estudiar la fosforilación en distintos contextos, aprovechando la particularidad de la CP de PPV-BOR-3 de migrar como doble banda solo cuando se encuentra fosforilada (Šubr *et al.*, 2007), se construyó un virus quimérico insertando el gen de la CP y el extremo 3' no traducible (UTR) de PPV-BOR-3 en la región equivalente de un clon infeccioso de PPV-R. Para ello, se sintetizó un fragmento de 564 pb (*Invitrogen*) que contenía los últimos 34 pb de la CP y la región 3' UTR del genoma de PPV-BOR-3 (*GenBank*: AY028309.2), una región poliA, el terminador de la nopalina sintetasa y un sitio *XbaI* en el extremo 3'. Paralelamente, la CP de PPV-BOR-3 se amplificó a partir del plásmido pUC-CPB3 80-116, donde estaba clonada, utilizando la pareja de oligonucleótidos SM60-F-BOR-3-KpnI y SM61-R-OV-BOR-3. El producto anterior y el fragmento sintético, solapantes, se ensamblaron mediante una nueva PCR utilizando los oligonucleótidos SM60-F-BOR3-KpnI y SM62-R-TNOS-XbaI (**Anexo 3**). El amplicón *KpnI*-CP(BOR-3)-3'UTR(BOR-3)-tNOS-*XbaI*, digerido con las enzimas *KpnI* y *XbaI*, se empleó para reemplazar el fragmento correspondiente en el vector pICPPV-NK-IGFP, obteniéndose la quimera pICPPV-NK-IGFP-BOR-3-CP. Para obtener una versión de la CP de PPV-BOR-3 incapaz de ensamblarse, se introdujo la mutación puntual D264K en la proteína, tomando como referencia trabajos previos realizados en el PPV y en otros *Potyvirus* (Dolja *et al.*, 1994; Jagadish *et al.*, 1993; Varrelmann & Maiss, 2000; Voloudakis *et al.*, 2004). Para ello se empleó el método de PCR en tres pasos, esta vez realizando dos PCR independientes con el molde pICPPV-NK-IGFP-BOR-3-CP y los pares de cebadores SM69-BOR-3-CP-Lys-F y SM30-R-ext (para la PCR1) y SM69-BOR-3-CP-Lys-R y SM70-F-ext (para la PCR2) (**Anexo 3**). Con los amplicones anteriores se realizó una tercera amplificación utilizando los oligonucleótidos SM70-F-ext y SM30-R-ext y el producto resultante, digerido *SacI* y *XbaI*, se empleó para reemplazar el correspondiente fragmento en el plásmido pICPPV-NK-IGFP-BOR-3-CP y obtener el vector quimérico mutado pICPPV-NK-IGFP-BOR-3-CP^{D264K} (**Anexo 2**). Para expresar la CP de PPV-BOR-3 silvestre o mutada en vectores agroinfiltrables, los plásmidos pICPPV-NK-IGFP-BOR-3-CP y pICPPV-NK-IGFP-BOR-3-CP^{D264K} se digirieron con *BamHI* y *XbaI*, y las bandas resultantes se utilizaron para reemplazar los fragmentos correspondientes en el vector pLONG, dando lugar a las construcciones pLONG-BOR-3-CP y pLONG-BOR-3-CP^{D264K}, respectivamente.

III.5.2. Obtención de plásmidos que expresan la CP de PPV-BOR-3 en ausencia de movimiento, replicación o de otras proteínas virales

Para estudiar si la fosforilación de la CP del PPV se afecta al impedir el movimiento o la replicación viral, se utilizaron los vectores pLONG-CI^{DD3,4AA} y pLONG-CI^{KS91,92AA} (**Anexo 1**), que contenían

mutaciones en CI que impiden la unión de la proteína con PD (DD3,4AA) o afectan su dominio helicasa (KS91,92AA) (Carrington *et al.*, 1998; Gómez De Cedrón *et al.*, 2006). Para ello, la construcción pICPPV-NK-IGFP-BOR-3-CP, que contenía la CP de PPV-BOR-3, se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I. La banda resultante se utilizó para reemplazar el fragmento correspondiente en los vectores pLONG-CI^{DD3,4AA} y pLONG-CI^{KS91,92AA}, generándose las construcciones quiméricas pLONG-CI^{DD3,4AA}-BOR-3-CP y pLONG-CI^{KS91,92AA}-BOR-3-CP, respectivamente (**Anexo 2**).

Para expresar la CP de PPV-BOR-3 en ausencia de otras proteínas virales, el plásmido pICPPV-NK-IGFP-BOR-3-CP fue digerido con las enzimas *Hpa*I y *Xba*I, y la banda resultante utilizada para reemplazar el fragmento correspondiente en el vector pGFP-CP, generándose el plásmido pGFP-BOR-3-CP (**Anexo 2**).

III.5.3. Construcción de plásmidos para expresar proteínas de *A. thaliana*

Los clonajes de genes de *A. thaliana* que se han realizado durante esta tesis se han llevado a cabo aprovechando la tecnología *Gateway* (GW). Después de obtener los cDNA de la planta (ver sección III.3.2.2), los genes de interés fueron amplificados empleando oligonucleótidos específicos e introducidos en vectores tipo pUC, digeridos con *Sma*I. A partir de los vectores resultantes, y utilizando cebadores que portaban las colas GW, se obtuvieron amplicones que fueron incorporados al plásmido pDONR207 mediante recombinación utilizando el kit *Gateway BP Clonase Enzyme Mix* (*Thermo Fisher Scientific*). Las construcciones finales se obtuvieron por una nueva recombinación entre los vectores donadores y el vector de destino pCTAPi (Rohila *et al.*, 2004), utilizando el kit *Gateway LR Clonase Enzyme Mix* (*Thermo Fisher Scientific*).

Los genes de las hexosaminidasas fueron amplificados desde el cDNA empleando las siguientes parejas de oligonucleótidos: SM41-F-HEXO1 y SM41-R-HEXO1 para *HEXO1* (*Gene ID*: At3g55260); SM43-F-HEXO2 y SM43-R-HEXO2 para *HEXO2* (*Gene ID*: At1g05590) y SM45-F-HEXO3 y SM45-R-HEXO3 para *HEXO3* (*Gene ID*: At1g65590) (**Anexo 3**). Los fragmentos anteriores se clonaron en el vector pUC19 dando lugar a las construcciones pUC19-HEXO1, pUC19-HEXO2 y pUC19-HEXO3. En el caso del gen *HEXO1*, se generaron a continuación las construcciones pUC19-HEXO1GW y pUC19-HEXO1-STOPGW, amplificando el gen, con y sin codón de parada, desde el vector pUC19-HEXO1, con los cebadores SM42-F-bis-GW-HEXO1 y SM42-R-bis-GW-HEXO1/SM42-R-bis-GW-stop-HEXO1, respectivamente (**Anexo 2** y **Anexo 3**). A continuación, los vectores pUC19-HEXO1GW, pUC19-HEXO1-STOPGW, pUC19-HEXO2 y pUC19-HEXO3 fueron utilizados para obtener los fragmentos que contenían las secuencias de cada una de las hexosaminidasas fusionadas o no a un codón de parada y portando las colas GW. Para ello, se emplearon las siguientes parejas de cebadores: SM42-F-bis-GW-HEXO1 y SM42-R-bis-GW-HEXO1/SM42-R-bis-GW-stop-HEXO1 para amplificar los genes *HEXO1/HEXO1-STOP*; SM44-F-GW-HEXO2 y SM44-R-GW-HEXO2/SM44-R-GW-stop-HEXO2 para *HEXO2/HEXO2-STOP* y SM46-F-GW-HEXO3 y SM46-R-GW-HEXO3/SM46-R-GW-stop-HEXO3 para

HEXO3/HEXO3-STOP (**Anexo 3**). Tras la reacción BP entre los amplicones GW y el vector pDONR, se generaron los vectores donadores pDONR-HEXO1, pDONR-HEXO1-STOP, pDONR-HEXO2, pDONR-HEXO2-STOP, pDONR-HEXO3 y pDONR-HEXO3-STOP (**Anexo 2**). Finalmente, la reacción LR entre los plásmidos anteriores y el vector pCTAPi permitió obtener las construcciones pCTAPi-HEXO1, pCTAPi-HEXO1-STOP, pCTAPi-HEXO2, pCTAPi-HEXO2-STOP, pCTAPi-HEXO3 y pCTAPi-HEXO3-STOP (**Anexo 2**).

Para el clonaje del gen de *SEC* (*Gene ID*: At3g04240) se siguió un procedimiento similar al descrito anteriormente para las hexosaminidasas. El cDNA correspondiente, amplificado con los oligonucleótidos SM3 y SM5, o SM3 y SM4 para introducir un codón de parada al final de la secuencia (**Anexo 3**), se clonó en el vector pUC18 generándose los plásmidos pUC18-SEC y pUC18-SEC-STOP, respectivamente (**Anexo 2**). Los amplicones GW, obtenidos utilizando las parejas de cebadores SM8 y SM10 para SEC o SM8 y SM9 para el gen fusionado a un codón de parada, se recombinaron con el vector pDONR para obtener los vectores pDONR-SEC y pDONR-SEC-STOP. Por último, la reacción LR entre los plásmidos anteriores y el vector pCTAPi permitió obtener las construcciones pCTAPi-SEC y pCTAPi-SEC-STOP.

Tras la amplificación de los distintos cDNA, los genes clonados en los vectores pUC18 o pUC19 fueron secuenciados con los oligonucleótidos M13-F y M13-R. En el caso del clonaje del gen HEXO2 en el vector pUC19-HEXO2, se detectó una secuencia que correspondía con un intrón de 73 pb, que previsiblemente podría ser procesado por la planta y no afectaría a la función de la proteína. En el caso de las construcciones donadoras la secuenciación clonada se verificó utilizando los cebadores attL1-F y attL2-R. Adicionalmente, los fragmentos recombinados en los vectores pCTAPi se secuenciaron utilizando los siguientes oligonucleótidos (**Anexo 3**): para HEXO1 y HEXO1-STOP, las parejas SM41-F-HEXO1/SM41-R-HEXO1 y SM53-H1-secu-F/SM53-H1-secu-R; para HEXO2 y HEXO2-STOP, SM43-F-HEXO2/SM43-R-HEXO2 y SM54-H2-secu-F/SM54-H2-secu-R; para HEXO3 y HEXO3-STOP, SM45-F-HEXO3/SM45-R-HEXO3 y SM55-H3-secu-F/SM55-H3-secu-R y para SEC y SEC-STOP, SM8/ SM9.

III.6. Producción y manipulación de proteínas

III.6.1. Expresión transitoria de proteínas en plantas por agroinfiltración

Para expresar transitoriamente proteínas en plantas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración, se siguió el mismo procedimiento que para la agroinoculación descrita en la sección III.2.1.5. En los casos en los que se necesitó expresar más de un plásmido simultáneamente, se infiltraron mezclas con cantidades equivalentes de los cultivos deseados. En esta tesis se les ha dado a los cultivos de *A. tumefaciens* el nombre del plásmido que porta la bacteria para simplificar la lectura.

En los experimentos en los que se agroinfiltraron hojas completas con mutantes afectados en las posiciones 254 o 313 de la CP de PPV-R, todas las mezclas de agroinfiltración incluyeron el plásmido pP1b ($DO_{600} = 0.3$) en combinación con los plásmidos objeto de estudio (pLX-PPV-T254D o pLX-PPV-T313D) o sus controles (pLX-PPV o pPPV-CI^{KS91,92AA}), todos a una $DO_{600} = 0.7$.

En los ensayos en los que se agroinfiltraron pequeñas regiones de hojas, todas las mezclas de agroinfiltración incluyeron los plásmidos pP1b ($DO_{600} = 0.3$) y pRFP ($DO_{600} = 0.25$), en combinación con los vectores a evaluar (pLX-PPV-T254D o pLX-PPV-T313D) o sus controles (pLX-PPV o pPPV-CI^{DD3,4AA}), todos a una $DO_{600} = 0.45$.

Para evaluar si la *O*-GlcNAcilación de la CP de PPV-R o la fosforilación de la misma proteína de PPV-BOR-3 podía tener lugar al afectarse diferentes etapas del ciclo viral o en ausencia de otras proteínas del virus, nuevamente se agroinfiltraron hojas completas de *N. benthamiana* tanto silvestre como SEC-b2. En estos casos las mezclas de cultivos incorporaron vectores a una $DO_{600}=0.5$ para evaluar la *O*-GlcNAcilación (pLONG-CI^{DD3,4AA}, pLONG-CI^{KS91,92AA} o pLONG-CP^{D264K}) o la fosforilación (pLONG-CI^{DD3,4AA}-BOR-3-CP, pLONG-CI^{KS91,92AA}-BOR-3-CP o pLONG-BOR-3-CP^{D264K}), combinados en todos los casos con pP1HC ($DO_{600} = 0.3$). En ambos estudios, para expresar la CP en ausencia de otras proteínas virales, se empleó una combinación de plásmidos que incluían el vector a ensayar, pGFP-CP o pGFP-BOR-3-CP (ambos a $DO_{600} = 0.25$), + pP1b ($DO_{600} = 0.3$) + pNIapro ($DO_{600} = 0.25$). Como controles positivos se utilizaron los vectores pLX-PPV ($DO_{600} = 0.5$) + pP1b ($DO_{600} = 0.3$) en los estudios con la CP de PPV-R, o pLONG-BOR-3-CP ($DO_{600} = 0.5$) + pP1HC ($DO_{600} = 0.3$), en los que se realizaron con la CP de PPV-BOR-3.

Para determinar si los genes *HEXO* de *A. thaliana* podían expresarse apropiadamente a partir de las construcciones pCTAPi, las correspondientes construcciones fueron agroinfiltradas en hojas completas de *N. benthamiana* silvestre y SEC-b2. Se utilizaron mezclas de cultivos bacterianos que contenían los vectores a ensayar (pCTAPi-HEXO1, pCTAPi-HEXO1-STOP, pCTAPi-HEXO2, pCTAPi-HEXO2-STOP, pCTAPi-HEXO3 o pCTAPi-HEXO3-STOP) en combinación con el plásmido pP19, ambos a una $DO_{600} = 0.5$.

Para evaluar si la *O*-GlcNAcilación de la CP de PPV-R se afectaba al expresarse transitoriamente las proteínas HEXO o SEC de *A. thaliana* en plantas de *N. benthamiana* silvestre y SEC-b2, se agroinfiltraron hojas completas con mezclas de cultivos bacterianos que contenían en todos los casos los plásmidos pP19 y pSN-PPV (ambos a $DO_{600} = 0.3$), en combinación con vectores (a una $DO_{600} = 0.3$) desde los que se expresaban las hexosaminidasas (pCTAPi-HEXO1, pCTAPi-HEXO2, pCTAPi-HEXO3, pCTAPi-HEXO1-STOP, pCTAPi-HEXO2-STOP o pCTAPi-HEXO3-STOP) o la enzima SEC (pCTAPi-SEC o pCTAPi-SEC-STOP). En el experimento en el que se evaluó la *O*-GlcNAcilación de la CP al expresarse conjuntamente las tres hexosaminidasas, la mezcla de agroinfiltración contenía cinco

cultivos distintos (pCTAPi-HEXO1 + pCTAPi-HEXO2 + pCTAPi-HEXO3 + pP19 + pSN-PPV, todos a $DO_{600} = 0.2$).

En los dos últimos ensayos, en los que se expresaron transitoriamente las enzimas HEXO y SEC, se utilizó como control la mezcla pGFP ($DO_{600} = 0.3$) + pP19 ($DO_{600} = 0.3$) + pSN-PPV ($DO_{600} = 0.3$).

III.6.2. Análisis de la estabilidad de la CP

Para analizar la estabilidad de la CP se obtuvieron extractos de proteínas totales a partir de tejido de *N. benthamiana* o *A. thaliana* previamente infectado con PPV, los cuales se incubaron a 25 °C durante distintos tiempos. Para ello, el tejido infectado se pulverizó en nitrógeno líquido y se homogenizó en tampón fosfato sódico 5 mM, pH 7.2 en una relación 2 : 1 (μL tampón : mg tejido). El extracto se centrifugó a 4 °C en una centrífuga *Hettich Mikro 12-24* durante 1 minuto a 14 000 rpm, y a partir del sobrenadante clarificado se tomaron alícuotas a distintos tiempos post-incubación. Las alícuotas se mezclaron directamente con tampón SDS 1X (Tris-HCl 125 mM pH 7.5, SDS 2 %, urea 6M, glicerol 4 %, β -mercaptoetanol 5 %, azul de bromofenol 0.1 %) siguiendo una relación 2 : 1 (μL : mg tejido) como se ha descrito arriba.

III.6.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida y detección de proteínas por *Western Blot* o tinción con azul de *Coomassie*

Las muestras conteniendo las proteínas, previamente mezcladas con tampón SDS 1X y calentadas a 95 °C durante 5 minutos, se separaron en geles SDS-PAGE al 10 o 12 % (Laemmli, 1970).

La detección basada en la tinción con azul de *Coomassie* se empleó para estimar la concentración y el grado de limpieza de las muestras analizadas mediante estudios proteómicos (ver sección III.9). Este método también se utilizó para detectar posibles variaciones en el peso molecular de la CP cuando la misma se expresaba junto con la proteína SEC heteróloga en plantas de *N. benthamiana* silvestre y SEC-b2.

Para la detección mediante *Western Blot*, las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa *BioTrace* (*Pall Corporation*), excepto en el caso del análisis de expresión de las proteínas HEXO que se transfirieron a membranas *Immun-blot PVDF* (*Bio-Rad*). Las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con una solución de rojo *Ponceau* para evaluar la carga de proteínas. Para detectar la CP se utilizó un suero de conejo anti-CP del PPV (1 : 500 000) obtenido en el laboratorio, en combinación con un anticuerpo secundario (1 : 10 000) marcado con peroxidasa (*Jackson ImmunoResearch*). La presencia de *O*-GlcNAcilaciones en viriones purificados se detectó con el anticuerpo monoclonal CTD110.6 (1 : 2000) (*Merck*) y un anticuerpo secundario (1 : 20 000) conjugado con peroxidasa (*GE Healthcare*). Para el reconocimiento de las proteínas fusionadas a la etiqueta TAP (*tandem affinity purification*) se empleó un complejo soluble de anticuerpo PAP

(*peroxidase anti-peroxidase*) (1 : 10 000) (*Merck*). Las membranas utilizadas para detectar la O-GlcNAcilación de la CP se trataron con la solución *Reblot Plus Strong* (*Millipore*) antes de la inmunodetección de la proteína con el suero anti-CP. Para el revelado se emplearon indistintamente los sustratos quimio-luminiscentes *Clarity Western ECL* (*Bio-Rad*) o el kit *LiteAblot* (*Euroclone*). La señal generada fue detectada en películas fotográficas y a partir de un momento dado de la tesis utilizando el equipo *ChemiDoc* (*Bio-Rad*). Tras el revelado, las proteínas fueron cuantificadas con el programa *Quantity One 1-D* (*Bio-Rad*).

III.6.4. Inmunoprecipitación de la CP

Para inmunoprecipitar la CP del PPV, se obtuvieron extractos de proteínas totales a partir de hojas agroinfiltradas (*N. benthamiana*) o sistémicamente infectadas (*N. benthamiana* y *A. thaliana*). Para ello, el tejido previamente pulverizado se homogenizó en tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, DTT 2.5 mM, Tritón X-100 0.1 %, pH 7.4) suplementado con el inhibidor de proteasas *cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (*Roche*) al 0.2 %, utilizando un vórtex. Cuando la CP fue inmunoprecipitada a partir de alícuotas que provenían del fraccionamiento por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (ver sección III.7), el extracto de proteínas totales se obtuvo utilizando el mismo tampón de extracción concentrado 4 veces. Las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 10 000 rpm en el rotor SS34 de una centrífuga *Sorvall RC-5C*, y el sobrenadante se clarificó repitiendo el procedimiento dos veces más. El clarificado, diluido a la mitad en el tampón de extracción, se incubó en un agitador orbital con el suero anti-CP del PPV (1 : 800) durante 6 h y a continuación con la resina *rProtein A Sepharose Fast Flow* (*GE Healthcare*) durante toda la noche. La mezcla se centrifugó durante 1 minuto a 2000 rpm en una centrífuga *Hettich Mikro 12-24* y el sedimento se lavó con el tampón de extracción, repitiéndose este paso un total de 3 veces. Hasta este punto todo el procedimiento se llevó a cabo a 4 °C. A continuación, la proteína inmunoprecipitada se eluyó mediante resuspensión en tampón SDS 1X, calentando la mezcla 10 minutos a 65 °C.

III.6.5. Detección de fluorescencia

Cuando se inocularon plantas de *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *A. thaliana* y *P. persica* utilizando clones del PPV que expresaban una versión recombinante de la proteína verde fluorescente (GFP), la infección viral pudo ser monitorizada mediante la detección de fluorescencia. Para ello, se utilizó una lámpara de luz UV de onda larga *Black-Ray B-100AP* (*Ultra-Violet Products*) y/o un microscopio de epifluorescencia *Leica MZ FLIII* (*Leica Microsystems*), empleando un filtro excitador de 480/40 nm y uno de bloqueo de 510 nm. En los ensayos en los que se evaluó el movimiento viral y fue necesario delimitar el área agroinfiltrada expresando la proteína roja fluorescente (RFP) en hojas de *N. benthamiana*, se emplearon filtros de 546/10 nm (excitador) y 570 nm (bloqueo). En ambos casos,

las imágenes fueron adquiridas con las cámaras digitales *Nikon D1X* (para UV) y *Olympus DP70* (para fluorescencia).

III.7. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa

Para el análisis de los distintos estados de agregación de la CP del PPV, se realizó una separación por velocidad de sedimentación, ultracentrifugando las muestras de interés en gradientes continuos de sacarosa (10-40 %); preparados a partir de soluciones concentradas de sacarosa en tampón borato sódico 100 mM, EDTA 10 mM, pH 8.2, siguiendo el método *freezing-thawing* (Chanas & Johnson, 1980). Sobre cada gradiente se aplicaron 200 μ L de un extracto clarificado de proteínas totales, obtenido a partir de tejido infectado de plantas (ver sección III.6.2), y las muestras se centrifugaron durante 20 minutos, a 4 °C y a 50 000 rpm, en el rotor SW55 de una ultracentrífuga *Beckman Coulter, Optima L-100 XP*. A continuación, se tomaron 11 o 18 fracciones de 500 μ L o 250 μ L, respectivamente, insertando un capilar plástico en el fondo del tubo y dejando caer las gotas de líquido por gravedad. Cuando las fracciones fueron inmunoprecipitadas (ver sección III.6.4) para ser analizadas por MS (ver sección II.9), el procedimiento fue escalado preparando gradientes de mayor volumen sobre los que se aplicaron 5 mL del extracto de proteínas totales clarificado. En este caso la muestra se centrifugó durante 2 h en el rotor SW28 de la misma centrífuga y se tomaron 19 alícuotas de 2 mL cada una.

III.8. Microscopía electrónica

La observación de las partículas virales se realizó mediante microscopía electrónica inmunoabsorbente (ISEM), como se ha descrito anteriormente (Valli *et al.*, 2014). Los extractos de proteínas totales procedentes de tejido de *N. benthamiana* sistémicamente infectado se incubaron durante 5 minutos en rejillas de cobre recubiertas con colodión y carbón, tratadas con suero anti-CP (1 : 100) en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4). Para la tinción negativa se utilizó acetato de uranilo al 2 %. Las rejillas se observaron en un microscopio *JEM-1011 (Jeol)* a 100 Kv, y las imágenes se tomaron con una cámara *CCD ES1000W Erlangshen (Gatan)*. Se examinó un mínimo de tres campos por rejilla y dos rejillas por muestra, de manera que se analizaron al menos 35-50 partículas virales por preparación. La presencia de partículas estructuralmente deformes únicamente en muestras del mutante 4SD, pero no del virus silvestre, se evaluó estadísticamente. Para ello, se contaron todas las partículas normales y anormales, en tres réplicas biológicas del virus mutante y silvestre, tanto a T=0 como a T=60, y los datos fueron analizados por un test de Fisher 2x2 ($P < 0.000001$). Las partículas estructuralmente deformes también se detectaron en las muestras de los mutantes compensatorios 4SD^{T254K} y 4SD^{D118N}, al analizarse una o dos réplicas biológicas, respectivamente.

III.9. Estudios proteómicos

Los estudios proteómicos realizados durante esta tesis se llevaron a cabo en viriones purificados del PPV y en la CP inmunoprecipitada del virus.

III.9.1. Análisis por 2D-PAGE

Alrededor de 2 µg de viriones del PPV se sometieron a una electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida al 12 % con SDS (2D-PAGE). Para la separación en la primera dimensión se empleó el sistema *PROTEAN 12 IEF* y una tira *IPG Ready Strip* pH 4-7 de 11 cm (ambos de *Bio-Rad*). La separación por peso molecular se llevó a cabo en un sistema *Midi Format* (*Bio-Rad*) y a continuación los geles fueron teñidos con azul de *Coomassie* coloidal (*Bio-rad*).

III.9.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF

Las proteínas se analizaron empleando la técnica de desorción e ionización mediante láser asistida por matriz que se encuentra acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF), según se ha descrito anteriormente (*Chen et al., 2005*). Para ello, se digirieron 50 ng de proteína, durante 20 minutos, a temperatura ambiente, utilizando como proteasa tripsina de calidad proteómica (*Merck*). Los péptidos resultantes, secados al vacío, se resuspendieron en un tampón que contenía acetonitrilo (30 %), isopropanol (15 %) y ácido trifluoroacético (0.5 %), y se depositó 1 µL de cada digerido sobre una placa de 384 pocillos *OptiTOF* (*SCIEX*). Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1 µL de la solución matriz (2,5-dihidroxiacetofenona, 10 mg/mL) disuelta en acetonitrilo acuoso (50 %) y citrato de amonio (100 mM), y la placa se dejó secar nuevamente a temperatura ambiente. La detección de la huella peptídica se realizó en un espectrómetro de masas *ABi 4800 MALDI TOF/TOF* (*SCIEX*) en modo lineal para iones positivos, tal como se describió previamente (*Taurino et al., 2014*). El rango de detección de masa se estableció entre 1000 y 10 000 masa/carga (m/z).

III.9.3. Espectrometría de masas LC-MS/MS

Para el análisis de proteínas utilizando nano cromatografía líquida (LC) de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS), mediante ionización electrospray (ESI), las muestras fueron precipitadas con metanol-cloroformo y reconstituidas en un tampón que contenía urea (8 M) y bicarbonato de amonio (100 mM). A continuación, se llevó a cabo reducción de cisteínas con DTT (10 mM) y su posterior alquilación con iodoacetoamida (50 mM).

Posteriormente, y tras la dilución de la urea y del bicarbonato a 2 M y 25 mM, respectivamente, las muestras fueron digeridas consecutivamente con las proteasas Lys-C y tripsina, y enriquecidas en fosfopéptidos, concatenando dos micro-columnas empaquetadas en el laboratorio: IMAC

(cromatografía de afinidad con Fe III como metal inmovilizado) y Oligo R3 de fase inversa (para péptidos hidrofílicos). El enriquecimiento selectivo y eliminación de interferentes de la muestra antes del análisis por MS/MS, se hizo tal como se indica en Navajas *et al.* (2011). Las fracciones enriquecidas en fosfopéptidos fueron analizadas por dos sistemas distintos de MS en donde la LC se acoplaba bien a un analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) de tipo TTOF, o bien a un analizador de trampa de iones.

El sistema LC-MS/MS con analizador QTOF consistió en un sistema *nanoLC Ultra 1D plus (Eksigent Technologies)*, acoplado a un espectrómetro de masas de alta velocidad *TTOF 5600 (SCIEX)*. La columna analítica usada fue la *nanoAcquity BEH C18 75 μm x 15 cm*, con un tamaño de partícula de 1.7 μm y un tamaño de poro de 130 Å (*Waters*), mientras que la columna de atrapamiento, fue una *Acclaim PepMap 100 (100 μm x 2 cm) (Thermo Fisher Scientific)* con un diámetro de partícula de 5 μm y un tamaño de poro de 120 Å. La bomba de carga suministró una solución acuosa de ácido fórmico al 0.1 % a un flujo de 2 μL/min. La nano-bomba proporcionó un caudal de 250 nL/min y se hizo funcionar bajo condiciones de elución en gradiente, utilizando como fase móvil A una solución acuosa de ácido fórmico (0.1 %) y como fase B una solución de ácido fórmico en acetonitrilo (0.1 %). Se utilizó un gradiente lineal de 2-40% B, de 60 minutos y el volumen de inyección fue de 5 μL. El espectrómetro de masas desarrolló un modo de adquisición denominado dependiente de datos, en el que, en cada ciclo, se seleccionaron los 15 iones precursores más abundantes en el rango m/z de 350-1250, que fueron sucesivamente fragmentados obteniéndose sus correspondientes espectros de masas en el rango m/z de 100-1800 (tiempo total por ciclo, 4.04 segundos).

Las fracciones enriquecidas en fosfopéptidos fueron también sometidas a análisis LC-MS/MS con un analizador de trampa de iones. En este caso, la LC de fase inversa se realizó con un sistema *nanoHPLC Ultimate 3000 (Dionex)*, utilizando una columna de atrapamiento *C18 PepMap (5 μm, 100 Å, 300 μm de diámetro interno (ID) x 5 mm)* y una columna analítica *C18 PepMap 100 (3 μm, 100 Å, 75 μm ID x 15 cm)* (todo de *Thermo Fisher Scientific*). La fase móvil A fue ácido fórmico acuoso (0.1 %), y la fase móvil B una mezcla de ácido fórmico al 0.1 % en 20 % de agua / 80 % acetonitrilo. La nano-bomba suministró un gradiente lineal de 4-50 % B, durante 60 minutos, con un caudal de 300 nL/min. Este sistema cromatográfico estaba acoplado a un espectrómetro de masas con trampa iónica tridimensional *AmaZon speed (Bruker Daltonics)*. La trampa iónica se hizo funcionar en modo de adquisición dependiente de datos, para lo que se seleccionó en cada ciclo los ocho iones precursores más abundantes en el rango (m/z 350-1500) que fueron sucesivamente fragmentados alternando dos técnicas distintas de fragmentación, como son CID/ETD (disociación inducida por colisión/disociación por transferencia de electrones). Se aplicó una exclusión dinámica para evitar que el mismo ratio m/z fuera aislado, después de 0.6 minutos post-fragmentación. Para la identificación de péptidos, los espectros CID y ETD fueron validados manualmente.

Los datos de MS y MS/MS de ambos sistemas de espectrometría de masas se convirtieron en archivos MGF (*Mascot Generic File*), con los cuales se realizaron búsquedas en una base de datos de proteínas del PPV, utilizando *Mascot* como motor de búsqueda (Licencia *Mascot Server 2.3.2, Matrix Science*). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: enzima tripsina, cortes de enzima fallidos admitidos 3; modificaciones fijas, carbamidometilación de cisteína, utilizando como agente alquilante la iodoacetamida; modificaciones variables, oxidación de metionina, fosforilación y glicosilación (HexNAc) de serina y treonina.

Para el análisis de proteómica diferencial mediante cuantificación absoluta y relativa por marcaje isobárico (iTRAQ), los péptidos resultantes de la digestión con proteasas fueron marcados utilizando el kit *iTRAQ 4-plex (SCIEX)*, como se describió previamente en *Ciordia et al. (2016)*. Se siguió este esquema de marcaje: réplica biológica 1 WT, tag-114; réplica biológica 1 SEC-b2, tag-115; réplica biológica 2 WT, tag-116 y réplica biológica 2 SEC-b2, tag-117. Las muestras marcadas se mezclaron, secaron y desalaron utilizando el cartucho *SEP-PAK C18 (Waters)* y posteriormente, se analizaron por nanoLC-MS/MS TTOF después del enriquecimiento en fosfopéptidos. Para el análisis de los datos iTRAQ, además de los parámetros de búsqueda que se han indicado anteriormente, también se incluyó como modificación fija el iTRAQ-4plex (N-term y K).

Dependiendo del sistema de espectrometría de masas, la tolerancia de la masa del péptido precursor se estableció en ± 25 ppm y 0.5 Da, para el TTOF y la trampa de iones, respectivamente, mientras que para las masas de los fragmentos se estableció en 0.05 y 0.5 Da para el TTOF y la trampa de iones, respectivamente. El intervalo de confianza para la identificación de proteínas se fijó en ≥ 95 ($P < 0.05$) y solo se tuvieron en cuenta los péptidos con una puntuación individual significativa de entre 29 y 50. Los datos proteómicos obtenidos como resultado de esta tesis, y que ya han sido publicado, están depositados en el consorcio *ProteomeXchange* a través del repositorio asociado *PRIDE (Vizcaíno et al., 2016)* con el identificador PXD006159.

El análisis de los péptidos digeridos analizados por LC-MS/MS utilizando un espectrómetro de masas con un analizador de trampa iónica lineal cuadrupolo de confinamiento lineal (LTQ) *Orbitrap (Thermo Fisher Scientific)*, se hizo como se describió anteriormente (*Housley et al., 2008*).

III.10. Modelado de la CP y el oligómero del PPV

El modelo *in silico* del monómero de la CP de PPV-R fue obtenido con el programa *I-TASSER (Yang et al., 2015)*, mediante un modelado comparativo basado en la estructura de la CP del WMV (código *Protein Data Bank (PDB): 5ODV (Zamora et al., 2017)*). La validez de la predicción se determinó en base a los siguientes parámetros de calidad: *C-score (1.77)*, *TM-score estimado (0,96 \pm 0,05)* y *RMSD (2,0 \pm 1,6 Å)*. Para la visualización de la estructura 3D de los modelos de las proteínas se utilizó el programa *PyMOL Molecular Graphics System 1.7.4 Schrödinger, LLC (DeLano, 2002)*. El complejo

oligomérico del PPV se obtuvo mediante superposición rígida del monómero del PPV sobre cada una de las subunidades del oligómero del WMV.

III.11. Búsqueda de secuencias y alineamientos

Las secuencias de los genes de *A. thaliana* estudiados en esta tesis se obtuvieron a partir del *Arabidopsis Information Resource* (TAIR) (Reiser *et al.*, 2017) y las secuencias aminoacídicas de las CP de los distintos aislados del PPV y otros potyvirus de la base de datos *Reference Sequence*, del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (O'Leary *et al.*, 2016).

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las CP de los aislados de distintas cepas del PPV, además de las de otros potyvirus, se llevó a cabo utilizando el servidor web *Clustal omega* (Sievers *et al.*, 2011) (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo), con los parámetros establecidos por defecto. En el caso del alineamiento múltiple de las CP de distintos aislados del PPV que se muestra en el **Anexo 7**, o del alineamiento de la proteína de distintos potyvirus mostrado en el **Anexo 8**, se emplearon el programa *Geneious 9.1.5* (www.geneious.com; Kearse *et al.*, 2012) o el programa *DNASTAR* (www.dnastar.com, Burland, 2000), respectivamente, utilizándose en ambos casos el método *MUSCLE* (Edgar, 2004).

IV. RESULTADOS



IV. RESULTADOS

IV.1. La CP del PPV está fosforilada en múltiples residuos, que no coinciden con los O-GlcNAcilos

Análisis previos de nuestro laboratorio utilizando un sistema de espectrometría de masas MALDI-TOF en viriones de PPV-R, purificados a partir de plantas infectadas de *A. thaliana* y *N. benthamiana*, detectaron al menos un residuo fosforilado en la región N-terminal de la CP viral, concretamente en el péptido tríptico que comprende los aminoácidos 1 al 39 (Chen *et al.*, 2005). En esta tesis se ha recurrido a técnicas adicionales de MS con el fin de identificar el número y la localización específica de residuos fosforilados en la CP del PPV.

IV.1.1. La CP de PPV-R puede fosforilarse en los aminoácidos S25, S81, S101 y S118

Para llevar a cabo este estudio, se obtuvieron viriones de PPV-R siguiendo el protocolo de Laín *et al.* (1988) (ligeramente modificado por Chen *et al.* (2005)), utilizando tejido de hojas de *N. benthamiana* sistémicamente infectadas. Las muestras se digirieron con las proteasas tripsina y Lys-C, y se sometieron a un tratamiento de fosfo-enriquecimiento por IMAC antes de su análisis por LC-MS/MS. Se seleccionaron los iones peptídicos precursores convenientes en base a su ratio m/z y se generaron sus correspondientes espectros de fragmentación. Se emplearon dos sistemas de MS/MS basados en ESI, un analizador de trampa de iones en el que se alternó la fragmentación por ETD con la fragmentación por CID, y un analizador TTOF de alta resolución. La identificación de los péptidos se realizó usando algoritmos informáticos que comparaban los datos experimentales con los espectros teóricos derivados de una base de datos construida ex profeso que incluía a la CP de PPV-R, detectándose señales que permitieron mapear inequívocamente cuatro residuos de serina fosforilados en las posiciones 25, 81, 101 y 118 de la CP de PPV-R (**Fig. IV.1** y **Tabla IV.1**).

La fosforilación de los residuos de S25, S81, S101 y S118 puede tener lugar a la par que la O-GlcNAcilosación previamente descrita, que también podría modificar la región N-terminal de la CP de PPV-R en los residuos de T19, T24, T41, T50, T53, T54/58 y S65 (Kim *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2013). Estos resultados indican que los residuos susceptibles de ser fosforilados difieren de aquellos que pueden ser O-GlcNAcilosados (**Fig. IV.1**). Como resultado del patrón de digestión por proteasas, la coexistencia de fosforilaciones y O-GlcNAcilosaciones solo es posible en algunos péptidos (**Fig. IV.1B**). Así, la fosfo-serina pS25 podría coexistir con la O-GlcNAcilosación en T19 y T24; mientras que la fosfo-serina pS81 podría coexistir con la O-GlcNAcilosación en S65. Una de estas combinaciones pudo ser observada en el péptido [1-39], el cual se detectó simultáneamente fosforilado en S25 y O-GlcNAcilosado en T24 (**Tabla IV.1**). Este resultado indica que los grupos O-GlcNAc y O-fosfato no compiten por ocupar los mismos residuos en la CP de PPV-R.

Tabla IV.1. Fosfopéptidos identificados en la CP de PPV-R por MS mediante TTOF de alta resolución y/o ETD-trampa iónica de baja resolución

Péptido	Secuencia del péptido	Modificación	z	m/z
[1-39]	ADEREDEEEVDAGKPSVVTAPAATSPILQPPPVIQPAPR	N.M.	5	816.23
			4	1020.03
	ADEREDEEEVDAGKPSVVTAPAAT <p>S</p> SPILQPPPVIQPAPR	pS25	5	832.22
			4	1040.03
	ADEREDEEEVDAGKPSVVTAPAAgTSPILQPPPVIQPAPR	gT24	5	856.84
			4	1070.80
ADEREDEEEVDAGKPSVVTAPAAgT <p>S</p> SPILQPPPVIQPAPR	gT24, pS25 **	5	872.84	
		4	1090.79	
[20-39]	APAAT <p>S</p> SPILQPPPVIQPAPR	pS25	3	701.05
	APAAgTSPILQPPPVIQPAPR	gT24	3	742.09
[60-93]	PVSQVSGPQLQTFGTGYNEDASPSNSNALVNTNR	N.M.	3	1183.91
			4	888.18
	PVSQVSGPQLQTFGTGYNEDA <p>S</p> SPNSNALVNTNR	pS81	3	1210.56
			4	908.17
	PVSQVSGPQLQg (TFGT) ?YGNEDA <p>S</p> SPNSNALVNTNR	gT74? o gT71?	4	958.94
5			767.35	
[71-93]	TFGTGYNEDASPSNSNALVNTNR	N.M.	2	1215.05
			3	810.37
			2	1215.15*
	TFGTGYNEDA <p>S</p> SPNSNALVNTNR	pS81	3	837.03
			2	1255.60*
[94-109]	DRDVDAGSVGTFTVPR	N.M.	3	564.62
			3	564.66*
	DRDVDAG <p>S</p> SVGTFTVPR	pS101	3	591.27
			3	591.37*
[96-109]	DVDAG <p>S</p> SVGTFTVPR	pS101	2	750.84
[112-121]	AMTSKL <p>S</p> LPK	pS118	2	578.30
			2	578.40*
	AoxMTSKL <p>S</p> LPK	pS118	2	586.29
			2	586.40*

Resumen de péptidos y sus sitios *O*-GlcNAcilosados/fosforilados identificados en la CP de PPV-R mediante MS utilizando un TTOF de alta resolución y/o una ETD-trampa iónica de baja resolución, en 6 y 4 réplicas biológicas respectivamente. Para los espectros CID-MS/MS se utilizaron los motores de búsqueda *Mascot* y *Peaks*, seleccionándose valores de confianza por encima de 40 y 60, respetivamente. Se indican los péptidos no modificados (N.M.) o modificados por fosforilación (p), *O*-GlcNAcilosación (g) u oxidación (ox). (?) Datos que no han permitido determinar cuál de las dos treoninas está *O*-GlcNAcilosada. (*) Péptidos identificados exclusivamente por ETD. (**) Modificaciones simultáneas que coexisten de manera inambigua en los residuos de T24 y S25 y que han sido asignadas como gT24pS25, en base a mapeos individuales previos. (z) Carga. (m) Masa. Todos los espectros ETD fueron asignados y validados manualmente. Los datos sin procesar están disponibles en el repositorio *ProteomeXchange* (identificador de datos PXD006159).

Asimismo, los espectros MALDI-TOF mostraron señales muy reducidas correspondientes a péptidos trípticos *O*-GlcNAcildados en el caso de los viriones obtenidos a partir de plantas SEC-b2, en comparación con las de los viriones procedentes de plantas silvestres (**Fig. IV.2B**). Ambos análisis demostraron que los niveles de *O*-GlcNAcildación en la CP de PPV-R son mucho menores en las plantas deficientes en SEC que en las no silenciadas, lo que concuerda con una reducción acentuada en la actividad OGT de esta enzima.

Con el objetivo de analizar cuantitativamente la fosforilación y *O*-GlcNAcildación en la CP de PPV-R en plantas silvestres y plantas deficientes en la producción de SEC, los viriones de PPV-R purificados a partir de ambos tipos de plantas se examinaron mediante iTRAQ, precedida de enriquecimiento de fosfopéptidos. Para analizar los datos se tuvieron en cuenta los valores de intensidad de señal de los péptidos identificados con un intervalo de confianza > 95 % ($P < 0.05$) y una puntuación > 40, procedentes de dos réplicas biológicas por cada condición.

En concordancia con el análisis MALDI-TOF (**Fig. IV.2B**), tanto las especies no glicosiladas como las mono- y di-*O*-GlcNAcildadas del péptido [1-39] y del [15-39] mostraron altos valores de intensidad en las muestras obtenidas a partir de plantas silvestres (**Tabla IV.2**). Por otro lado, las formas mono- y poli-*O*-GlcNAcildadas del péptido [40-59] y, especialmente, del [40-93], mostraron bajas intensidades incluso en muestras procedentes de plantas silvestres. Estos datos sugieren que durante el análisis iTRAQ la eficiencia en la recuperación de péptidos puede diferir dependiendo de las especies peptídicas. Así pues, aunque se pueden comparar cantidades relativas del mismo péptido en distintas muestras de proteínas, la comparación de los ratios de intensidad para los distintos péptidos debe ser interpretada con cautela, ya que las diferentes propiedades físico-químicas de cada péptido pueden dar como resultado diferencias en sus intensidades.

Como se esperaba, la comparación entre los niveles de *O*-GlcNAcildación de péptidos provenientes de plantas silvestres y SEC-b2, reveló una abundancia mucho menor de formas glicosiladas en las plantas deficientes en SEC (**Fig. IV.3**). El ratio de los valores de intensidad para los péptidos [1-39] y [15-39] *O*-GlcNAcildados, con respecto a la suma de los valores de las intensidades de todas las especies de cada péptido, fue más de tres veces inferior en la condición SEC-b2 que en la silvestre (29.1 % frente a 90.3 %). Las diferencias en los niveles de *O*-GlcNAcildación fueron incluso más evidentes para las especies di-*O*-GlcNAcildadas de los péptidos [1-39] y [15-39], llegando a ser aproximadamente quince veces menos abundantes en plantas deficientes en SEC que en plantas silvestres (5.4 % frente a 78.6 %) (**Fig. IV.3**). Aunque la recuperación en el análisis iTRAQ de los péptidos que incluyen dianas de *O*-GlcNAcildación posteriores al residuo 40 (T41, T50, T53, T54/T58 y S65) fue pobre, sí se pudo detectar una disminución notable en la *O*-GlcNAcildación del péptido [40-59] en la condición SEC-b2 respecto a la silvestre (32.8 % frente a 95.9 %) (**Fig. IV.3**).

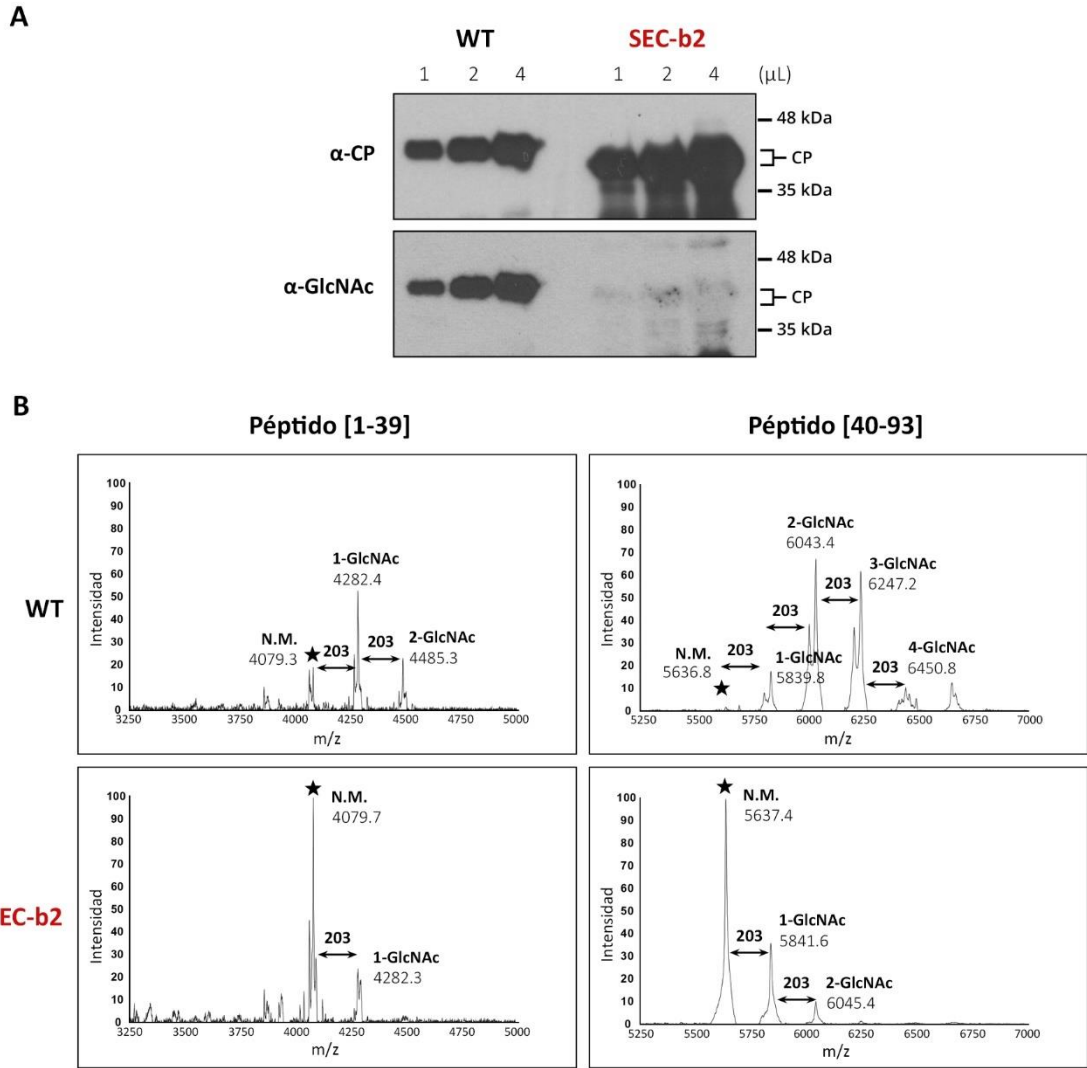


Figura IV.2. *O*-GlcNAcilación de la CP de viriones de PPV-R obtenidos a partir de plantas infectadas de *N. benthamiana* WT y SEC-b2. **(A)** Análisis de *Western Blot* utilizando cantidades similares de viriones de PPV-R purificados desde los dos tipos de plantas. La misma membrana se incubó consecutivamente con anticuerpos específicos para detectar residuos *O*-GlcNAc y la CP del PPV. A la derecha se muestra la escala de pesos moleculares (y la ventana de pesos moleculares que ocuparían las distintas especies de CP). **(B)** Espectros MALDI-TOF que cubren la región de la proteína que contiene los péptidos [1-39] y [40-93]. Se muestran los ratios *m/z* asignados a los picos relevantes, así como el número de residuos *O*-GlcNAc predichos para cada especie peptídica. Las estrellas señalan los iones precursoros N.M. que se corresponden con los péptidos trípticos [1-39] y [40-93].

En los péptidos [1-39] y [15-39] la fosforilación de la S25 se detectó sola o en combinación con la *O*-GlcNAcilación de la T24 o con la de las T24 y T19 (**Tabla IV.2**). Esta coexistencia indica que ambas MPT son compatibles y pueden afectar al mismo tiempo a la región N-terminal de la CP de PPV-R. Aunque la comparación de las intensidades de las diferentes especies peptídicas detectadas en el iTRAQ debe hacerse con cautela (ver más arriba), el hecho de que en todos los casos el ratio de especies fosforiladas frente a no fosforiladas fuera notablemente menor para los péptidos *O*-GlcNAcilados (0.04-0.06) que para los péptidos que no lo estaban (0.14-0.11), sugiere la existencia de algún tipo de *cross-talk* entre ambas MPT (**Fig. IV.4**). Esta idea se ve apoyada por los datos

obtenidos cuando se comparan los niveles de fosforilación de la S25 en los dos tipos de plantas, ya que el ratio de intensidad de especies con S25 fosforilada frente al del conjunto de especies de los péptidos [1-39] y [15-39] fue notablemente menor en los viriones obtenidos de plantas silvestres que en los obtenidos de plantas SEC-b2 (4.4 % frente a 8.8 %) (**Fig. IV.4**).

Tabla IV.2. Listado completo de los valores de intensidad obtenidos en el análisis iTRAQ

Péptido	Especie detectada	Condición 1		Condición 2	
		WT (1)	WT (2)	SEC-b2 (1)	SEC-b2 (2)
[1-14]	N.M.	1 169.00	2 968.00	1 011.12	1 064.32
[1-39]	gT19	2 828.29	3 611.45	1 375.79	933.02
	gT24	78 838.49	100 719.30	36 222.15	27 040.93
	gT19; gT24	47 829.83	77 379.81	10 004.27	1 995.93
	gT24; pS25	3 396.21	3 855.86	2 221.06	1 782.11
	gT19; gT24; pS25	1 668.49	2 687.84	618.58	281.10
	pS25	1 897.48	2 170.81	11 133.70	8 952.59
	N.M.	15 495.15	14 229.38	108 585.13	74 829.97
[15-39]	gT19	288.27	635.28	358.30	234.91
	gT24	120.42	209.46	156.56	108.68
	gT19; gT24	1 301.54	1 711.08	671.74	682.11
	gT24; pS25	0.00	0.00	0.00	0.00
	gT19; gT24; pS25	0.00	0.00	0.00	0.00
	pS25	81.97	63.11	9.59	13.54
	N.M.	37.66	115.58	405.77	358.71
[40-59]	gT41	0.00	0.00	0.00	0.00
	gT50	1 913.32	3 250.40	3 261.45	4 286.55
	gT51	0.00	0.00	0.00	0.00
	gT53	875.68	2 150.90	1 924.47	2 526.28
	gT54	0.00	0.00	0.00	0.00
	gT58	0.00	0.00	0.00	0.00
	gT41; gT50	10 483.58	27 401.11	2 237.63	2 102.39
	gT50; gT53	865.90	1 593.82	279.02	423.84
	gT53; gT54	325.24	699.47	192.55	106.42
	gT41; gT50; gT53	1 580.73	3 352.99	275.13	206.75
	N.M.	947.44	1 001.30	17 592.30	18 772.02
[40-93]	gT41	0.00	0.00	0.00	0.00
	gT50	0.00	0.00	0.00	0.00
	gT51	0.00	0.00	0.00	0.00
	gT53	13.79	46.69	88.53	13.54
	gT54	0.00	0.00	0.00	0.00

	gT58	57.42	70.76	82.87	13.54
	gS65	47.75	452.20	2 089.44	1 431.13
	gT50; gT53	368.43	651.91	556.27	266.13
	gT53; gT54	0.00	0.00	0.00	0.00
	gS65; gT50; gT53; gT54	120.09	210.56	171.84	13.54
	gS65; gT53; pS81	13.79	128.56	81.57	13.54
	gS65; gT50; gT58; pS81	13.79	278.53	65.81	13.54
	gT58; pS81	78.32	203.19	290.85	260.39
	gS65; pS81	13.79	10.71	479.53	422.67
	pS81	120.39	98.26	1 313.37	968.44
	N.M.	61.54	137.46	3 531.62	2 062.50
[60-93]	gS65	146.81	150.99	90.69	102.94
	pS81	149.89	282.16	287.48	147.20
	N.M.	181.99	461.13	907.71	529.70
[60-95]	gS65	170.39	700.16	135.40	16.37
	pS81	13.79	120.90	233.55	105.44
	N.M.	128.19	426.69	1 145.37	458.50
[60-109]	pS81	0.00	0.00	0.00	0.00
	pS101	0.00	0.00	0.00	0.00
	gS65	137.69	381.38	104.28	87.37
	N.M.	277.45	780.70	2 226.39	1 062.38
[94-109]	pS101	218.22	287.48	398.84	258.02
	N.M.	9 112.00	13 350.84	15 197.62	9 463.33
[96-109]	pS101	177.56	268.08	302.50	272.44
	N.M.	31 821.81	37 425.74	49 027.01	33 811.49
[112-121]	pS118	2 211.01	2 599.66	1 848.47	2 424.42
	N.M.	0.00	0.00	0.00	0.00

La tabla muestra los valores de intensidad obtenidos en el análisis iTRAQ de viriones de PPV-R purificados a partir de plantas infectadas de *N. benthamiana* WT (Condición 1) y SEC-b2 (Condición 2). Se utilizaron dos réplicas biológicas por cada condición. Se recuperaron péptidos N.M., O-GlcNAcildados (g) o fosforilados (p). Algunas de las especies peptídicas listadas en la tabla se encontraban también modificadas por un grupo acetilo en N-terminal (péptidos [1-14] y [1-39]), o contenían un residuo de metionina oxidado (péptidos [40-59], [40-93] y [112-121]). Todos los datos sin procesar obtenidos en el iTRAQ se encuentran disponibles en el repositorio *ProteomeXchange* (identificador PXD006159).

La fosforilación de la S81 se detectó en los péptidos [40-93], [60-93] y [60-95], tanto en plantas silvestres como en plantas SEC-b2 (**Tabla IV.2**). El nivel de fosforilación, estimado como el ratio de la suma de los valores de intensidad de las especies con S81 fosforilada de estos tres péptidos con respecto a la del conjunto de sus especies, fue similar en las muestras que provenían de plantas silvestres y SEC-b2 (**Fig. IV.5**). El hecho de que las formas glicosiladas de estos péptidos (fosforilados

o no fosforilados) se detectaran con poca frecuencia en este experimento iTRAQ, hace que estos datos deban ser interpretados con prudencia.

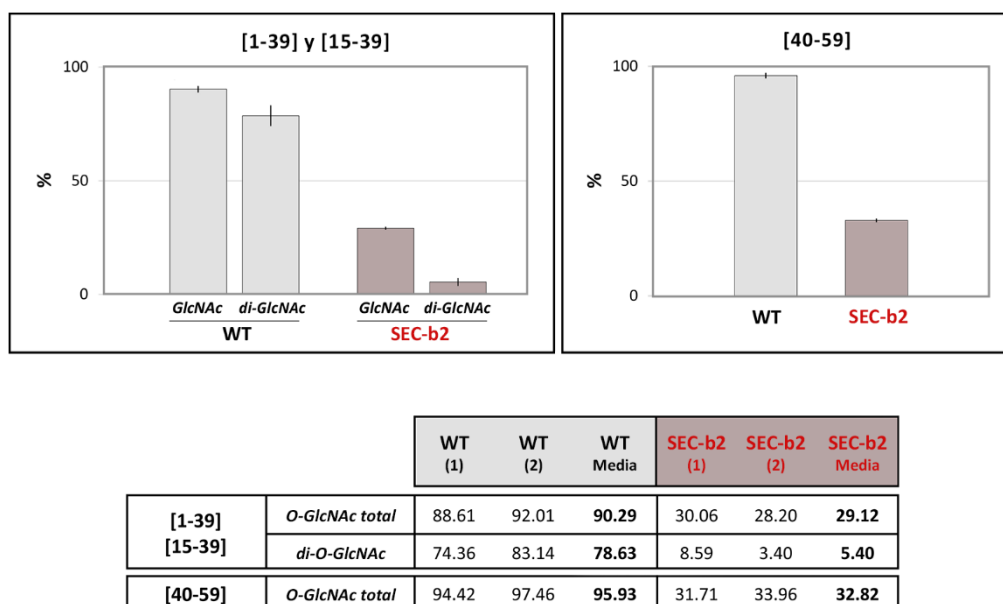
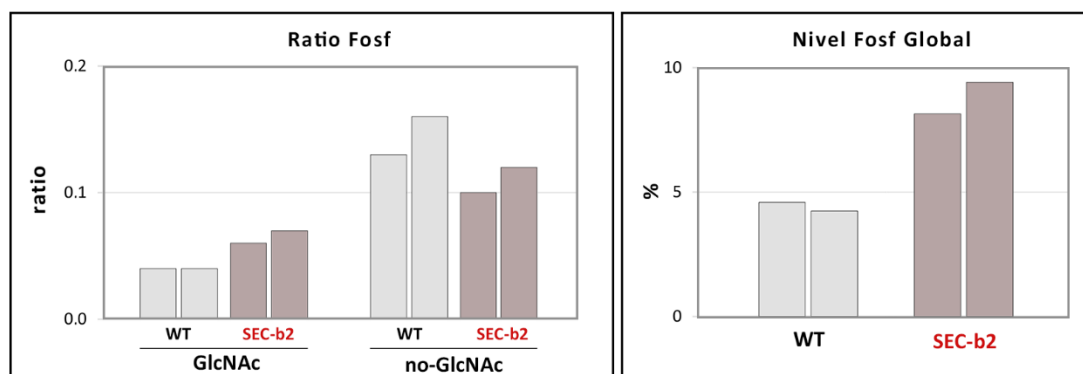


Figura IV.3. Disminución de O-GlcNAcilación de la CP de PPV-R en plantas SEC-b2. Los porcentajes fueron calculados como la suma de los valores de intensidad obtenidos en el análisis iTRAQ para todas las especies O-GlcNAciladas (O-GlcNAc total) o para las especies di-O-GlcNAciladas (di-O-GlcNAc), divididos en cada caso por la suma de los valores de intensidad de todas las especies peptídicas que se especifican. La tabla muestra el valor obtenido para cada réplica biológica de viriones purificados a partir de plantas de *N. benthamiana* WT y SEC-b2 infectadas, y la correspondiente media. Los valores promedio se representan en los histogramas y los rangos de valores se muestran como líneas verticales en cada barra.

La diana de fosforilación S101 apareció representada en los péptidos [94-109] y [96-109], los cuales no contienen sitios en los que se predigan O-GlcNAcilaciones. Se detectaron formas fosforiladas de ambos péptidos, pero con mucha menor intensidad que sus especies no modificadas y a niveles similares en plantas silvestres y SEC-b2 (**Fig. IV.5**).

El péptido [112-121] es el único capaz de albergar la fosforilación en la S118 que pudo ser identificado con certeza en el análisis iTRAQ (**Tabla IV.2**). Todas las especies de este péptido que se detectaron se encontraron fosforiladas, lo que podría sugerir que la S118 siempre está fosforilada cuando la CP se encuentra formando viriones. No obstante, este péptido contiene una lisina (K116, **Fig. IV.6**) y es, por tanto, un producto de digestión parcial del tratamiento con Lys-C y tripsina. Una posible explicación de esta proteólisis incompleta es que justamente la fosforilación de la S118 esté obstaculizando el corte de la enzima en el residuo K116. No se puede descartar la posibilidad de que el péptido [117-121], completamente digerido, se genere y no se detecte, pues su tamaño sería demasiado pequeño para poder dar lugar a una cantidad suficiente de fragmentos ionizados que permita una identificación fiable por MS/MS. En cualquier caso, la similitud de las intensidades de las especies peptídicas fosforiladas del péptido [112-121] en muestras provenientes de plantas

silvestres y SEC-b2 (**Tabla IV.2**), sugiere que la fosforilación de la S118 no se altera al cambiar los niveles de *O*-GlcNAcilación de la proteína.

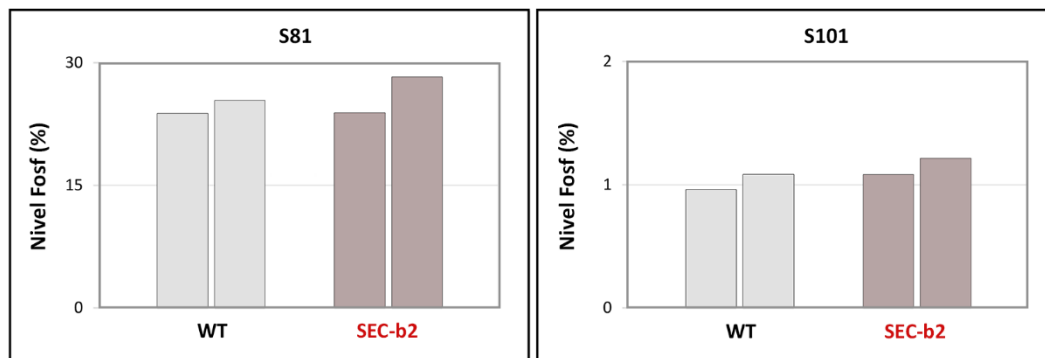


[1-39] y [15-39]		WT (1)	WT (2)	WT Media	SEC-b2 (1)	SEC-b2 (2)	SEC-b2 Media
Ratio Fosf Específico	GlcNAc	0.04	0.04	0.04	0.06	0.07	0.06
	no-GlcNAc	0.13	0.16	0.14	0.10	0.12	0.11
Nivel Fosf Global (%)		4.58	4.23	4.40	8.14	9.41	8.75

Figura IV.4. Efecto que provoca el descenso de *O*-GlcNAcilación sobre el nivel de fosforilación de la S25 en la CP de PPV-R. La tabla muestra los ratios de los valores de intensidad obtenidos en el análisis iTRAQ de las especies fosforiladas que contienen a la diana S25 respecto a las de las especies no fosforiladas de los péptidos [1-39] y [15-39]. Se comparan las especies que están adicionalmente *O*-GlcNAciladas (GlcNAc) o no glicosiladas (no-GlcNAc). En la tabla también se comparan los porcentajes de los valores de intensidad de las especies fosforiladas con respecto a todas las especies de los péptidos [1-39] y [15-39] (Nivel Fosf Global). Se muestra el valor obtenido con cada réplica biológica de viriones purificados a partir de plantas infectadas de *N. benthamiana* WT y SEC-b2, así como la correspondiente media. Los valores individuales se representan en los histogramas (parte superior).

Para confirmar el efecto de la *O*-GlcNAcilación en la fosforilación de la S25 mediante el uso de una técnica adicional, se realizó un ensayo de cuantificación sin marcaje (LFQ) comparando la abundancia de las especies fosforiladas y/o *O*-GlcNAciladas del péptido [1-39] en viriones de PPV-R purificados a partir de plantas silvestres y SEC-b2 (**Tabla IV.3**). Los resultados confirmaron los bajos niveles de *O*-GlcNAcilación del péptido [1-39] en plantas SEC-b2 con respecto a la condición silvestre (8.3 % frente a 75.0 %); y, lo que es más interesante, el nivel de fosforilación del péptido [1-39] era más de dos veces superior en los viriones de PPV-R producidos en plantas deficientes en SEC que en aquellos obtenidos a partir de plantas silvestres (5.5 % frente a 2.3 %).

Estos resultados confirman que la *O*-GlcNAcilación y la fosforilación pueden coexistir en la misma molécula de CP, pero también indican que la *O*-GlcNAcilación de la proteína afecta a su fosforilación, aparentemente de manera diferente en las distintas fosfo-dianas.



	WT (1)	WT (2)	WT Media	SEC-b2 (1)	SEC-b2 (2)	SEC-b2 Media
Nivel Fosf en S81 (%) [40-93] [60-93] [60-95]	23.75	25.33	24.53	23.82	28.24	25.94
Nivel Fosf en S101 (%) [94-109] [96-109]	0.96	1.08	1.02	1.08	1.21	1.14

Figura IV.5. Efecto que tiene el descenso de *O*-GlcNAcilación sobre los niveles de fosforilación de la S81 y la S101 de la CP de PPV-R. La tabla compara el porcentaje de los valores de intensidad de las especies fosforiladas (Nivel Fosf) con respecto al de todas las especies peptídicas que contienen la S81 (péptidos [40–93], [60–93] y [60–95]) o la S101 (péptidos [94–109] y [96–109]). Se muestra el valor obtenido con cada réplica biológica de viriones purificados a partir de plantas infectadas de *N. benthamiana* WT y SEC-b2, así como la correspondiente media. Los valores individuales se representan en los histogramas (parte superior).

IV.1.3. Alterar la capacidad de la CP de PPV-R de ser fosforilada, sobre todo en la S118, afecta notablemente a la infección viral

Para evaluar la influencia del estado de fosforilación de la mitad N-terminal de la CP en la infección de PPV-R, los cuatro residuos fosforilables inicialmente mapeados, S25, S81, S101 y S118, fueron reemplazados por residuos de alanina (mutante 4SA), para prevenir la fosforilación, o de ácido aspártico (mutante 4SD), para emular un estado de fosforilación constitutiva. Estas mutaciones fueron introducidas en los clones de cDNA que codifican el genoma completo del virus, pICPPV-NK-IGFP (4SA, 4SD) y pICPPV-5'BD-GFP (sf-4SA, sf-4SD), adecuados para la infección de plantas herbáceas y plántulas de *Prunus*, respectivamente (**Fig. IV.6**). Los virus derivados de ambos tipos de vectores expresan una versión recombinante de la GFP, que facilita la monitorización de la infección.

IV.1.3.1. Emular la fosforilación en la mitad N-terminal de la CP causa fuertes efectos deletéreos en la infección por PPV-R en *N. benthamiana*

Inicialmente se inocularon plantas de *N. benthamiana* mediante bombardeo con el cDNA de los vectores 4SA y 4SD, así como con el del virus silvestre (WT), detectándose infección en hojas superiores a las inoculadas en un número variable de plantas dependiendo del virus utilizado como inóculo (5/10 para WT, 8/10 para 4SA y 2/9 para 4SD). Además de mostrar una infectividad más baja,

el mutante 4SD se acumuló en menor cantidad que los virus 4SA y WT (**Fig. IV.7**). La estabilidad de los cambios introducidos en los mutantes 4SA y 4SD fue confirmada a partir de la amplificación y posterior secuenciación de un fragmento de cDNA de la región codificadora de la CP, que se llevó a cabo mediante IC-RT-PCR.

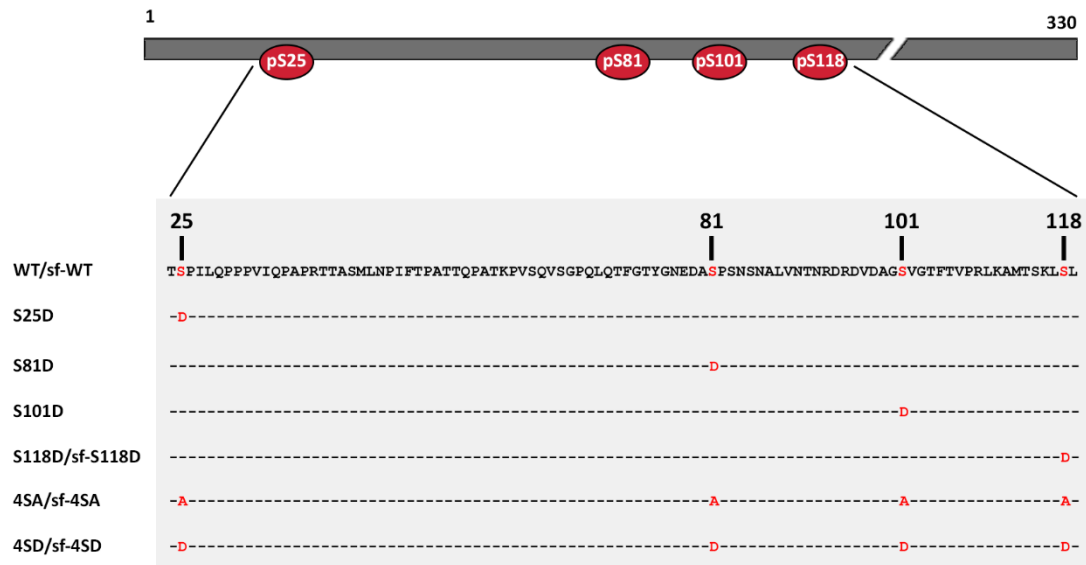


Figura IV.6. Esquema de la mitad N-terminal de la CP de PPV-R, en el que se muestran las mutaciones introducidas en los residuos de serina 25, 81, 101 y 118 en los clones de cDNA que codifican el genoma completo del virus. El prefijo "sf" se refiere a construcciones basadas en el plásmido pICPPV-NK-5'BD, utilizado para la inoculación de hospedadores leñosos, mientras que la ausencia de prefijo hace referencia a construcciones basadas en el plásmido pICPPV-NK-IGFP que infecta especies herbáceas. Los residuos mutados en las posiciones 25, 81, 101 y 118 se muestran en rojo. Las fosforilaciones en las cuatro dianas de serina fosforilables se representan como elipses rojas en el esquema de la parte superior de la imagen.

A continuación, se inocularon manualmente nuevas plantas de *N. benthamiana* utilizando extractos de hojas sistémicamente infectadas, obtenidos a partir de las plantas previamente bombardeadas. Como inóculo del mutante 4SD se empleó un extracto ocho veces más concentrado que los de los virus 4SA y WT, para así compensar su menor acumulación en las primeras plantas infectadas. Mientras que el mutante 4SA no mostró diferencias respecto al virus silvestre, las plantas inoculadas con el mutante 4SD mostraron síntomas sistémicos que aparecieron más tarde y fueron más leves que los de las plantas infectadas con los otros dos virus. En contraste con los resultados obtenidos en la inoculación por bombardeo, no se observaron grandes diferencias en la acumulación viral en las plantas infectadas con los virus WT, 4SA y 4SD (datos no mostrados). El estudio de la progenie viral de varias plantas infectadas con los virus 4SA o 4SD no mostró alteraciones en las mutaciones iniciales. Sin embargo, al analizarse dos de las cuatro plantas infectadas con el virus 4SD, se detectaron nuevas mutaciones en posiciones alejadas de los sitios inicialmente mutagenizados (Y266F en una de las plantas y T254K en la otra) (**Fig. IV.8**).

Tabla IV.3. Cuantificación sin marcaje de la O-GlcNAcilación y fosforilación del péptido [1-39] de la CP de PPV-R en plantas WT y SEC-b2

Especie detectada	WT	SEC-b2
No modificado	4.83E+09	2.92E+10
GlcNAc	5.44E+09	2.68E+09
2GlcNAc	7.24E+09	2.85E+08
Acetil	1.73E+09	1.33E+10
Acetil+ GlcNAc	3.86E+09	1.13E+09
Acetil+ 2GlcNAc	2.49E+09	N.D.
GlcNAc + Fosf	5.14E+08	N.D.
2GlcNAc + Fosf	7.51E+07	N.D.
Fosf	N.D.	2.17E+09
Acetil+ Fosf	N.D.	5.67E+08
Intensidad total	2.62E+10	4.94E+10
Intensidad GlcNAc	1.96E+10	4.10E+09
Intensidad Fosf	5.89E+08	2.73E+09
% GlcNAc	74.96	8.29
% Fosf	2.25	5.53

La tabla muestra los resultados obtenidos con viriones del PPV purificados a partir de plantas de *N. benthamiana* WT y SEC-b2, digeridos con las proteasas Lys-C y tripsina y sometidos a MS utilizando un analizador LTQ Orbitrap. Los cromatogramas de los iones extraídos (XIC) se generaron en todos los estados precursores de carga observables para las diferentes formas modificadas del péptido [1-39]. Se determinó el área XIC para cada forma modificada y se utilizó posteriormente en el cálculo de la abundancia relativa. Especies no detectadas (N.D.).

Para caracterizar mejor el fenotipo del mutante 4SD, se realizó una nueva ronda de infección usando como inóculo un extracto de hojas sistémicamente infectadas con este virus, procedente de aquellas plantas cuya progenie viral no había sufrido alteraciones en la secuencia inicial de la CP. En este ensayo, todas las plantas inoculadas resultaron infectadas y el tejido de hojas superiores a las inoculadas se analizó a distintos dpi. A los 10 dpi, las plantas inoculadas con los virus WT y 4SA mostraron síntomas claros de infección, abundante expresión de GFP y niveles similares de acumulación viral estimados por *Western Blot* anti-CP (**Fig. IV.9**). A este mismo tiempo, las plantas inoculadas con el mutante 4SD no exhibieron síntomas, expresión de GFP o acumulación viral alguna (**Fig. IV.9**). A los 15 dpi comenzaron a aparecer síntomas sistémicos leves en las plantas inoculadas con el virus 4SD; y a los 24 dpi, la expresión de GFP y la acumulación de la CP viral era patente (bastante variable entre plantas), aunque continuaba siendo inferior con respecto a la observada en las plantas inoculadas con 4SA y WT (**Fig. IV.9**). En este caso no se encontraron mutaciones espontáneas al analizar la secuencia de la CP obtenida a partir de cuatro plantas individuales infectadas con el mutante 4SD.

Los resultados descritos en esta sección indican que la mimetización de fosforilación en la mitad N-terminal de la CP de PPV-R retrasa la infección y fomenta la selección de segundas mutaciones

potencialmente compensatorias, mientras que la falta de fosforilación no parece acarrear efectos notables en la infección viral.

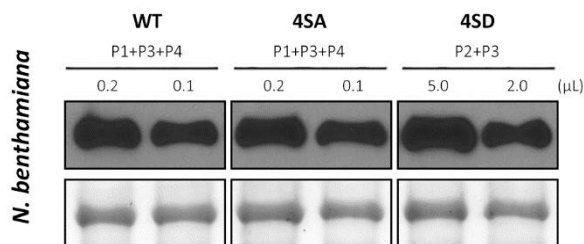


Figura IV.7. Acumulación de PPV-R silvestre (WT) y de los mutantes del virus (4SA y 4SD) afectados en los cuatro residuos de serina de la CP susceptibles de ser fosforilados. Plantas de *N. benthamiana* se inocularon por bombardeo con los distintos cDNA virales y las hojas sistémicamente infectadas se recogieron a los 21 dpi, mezclándose algunas de las plantas infectadas y analizándose sus extractos crudos por *Western Blot* para la detección específica de la CP del PPV. Se indican los virus inoculados, las plantas que se mezclaron para el análisis y los volúmenes cargados de cada extracto. La señal de la RuBisCO (ribulosa-1,5-bisfosfato-carboxilasa/oxigenasa) teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga.

IV.1.3.2. Emular la fosforilación en la mitad N-terminal de la CP de PPV-R resulta deletéreo para la infección en otras especies herbáceas y es letal en el huésped natural *P. persica*

Para buscar posibles efectos específicos del huésped, que pudieran afectar a la infección por PPV cuando se impide o emula la fosforilación de su CP, se seleccionó otro huésped herbáceo susceptible de infectarse sistémicamente por el virus, *N. clevelandii*, así como un huésped herbáceo al que el PPV solo causa lesiones locales, *C. foetidum*, y uno de sus huéspedes naturales, *P. persica*.

Se inocularon manualmente plantas de *N. clevelandii* empleando extractos procedentes de hojas de *N. benthamiana* sistémicamente infectadas con los virus 4SA, 4SD y WT. A los 10 dpi se observaron síntomas claros de infección en las plantas inoculadas con los virus 4SA y WT. El análisis por *Western Blot* anti-CP detectó niveles similares de acumulación viral en estas plantas. Al igual que ocurría en *N. benthamiana*, a ese tiempo no se observaron síntomas ni se detectó acumulación viral en las plantas inoculadas con 4SD, aunque a los 24 dpi sí pudo visualizarse fácilmente acumulación del mutante en este huésped (**Fig. IV.10A, B**).

En *C. foetidum*, el mutante 4SA causó lesiones necróticas locales similares a las producidas por el virus WT. El mutante 4SD también fue capaz de infectar *C. foetidum*; sin embargo, en su caso se desarrollaron lesiones más leves y mucho menos numerosas, que aparecieron más tarde que las de los virus 4SA y WT (**Fig. IV.10C**).

Para evaluar si la alteración de la fosforilación de la CP tenía algún efecto en la infección de un huésped natural del PPV, se inocularon por bombardeo plántulas de *P. persica* con los cDNAs sf-4SA, sf-4SD y sf-WT. Al igual que ocurría en los huéspedes herbáceos, el mutante 4SA mostró niveles de infectividad, patogenicidad y acumulación viral similares a los del virus silvestre (**Fig. IV.11 y Tabla**

IV.4). En cuanto a las plantas inoculadas con el mutante 4SD, en ninguna de ellas se observaron síntomas de infección, fluorescencia procedente de la expresión de GFP o se detectó acumulación viral en el análisis *Western Blot* anti-CP (Fig. IV.11).

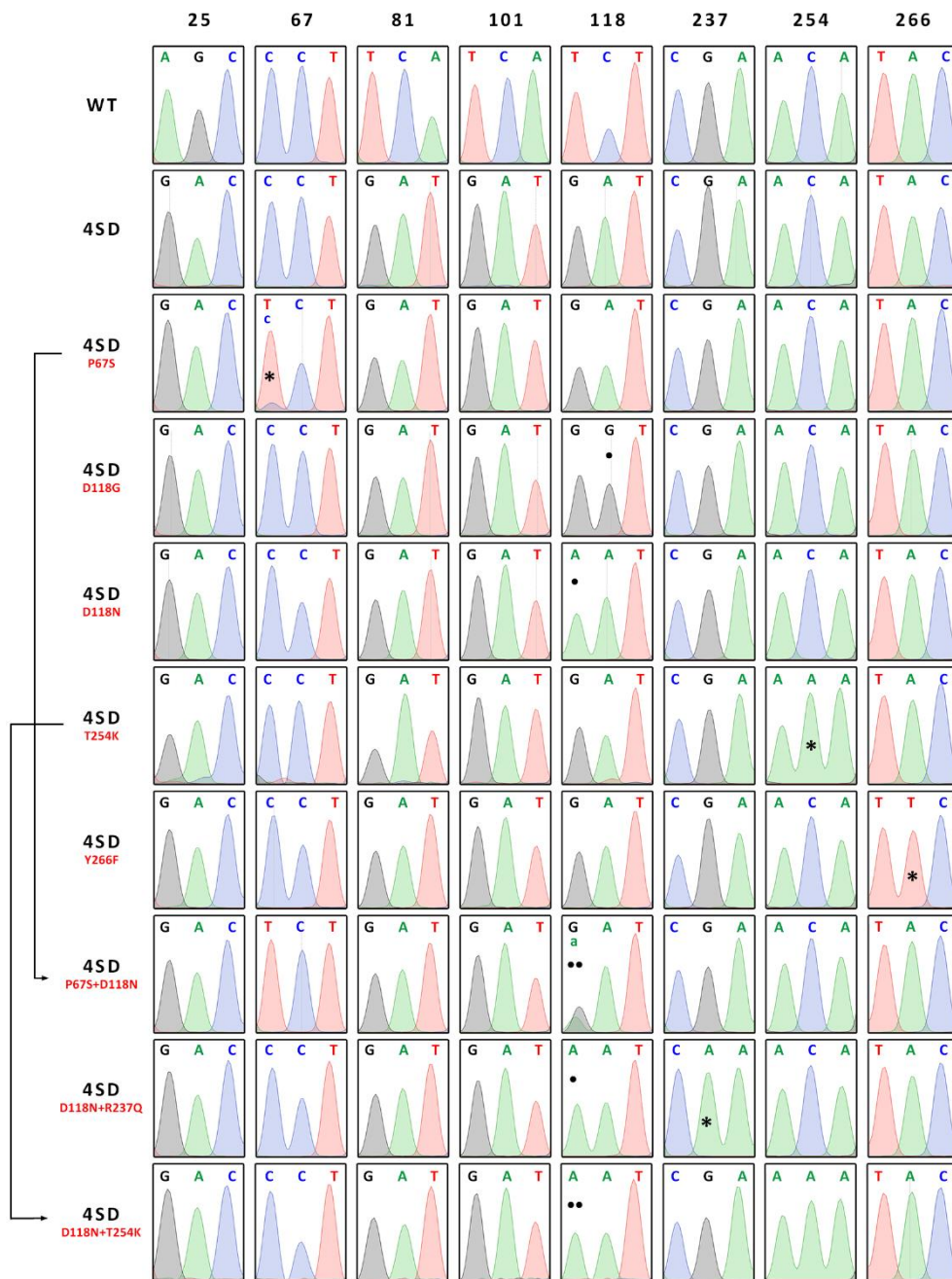


Figura IV.8. Mutaciones espontáneas detectadas en la progenie viral de un mutante de PPV-R en el que se reemplazaron las serinas fosforilables 25, 81, 101 y 118 de la CP por ácidos aspárticos (mutante 4SD). La progenie viral de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con el mutante 4SD se analizó mediante amplificación por IC-RT-PCR y secuenciación de un fragmento de cDNA que abarca la secuencia codificante completa de la CP. Los cromatogramas muestran las mutaciones secundarias que afectan a tripletes que originalmente codificaban a los residuos P67, R237, T254, Y266 (*), además de a una de las cuatro serinas fosforilables de la CP de PPV-R, S118 (•). En la parte superior se indican todas las posiciones de interés en el virus silvestre (WT), así como el resto de serinas fosforilables alteradas en el mutante 4SD, en las que no se detectaron mutaciones espontáneas (S25D, S81D y S101D). Las flechas indican que algunos de los mutantes espontáneos evolucionaron introduciendo una segunda mutación en la posición 118 (••). La letra “c” más pequeña en la posición 67 del mutante 4SD^{P67S} indica que el virus 4SD se detectó en menor proporción y coexistiendo junto con el mutante espontáneo.

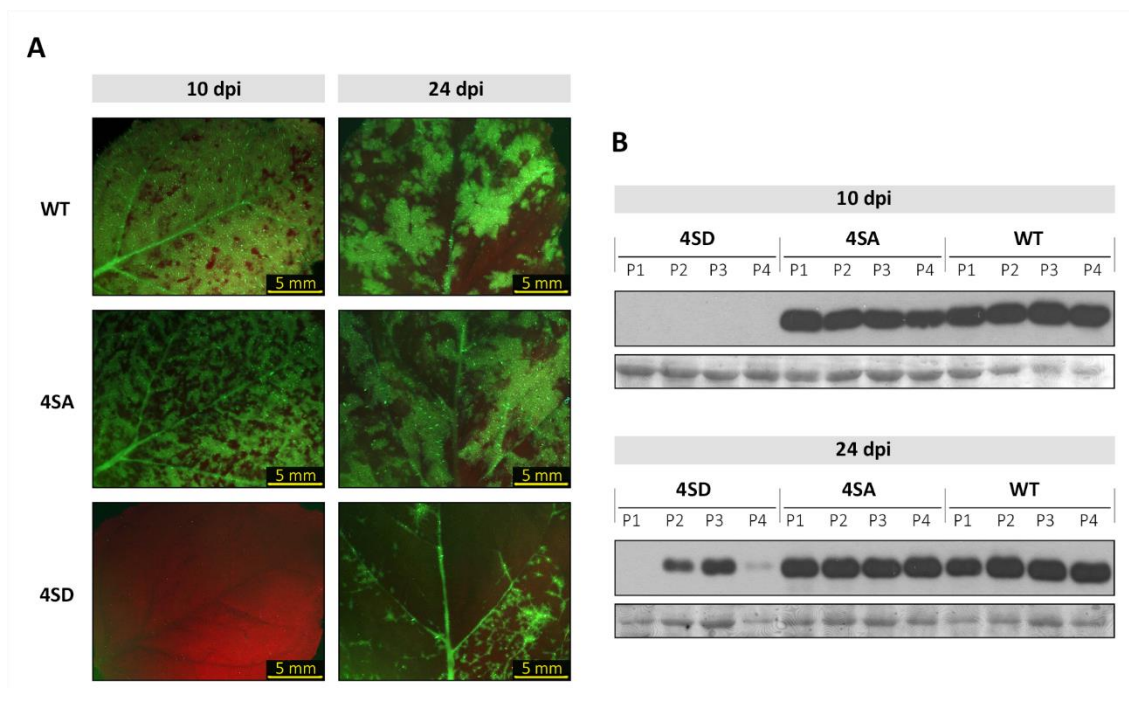


Figura IV.9. Infección de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PPV-R silvestre (WT) o con mutantes que presentan cambios que previenen (4SA) o emulan (4SD) la fosforilación de la CP en los residuos de serina 25, 81, 101 y 118. Las plantas fueron inoculadas manualmente con extractos de hojas también de *N. benthamiana* sistémicamente infectadas. **(A)** Imágenes tomadas a los 10 o 24 dpi bajo un microscopio de epifluorescencia, correspondientes a hojas superiores a las inoculadas, de plantas infectadas con los virus que se indican. Barras, 5 mm. **(B)** Análisis *Western Blot* para la detección específica de la CP del PPV en extractos de proteínas totales procedentes de hojas superiores a las inoculadas de cuatro plantas individuales infectadas con los virus indicados. Las muestras fueron analizadas a los 10 y 24 dpi. La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga.

Estos resultados indican que la emulación de un estado de fosforilación constitutiva en la mitad N-terminal de la CP afecta a la infección por PPV en todas las especies de plantas analizadas, teniendo un efecto deletéreo más acusado en el huésped natural *P. persica*.

IV.1.3.3. Impedir la fosforilación en las dianas específicas de serina de la CP de PPV-R reduce la eficacia biológica del virus

Con el objetivo de buscar posibles efectos sutiles en la eficiencia de la infección viral causados por impedir la fosforilación de la CP de PPV-R, se llevaron a cabo experimentos de competición del mutante 4SA con el virus silvestre en infecciones de plantas de *N. benthamiana* y *N. clevelandii*. Se utilizaron como inóculo mezclas de extractos de hojas de plantas de *N. benthamiana* sistémicamente infectadas con ambos virus, en los que el mutante estaba en exceso (1 : 0.6 o 1 : 0.4). A los 14 dpi, el análisis de la progenie viral mediante amplificación por RT-PCR y secuenciación de un fragmento de cDNA correspondiente a la región codificante de la CP detectó en solitario al mutante 4SA en las cuatro plantas de *N. benthamiana* y en una de las de *N. clevelandii* inoculadas (**Fig. IV.12**, panel izquierdo). Este resultado confirma que la

competitividad del mutante no es mucho menor que la del virus silvestre. Sin embargo, a pesar de su menor representación en el inóculo, el virus WT se detectó en tres de las plantas de *N. clevelandii* inoculadas, siendo el único virus encontrado en dos de ellas (Fig. IV.12, panel izquierdo). Esto podría estar sugiriendo que la eficacia biológica del mutante 4SA es ligeramente menor que la del virus silvestre.

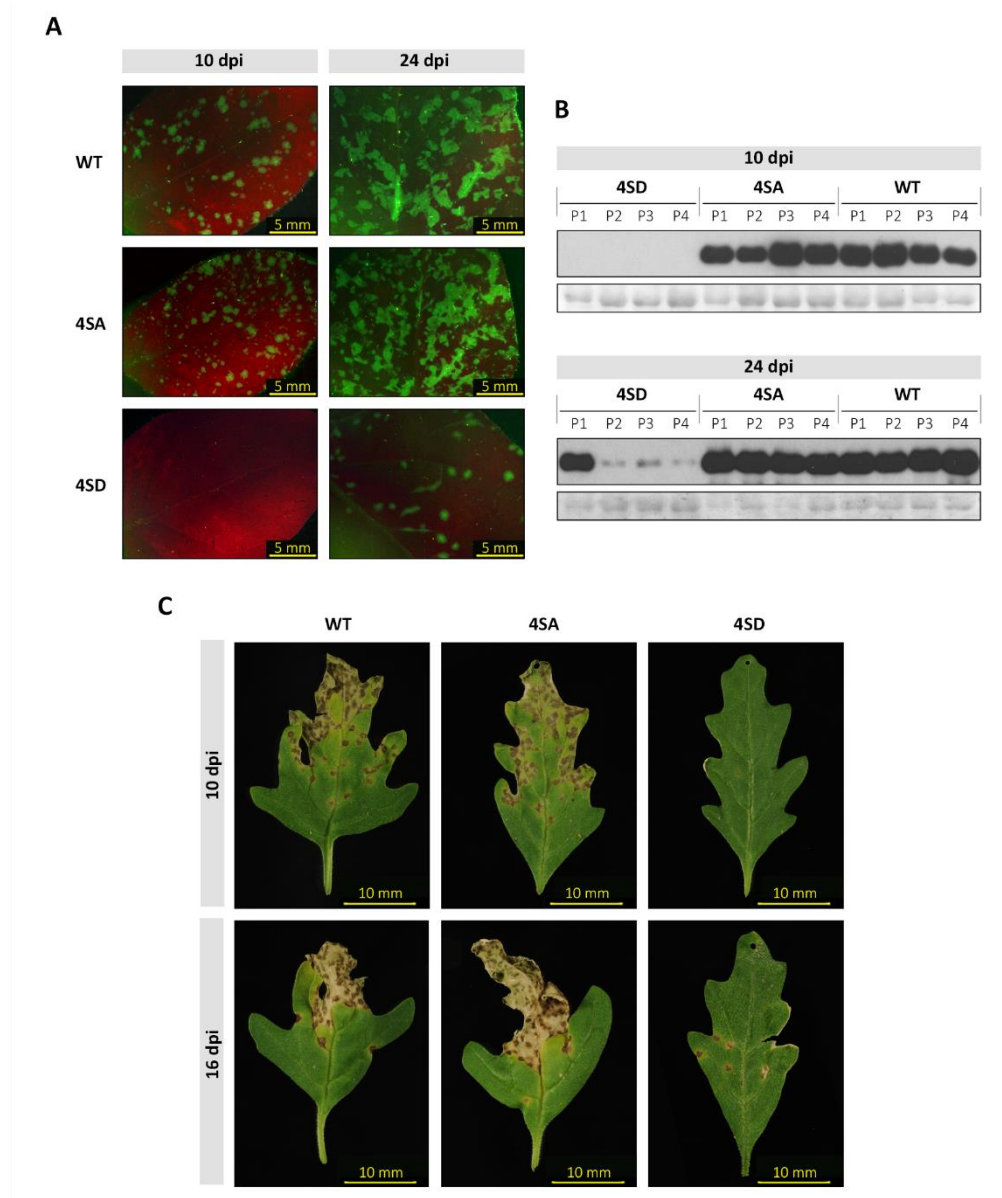


Figura IV.10. Infección de plantas de *N. clevelandii* y *C. foetidum* con el PPV-R silvestre (WT) o con mutantes que presentan cambios que previenen (4SA) o emulan (4SD) la fosforilación de la CP en los residuos de serina 25, 81, 101 y 118. Las plantas fueron inoculadas manualmente con extractos de hojas sistémicamente infectadas, obtenidas a partir de plantas de *N. benthamiana* previamente infectadas mediante inoculación manual. **(A)** Imágenes de hojas superiores a las inoculadas de plantas de *N. clevelandii* que fueron inoculadas con los virus indicados, tomadas bajo un microscopio de epifluorescencia a los 10 o 24 dpi. Barra, 5 mm. **(B)** Análisis *Western Blot* para la detección específica de la CP del PPV en extractos crudos de hojas superiores a las inoculadas de cuatro plantas individuales inoculadas con los virus indicados. Las muestras fueron recogidas a los 10 y 24 dpi. La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga. **(C)** Imágenes de hojas de *C. foetidum* inoculadas con los virus indicados y tomadas bajo luz visible a los 10 y 16 dpi. Barra, 10 mm.

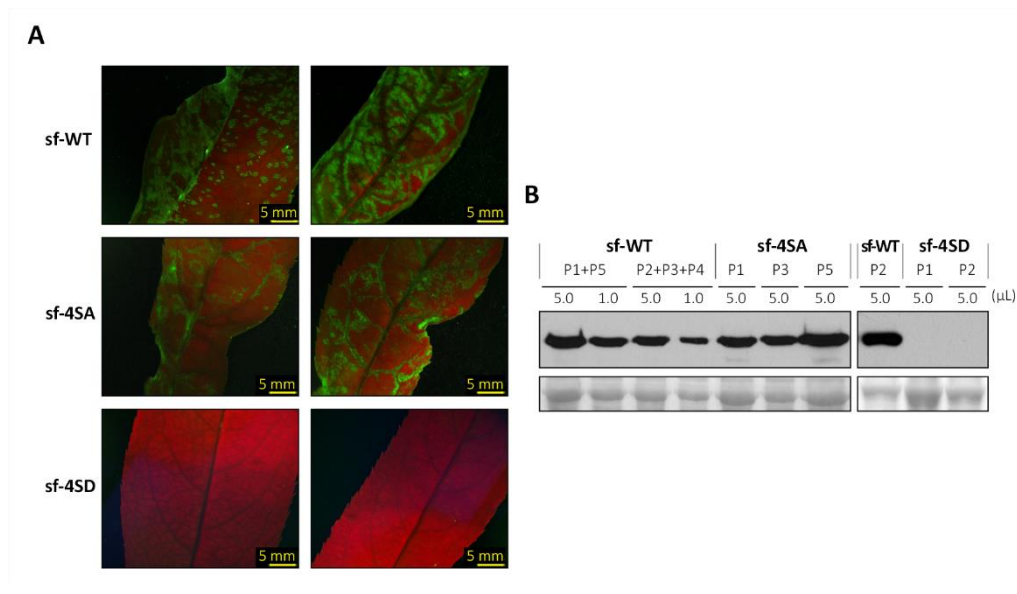


Figura IV.11. Inoculación mediante bombardeo de plantas de *P. persica* con el virus silvestre (sf-WT) o con mutantes en los cuales se impide (sf-4SA) o mimetiza (sf-4SD) la fosforilación en las serinas 25, 81, 101 y 118 de la CP de PPV-R. **(A)** Imágenes de hojas superiores a las inoculadas obtenidas bajo un microscopio de epifluorescencia a los 21 dpi. Barra, 5 mm. **(B)** Análisis *Western Blot* para la detección específica de la CP del PPV en extractos crudos de hojas superiores a las inoculadas de plantas individuales, o mezclas de ellas, recogidas a los 21 dpi. Los virus inoculados, las plantas analizadas y los volúmenes de extractos cargados aparecen indicados. La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga.

Para testar esta posibilidad, se inocularon cuatro nuevas plantas de *N. benthamiana* y tres de *N. clevelandii* con un extracto de las hojas sistémicamente infectadas procedente de la planta de *N. clevelandii* en la que los virus 4SA y WT parecían coexistir a niveles similares (planta 2 del inóculo 1 : 0.6, **Fig. IV.12**, panel izquierdo). Al analizar las poblaciones virales presentes en estas plantas mediante RT-PCR y posterior secuenciación, se observó que el virus WT se había impuesto al mutante 4SA en una de las plantas de *N. benthamiana* inoculadas, al tiempo que en el resto de plantas la población del mutante parecía ser mucho menos abundante que en el extracto utilizado como inóculo (**Fig. IV.12**, panel derecho).

Tabla IV.4 Infectividad en *P. persica* de variantes del PPV que contienen la CP no mutada de PPV-R (sf-WT) o sus versiones mutagenizadas en las cuales se han introducido cambios que previenen (sf-4SA) o mimetizan (sf-4SD y sf-S118D) fosforilaciones en la proteína

Inóculo ^a	Ensayo No. 1*	Ensayo No. 2*
sf-WT	5/5	5/5
sf-4SA	4/5	-
sf-4SD	0/5	0/9
sf-S118D	-	5/5

^aLas plantas se inocularon biolísticamente con cDNA de los clones indicados

*Plantas infectadas/plantas inoculadas

Por consiguiente, el resultado de los experimentos de competición sugiere que, aunque las mutaciones que impiden la fosforilación de la CP no causan efectos drásticos en la infección de PPV-R, sí que pueden reducir ligeramente la eficacia biológica del virus en especies de *Nicotiana*.

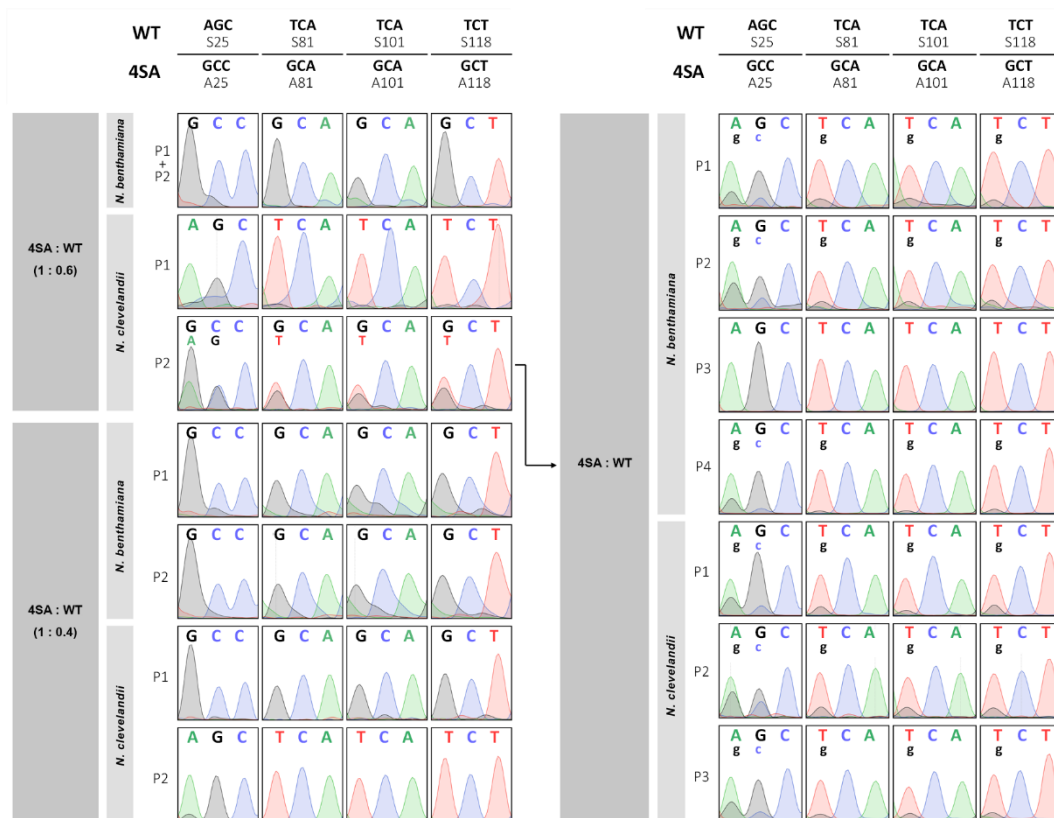


Figura IV.12. Análisis de la progenie viral en infecciones en las que se mezcló el PPV-R silvestre (WT) con un virus mutante en el cual se impidió la fosforilación de los residuos de serina 25, 81, 101 y 118 de la CP (4SA). Extractos de hojas de *N. benthamiana* sistémicamente infectadas con los virus WT y 4SA se mezclaron en las proporciones indicadas y se emplearon para inocular plantas de *N. benthamiana* y *N. clevelandii*. Los virus presentes en las plantas infectadas fueron identificados mediante RT-PCR y secuenciación de un fragmento de cDNA que alberga la región codificante de la CP. Posteriormente, se utilizó el extracto de hojas sistémicamente infectadas de una planta de *N. clevelandii* en la que los virus WT y 4SA se acumulaban de forma similar (ratio 1 : 0.6, planta 2) para inocular nuevas plantas de *N. benthamiana* y *N. clevelandii*. Los cromatogramas muestran la región de la secuenciación correspondiente a las posiciones 25, 81, 101 y 118 de la CP. Cuando la señal del cromatograma sugiere que uno de los dos virus que compiten se acumula menos, las bases del triplete correspondiente se representan en minúscula.

IV.1.3.4. Mimetizar la fosforilación en la posición 118 de la CP de PPV-R es especialmente deletéreo para la infección viral, y este efecto se ve reforzado cuando además se emula la fosforilación en otras fosfo-dianas

La detección de las mutaciones Y266F y T254K en dos plantas infectadas con el virus 4SD (**Fig. IV.8**) sugiere que la baja eficiencia de la infección observada con este mutante podría favorecer la selección de mutaciones compensatorias que mitiguen los efectos negativos resultantes de la mimetización de fosforilación en la CP de PPV-R.

Para incrementar las posibilidades de adaptación del mutante 4SD, se inocularon dos lotes de 37 plantas de *N. benthamiana* utilizando extractos procedentes de dos plantas de *N. benthamiana*

infectadas con este mutante, pero en cuya progenie viral no habían sido detectadas mutaciones secundarias. Todas las plantas inoculadas resultaron infectadas, sin embargo, a los 25 dpi pudieron distinguirse dos fenotipos: el de plantas que mostraban síntomas intensos de infección (35 plantas de un lote y 2 de otro) y el de plantas en las que los síntomas eran más leves (resto de plantas). La amplificación por IC-RT-PCR y la secuenciación de fragmentos de cDNA viral apropiados reveló que la progenie viral de las plantas que mostraban una infección leve tenía intacta la secuencia de la CP del mutante 4SD. Sin embargo, en las 35 plantas del primer lote que presentaban síntomas intensos se detectó una mutación de G a A que causaba un cambio de ácido aspártico a asparagina en la posición 118 (D118N), junto con una segunda mutación de G a A que daba lugar a una sustitución de arginina por glutamina en la posición 237 (R237Q). Por otro lado, en las 2 plantas restantes con sintomatología acusada (segundo lote) se detectó una mutación de A a G que también afectaba a la posición 118, pero que en este caso originaba un cambio de ácido aspártico a glicina (D118G) (**Fig. IV.8**). A continuación, se inoculó un nuevo lote de plantas de *N. benthamiana* empleando extractos de las hojas sistémicamente infectadas en las que se acumulaban los mutantes 4SD, 4SD^{D118N+R237Q} o 4SD^{D118G}, reproduciéndose el fenotipo de las plantas parentales, sin que se detectaran mutaciones adicionales en sus progenies virales.

La inestabilidad de D118 sugería que los defectos asociados al mutante 4SD se debían principalmente al cambio S118D. Para verificar esta posibilidad y estimar la relevancia de las fosfomimetizaciones en el resto de residuos fosforilables, se construyeron los mutantes puntuales S25D, S81D, S101D y S118D (**Fig. IV.6**). Los distintos cDNA se utilizaron para inocular mecánicamente plantas de *N. benthamiana*, llevando como controles los cDNA de los virus WT y 4SD. La infectividad y la sintomatología asociada a la inoculación con los distintos mutantes puntuales fue similar a la del virus silvestre (**Tabla IV.5**); sin embargo, las plantas inoculadas con el clon S118D mostraron un ligero retraso en la aparición de los síntomas. A los 21 dpi, cuando la acumulación del virus 4SD era casi indetectable mediante *Western Blot* anti-CP, la de los cuatro mutantes sencillos era similar a la del virus silvestre (**Fig. IV.13A, B**). Todos los cambios de serina a ácido aspártico de los mutantes sencillos se mantuvieron estables, sin que se detectaran mutaciones adicionales en la progenie viral de las 2 plantas por construcción analizadas. En cambio, se detectó una nueva mutación de prolina a serina en la posición 67 (P67S) en la progenie viral de una de las plantas inoculadas con el 4SD (**Fig. IV.8**). Estos resultados sugieren que los efectos deletéreos que se producen al mimetizar la fosforilación en la posición 118 se ven reforzados cuando también se emula un estado de fosforilación permanente en las otras tres serinas fosforilables.

No obstante, después de un pase a nuevas plantas de *N. benthamiana*, se detectaron en la descendencia del mutante S118D variantes virales con asparagina en la posición 118 (D118N), mientras que la progenie del resto de mutantes permanecía estable, lo cual supone una evidencia adicional del efecto distintivo de la mutación S118D.

Tabla IV.5. Infectividad en plantas de *N. benthamiana* del virus PPV-R (WT) y de sus mutantes de la CP en los que se ha emulado la fosforilación constitutiva en todas (4SD) o en cada una de las fosfo-dianas de serina (S25D, S81D, S101D, S118D) de la mitad N-terminal de la proteína

Inóculo ^a	Clon	Infectividad*
S25D	1	4/5
	2	2/5
S81D	1	5/5
	2	4/5
S101D	1	5/5
	2	5/5
S118D	1	5/5
	2	4/5
4SD	1	1/5
	2	2/5
WT	1	4/5
	2	4/5

^aLas plantas se inocularon manualmente con cDNA de los clones indicados

*Plantas infectadas/plantas inoculadas

Para evaluar mejor las consecuencias de emular constitutivamente la fosforilación en la posición 118, se introdujo el cambio S118D en el plásmido pICPPV-5'BD-GFP (**Fig. IV.6**). El clon resultante, sf-S118D, se utilizó para inocular plántulas de *P. persica* mediante bombardeo de partículas, llevando como controles los clones sf-4SD y sf-WT (**Fig. IV.13C, D**). En este experimento se confirmó la incapacidad del mutante 4SD de infectar melocotonero, mientras que la infectividad del mutante S118D resultó ser similar a la del virus silvestre (**Tabla IV.4**). Sin embargo, los síntomas causados por S118D fueron más leves y su acumulación viral ligeramente inferior comparados con el virus silvestre (**Fig. IV.13C, D**). Un análisis por RT-PCR y posterior secuenciación mostró que la mutación S118D se mantenía estable en la progenie viral del mutante simple en *P. persica*, sin que se detectaran mutaciones adicionales. Estos resultados estarían apoyando la conclusión de que la emulación de fosforilación constitutiva de varias fosfo-dianas de la CP de PPV-R contribuye colectivamente a perturbar la infección del virus.

IV.1.4. No permitir la fosforilación estándar de la CP de PPV-R parece afectar, aunque levemente, a los niveles de O-GlcNAcilación de la proteína

Para conocer si la relación observada entre la O-GlcNAcilación global y la fosforilación de la CP de PPV-R (**Fig. IV.3** y **Fig. IV.4**) es recíproca, se purificaron viriones WT y 4SA a partir de plantas de *N.*

benthamiana infectadas. Ambas muestras se digirieron con tripsina y se analizaron por MS. Dos análisis MALDI-TOF utilizando réplicas biológicas independientes mostraron un ligero incremento de los niveles de *O*-GlcNAcilación en el péptido [1-39] en los viriones 4SA con respecto a los del virus silvestre (**Fig. IV.14**). El porcentaje encontrado del péptido no glicosilado fue casi dos veces menor en los viriones 4SA que en los WT (una media de 13.6 % frente a 24.3 %). En concordancia con esto, se observó también un aumento en el porcentaje de formas di-glicosiladas en las muestras del virus mutante con respecto al silvestre (una media de 32.7 % frente a 26.5 %) (**Fig. IV.14**). Por otra parte, se intentó llevar a cabo un análisis complementario utilizando viriones del mutante 4SD para determinar posibles variaciones en el patrón de *O*-GlcNAcilación cuando se emula la fosforilación constitutiva de la CP; sin embargo, la baja acumulación de este mutante unida a la frecuente aparición de mutaciones secundarias (**Fig. IV.8**), impidió disponer de datos fiables al respecto.

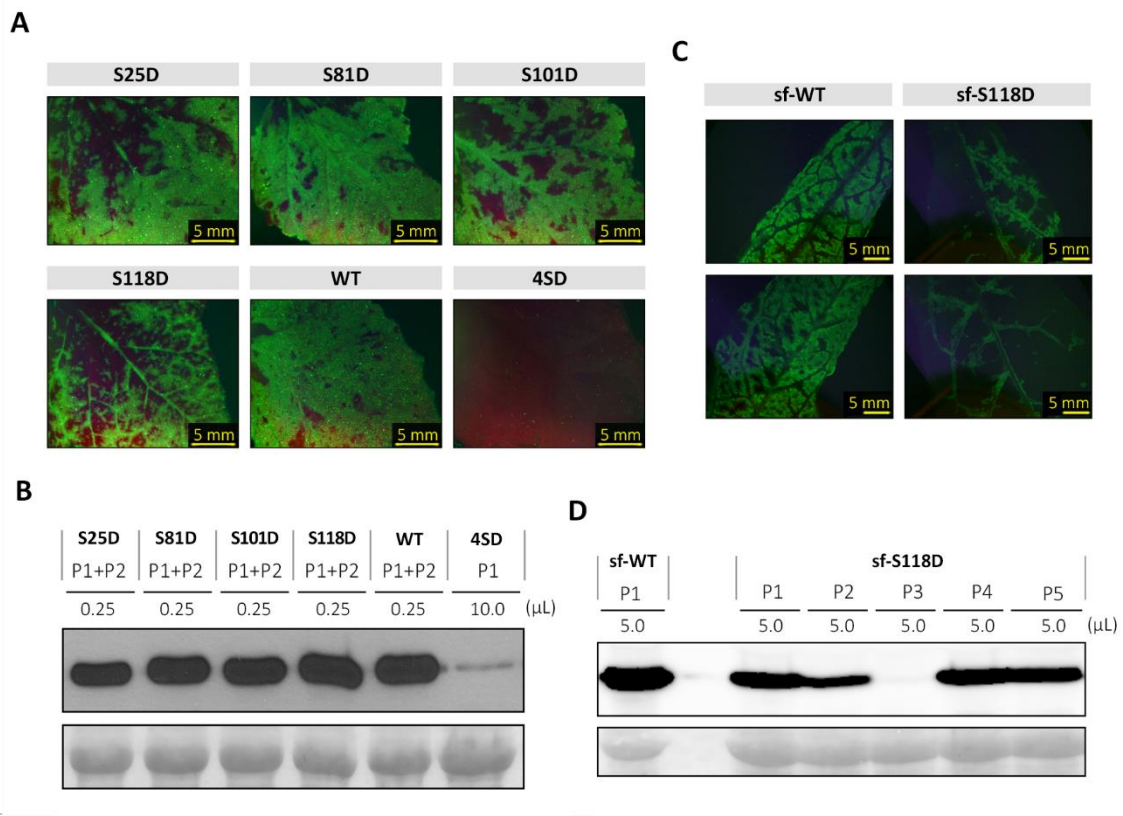


Figura IV.13. Infección de plantas de *N. benthamiana* y *P. persica* por el PPV-R silvestre (WT) o por mutantes que portan mutaciones puntuales (S25D, S81D, S101D o S118D) o múltiples (4SD) que mimetizan la fosforilación en la CP del virus. Las plantas fueron inoculadas manualmente con cDNA (*N. benthamiana*) o mediante bombardeo con cDNA de clones sf- (*P. persica*). (**A, C**) Imágenes de hojas superiores a las inoculadas de plantas de *N. benthamiana* (A) o *P. persica* (C) tomadas bajo un microscopio de epifluorescencia a los 21 y 23 dpi, respectivamente. Barra, 5 mm. (**B, D**) Análisis *Western Blot* para la detección específica de la CP del PPV en extractos de proteínas totales procedentes de hojas superiores a las inoculadas de plantas de *N. benthamiana* (B) o *P. persica* (D), individuales o mezclas, recogidas a los 21 dpi (*N. benthamiana*) o 23 dpi (*P. persica*). Los virus inoculados, las plantas analizadas y el volumen de extracto cargado aparecen indicados. La señal de la RuBisCO teñida con rojo Ponceau se incluye como control de carga.

Las diferencias observadas entre los patrones de *O*-GlcNAcilación de la CP de viriones no fosforilados y del virus silvestre, unidas a los resultados obtenidos a partir del análisis iTRAQ,

corroboran la existencia de una cierta interrelación recíproca y negativa entre la fosforilación y la O-GlcNAcilación de la CP de PPV-R.

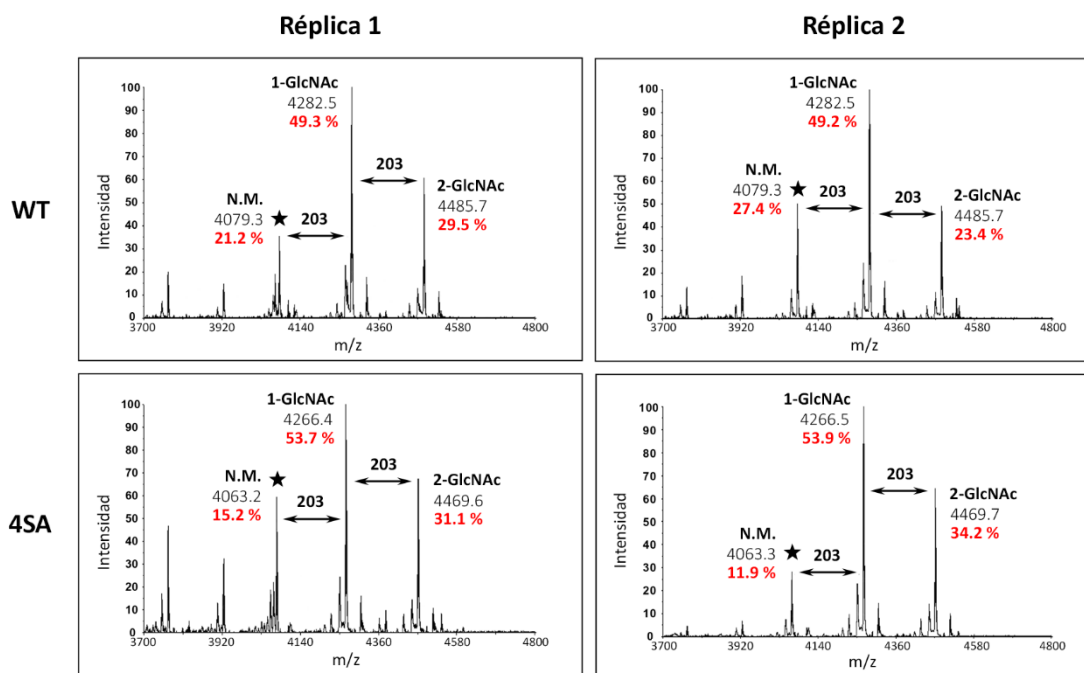


Figura IV.14. O-GlcNAcilación de la CP de viriones de PPV-R silvestre (WT) y de un mutante del virus en el que se impidió la fosforilación de la proteína sustituyendo las cuatro fosfo-serinas de la mitad N-terminal de la CP por residuos de alanina (4SA). Los viriones se obtuvieron a partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas y se analizaron mediante MALDI-TOF. Se muestran los espectros que cubren la región del péptido [1-39], los ratios m/z asignados a los picos relevantes y el número de residuos O-GlcNAc predichos para cada especie peptídica. En rojo se indica el porcentaje calculado para los péptidos N.M., mono-glicosilados (1-GlcNAc) y di-glicosilados (2-GlcNAc) obtenido en base a la intensidad de cada señal mayoritaria con respecto a la suma de las intensidades de las tres especies peptídicas. Las estrellas señalan los picos precursores N.M. que se corresponden con el péptido tríptico [1-39].

IV.1.5. La CP de PPV-R se encuentra fosforilada en un número mayor de residuos que los detectados inicialmente

A fin de confirmar la ausencia de fosforilación en la CP del mutante 4SA, los viriones de este mutante se analizaron mediante 2D-PAGE. Como control positivo se analizaron paralelamente viriones WT. Sorprendentemente, la carrera de la CP de la segunda dimensión mostró un patrón de “cuentas de collar”, que podría corresponder a variantes fosforiladas de la proteína, no solo en los viriones del virus silvestre sino además en los del mutante 4SA (**Fig. IV.15**). Para tratar de identificar hipotéticas fosfo-dianas no detectadas previamente en estas proteínas, los viriones 4SA se analizaron mediante LC-MS/MS, como se describió en el Apartado IV.1.1. El análisis reveló cuatro nuevos aminoácidos susceptibles de ser fosforilados en la CP del mutante 4SA, las treoninas de las posiciones 71, 106, 254 y 313 (**Fig. IV.16**). Sin embargo, la frecuencia con la que se detectaron fosforilados los péptidos que permitieron mapear dichos residuos en el mutante fue mucho menor en comparación con la frecuencia con la que se suelen detectar fosforilados los péptidos que nos permitieron mapear las dianas S25, S81, S101 y S118 (**Anexo 5**).

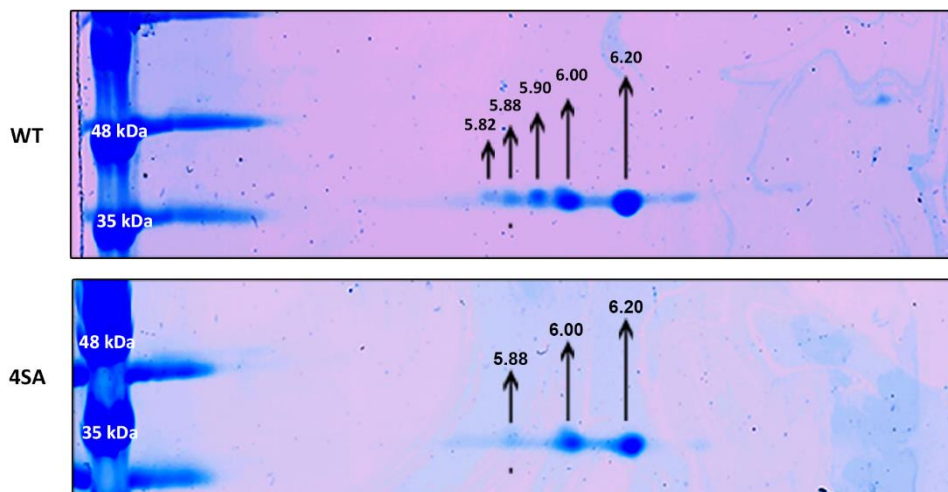


Figura IV.15. Análisis 2D-PAGE de viriones de PPV-R silvestre (WT) y de un mutante en el que las fosfo-dianas de serina 25, 81, 101 y 118 de la CP fueron reemplazadas por alanina (4SA) para prevenir la fosforilación de la proteína. Los viriones se purificaron a partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas y se analizaron por 2D-PAGE, seguido de tinción con azul de *Coomassie*. A la izquierda se muestra un marcador de peso molecular de proteínas y horizontalmente se indican los puntos isoeléctricos estimados para las distintas isoformas de la CP.

Debido a este hallazgo, se llevó a cabo un análisis más exhaustivo de la CP de los viriones del PPV silvestre. Aunque las fosfo-treoninas 71, 106, 254 y 313 fueron identificadas claramente en la CP de los viriones 4SA usando un motor *Mascot* con un umbral de confianza de 30 y una validación manual posterior, solo dos de las cuatro nuevas fosfo-dianas (T254 y T313) pudieron ser detectadas, y con menos fiabilidad, en los viriones del PPV silvestre (**Anexo 5**). La identificación de T254 y T313 como dianas de fosforilación en la CP del virus silvestre solo fue posible tras reducir el umbral de confianza de *Mascot* y únicamente después de comparar los espectros de fragmentación MS/MS de “baja calidad” de los péptidos de la CP del virus silvestre, con los de “alta calidad” que sirvieron para validar la modificación de ambos residuos en la CP de los viriones 4SA.

Aunque el hecho de que las propiedades físico-químicas particulares de cada péptido puedan afectar a la eficiencia de su detección en los experimentos de MS limita el alcance de las conclusiones cuantitativas de este tipo de estudios, nuestros resultados parecen indicar que existen importantes diferencias en la incidencia de fosforilación entre unas dianas y otras en la CP de los viriones del PPV silvestre. Por otro lado, los resultados también sugieren que la eliminación de las dianas de fosforilación habitualmente detectadas (mutante 4SA) potencia la fosforilación de las encontradas con menor frecuencia. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el sistema de análisis empleado se basa en la selección de los iones precursores más abundantes, por lo que la dificultad de detectar fosforilación en las dianas “esporádicas” en los viriones del PPV silvestre podría deberse, más que a su supuesta menor incidencia en estos viriones en comparación con los del mutante 4SA, a la competición impuesta por los iones con fosforilaciones en las dianas mayoritarias, ausentes en la CP del mutante 4SA.

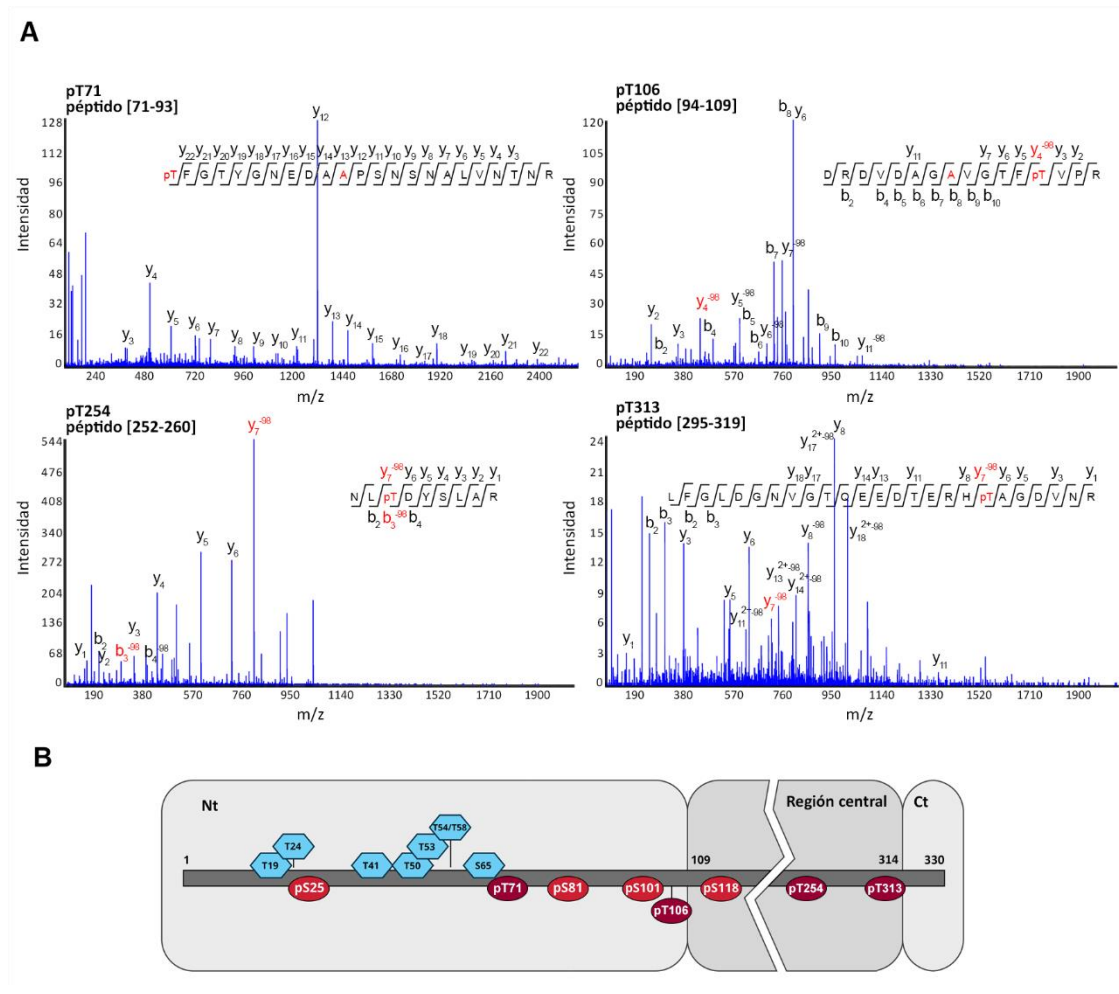


Figura IV.16. Localización de residuos específicos de treonina fosforilados en la CP de PPV-R. **(A)** Espectros de fragmentación CID-MS/MS en los que se muestran los correspondientes péptidos fosforilados en un virus mutante en el que se impidió la fosforilación de la serina diana 25, 81, 101 y 118 (mutante 4SA), previamente identificadas en la CP del virus silvestre. En rojo se muestran algunos de los cambios previamente introducidos en el mutante 4SA, que afectan a las fosfo-dianas de serina (S81A y S101A) y las cuatro treoninas susceptibles de ser fosforiladas (pT71, pT101, pT254 y pT313). **(B)** Esquema de la CP de PPV-R y sus MPT. Se muestra la distribución de las fosforilaciones mapeadas en las treoninas específicas del mutante 4SA (elipses granates). En el esquema también se incluyen las fosfo-dianas de serina descritas en el Capítulo IV.1 de la tesis (elipses rojas) y los aminoácidos O-GlcNAcylados mapeados previamente en los viriones silvestres (hexágonos azules, Kim *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2013). Las regiones Nt y Ct, así como la región central de la proteína, se muestran sobre fondo gris. Las regiones de la CP de PPV-R se definieron en base a la CP del potyvirus WMV (Zamora *et al.*, 2017).

IV.1.5.1. Emular una fosforilación constitutiva en los residuos T254 o T313 de la CP resulta deletéreo para la infección por PPV-R

La detección de fosforilación en el residuo T254 resulta especialmente interesante ya que en la progenie del mutante múltiple 4SD, en el que se emulaba la fosforilación constitutiva de las cuatro serinas fosforilables de la CP, aparecía una mutación potencialmente compensatoria (T254K) afectando a dicho residuo (**Fig. IV.8**). La fosforilación en T313 también resultaba llamativa, debido a que afecta a la región central distal de la proteína, donde se localizan las dos posibles dianas de fosforilación que se han descrito en la CP de otro potyvirus, el PVA (Ivanov *et al.*, 2003; Löhmus *et al.*, 2017).

Para evaluar la posible relevancia de las fosforilaciones en las treoninas 254 y 313, estos aminoácidos fueron reemplazados por residuos de alanina (T254A y T313A), para impedir que tuviera lugar la fosforilación, o de ácido aspártico (T254D y T313D), para emular un estado de fosforilación constitutiva en cada una de las dianas de forma individual. Como controles se introdujo una mutación silenciosa en la posición 254 (T254T*) o se reemplazó el residuo T313 por asparagina (T313N), un aminoácido neutro con un tamaño de cadena lateral similar a la del ácido aspártico cargado negativamente. Todas las mutaciones se introdujeron en la secuencia codificante de la CP del plásmido pICPPV-NK-IGFP (Fig. IV.17).

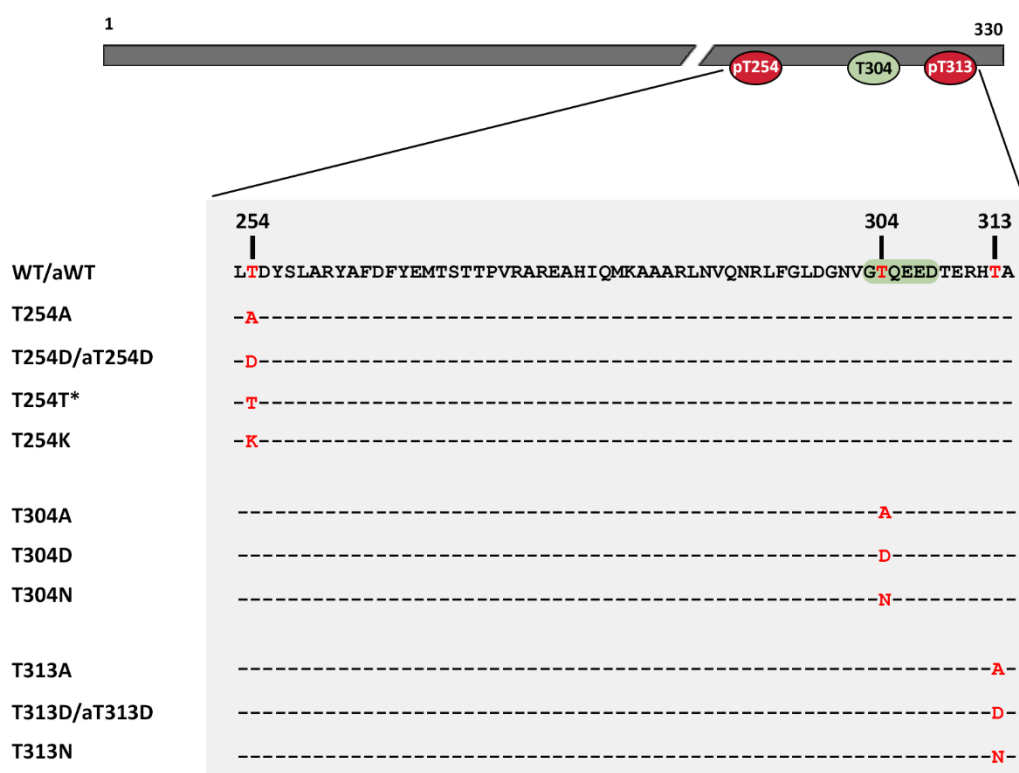


Figura IV.17. Esquema de la CP de PPV-R expandiendo la mitad C-terminal desde el residuo 253 al 314, donde se localizan las fosfo-dianas T254 y T313; además del residuo T304 dentro del motivo CK2 (recuadrado en verde). Se muestran las mutaciones introducidas en los clones de cDNA de los vectores PPV-R denominados pICPPV-NK-IGFP y pLX-PPV (este último utilizado para agroinfectar, a). Los residuos mutados en las posiciones 254, 304 y 313 se marcan en rojo. En el esquema de la parte superior de la imagen se representan como elipses rojas las fosforilaciones detectadas en los residuos T254 y T313, mientras que la hipotética diana T304 de la quinasa CK2 se muestra como una elipse verde.

Los cDNA de las distintas construcciones se emplearon para inocular manualmente plantas de *N. benthamiana*. El curso de la infección viral se monitorizó por inspección visual de los síntomas y mediante la observación de la fluorescencia procedente de la GFP expresada a partir de los distintos vectores virales. En un primer ensayo, las plantas se inocularon con los mutantes T254A, T254D y T254T*, además del virus silvestre. A los 8 dpi se detectaron síntomas y expresión de GFP compatibles con infección por PPV en la mayoría de las plantas inoculadas con el virus silvestre y en

unas pocas plantas inoculadas con los virus T254A y T254T*. Sin embargo, a tiempos tardíos el número de plantas con signos de infección resultó ser similar en los tres virus. A los 28 dpi, todas las plantas inoculadas con el virus silvestre o con los mutantes T254A o T254T* se encontraban infectadas (6/6). Además, el análisis por *Western Blot* reveló que la acumulación de CP viral de ambos mutantes era similar, y comparable a la del virus silvestre. Por el contrario, ninguna de las plantas inoculadas con el mutante T254D mostró signos de infección (0/6) y en ninguna de ellas se observó expresión de GFP o se detectó acumulación de CP (**Fig. IV.18A, B**). La amplificación por IC-RT-PCR y posterior secuenciación de un fragmento de cDNA que alberga la región codificante de la CP reveló que las sustituciones T254A y T254T* se mantenían estables en la progenie viral, y no detectó mutaciones adicionales en el resto de la proteína. En el caso del mutante T254D, la ausencia de amplificación, permitió confirmar la infectividad nula de este virus.

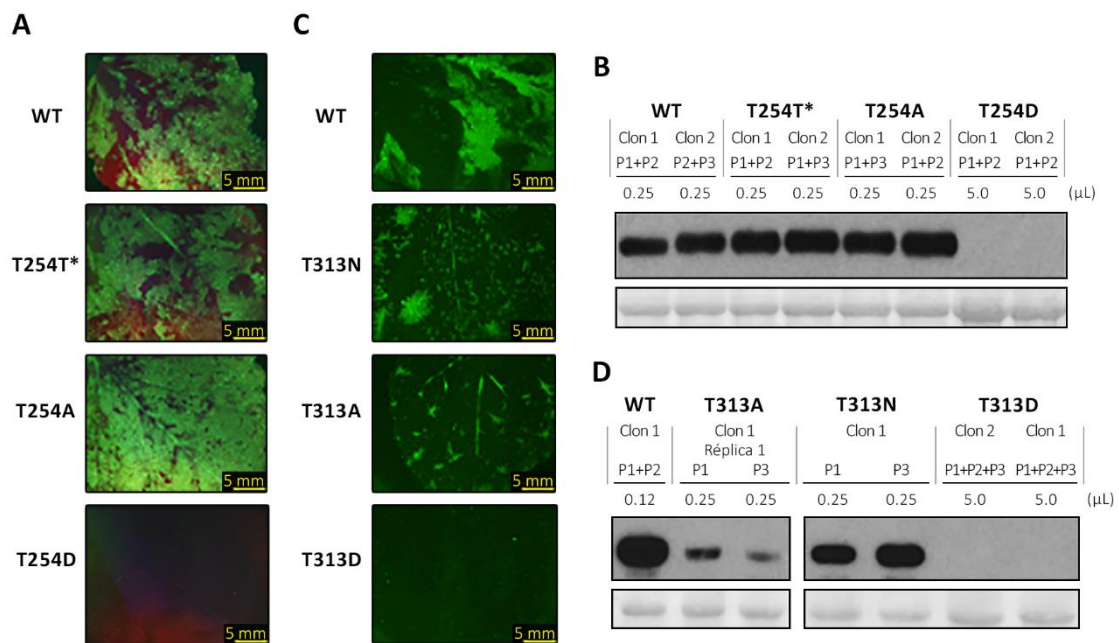


Figura IV.18. Inoculación de plantas de *N. benthamiana* con PPV-R silvestre (WT) o mutantes afectados en la CP del virus en los que se han introducido cambios en las treoninas 254 o 313. Las plantas se inocularon manualmente con cDNA viral (dos clones por construcción excepto en el caso del mutante T313A del que se analizaron dos réplicas del mismo clon). Se recogieron las hojas superiores a las inoculadas a los 28 (A, B) o 21 (C, D) dpi. **(A, C)** Imágenes tomadas bajo el microscopio de epifluorescencia. Barra, 5 mm. **(B, D)** Análisis *Western Blot* anti-CP de extractos crudos procedentes del tejido de plantas inoculadas. Los virus ensayados, los clones, las réplicas técnicas, las combinaciones de plantas analizadas y los volúmenes de extracto cargados aparecen indicados. La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga.

En un segundo experimento, las plantas fueron inoculadas manualmente con el cDNA de los mutantes T313A, T313D y T313N, y el del virus silvestre. La monitorización de síntomas y de la fluorescencia de la GFP permitieron detectar infección sistémica a los 7 dpi en la mayoría de las plantas inoculadas con el virus no mutado; sin embargo, en el caso de los mutantes T313A y T313N solo se pudieron detectar ligeros signos de infección a partir de los 18 dpi. Por otro lado, ninguna

de las plantas inoculadas con el mutante T313D parecía estar infectada. La visualización de la fluorescencia de la GFP y la detección de la CP mediante *Western Blot* permitió determinar que la acumulación viral era claramente inferior en las plantas de *N. benthamiana* infectadas con el mutante incapaz de fosforilarse en la posición 313 (T313A) en comparación con la de las plantas infectadas con el virus silvestre o con el mutante utilizado como control (T313N) (**Fig. IV.18C, D**). En cuanto al mutante T313D, no se pudo detectar GFP o CP en ninguna de las plantas inoculadas con este mutante. El análisis por IC-RT-PCR y en su caso, la posterior secuenciación del fragmento amplificado, confirmó la estabilidad de la secuencia codificante de la CP de los mutantes T313A y T313N, además de la ausencia de infección en las plantas inoculadas con el mutante T313D.

Estos resultados muestran que, mientras que la incapacidad de la CP de fosforilarse en los residuos T254 o T313 tiene efectos limitados en la infección por PPV-R (más pronunciados en el caso de T313), la mimetización de fosforilación en cualquiera de las dos dianas afecta drásticamente a la infección viral.

IV.1.5.2. El residuo T304 de la CP de PPV-R, que forma parte de un motivo CK2 conservado mayoritariamente en los potyvirus, no parece ser diana de fosforilación

Como se ha comentado en la Introducción, la CP del PVA puede fosforilarse por la quinasa CK2 en los residuos T242 y T243, incluidos en un motivo CK2 presente en la región central distal de esta proteína y que se encuentra mayoritariamente conservado entre los miembros del género *Potyvirus* (Ivanov *et al.*, 2003; Löhmus *et al.*, 2017). Teóricamente, el motivo CK2 presente en la CP del PPV podría ser fosforilado en el residuo T304, homólogo a la fosfo-diana T243 de la CP del PVA (**Fig. IV.19A**). Sin embargo, en ninguno de los análisis por MS realizados hasta el momento se había detectado que la CP de PPV-R, ensamblada en viriones, estuviera fosforilada en T304.

Teniendo en cuenta que mutar las treoninas del motivo CK2 de la CP del PVA tiene consecuencias drásticas para el virus (Ivanov *et al.*, 2003; Löhmus *et al.*, 2017), decidimos analizar si mutagenizar el residuo T304 de la CP de PPV-R desencadenaba un efecto similar debido a la presencia de una fosforilación que no habíamos sido capaces de detectar. Para ello se siguió un procedimiento similar al descrito en el apartado anterior. La treonina 304 se reemplazó por alanina (T304A) para impedir su hipotética fosforilación, o por ácido aspártico (T304D) para emularla. Como control, el residuo 304 se sustituyó por asparagina (T304N). Todas estas mutaciones se introdujeron en el plásmido pICPPV-NK-IGFP (**Fig. IV.17**).

El cDNA de los clones virales mencionados se inoculó mecánicamente en plantas de *N. benthamiana*, que fueron monitorizadas para detectar síntomas de infección y GFP expresada por los virus. No se observaron diferencias en la infectividad (**Fig. IV.19B**) o en la progresión de la infección (**Fig. IV.19C**) a los 21 dpi entre los distintos mutantes, o en comparación con el virus silvestre. A este mismo tiempo, tampoco se detectaron diferencias apreciables en la acumulación

viral en hojas sistémicamente infectadas analizadas mediante *Western Blot* anti-CP (**Fig. IV.19D**). La amplificación por IC-RT-PCR seguida de secuenciación de un fragmento de cDNA correspondiente a la CP confirmó la estabilidad de las tres mutaciones en la progenie viral de cada uno de los virus. Por último, y con el objetivo de facilitar la posible adaptación de los mutantes T304A, T304D y T304N por medio de mutaciones espontáneas secundarias, la progenie de cada mutante se sometió a cuatro pases seriados. El análisis de la progenie viral acumulada en las plantas infectadas tras el cuarto pase, constató la estabilidad de la secuencia codificante de la CP en todos los casos.

Estos resultados indican que, al contrario de lo que ocurre en PVA, impedir o emular la fosforilación de la CP de PPV-R en la diana teórica T304 del motivo CK2 conservado no afecta de forma significativa a la infección viral, y sugieren que la fosforilación en este motivo no es relevante para todos los potyvirus.

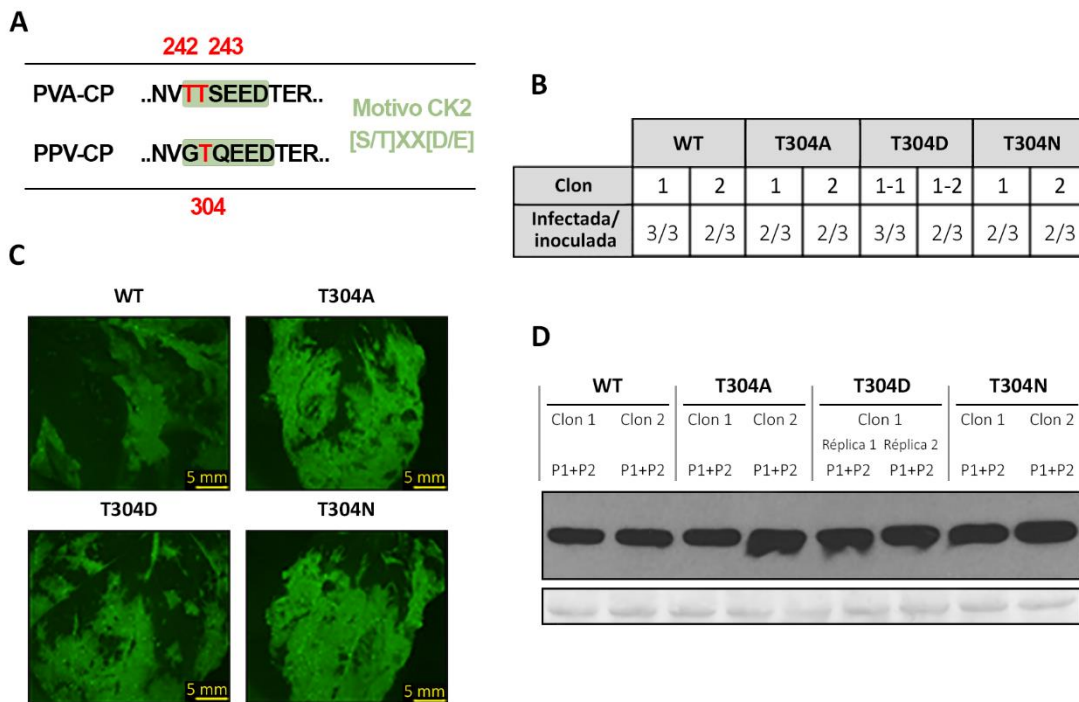


Figura IV.19. Análisis de la relevancia del motivo CK2 de la CP de PPV-R en la infección viral. **(A)** La secuencia consenso [S/T]XX[D/E] de la quinasa CK2 presente en la CP del PVA y de PPV-R se muestra sobre fondo verde. Los residuos fosforilables (T242 y T243) en la CP del PVA (Ivanov *et al.*, 2003; Löhmus *et al.*, 2017), así como la hipotética fosfodiana T304 en la CP de PPV-R se marcan en rojo. **(B)** Infectividad, estimada en base a la expresión de GFP a los 21 dpi en plantas de *N. benthamiana* inoculadas mecánicamente con cDNA de PPV-R silvestre (WT) o de mutantes en T304. Se utilizaron dos clones de cada virus, excepto en el caso de T304D del que se analizaron dos réplicas del mismo clon. **(C)** Imágenes tomadas bajo el microscopio de epifluorescencia. Barra, 5 mm. **(D)** Análisis por *Western Blot* anti-CP de extractos de hojas superiores a las inoculadas, recogidas a los 21 dpi. Se indican los virus inoculados, los clones, las réplicas técnicas y las combinaciones de plantas analizadas. La señal de la proteína RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga.

IV.2. La fosforilación y O-GlcNAcilación de la CP se conserva en diferentes aislados y huéspedes del PPV

Estudios previos identificaron siete residuos de treonina y uno de serina que pueden O-GlcNAcilarse (o influenciar la O-GlcNAcilación de otros aminoácidos) en la región N-terminal de la CP del aislado PPV-R, cuando infecta diferentes especies herbáceas (Kim *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2013). En el Capítulo IV.1 de esta tesis se describe que la CP de viriones de PPV-R purificados a partir de plantas infectadas de *N. benthamiana* puede además modificarse por fosforilación en los residuos S25, T71, S81, S101, T106, S118, T254 y T313, distribuidos por las distintas regiones de la proteína (Fig. IV.1 y Fig. IV.16). A continuación, se realizaron distintos ensayos con el fin de evaluar el grado de conservación de estas modificaciones en las infecciones de diferentes huéspedes y por distintas cepas virales.

IV.2.1. La fosforilación y O-GlcNAcilación de la CP de PPV-R se conserva en distintos huéspedes herbáceos experimentales, así como en un huésped natural del patógeno

Para verificar si, como la O-GlcNAcilación, los patrones de fosforilación también se conservan en diferentes huéspedes herbáceos, y extender estos estudios a la infección en un huésped natural leñoso, se llevaron a cabo diferentes análisis de MS.

IV.2.1.1. El patrón de fosforilación de la CP de PPV-R es similar en distintos huéspedes experimentales herbáceos

Entre las plantas que el PPV es capaz de infectar se encuentra *A. thaliana*. Este huésped se infectó empleando la agroinfiltración como método de inoculación utilizando la construcción pSN-PPV, un vector binario de PPV-R. Las partículas virales producidas en *A. thaliana* se purificaron a partir de tejido sistémicamente infectado recogido a los 21 dpi, siguiendo el protocolo descrito por Sheveleva *et al.* (2016) ligeramente modificado. Los viriones se digirieron con tripsina y Lys-C, se sometieron a un tratamiento de fosfo-enriquecimiento y se analizaron por LC-MS/MS. La ionización y posterior fragmentación de los péptidos trípticos permitió identificar fosforilaciones en los residuos S81, S101, S118 e, incluso, en T71 y T254, denominadas en el Capítulo IV.1 como dianas de fosforilación “esporádica” (Anexo 6). Es importante destacar que, como en el caso de los viriones purificados a partir de *N. benthamiana*, los péptidos que incluyen los residuos T71 y T254 fueron mucho menos abundantes que los que contienen a S81, S101 o S118. La fosforilación en S25, detectada con frecuencia en viriones de PPV-R obtenidos a partir de *N. benthamiana* (Tabla IV.1 y Anexo 5), solo pudo mapearse con ambigüedad en la proteína expresada en *A. thaliana*, al no obtenerse un espectro de fragmentación claro que permitiera distinguir si la fosforilación estaba teniendo lugar en S25, T19 o T24. Por su parte, los residuos T106 y T313 no se detectaron fosforilados, a pesar de que los péptidos que los contenían se generaron en abundancia. De manera que es probable que ambos residuos no se encuentren

fosforilados en la CP de viriones producidos en *A. thaliana* o que su modificación tenga lugar de manera muy esporádica (al igual que ocurría en *N. benthamiana*, ver **Anexo 5**).

Aunque en los viriones de PPV-R procedentes de *A. thaliana* no se han podido cubrir homogéneamente las regiones de la CP donde se sitúan todas las dianas fosforilables previamente identificadas, globalmente los resultados muestran que la localización de los residuos fosforilables en la proteína se conserva en huéspedes herbáceos experimentales tan distintos como *N. benthamiana* y *A. thaliana*.

IV.2.1.2. El patrón de fosforilación de la CP de PPV-R en un huésped natural de este virus es similar al observado en los huéspedes herbáceos experimentales

Con el objetivo de determinar si la fosforilación de la CP de PPV-R también tiene lugar en sus huéspedes naturales y, de ser así, si se produce en las mismas dianas, se inocularon plántulas de *P. persica* mediante agroinfiltración con pSN-PPV-5'BD un clon derivado de pICPPV-5'BD-GFP (sf-WT, **Fig. IV.6**). A los 21 dpi se recolectó tejido sistémicamente infectado, y a partir del mismo, se purificaron viriones utilizando el método de Sheveleva *et al.* (2016) modificado. Las muestras digeridas con tripsina/Lys-C y fosfo-enriquecidas se analizaron por LC-MS/MS. El análisis de los espectros de fragmentación mostró que la CP de los viriones de PPV-R procedentes de *P. persica* es capaz de fosforilarse en los residuos S81, S101, S118 y T254 (**Anexo 6**). El hecho de que la T254 se detecte fosforilada en tres huéspedes diferentes avala la idea de que, a pesar de que la fosforilación en esta posición parece ser más esporádica que la que afecta a otras posiciones de la proteína ensamblada, puede ser igualmente relevante para la infección viral. Al igual que ocurrió en *A. thaliana*, en *P. persica* la fosforilación en S25 no pudo ser asignada sin ambigüedad, debido a que los espectros de fragmentación correspondientes no permitieron discernir con seguridad si el grupo fosfato se encontraba modificando a S16, T19, T24 o S25. Otra posible diana de fosforilación, T71, solo pudo ser estudiada en el péptido [71-93], muy poco abundante. Por esta razón, aunque T71 solo apareció no modificada, no se puede descartar que un análisis más exhaustivo permitiera detectar este residuo fosforilado. La fosfo-diana teórica T106 tampoco se detectó fosforilada; sin embargo, en su caso sí fue posible identificar un número mayor de péptidos albergando este residuo. De ahí que se pueda asumir como probable que T106 no se modifica en este huésped o lo hace muy esporádicamente. En cuanto al residuo T313, solo se detectó un péptido poco abundante que lo contuviera, por lo que no fue posible sacar ninguna conclusión acerca de si este sitio podía ser modificado o no en *P. persica*.

Teniendo en cuenta los resultados del mapeo de las fosforilaciones que modifican a la CP de los viriones purificados desde *N. benthamiana*, *A. thaliana* y *P. persica*, puede afirmarse que los residuos S81, S101, S118, T254 (y posiblemente S25) de la CP de PPV-R se fosforilan en los tres huéspedes

estudiados. Esta fuerte conservación entre especies sugiere que la fosforilación de la CP puede cumplir una función relevante durante la infección viral.

IV.2.1.3. La CP de PPV-R se O-GlcNAcila en un huésped natural del virus, incluso a niveles superiores a los detectados en un huésped herbáceo experimental

Para averiguar si la O-GlcNAcilación de la CP de PPV-R también puede tener lugar en sus huéspedes leñosos naturales, dos lotes de plantas de *P. persica* y *N. benthamiana* se inocularon mediante agroinfiltración con la quimera pSN-PPV-5'BD. El tejido sistémicamente infectado fue recolectado a los 21 dpi y a partir del mismo se purificaron partículas virales por el método de Sheveleva *et al.* (2016) modificado. Las dos réplicas biológicas de viriones obtenidos a partir de cada huésped se digirieron con tripsina y los péptidos resultantes se analizaron por MALDI-TOF (Fig. IV.20). La intensidad relativa con la que se detectó el péptido [1-39] no modificado fue 3 veces superior en la CP obtenida desde plantas de *N. benthamiana* que en la obtenida a partir de plantas de *P. persica* (una media de 25.8 % frente a 8.2 %). Recíprocamente, la intensidad relativa de la especie peptídica di-O-GlcNAcilada fue casi 2 veces superior en la CP procedente de *P. persica* comparada con la de *N. benthamiana* (una media de 43.0 % frente a 24.6 %).

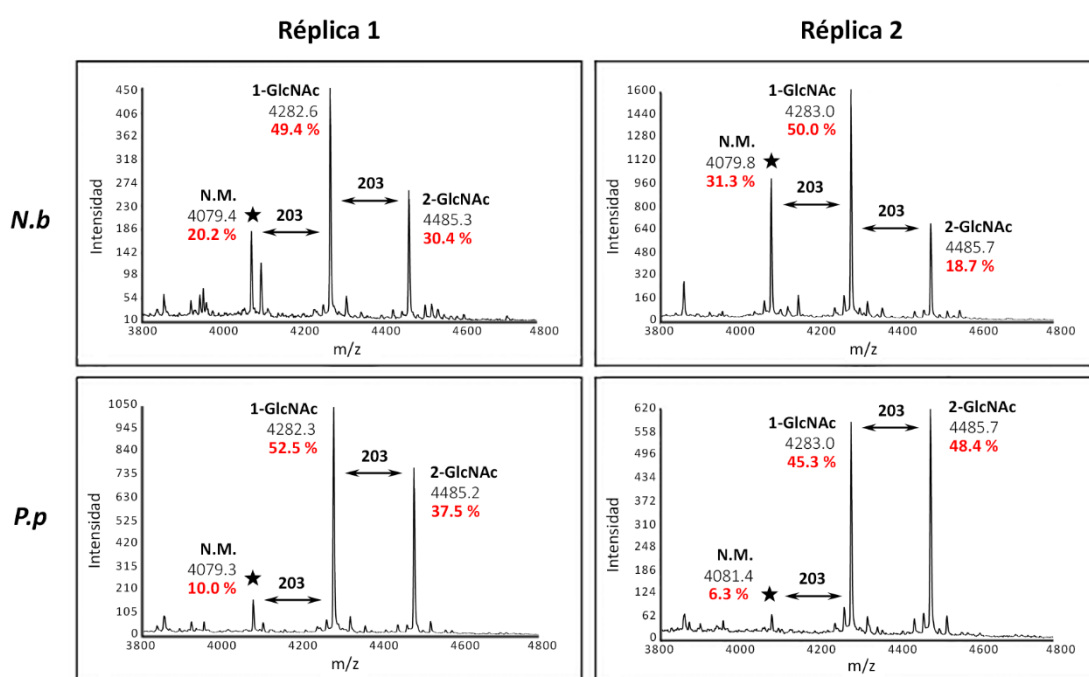


Figura IV.20. O-GlcNAcilación de la CP de PPV-R presente en viriones purificados a partir de plantas infectadas de *N. benthamiana* (N.b) y *P. persica* (P.p). Se muestran los espectros MALDI-TOF que cubren la región del péptido [1-39] en dos réplicas biológicas distintas para cada una de las muestras. Se indican los ratios m/z asignados a los picos relevantes y el número de residuos O-GlcNAc predichos para cada especie peptídica. En rojo se indica el porcentaje calculado para los péptidos N.M., 1-GlcNAc y 2-GlcNAc obtenido en base a la intensidad de cada señal mayoritaria con respecto a la suma de las intensidades de las tres especies peptídicas. Las estrellas señalan los picos precursores N.M. que se corresponden con el péptido triptico [1-39].

La eficiente *O*-GlcNAcilación de la CP de PPV-R en *P. persica* apoya la idea de que esta modificación post-traducciona desempeña un papel importante en la infección del PPV en condiciones naturales.

IV.2.2. La fosforilación y *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV se conserva en distintas cepas del virus, en las cuales se detectan residuos fosforilables comunes y específicos

Experimentos previos de nuestro laboratorio sugerían que la CP de aislados de las cepas D y M del PPV podía fosforilarse en residuos de serina y treonina (Fernández-Fernández *et al.*, 2002). Por otro lado, análisis cualitativos del grupo de M. Glasa y Z. Šubr (*Institute of Virology, Slovak Academy, Bratislava*) acerca de la presencia de glicosilaciones y fosforilaciones en la CP de aislados del PPV de las cepas D, M (Kollerová *et al.*, 2008) y Rec (Kollerová *et al.*, 2008; Šubr *et al.*, 2007; Šubr *et al.*, 2010), sugerían que la proteína procedente de las tres cepas podía estar siendo modificada por ambas MPT.

Hasta este momento, en esta tesis el estudio de la *O*-GlcNAcilación y fosforilación de la CP del PPV se ha realizado sobre el aislado PPV-R, que pertenece a la cepa D. Con el objetivo de extender el conocimiento de las MPT de la CP del PPV a otras cepas del virus, se añadieron a los análisis las CP de los aislados PPV-SwCM (cepa C) y PPV-BOR-3 (cepa Rec).

La secuencia de la CP del PPV está muy conservada en su región central y C-terminal, pero bastante menos en su región N-terminal. Debido a esto, no todos los residuos susceptibles de ser *O*-GlcNAcilados o fosforilados en la CP de PPV-R se encuentran conservados en las CP de los aislados de otras cepas del virus. Un alineamiento entre las secuencias de la CP de los aislados PPV-R, PPV-SwCM y PPV-BOR-3 reveló que las dianas fosforilables (serinas o treoninas) de la CP de PPV-R en 71, 81, 101, 118, 254 y 313 se conservaban en PPV-BOR-3 y PPV-SwCM, mientras que las dianas 25 y 106 solo lo hacían en este último (**Fig. IV.21**).

El hecho de que la diana fosforilable T106 no exista en todas las cepas del virus, sugiere que la modificación de esta posición no es especialmente relevante, hecho que también se sustenta al no haberse detectado modificado el residuo T106 en la CP de PPV-R silvestre procedente de *N. benthamiana* (**Anexo 5**), *A. thaliana* o *P. persica* (**Anexo 6**). Por otro lado, se observó que todos los sitios susceptibles de *O*-GlcNAcilación, exceptuando T58 (ausente en PPV-SwCM y PPV-BOR-3) y S65 (ausente en PPV-SwCM), están conservados en los tres aislados analizados. Este análisis revela que la mayoría de los residuos de la CP en los que se ha detectado *O*-GlcNAcilación o fosforilación se conservan en otras cepas del virus, lo que apoya la hipótesis de que la modificación de estas dianas posee relevancia funcional.

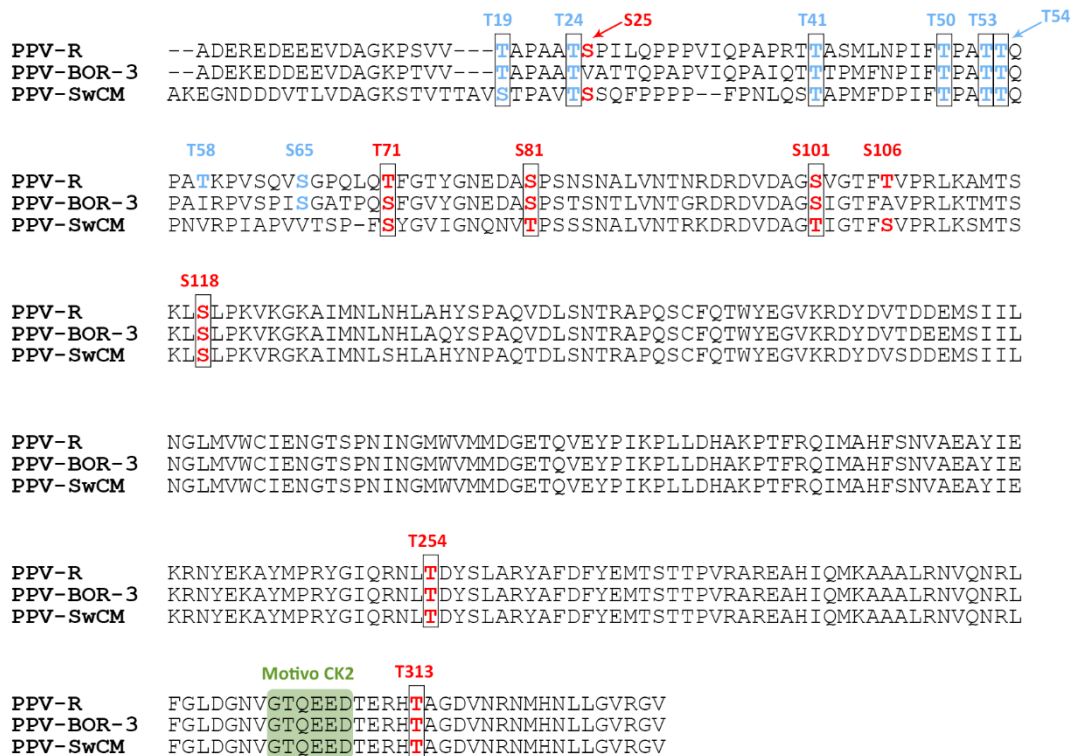


Figura IV.21. Alineamiento de las secuencias de la CP de tres aislados del PPV: PPV-R, PPV-BOR-3 y PPV-SwCM, pertenecientes a las cepas D, Rec y C, respectivamente. Se destacan los residuos en los que previamente se han identificado fosforilaciones (rojo) y O-GlcNAcilaciones (azul) en la CP de viriones de PPV-R y sus equivalentes potencialmente modificables en los otros dos aislados. Los recuadros muestran la conservación de las dianas que se han visto fosforiladas en PPV-R. El motivo CK2, conservado mayoritariamente en los potyvirus, se muestra sobre fondo verde. Las proteínas se alinearon utilizando el programa *Clustal Omega* (European Bioinformatics Institute).

IV.2.2.1. La CP de PPV-SwCM (cepa C) se encuentra fosforilada, además de en sitios compartidos con PPV-R, en el motivo CK2 conservado en el género Potyvirus

Para determinar si la CP de PPV-SwCM se fosforila, se utilizó el cDNA infeccioso de la quimera CP-SwCM-R, que incluye la secuencia codificante de la CP de PPV-SwCM en el armazón del cDNA de PPV-R (Calvo, Martínez-Turiño, *et al.*, 2014). El motivo por el que se utilizó un clon híbrido y no un cDNA completo de PPV-SwCM es que este aislado provoca una necrosis sistémica letal en *N. benthamiana* (Calvo, Malinowski, *et al.*, 2014) que impediría obtener suficiente tejido infectado para purificar viriones.

Inicialmente se inoculó un pequeño número de plantas de *N. benthamiana* con el cDNA de CP-SwCM-R, y con el tejido sistémicamente infectado de estas plantas, se inoculó un lote mayor de plantas de *N. benthamiana*, a partir de cuyas hojas infectadas sistémicamente, recogidas a 21 dpi, se purificaron viriones por el método de Sheveleva *et al.* (2016) modificado. Las muestras se analizaron por LC-MS/MS después de digestión con tripsina/Lys-C y fosfo-enriquecimiento. Los resultados muestran que la CP de PPV-SwCM se encuentra fosforilada en los aminoácidos T83, S120 y T256, respectivamente equivalentes a los residuos S81, S118 y T254 de la CP de PPV-R (Anexo 6).

El haberse detectado fosforilado el residuo equivalente de T254, aunque también ahora de manera esporádica, sugiere una vez más que la fosforilación de esta diana es especialmente relevante. Sorprendentemente, y a diferencia de lo observado para la CP de PPV-R, en la proteína de PPV-SwCM también se encontró fosforilado el residuo T306 (equivalente a la diana T304 de PPV-R) del motivo CK2 mencionado en el Apartado IV.1.5.2 (**Fig. IV.21, Fig. IV.22A y Anexo 6**). Debido a que la cobertura de secuencia de la proteína no resultó demasiado buena, no fue posible recuperar péptidos que contuvieran al residuo S30 (equivalente a la S25 de PPV-R) y no se pudo obtener información acerca de esta posición. Además, los péptidos que incluían las posiciones 73, 103, 108 y 315 (equivalentes a 71, 101, 106 y 313 en la CP de PPV-R) fueron en general poco abundantes (**Anexo 6**); de manera que no se pudo descartar la posibilidad de que los mismos pudieran estar también modificados en PPV-SwCM. A pesar de estos inconvenientes, los resultados indican que como la CP del virus de la cepa D un virus de la cepa C también se fosforila, aunque las dianas fosforilables pueden ser comunes o específicas de cada cepa.

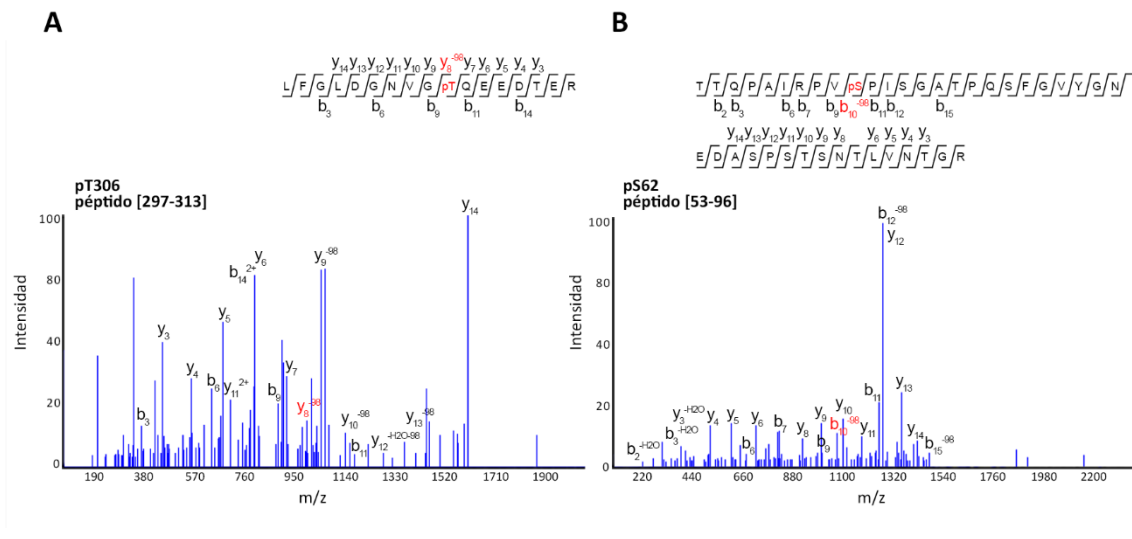


Figura IV.22. Fosfo-dianas de la CP del PPV identificadas exclusivamente en la proteína del aislado PPV-SwCM o PPV-BOR-3. Espectros de fragmentación CID-MS/MS que han permitido identificar de forma inequívoca la fosforilación en la diana T306 en la CP de PPV-SwCM (**A**) y en la S62 en la CP de PPV-BOR-3 (**B**).

Como se describió en el Apartado IV.1.5.2, el residuo T304 del motivo CK2 de la CP de PPV-R, a diferencia de su equivalente en el PVA, no parece estar modificado por fosforilación (**Anexo 5**) ni ser muy relevante para la infección viral (**Fig. IV.19**). El hecho de haberse detectado modificado el residuo equivalente en la CP de PPV-SwCM (T306) sugiere que la modificación de este aminoácido podría ser importante específicamente para dicha cepa, al igual que ocurre con el PVA. Para explorar esta posibilidad se llevó a cabo un ensayo similar al descrito para la posición 304 de la CP de PPV-R, mutagenizando en este caso el residuo T306 de la CP de la quimera CP-SwCM-R por alanina (T306A), ácido aspártico (T306D) o asparagina (T306N). El cDNA de los tres mutantes puntuales se empleó para inocular mecánicamente plantas de *N. benthamiana*, llevando como control el cDNA de la

quimera no mutada. La mayor parte de las plantas inoculadas con el virus silvestre (4/4) o con el mutante T306A (7/8) mostraron signos de infección a tiempos tempranos (12 dpi), mientras que el número de plantas que mostraron síntomas tras ser inoculadas con los mutantes T306D y T306N (1/8 y 0/8, respectivamente) fue claramente menor. No obstante, a los 21 dpi la infectividad en todos los mutantes tendió a igualarse (**Tabla IV.6**). La acumulación viral en el tejido sistémicamente infectado al cabo de 21 dpi resultó ser ligeramente inferior en las plantas inoculadas con el virus T306D, comparado con los otros dos mutantes y el virus silvestre (**Fig. IV.23A**). El análisis mediante IC-RT-PCR y posterior secuenciación de la región codificante de la CP de las poblaciones virales de una planta infectada con cada construcción, no mostró alteraciones en la secuencia de la CP en ninguno de los casos (**Fig. IV.23B**). Estos resultados sugieren que, aunque la CP procedente del aislado PPV-SwCM se fosforila en un sitio equivalente a la del PVA, la fosforilación en esta diana es menos relevante para la infección por PPV que en el caso del PVA.

Tabla IV.6. Infectividad en plantas de *N. benthamiana* inoculadas con la quimera CP-SwCM-R que expresa la CP del aislado PPV-SwCM y mutantes afectados en la fosfo-diana T306 de la proteína

Inóculo ^a	Clon	Infectividad*
T306A	1-1	4/4
	1-2	4/4
T306D	1	2/4
	2	3/4
T306N	1	4/4
	2	2/4
WT	1	4/4

^aLas plantas se inocularon manualmente con cDNA de los clones indicados

*Plantas infectadas/plantas inoculadas

El enlentecimiento en la progresión de la infección observado tras inocular los mutantes T306N y T306D, además de la menor acumulación de este último (**Fig. IV.23A**), sugerían que la modificación de la fosfo-diana T306 podría estar afectando a la eficacia biológica del patógeno. Para facilitar una posible evolución adaptativa de los mutantes, que proporcionara información acerca de sus potenciales defectos, las progenies de cada uno de ellos se sometieron a pases seriados (utilizando dos linajes independientes por construcción). Tras cuatro pases, el análisis por IC-RT-PCR y posterior secuenciación del fragmento de cDNA correspondiente a la región codificante de la CP reveló la aparición de mutaciones espontáneas en la progeie viral de todos los mutantes analizados (**Fig. IV.23B**). En la población viral de los dos linajes procedentes del mutante T306A se detectó reversión a la secuencia original del virus silvestre, al introducirse un cambio de G a A y la consiguiente

reversión de alanina a treonina en la posición 306. Por su parte, los dos linajes del mutante T306D mostraron una mutación de C a A que provocaba un cambio de treonina a lisina en la posición 273. Además, en uno de los linajes de este mutante apareció una segunda mutación, de G a A, que daba lugar a un cambio de alanina a treonina en la posición 128. Por último, cada uno de los linajes del mutante T306N siguió una historia evolutiva diferente. En uno de ellos se introdujo una mutación de A a G que causaba un cambio de asparagina a ácido aspártico en la posición 88, mientras que en el otro tuvieron lugar mutaciones de T a G y de C a T que causaron cambios de isoleucina a serina en la posición 77 y de leucina a fenilalanina en la posición 121.

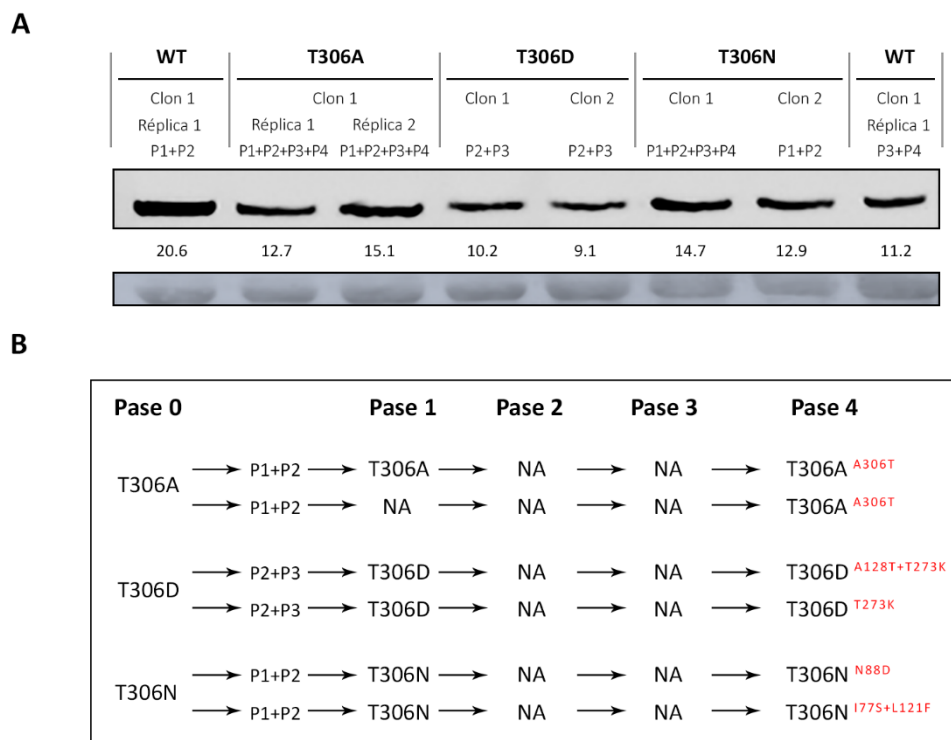


Figura IV.23. Acumulación viral y mutaciones secundarias que aparecen en la progenie de mutantes de la quimera CP-SwCM-R afectados en la fosfo-diana del motivo CK2 de la CP del PPV. A los 21 dpi se analizaron extractos de proteínas totales obtenidos a partir de plantas de *N. benthamiana* inoculadas mecánicamente con el cDNA de la quimera CP-SwCM-R del PPV, cuya secuencia correspondía a la de PPV-R a excepción de la CP que procedía de PPV-SwCM. Se ensayó la quimera silvestre (WT) y mutantes del virus en los que se suprimió (T306A) o emuló una fosforilación constitutiva (T306D) en la treonina 306 de la CP. Como control se utilizó un mutante en el que se introdujo un residuo neutro con una cadena lateral de tamaño similar a la del ácido aspártico (T306N). **(A)** Análisis mediante *Western Blot* específico anti-CP utilizando dos clones de cDNA de T306D y T306N, y dos réplicas de un único clon de T306A. Se indican los virus inoculados, los clones, las réplicas técnicas y las combinaciones de plantas analizadas. La intensidad de cada banda de CP, mostrada debajo de cada carril, se calculó con el programa *Quantity One 1-D (Bio-Rad)*. La señal de la proteína RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga. **(B)** Pases seriados en plantas de *N. benthamiana* de la progenie viral de cada uno de los mutantes. Cada linaje corresponde a un clon viral, o una de las réplicas del clon T306A. Como inóculo se emplearon mezclas de extractos de varias plantas. En el esquema se muestra la mutación que originalmente estaba presente en el cDNA inoculado, que permaneció inalterada tras el primer pase, así como las nuevas mutaciones (en rojo) detectadas tras el cuarto pase. (NA) No analizado.

El resultado de los pases seriados matiza la conclusión derivada de la inoculación primaria y sugiere que modificar la diana del motivo CK2 en la CP de PPV-SwCM provoca un efecto deletéreo

en la infección viral, aunque no tan drástico como el de la mutación de este mismo motivo en PVA, no extensible al aislado PPV-R. Parece, por tanto, que la repercusión de fosforilar este sitio en las CP del PPV y del PVA no sería la misma, y que en el caso del PPV su función podría ser compensada por otras fosforilaciones o cambios estructurales en distintas regiones de la proteína.

IV.2.2.2. La CP de PPV-BOR-3 (cepa Rec) comparte dianas de fosforilación con otros aislados y, además, puede fosforilarse específicamente en la S62

La CP de PPV-BOR-3 presenta propiedades atípicas en cuanto a su movilidad en geles SDS-PAGE, pues se detecta como una doble banda (Šubr & Glasa, 1999). Cuando esta proteína es tratada con fosfatasa, la banda de menor movilidad electroforética desaparece y únicamente se detecta la segunda, ya que la doble banda se debe a una fosforilación diferencial (Šubr *et al.*, 2007).

Con el objetivo de confirmar la fosforilación de la CP de PPV-BOR-3 y concretar cuál es la localización específica de los residuos modificados, se purificaron viriones de este aislado y se analizaron por técnicas de MS. En el laboratorio disponíamos de dos réplicas biológicas de viriones PPV-BOR-3 que habían sido purificados por el método de Laín *et al.* (1988) a partir de plantas de *N. clevelandii*, y que fueron utilizados para inocular manualmente un pequeño número de plantas de *N. benthamiana*. El tejido sistémicamente infectado de estas plantas se empleó a su vez para infectar un lote mayor de plantas de *N. benthamiana*, a partir de las cuales se purificaron viriones por el método de Sheveleva *et al.* (2016) modificado. Los viriones obtenidos a partir de *N. benthamiana* junto con las dos réplicas biológicas de viriones PPV-BOR-3 procedentes de *N. clevelandii* se digirieron con tripsina y Lys-C, se fosfo-enriquecieron y se analizaron por LC-MS/MS. Los resultados permitieron mapear en la CP de PPV-BOR-3 fosforilaciones en los residuos S81, S101, S118 y T254 (**Anexo 6**). Además, en la CP de PPV-BOR-3 se detectó una nueva fosforilación en la serina 62 (**Fig. IV.22B**), una modificación que ya había sido predicha por el grupo de M. Glasa y Z. Šubr (Šubr *et al.*, 2010). Esta fosforilación nunca antes se había detectado en ninguno de los múltiples análisis a los que se había sometido la CP de PPV-R (**Anexo 5** y **Anexo 6**); aunque, hay que tener en cuenta que los péptidos que cubren esta posición suelen ser poco abundantes, por lo que no se puede descartar que la S62 también pueda modificarse en la CP de PPV-R. Sin embargo, que la S62 no se conserve en la CP de PPV-SwCM (**Fig. IV.21**), parece sugerir que la fosforilación en esta posición podría ser específica de la CP de PPV-BOR-3. No se encontraron más sitios fosforilados, pero el hecho de que fueran muy poco abundantes los péptidos que albergaban los aminoácidos T71, T304 o T313 impide obtener conclusiones fiables acerca de la posible modificación de estos residuos en PPV-BOR-3. Las posiciones equivalentes a las fosfo-dianas en posición 25 y 106 las ocupan aminoácidos que no podrían ser fosforilados en este aislado (**Fig. IV.21**).

Estos resultados, junto con los del mapeo de la CP del aislado PPV-SwCM, ponen de manifiesto que la fosforilación está extendida entre las distintas cepas del PPV, y confirman que muchos de los residuos fosforilables están compartidos entre ellas, pero que también hay dianas más específicas.

IV.2.2.3. La CP de los aislados PPV-SwCM (cepa C) y PPV-BOR-3 (cepa Rec) se modifica por O-GlcNAcilación

En un primer intento de determinar si la CP de PPV-SwCM y PPV-BOR-3 se modifica por O-GlcNAcilación, los viriones obtenidos anteriormente se analizaron por MALDI-TOF. En el caso de la CP de PPV-SwCM, no se recuperaron péptidos trípticos que cubrieran la región comprendida entre los aminoácidos 17 y 72, donde presumiblemente tendrían lugar las O-GlcNAcilaciones. Por otro lado, tampoco en su caso la mala digestibilidad de la CP de PPV-BOR-3 nos permitió obtener información de calidad. Como método alternativo de determinar de forma cualitativa la posible O-GlcNAcilación de la CP de estos aislados, se aprovecharon las pequeñas diferencias de movilidad en SDS-PAGE que se habían observado en la CP de PPV-R procedente de plantas de *N. benthamiana* silvestres o deficientes en SEC (SEC-b2), debidas a su diferente nivel de O-GlcNAcilación (Pérez, 2014).

En este ensayo se inocularon manualmente plantas de *N. benthamiana* silvestres y SEC-b2 con extractos de plantas infectadas con los virus CP-SwCM-R, PPV-BOR-3 y PPV-R. El tejido sistémicamente infectado se recolectó a los 17 dpi, y mediante SDS-PAGE y *Western Blot* anti-CP se analizó la movilidad electroforética de la CP de las distintas construcciones en plantas silvestres y SEC-b2 (Fig. IV.24). Los resultados indicaron que la CP de PPV-SwCM, PPV-BOR-3 y PPV-R de las plantas SEC-b2 poseía una mayor movilidad electroforética en comparación con la de las plantas silvestres. Esto indica que la proteína de los tres virus es susceptible de ser O-GlcNAcilada, y lo es por la misma enzima, SEC.

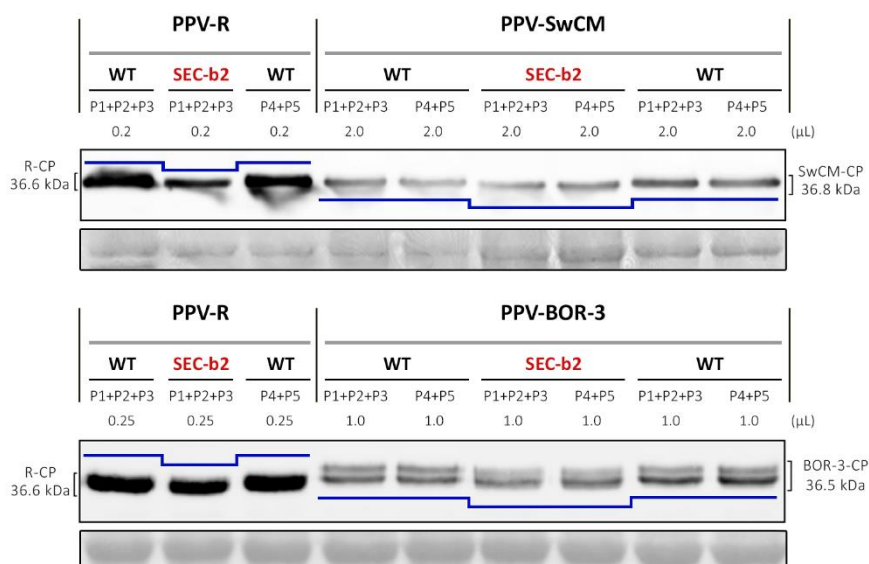


Figura IV.24. Migración de la CP de distintos aislados del PPV obtenida a partir de plantas de *N. benthamiana* WT y SEC-b2 infectadas. Extractos crudos de hojas sistémicamente infectadas de plantas de *N. benthamiana* inoculadas mecánicamente, recogidas a los 17 dpi, se analizaron mediante *Western blot* anti-CP. En la figura se indican, los inóculos virales, el tipo de planta infectada, la combinación de plantas analizadas y el volumen de extracto cargado. La interpretación de las diferencias de movilidad electroforética de la CP aparece representada con líneas azules. La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluyó como control de carga.

La confirmación de que la fosforilación y *O*-GlcNAcilación de los viriones del PPV tiene lugar en el huésped natural *P. persica*, y afecta a cepas tan diversas como D, C, y Rec, sugiere que el papel regulatorio atribuido a estas modificaciones es parte de una estrategia general que tiene lugar durante las interacciones huésped-virus.

IV.3. Emular una fosforilación permanente en residuos específicos de la región central distal de la CP de PPV-R afecta negativamente al movimiento viral

En el Capítulo IV.1 se concluyó que emular la fosforilación constitutiva en distintas regiones de la CP afectaba, de manera más o menos drástica, a la infección por el PPV. En este nuevo capítulo se ha tratado de determinar qué etapas de la infección pueden ser afectadas por esta modificación y así intentar establecer una relación entre la fosforilación de la proteína y la función que la misma desempeña durante la infección viral.

Para aumentar las posibilidades de infección de los mutantes fosfo-miméticos en las posiciones 254 y 313, y paralelamente facilitar la identificación de la etapa de la infección viral perturbada por las mutaciones T254D y T313D, ambos cambios fueron introducidos en el plásmido binario pLX-PPV, una construcción que permite inocular plantas mediante agroinfiltración, un método más eficiente que la inoculación manual con cDNA, a la que ya me he referido anteriormente. Para tratar de averiguar si las mutaciones afectan a la infección local por el virus, se infiltraron pequeñas regiones de hojas de *N. benthamiana* con cultivos bacterianos que expresaban las construcciones pLX-PPV-T254D (aT254D), pLX-PPV-T313D (aT313D), o pLX-PPV (aWT) como control positivo (**Fig. IV.17**). Como control negativo se empleó el clon pPPV-CI^{DD3,4AA} (aCI^{DD3,4AA}), cuyo cDNA viral porta una mutación en la secuencia codificante de la proteína CI que impide el movimiento del PPV, pero no su replicación (Gómez De Cedrón *et al.*, 2006). Todas las mezclas de agroinfiltración también incluyeron los plásmidos pP1b y pRFP que expresan, respectivamente, el supresor del silenciamiento de RNA P1b del *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) (Rodamilans *et al.*, 2013) y la RFP (Tanaka *et al.*, 2011). El supresor del silenciamiento garantiza niveles de expresión sostenidos en las hojas infiltradas con independencia de la eficacia de la infección viral, mientras que la RFP, al no moverse de una célula a otra, delimita el área de agroinfiltración. La monitorización de la fluorescencia emitida por la GFP y la RFP, mostró que la GFP expresada a partir de los mutantes T254D y T313D permanecía confinada en el área de agroinfiltración (delimitada por la expresión de RFP), de forma similar a lo que ocurría con el mutante en la proteína CI deficiente en movimiento. Por el contrario, como era de esperar, la GFP producida por el virus silvestre, capaz de moverse, sobrepasaba claramente los límites marcados por la fluorescencia de la RFP (**Fig. IV.25**).

Para discriminar si la incapacidad de traspasar el área agroinfiltrada de los mutantes T254D y T313D se debía a una deficiencia específica del movimiento, o era un efecto colateral al deterioro de la replicación, se llevó a cabo un experimento donde se evaluó la capacidad replicativa del RNA viral

de los mutantes mencionados. Se agroinfiltraron hojas completas con las construcciones aT254D, aT313D y aWT, incluyendo en este caso como control negativo la construcción pPPV-CI^{KS91,92AA} (aCI^{KS91,92AA}), cuyo cDNA viral posee una mutación en la secuencia codificante de la proteína CI que impide al virus replicarse (Gómez De Cedrón *et al.*, 2006). Como en el ensayo anterior, en las mezclas de infiltración se incluyeron bacterias que expresaban el supresor de silenciamiento P1b. La capacidad de replicarse de los distintos genomas virales se evaluó a los 5 dpi, cuantificando la acumulación de hebra negativa de RNA viral por medio de RT-qPCR específica de banda. Los valores obtenidos para las muestras de los mutantes T254D y T313D resultaron ser ligeramente inferiores a los obtenidos para el virus silvestre, pero mucho mayores al nivel basal detectado en la muestra del mutante no replicativo CI^{KS91,92AA}, demostrándose así, que ambos mutantes fosfomiméticos eran capaces de replicarse (Fig. IV.26A).

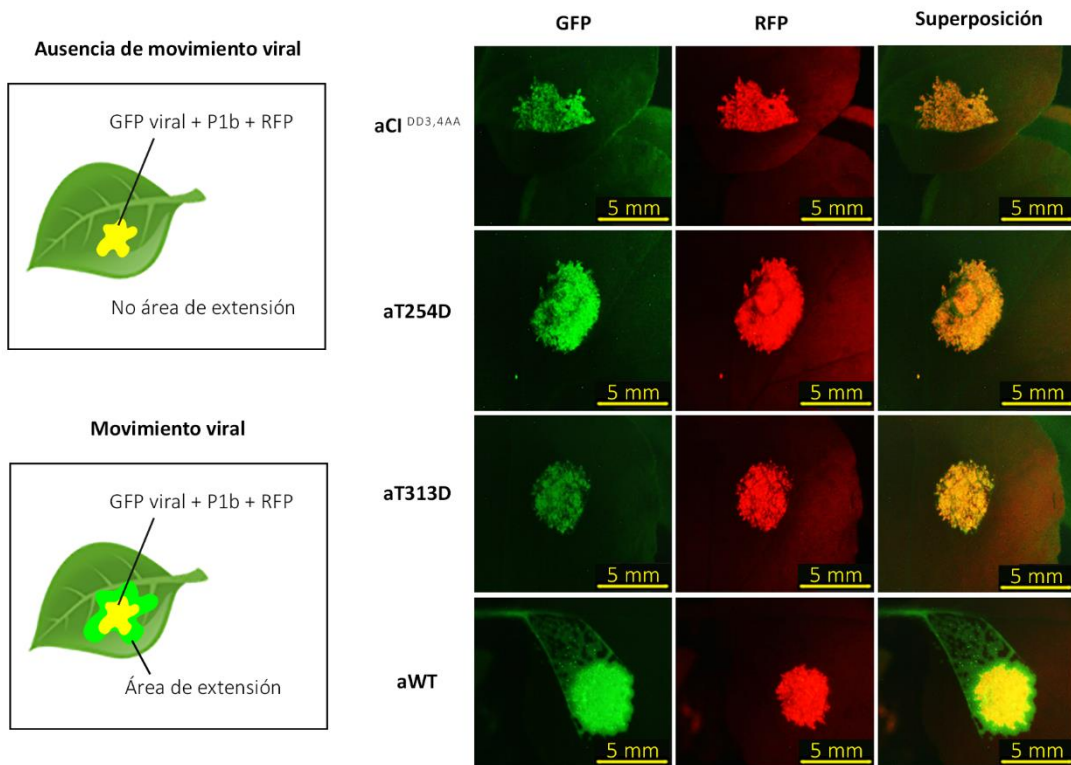


Figura IV.25. Efecto de las mutaciones fosfo-miméticas T254D y T313D en el movimiento del PPV. Se infiltraron pequeñas regiones de las hojas con una mezcla de tres cultivos de bacterias portadoras de las construcciones virales indicadas desde las que se expresaba GFP, de plásmidos que expresan el supresor del silenciamiento de RNA P1b del CVYV y la RFP. Las hojas agroinfiltradas se recogieron a los 7 dpi, momento en el que se tomaron imágenes del área infiltrada bajo un microscopio de epifluorescencia con filtros adecuados para diferenciar la fluorescencia de la GFP y la RFP. En la parte izquierda de la figura aparece una representación esquemática del resultado esperado en presencia o ausencia de movimiento viral. Barra, 5 mm.

Dos semanas después de recoger las hojas agroinfiltradas para el análisis de la replicación viral, las hojas superiores a las infiltradas de algunas plantas de *N. benthamiana* inoculadas con los clones aT254D o aT313D desarrollaron síntomas leves compatibles con infección por PPV. El

análisis por IC-RT-PCR de estas hojas confirmó que las seis plantas inoculadas con la construcción aT254D y al menos tres de las inoculadas con la aT313D se encontraban infectadas a nivel sistémico. La secuenciación del cDNA amplificado reveló que la progenie viral de ambos mutantes había evolucionado introduciendo cambios espontáneos en la CP en todas las plantas analizadas (**Fig. IV.26B**). En la progenie viral de las seis plantas inoculadas con el mutante T254D se habían introducido cambios en la posición 254, apareciendo la mutación D254N en 5 de ellas y D254I en la restante. En el caso de las plantas inoculadas con el virus T313D, la mutación inicial se mantuvo en la progenie viral de las tres plantas en las que se observaron síntomas sistémicos, pero en todas ellas se habían incorporado mutaciones secundarias, diferentes en cada caso: N301K, E235G o T254R. Es importante destacar que, aunque estas tres mutaciones espontáneas afectan a residuos distintos, con todas ellas se consigue una ganancia neta de carga, y, además, una de las mutaciones afecta a la fosfo-diana T254.

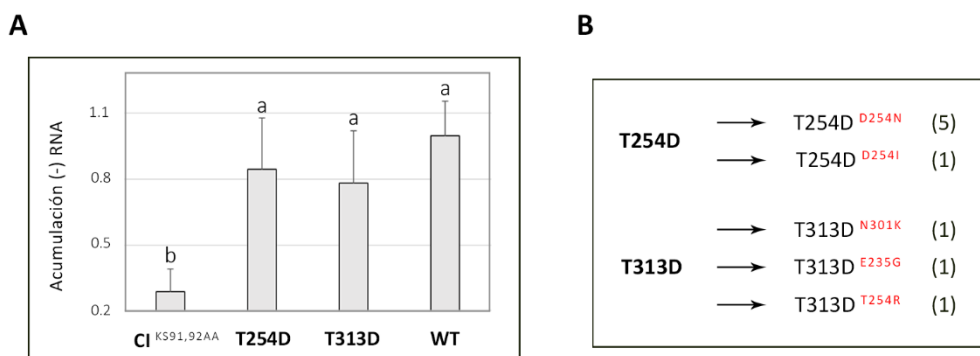


Figura IV.26. Evaluación de la capacidad replicativa de mutantes de PPV-R en los que se emuló la fosforilación constitutiva en las fosfo-dianas T254 (T254D) o T313 (T313D). **(A)** Cuantificación de la acumulación de hebra negativa de RNA viral (-RNA) por medio de RT-qPCR. Se infiltraron hojas completas de *N. benthamiana* con cultivos de *A. tumefaciens* que expresan los virus a ensayar. Las mezclas de agroinfiltración también incluían un cultivo bacteriano a partir del cual se expresaba el supresor del silenciamiento de RNA P1b del CVYV. Los valores obtenidos con cada mutante se referenciaron a los del virus WT (al que se le asignó el valor 1). Se infiltraron 6 plantas con dos cultivos independientes de *Agrobacterium* por construcción, que se analizaron agrupadas en tres replicas biológicas (mezclas de dos plantas infiltradas con el mismo cultivo, y mezcla de las terceras plantas inoculadas con cada cultivo). El análisis de la varianza unidireccional (ANOVA) con un valor de $P=0.009$ y el test de Bonferroni, confirmaron que la acumulación de -RNA en los mutantes T254D y T313D fue similar a la del virus WT (a) y diferente de la del mutante Cj^{KS91,92AA} (b). Las líneas en la gráfica representan la \pm DS. **(B)** Mutaciones identificadas en la progenie viral detectadas por amplificación por IC-RT-PCR y posterior secuenciación de la región codificadora de la CP en hojas superiores a las inoculadas de las plantas agroinfiltradas que mostraban síntomas de infección sistémica. Las muestras se recogieron entre los 25 y los 26 dpi. Se indica el número de plantas en las que se detectaron cada una de las mutaciones.

Todos estos hallazgos, restricción de la GFP derivada de los virus al área agroinfiltrada, acumulación local de la hebra negativa del RNA viral, e infección sistémica a tiempos tardíos de la infección cuando aparecen mutaciones potencialmente compensatorias, apoyan la conclusión de que emular la fosforilación constitutiva en la región central distal (T254 o T313) de la CP de PPV-R, no afecta notablemente la replicación viral, pero perturba drásticamente la capacidad del virus de moverse a corta distancia.

IV.4. Emular la fosforilación permanente en diferentes residuos de la CP de PPV-R afecta la estabilidad de la proteína y la formación de viriones

Para determinar si los efectos deletéreos observados durante la infección por PPV-R al emular la fosforilación constitutiva en las dianas de serina de la mitad N-terminal de la CP podían estar relacionados con alteraciones en la estabilidad de la proteína, se realizaron experimentos de incubación *in vitro* de extractos crudos de plantas en los que se acumulaban diferentes formas mutadas de la CP del PPV. En concreto, se estudiaron las CP de los mutantes 4SA y 4SD, que habían infectado sistémicamente plantas de *N. benthamiana* sin introducir mutaciones secundarias. Se prepararon en condiciones nativas extractos de hojas de *N. benthamiana* sistémicamente infectadas con cada uno de estos dos mutantes (o con el virus silvestre) y se incubaron a 25 °C, determinándose por *Western Blot* la integridad y los niveles de la acumulación de CP a diferentes tiempos de incubación. No se observaron cambios notables en los niveles de CP de los virus WT y 4SA, incluso tras 2 horas de incubación (**Fig. IV.27A**), lo que indica que impedir la fosforilación no afecta gravemente la estabilidad de la proteína. Por el contrario, se comprobó que la cantidad de CP del mutante 4SD que permanecía intacta después de dos horas de incubación era muy pequeña (**Fig. IV.27B**). Este resultado sugiere que la inestabilidad de la proteína podría estar contribuyendo a los efectos deletéreos sobre la infección por PPV-R observados al emular un estado de fosforilación constitutiva en la mitad N-terminal de la CP.

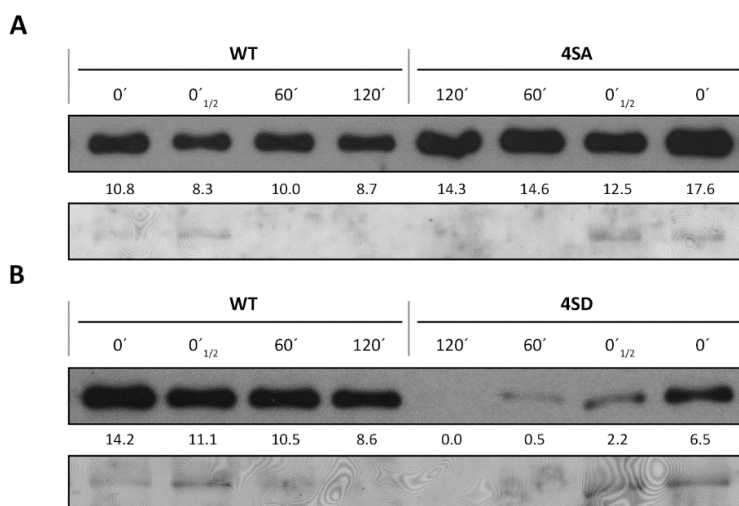


Figura IV.27. Ensayo de estabilidad de la CP de PPV-R del virus silvestre (WT) o de mutantes en los que se impide (4SA) o emula (4SD) la fosforilación en las serinas fosforilables de la mitad N-terminal de la proteína. El tejido sistémicamente infectado procedente de plantas de *N. benthamiana* inoculadas mecánicamente con extracto infectado con los distintos virus, fue recogido a los 21 dpi. Después de verificar por IC-RT-PCR y secuenciación que la progenie viral no portaba mutaciones adicionales en la CP, se prepararon extractos en condiciones nativas y se sometieron a *Western Blot* anti-CP inmediatamente después de la preparación (0' y 0'1/2, en el que se cargó la mitad de la muestra) o después de incubación a 25 °C durante los tiempos indicados. La estabilidad de la CP de los mutantes 4SA y 4SD se comparó con la del virus WT en (A) y (B), respectivamente. Los valores de intensidad de las bandas de CP que se muestran debajo de cada carril fueron calculados con el programa *Quantity One 1-D* (Bio-Rad). La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga.

El siguiente paso fue evaluar si podría estar ocurriendo algo similar con la CP de los mutantes T254D y T313D, en los que se emula la fosforilación constitutiva en las fosfo-dianas de la región central distal de la proteína. Sin embargo, como se explicó en apartados anteriores, estos virus no son capaces de provocar infecciones sistémicas a menos que introduzcan mutaciones secundarias en la secuencia de su CP. De ahí que en este caso se decidiera estudiar directamente en hojas agroinfiltradas la estabilidad de la proteína. Se infiltraron completamente hojas de *N. benthamiana* con cultivos bacterianos que expresaban las construcciones mutantes aT254D o aT313D, ensayando en paralelo el clon del virus silvestre aWT como control positivo de infección. En todas las mezclas de infiltración se incluyeron bacterias que expresaban el supresor del silenciamiento P1b. Como en el experimento anterior, los extractos de hojas agroinfiltradas que contenían la CP de los mutantes T254D o T313D se incubaron a 25 °C durante 2 horas, tomándose alícuotas a distintos tiempos. Tanto la CP del virus T313D como la de T254D resultaron ser inestables, observándose en este último una tasa de degradación de la proteína algo mayor (Fig. IV.28). Así pues, el efecto deletéreo sobre la infección viral que tiene el emular la fosforilación constitutiva en las fosfo-dianas de la región central distal (T254 y T313) de la CP podría también estar relacionado con un aumento en la inestabilidad de la proteína.

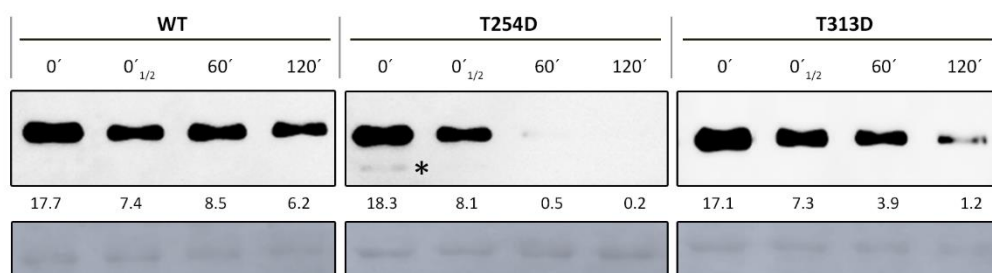


Figura IV.28. Ensayo de estabilidad de la CP de PPV-R del virus silvestre (WT) o de mutantes en los que se emuló la fosforilación en alguna de las treoninas fosforilables de la región central distal de la CP (T254D o T313D). Se infiltraron hojas completas de *N. benthamiana* con una mezcla de cultivos que expresan los virus a ensayar, junto con el supresor del silenciamiento de RNA P1b del CVYV. El tejido inoculado se recogió a los 5 dpi, y, después de verificar por IC-RT-PCR y posterior secuenciación que la progenie viral no portaba mutaciones no intencionadas, se prepararon extractos en condiciones nativas y se sometieron a *Western Blot* anti-CP inmediatamente después de la extracción (0' y 0'_{1/2}, en el que se cargó la mitad de la muestra) o después de la incubación a 25 °C durante los tiempos indicados. Los valores de intensidad de las bandas de CP que se muestran debajo de cada carril fueron calculados con el programa *Quantity One 1-D* (Bio-Rad). La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga. (*) Señal que podría corresponder con un producto de degradación de la CP.

Los resultados obtenidos al ensayar los mutantes 4SD, T254D y T313D podrían estar sugiriendo que tanto las fosforilaciones de la mitad N-terminal como las de la región central distal de la CP están implicadas en funciones similares durante el ciclo viral.

Una vez observada la inestabilidad *in vitro* de la CP de los mutantes 4SD, T254D y T313D, nos preguntamos si este defecto estaba causado por alteraciones en el ensamblaje de las partículas virales. En primer lugar, se analizaron las partículas formadas por el mutante 4SD. Para ello, se

emplearon extractos nativos preparados a partir de hojas de *N. benthamiana* sistémicamente infectadas, en las cuales la progenie viral acumulada había sido previamente analizada por IC-RT-PCR y secuenciación con el fin de asegurar la ausencia de segundas mutaciones espontáneas. Paralelamente, como control positivo, se utilizaron extractos de proteínas procedentes de plantas infectadas con el virus silvestre. Ambos tipos de extracto fueron analizados mediante ISEM y sometidos a fraccionamiento por centrifugación en gradiente de sacarosa seguido de *Western Blot* anti-CP, justo después de su preparación (T=0) o tras incubarse a 25 °C durante 60 minutos (T=60).

La estructura de las partículas virales presentes en los extractos no incubados (T=0) del mutante 4SD detectadas por ISEM era similar a la del virus silvestre, sin embargo, en algunas rejillas correspondientes a la muestra del mutante incubada durante una hora (T=60) se observaron partículas estructuralmente deformes (**Fig. IV.29A**). Estas partículas se visualizaron en 6 de las 18 rejillas escrutadas, procedentes de 3 ensayos independientes, examinándose un mínimo de 20 partículas en al menos 3 campos por cada rejilla. En el caso del virus silvestre nunca se observaron estas partículas deformes, independientemente de si la muestra se sometía o no a incubación antes del análisis.

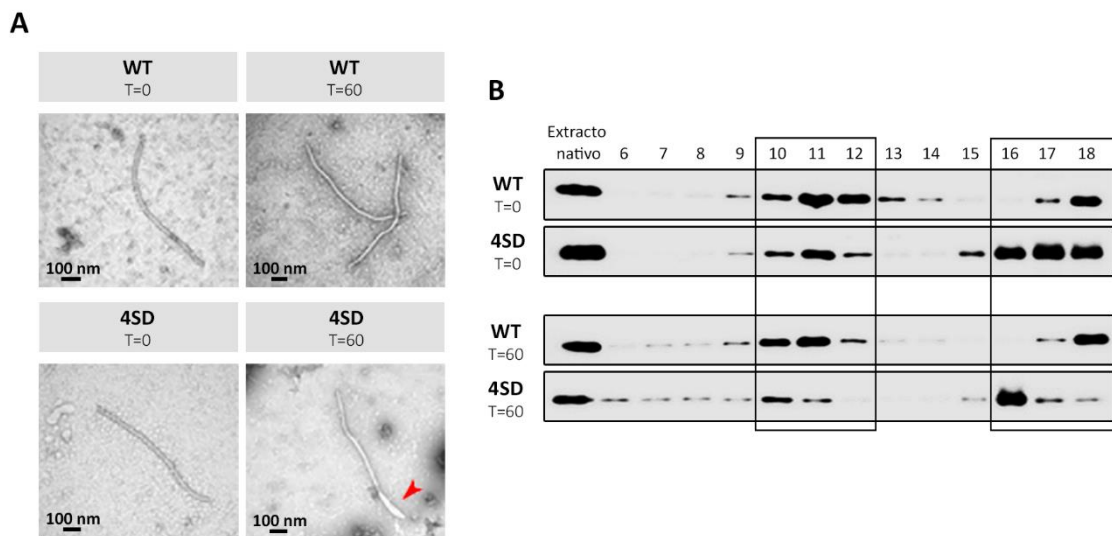


Figura IV.29. Análisis estructural de las partículas virales de PPV-R con mutaciones que emulan fosforilaciones constitutivas en residuos de la mitad N-terminal de la CP (4SD). Imágenes obtenidas mediante ISEM (**A**) y fraccionamiento por centrifugación en gradiente de sacarosa seguido de *Western Blot* anti-CP (**B**) de extractos preparados en condiciones nativas a partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas con el virus silvestre o el mutante 4SD. Los extractos se prepararon a partir de tejido sistémicamente infectado, recogido a 21 dpi, después de verificar por IC-RT-PCR y posterior secuenciación la ausencia de mutaciones no intencionadas, y se analizaron por ISEM y fraccionamiento en gradiente de sacarosa inmediatamente después de ser preparados (T=0) y después de incubarlos durante 60 min a 25 °C (T=60). En (A), las deformaciones observadas en algunas de las partículas virales se indican con una cabeza de flecha roja. En los *Western Blot* del panel (B) se muestra la inmunoreacción del extracto no fraccionado y de fracciones individuales del gradiente de sacarosa, numeradas (1-18) desde el fondo del tubo. Se han recuadrado las fracciones donde normalmente se concentran las partículas virales (10-12) y la CP libre o ensamblada en oligómeros de pequeño tamaño (16-18). El test de Fisher realizado sobre el número total de partículas deformes y no deformes encontradas a T=0 y T=60 en las muestras WT y 4SD de tres experimentos independientes ($P < 0.00001$) avaló estadísticamente que estas partículas únicamente se encuentran en la muestra del virus mutante.

Por otra parte, los extractos se sometieron también a centrifugación en gradiente de sacarosa. En línea con los resultados del ISEM, aunque las muestras del virus silvestre y el mutante 4SD tomadas a T=0 revelaban ciertas diferencias en las fracciones de la parte superior del gradiente, en general los perfiles internos resultaron muy similares, detectándose partículas virales mayoritariamente en las fracciones 10-12 (**Fig. IV.29B**). Sin embargo, lo que resultó más notorio fue que mientras que el perfil de sedimentación de las partículas del virus silvestre solo se vio ligeramente afectado por la incubación *in vitro*, el pico de los viriones 4SD del extracto centrifugado después de una hora de incubación (T=60) se encontró desplazado notablemente hacia el fondo del gradiente, revelando un incremento en el coeficiente de sedimentación de las partículas virales (**Fig. IV.29B**). En un análisis ISEM posterior de algunas de las fracciones internas (7+8 y 11) del gradiente a T=60 del mutante 4SD, únicamente se detectaron partículas virales similares a las del virus silvestre, lo que sugiere que las partículas deformes detectadas en el extracto no fraccionado se “perdieron” durante el proceso de centrifugación.

Para determinar si las CP de los mutantes T254D y T313D eran capaces de formar partículas virales, se analizaron por centrifugación en gradiente de sacarosa y *Western Blot* anti-CP extractos preparados en condiciones nativas a partir de las hojas agroinoculadas utilizadas en los ensayos de degradación y RT-qPCR descritos anteriormente (**Fig. IV.26A** y **Fig. IV.28**). Para evitar distorsiones debidas a la posible existencia de las mutaciones compensatorias detectadas en la población viral del tejido sistémicamente infectado (**Fig. IV.26B**), en este análisis únicamente se utilizó el tejido inoculado de aquellas plantas en las que no se detectó infección sistémica a tiempos tardíos.

Como se esperaba, en la muestra del virus silvestre la señal de la CP se observó en las fracciones intermedias donde habitualmente se detectan las partículas virales (**Fig. IV.30**). Por el contrario, y de forma similar al mutante deficiente en replicación y ensamblaje C1^{KS91,92AA} utilizado como control negativo, no se detectaron partículas virales en los extractos infectados correspondientes a los mutantes T254D y T313D, en los que la señal de la proteína apareció confinada en las fracciones superiores del gradiente. Curiosamente, en la muestra T313D se observaron bandas débiles desplazadas hacia las fracciones intermedias, lo que podría sugerir que este mutante posee una ligera propensión al ensamblaje, completamente ausente en el caso de la CP del mutante T254D (**Fig. IV.30**).

Estos resultados sugieren que mimetizar la fosforilación, tanto en la mitad N-terminal de la CP de PPV-R como en su región central distal, perturba el ensamblaje viral; si bien el efecto es más drástico en el último caso, lo que está de acuerdo con el fenotipo más severo y con el bloqueo del movimiento de célula a célula observado en los mutantes T254D y T313D.

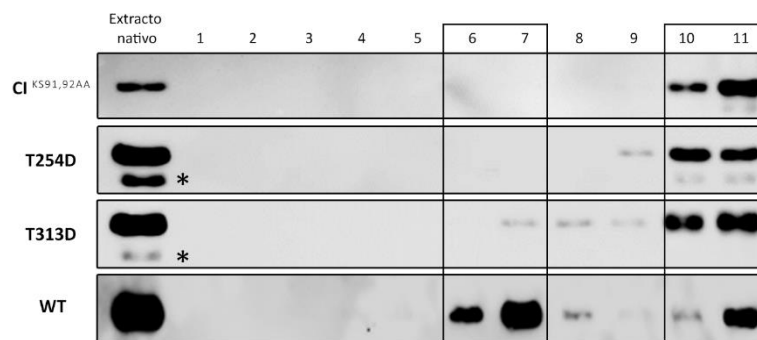


Figura IV.30. Evaluación de la capacidad de formación de viriones de mutantes de PPV-R en los que se emulan fosforilaciones constitutivas en residuos de la región central distal de la CP (T254 o T313). En el análisis se incluyeron también el virus silvestre (WT) y un mutante deficiente en replicación (CI^{K591,92AA}), como controles de formación de viriones positivo y negativo, respectivamente. Se infiltraron hojas completas de *N. benthamiana* con mezclas de cultivos bacterianos que expresan los diferentes virus a ensayar, junto con el supresor del silenciamiento de RNA P1b del CVYV. Se prepararon extractos en condiciones nativas a partir de tejido inoculado recogido a 5 dpi, después de verificar por IC-RT-PCR y posterior secuenciación que la progenie viral no portaba mutaciones no intencionadas, y se fraccionaron por centrifugación en gradientes de sacarosa. El extracto no fraccionado y las fracciones del gradiente (numeradas 1-11 desde el fondo del tubo) se analizaron por *Western Blot* anti-CP. Se han recuadrado las fracciones donde normalmente se concentran las partículas virales (6-7) y la CP libre o ensamblada en oligómeros de pequeño tamaño (10-11). (*) Señal que podría corresponder con un producto de degradación de la CP no ensamblada.

IV.5. Las fosforilaciones en las regiones central proximal y central distal de la CP de PPV-R pueden establecer vínculos funcionales

IV.5.1. La mutación T254K surgida en el contexto de un mutante 4SD, no mejora la competitividad del virus en ausencia de fosfo-emulación en la posición 118

El surgimiento de la mutación T254K en la progenie viral de las plantas inoculadas con el mutante 4SD sugiere que ésta podría desempeñar un papel importante compensando los efectos deletéreos de las propiedades fosfo-miméticas del mutante. Sin embargo, esta compensación parece no ser muy efectiva, ya que cuando se inocularon plantas de *N. benthamiana* con el extracto de una planta infectada con el mutante 4SD^{T254K}, aunque la mutación T254K se mantuvo en las cinco plantas inoculadas, en tres de ellas el virus evolucionó anulando la fosforilación constitutiva en uno de los residuos inicialmente mutados (4SD^{D118N+T254K}) (**Fig. IV.8**) [esta mutación, D118N, ya se había detectado en la progenie viral de plantas infectadas con el mutante original 4SD, ver Apartado IV.1.3.4].

Para determinar si la mutación compensatoria T254K proporciona una ventaja solo en el contexto del mutante 4SD, y si sigue siendo ventajosa después de surgir la segunda mutación D118N, se llevaron a cabo experimentos de competición. Para ello, la mutación T254K se incorporó a la construcción silvestre pICPPV-NK-IGFP (**Fig. IV.17**) y los cDNA del mutante resultante (T254K) y del virus silvestre se inocularon manualmente en plantas de *N. benthamiana*. A los 9 dpi, las plantas inoculadas con el mutante T254K desarrollaron síntomas de infección y expresión de GFP similares a los del virus no mutado (**Fig. IV.31A**). Al cabo de este tiempo la acumulación de CP

también fue prácticamente la misma en ambos virus (**Fig. IV.31B**). Más tarde, a los 22 dpi, se comprobó que la mutación T254K permanecía estable en la progenie viral de las tres plantas que se analizaron (**Fig. IV.31C**). Los extractos de tejido de plantas sistémicamente infectadas con el mutante T254K y con el virus silvestre, recogido a 22 dpi, se mezclaron en proporción 1.1 : 1 y la mezcla se inoculó en plantas de *N. benthamiana*. De forma similar, otro lote de plantas de *N. benthamiana* fue inoculado con una mezcla, en proporción 1.1 : 1, de extractos de tejido sistémicamente infectado, recogido a 21 dpi, de plantas en las que se acumulaban los virus 4SD^{D118N+T254K} y 4SD^{D118N} (**Fig. IV.32**).

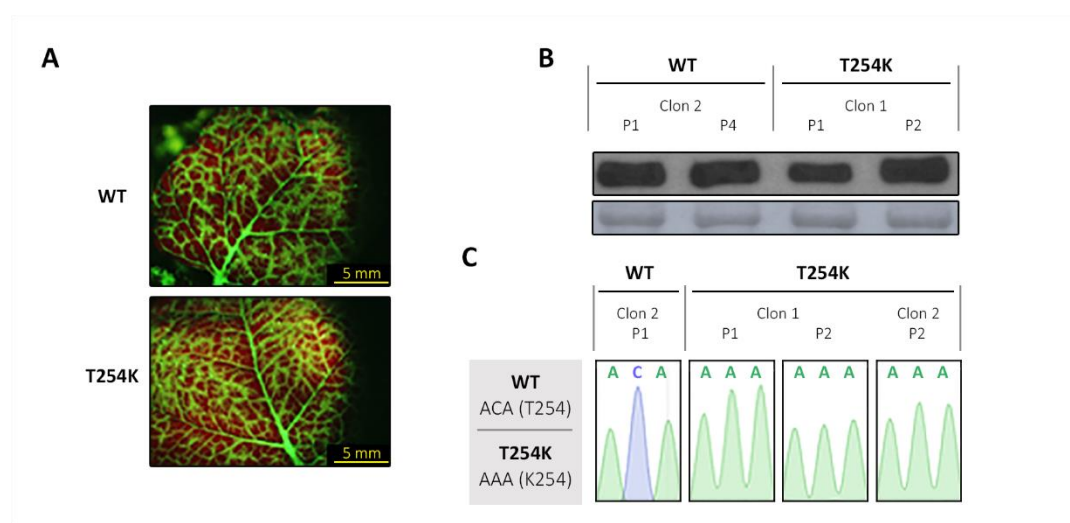


Figura IV.31. Análisis de la infección de un mutante de PPV-R en el cual se sustituyó la fosfo-diana T254 de la CP por un residuo de lisina (T254K). Se inocularon mecánicamente plantas de *N. benthamiana* con el cDNA del mutante T254K o del virus silvestre (WT) (dos clones por virus), y las hojas superiores a las inoculadas se recogieron a los 9 dpi. **(A)** Imágenes tomadas bajo el microscopio de epifluorescencia de hojas superiores a las inoculadas. Barra, 5 mm. **(B)** Análisis *Western Blot* anti-CP de extractos de hojas infectadas sistémicamente de plantas individuales inoculadas con los virus indicados. La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga. **(C)** Cromatogramas que muestran la ausencia de mutaciones no intencionadas en la posición 254 de la CP de los virus analizados.

En el experimento de competición entre el virus silvestre y el mutante T254K, a pesar de que la representación del virus silvestre en el inóculo era ligeramente inferior, en tres de las cuatro plantas inoculadas solo se detectó este virus, mientras que en la restante se detectaron coexistiendo ambos (panel izquierdo de la **Fig. IV.32**). Este resultado indica que la mutación T254K junto con el residuo S118 silvestre no mejora la eficacia biológica del virus. De forma similar, en la competición entre los mutantes 4SD^{D118N+T254K} y 4SD^{D118N}, el doble mutante, a pesar de encontrarse ligeramente sobrerrepresentado en el inóculo, no fue capaz de imponerse en ninguna de las cuatro plantas analizadas. De hecho, en una de estas plantas se encontró únicamente el mutante 4SD^{D118N} (panel derecho de la **Fig. IV.32**). Por tanto, la mutación T254K tampoco proporciona una ventaja adaptativa al virus cuando la posición 118 está ocupada por un residuo de asparagina no fosforilable.

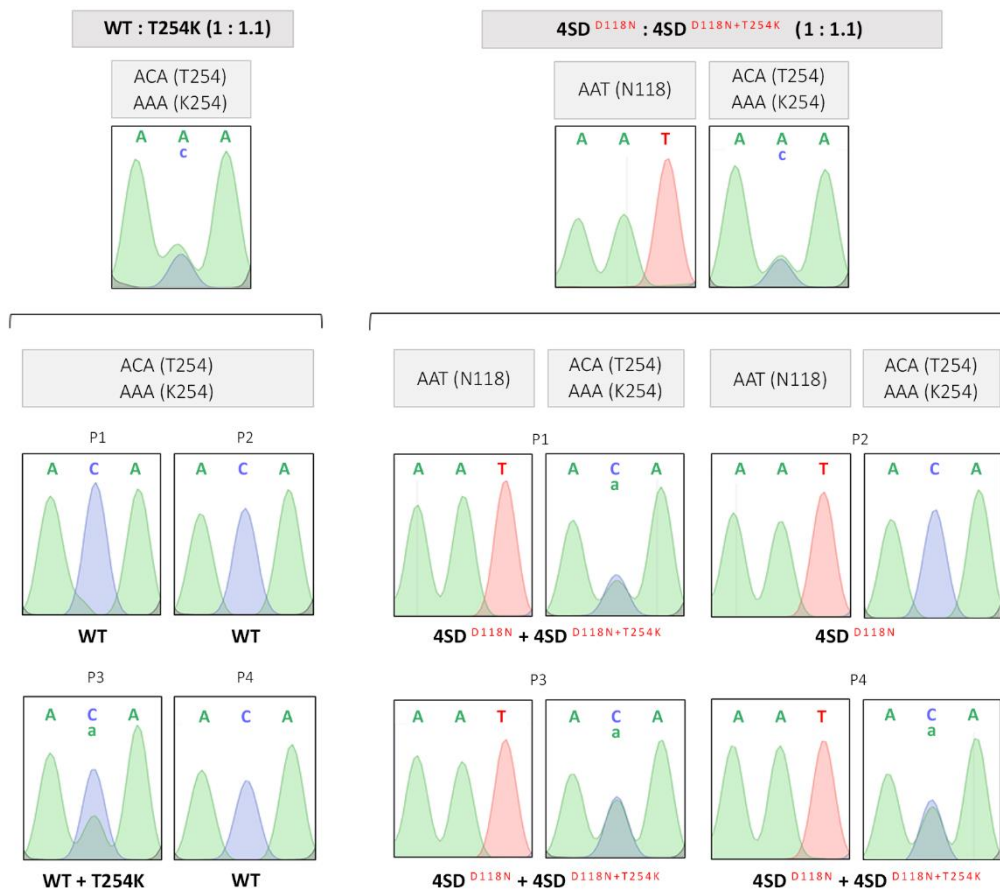


Figura IV.32. Análisis del efecto sobre la competitividad adaptativa de la mutación T254K cuando la posición 118 ocupa un aminoácido que no mimetiza una fosforilación constitutiva. Se inocularon plantas de *N. benthamiana* con mezclas de extractos de plantas infectadas con el virus silvestre y el mutante T254K (panel izquierdo) o con los mutantes 4SD^{D118N} y 4SD^{D118N+T254K} (panel derecho) en proporción 1 : 1.1. La composición de la progenie viral de las plantas infectadas se determinó analizando extractos de hojas superiores a las inoculadas por amplificación mediante IC-RT-PCR y secuenciación de un fragmento de cDNA que cubría la totalidad de la región codificante de la CP. Los cromatogramas muestran la secuencia de los codones mutados. El virus o los virus identificados en cada planta se indican debajo de cada cromatograma.

IV.5.2. La inestabilidad de la CP provocada por fosfo-mimetizaciones en su mitad N-terminal, puede compensarse parcialmente por mutaciones en la región central distal de la proteína

En el Capítulo IV.4 se mostró que la emulación constitutiva de fosforilaciones en la mitad N-terminal de la CP de PPV-R (mutante 4SD) afectaba a la estabilidad de la proteína (**Fig. IV.27B**) y daba lugar a la formación de partículas anómalas (**Fig. IV.29A**). Para valorar si la mutación espontánea presuntamente compensatoria T254K corregía estos defectos, se analizó la estabilidad de la CP del mutante 4SD^{T254K} y las propiedades de las partículas virales que es capaz de formar. En primer lugar, se realizó un ensayo de incubación *in vitro* de extractos preparados en condiciones nativas a partir de hojas sistémicamente infectadas de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con el mutante 4SD en cuya progenie viral permanecía el inóculo 4SD no alterado y otras en las cuales apareció la mutación adicional T254K. La cantidad de CP que se mantenía estable después de una hora de incubación era mayor en la muestra del mutante 4SD^{T254K} que en la del mutante 4SD, siendo la

diferencia más acusada después de dos horas de incubación (**Fig. IV.33A**). El hecho de que un cambio en la región central distal de la CP de PPV-R sea capaz de corregir (aunque parcialmente) el defecto originado en la mitad N-terminal, también apoya la existencia de una conexión funcional a larga distancia entre ambas regiones de la proteína.

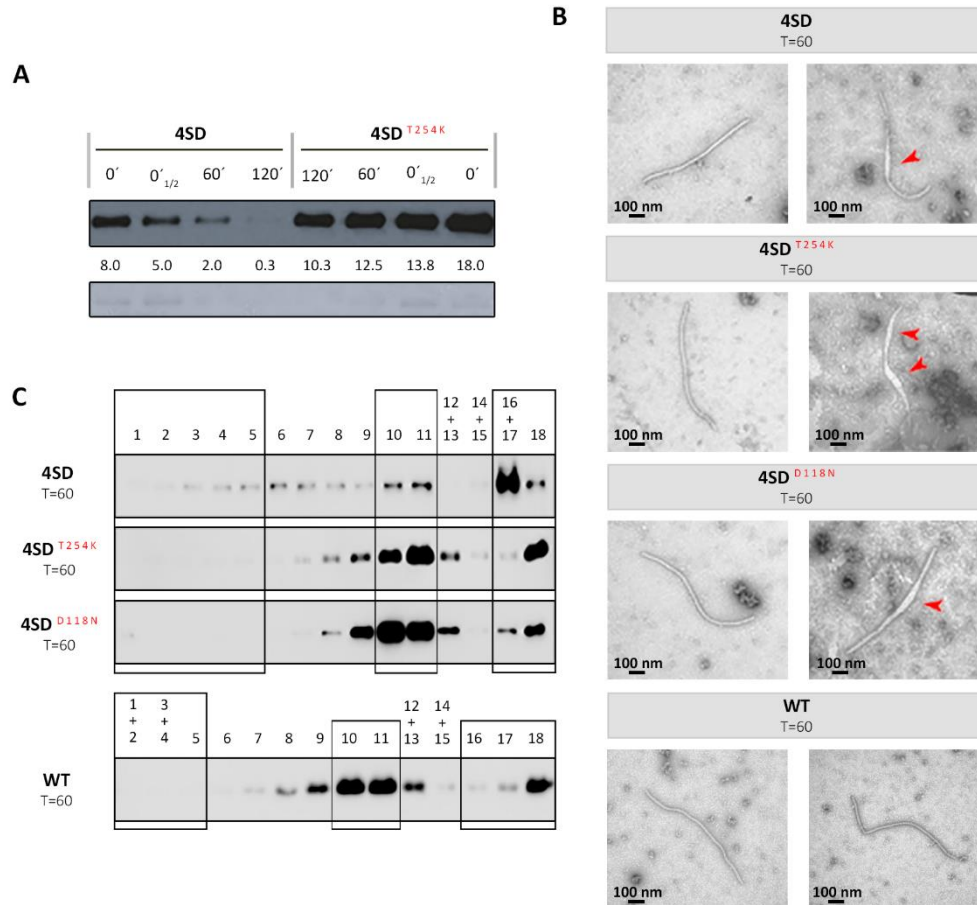


Figura IV.33. Evaluación de la capacidad de compensación de los defectos estructurales del mutante 4SD por las mutaciones espontáneas T254K y D118N. Se prepararon extractos en condiciones nativas a partir de tejido sistémicamente infectado de plantas de *N. benthamiana* conteniendo 4SD sin mutaciones adicionales, 4SD^{T254K} o 4SD^{D118N} recogido a los 21 dpi. **(A)** Western Blot anti-CP de extractos 4SD y 4SD^{T254K} analizados inmediatamente después de su preparación (0' y 0'_{1/2}, en el que se cargó la mitad de la muestra) o después de la incubación a 25 °C durante los tiempos indicados. Los valores de intensidad de las bandas de CP que se muestran debajo de cada carril fueron calculados con el programa *Quantity One 1-D (Bio-Rad)*. La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga. **(B)** Imágenes obtenidas mediante ISEM de extractos 4SD, 4SD^{T254K} y 4SD^{D118N} incubados durante una hora a 25 °C (T=60). Las deformaciones observadas en algunas de las partículas virales se indican con cabezas de flecha rojas. **(C)** Western Blot anti-CP de las fracciones de gradientes de sacarosa sobre los que se habían centrifugado los mismos extractos. Las alícuotas numeradas desde el fondo (1-18) se cargaron en el gel de forma individual o combinadas según se indica. Se han recuadrado las fracciones que contienen la CP con mayor coeficiente de sedimentación (1-5) o que albergan las partículas virales (10-11) o CP libre o ensamblada en oligómeros de pequeño tamaño (16-18).

A continuación, se comparó la morfología de las partículas virales formadas y las propiedades de sedimentación de la CP del mutante 4SD^{T254K} con las del mutante 4SD y las del virus silvestre. En este experimento se incluyeron también plantas inoculadas con el virus 4SD que habían sufrido la mutación D118N, que parecía tener un efecto compensatorio más eficaz que el de la mutación distante T254K.

Se prepararon extractos en condiciones nativas a partir de las diferentes plantas infectadas y se incubaron durante 60 minutos a 25 °C. Al igual que se había observado previamente en la muestra 4SD, las imágenes obtenidas por ISEM revelaron la presencia de partículas estructuralmente deformes en proporción variable en las muestras que contenían al mutante 4SD^{D118N} (en 1 de 8 rejillas analizadas) o 4SD^{T254K} (en 1 de 4 rejillas analizadas) (**Fig. IV.33B**). Sin embargo, la apariencia del perfil de sedimentación en gradiente de sacarosa de las partículas virales de ambos mutantes espontáneos recordaba más a la del virus silvestre que a la del mutante 4SD del que provenían (**Fig. IV.33C**). Estos resultados constituyen otra evidencia de que mutaciones espontáneas tanto en los residuos inicialmente mutados como en residuos alejados, pueden compensar los defectos causados por la emulación de fosforilaciones constitutivas en la mitad N-terminal de la CP de PPV-R, y sugieren la existencia de algún tipo de vínculo funcional entre regiones distantes de la proteína.

IV.5.3. El modelado de la estructura del virión de PPV-R sugiere que fosfo-dianas de la CP participan en las interacciones proteína-proteína entre monómeros

Recientemente se ha resuelto la estructura de la cápsida del potyvirus WMV mediante criomicroscopía electrónica (Zamora *et al.*, 2017). Dada la similitud de secuencia de la CP de los potyvirus, la estructura del virión de WMV constituye un excelente punto de partida para llevar a cabo extrapolaciones estructurales en otros potyvirus, incluyendo el PPV.

Los resultados presentados en el Apartado IV.5.1 sugieren la existencia de un vínculo funcional entre dos de las fosfo-dianas de la CP de PPV-R, los residuos S118 y T254, localizados en las regiones proximal y distal del núcleo de la proteína, respectivamente (**Fig. IV.16B**). Con el objetivo de obtener información acerca de la distribución espacial de ambos residuos, se realizó un modelado del monómero de la CP de PPV-R basado en el modelo atómico de la partícula viral del WMV, que se encuentra disponible en la *Protein Data Bank* (PDB) con el código de identificación 5ODV.

Como la estructura atómica de la CP del WMV carece de los primeros 59 y los últimos 17 aminoácidos de los extremos N- y C-terminal, respectivamente, el modelado comparativo de la CP de PPV-R se realizó utilizando un fragmento de secuencia equivalente, que se extendía desde la arginina 109 hasta la alanina 314 (**Fig. IV.34**). Debido a esto, los primeros 108 residuos de la región N-terminal de la CP de PPV-R, que albergan las dianas de O-GlcNAcilación (gT19, gT24, gT41, gT50, gT53, gT54/58 y gS65), así como cinco de los ocho residuos fosforilables (pS25, pT71, pS81, pS101 y pT106), quedaron fuera del modelado del monómero. Afortunadamente, las dianas de fosforilación situadas en la región central proximal (pS118) y la región central distal (pT254 y pT313), con un fuerte impacto sobre la infección por PPV-R, quedaron incluidas en el segmento modelado (**Fig. IV.34**). El modelado comparativo del monómero de CP de PPV-R en base al del WMV (**Fig. IV.35**) se validó con el método de predicción *I-TASSER* (Yang *et al.*, 2015). La fidelidad de la predicción se evaluó en base a los parámetros de calidad C-score (1.77), TM-score (0.96 ± 0.05) y RMSD (2.0 ± 1.6 Å).

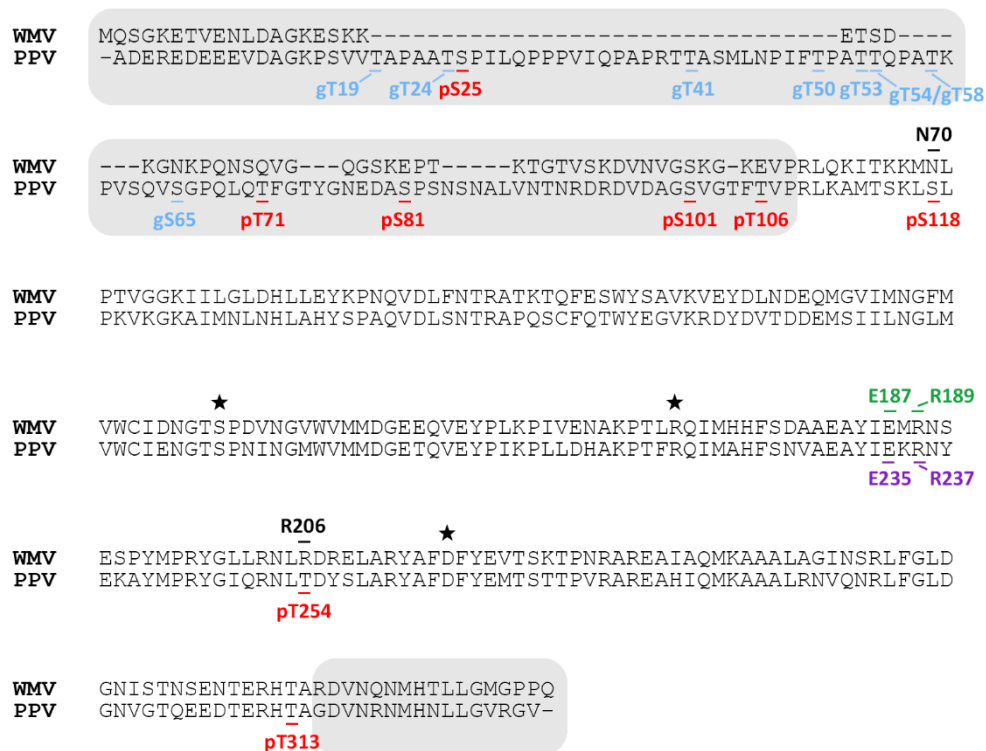


Figura IV.34. Alineamiento de las secuencias de CP del WMV y de PPV-R. Sobre fondo gris se muestran los extremos N- y C-terminal de la proteína que no se determinaron en el modelo atómico del virión del WMV (Zamora *et al.*, 2017), y que tampoco pudieron ser incluidos en el modelo comparativo obtenido para el monómero de la CP de PPV-R. Los residuos que previamente se detectaron O-GlcNAcildados en la CP de PPV-R (Kim *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2013) se muestran en azul; mientras que las fosfo-dianas de serina o treonina anteriormente identificadas en este trabajo se marcan en rojo. En negro se indican los residuos de la CP del WMV (N70 y R206) equivalentes a dos importantes fosfo-dianas de la CP de PPV-R (pS118 y pT254). Los aminoácidos clave conservados en el hipotético bolsillo de unión a RNA del WMV, y probablemente de PPV-R (S140-WMV/S188-PPV-R, R172-WMV/R220-PPV-R y D216-WMV/D264-PPV-R), se señalan con estrellas. Otros residuos de interés en la proteína del WMV y sus equivalentes en la de PPV-R se muestran en verde y morado, respectivamente. Las proteínas se alinearon utilizando el programa *Clustal Omega* (European Bioinformatics Institute).

A continuación, se elaboró un modelo del complejo oligomérico de PPV-R mediante la superposición rígida de monómeros de CP de PPV-R sobre el modelo atómico del virión del WMV. La distribución espacial adoptada por los distintos monómeros de CP de PPV-R sugiere que la serina 118, que se localiza en la extensión N-terminal, de gran flexibilidad (peor resuelta en la CP del WMV, y por ende peor modelada en la CP de PPV-R), del núcleo central, podría estar participando en las interacciones que ocurren en la cara externa de la partícula viral; mientras que la treonina 254 lo estaría haciendo en las que tienen lugar en la región interna del virión (Fig. IV.36).

En vista de que la estructura modelada no sugería la existencia de una interacción física entre los residuos fosforilables S118 y T254 que pudiera justificar el vínculo funcional entre ambos aminoácidos propuesto en base a los resultados experimentales, se analizaron los residuos involucrados en las interacciones proteína-proteína que estabilizan el complejo oligomérico del WMV (PDBsum, <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi->

bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=5odv&template=interfaces.html&o=RESIDUE&l=55) y se extrapolaron al virion de PPV-R en base al alienamiento de secuencia.

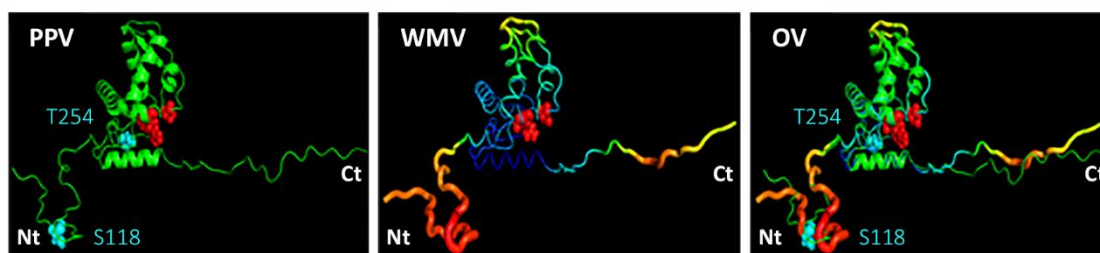


Figura IV.35. Modelo *in silico* de la CP de PPV-R (representación *cartoon*), modelo atómico de la CP del WMV (PDB: 5ODV, Zamora *et al.*, 2017) (representación *B-factor*) y superposición de ambos (OV). Imágenes generadas con el visualizador molecular *PyMOL 1.7.4* (*Schrödinger*). Los tres residuos claves del teórico bolsillo de unión a RNA, conservados en ambos virus y las fosfo-dianas S118 y T254 mapeadas en la CP de PPV-R, se representan como esferas rojas y azules, respectivamente. También se indican las regiones Nt y Ct de las proteínas modeladas. En la representación *B-factor*, las regiones de la proteína peor resueltas se representan con líneas más gruesas coloreadas en amarillo-rojo-naranja, mientras que los segmentos representados con líneas finas y en color azul-verde corresponden a aquellas regiones que pudieron ser modeladas con mayor exactitud.

El programa predijo en la estructura del WMV un puente salino y 8 puentes de hidrógeno implicados en interacciones proteína-proteína en el mismo giro de hélice (cadenas K y L); así como 3 puentes salinos y 10 enlaces de hidrógeno entre cadenas que pertenecen a giros de hélice distintos, pero adyacentes (2 puentes salinos y 8 puentes de hidrógeno entre las cadenas K y S; 1 puente salino y 1 enlace de hidrógeno entre las cadenas K y T; y 1 puente de hidrógeno entre las cadenas K y U) (**Tabla IV.7**). Además, también se predijo la existencia de un elevado número de uniones de *Van der Waals*. Es importante destacar que 1 de los 8 puentes de hidrógeno y 5 del total de uniones de *Van der Waals* que podrían tener lugar entre cadenas situadas en el mismo giro de hélice involucraban al aminoácido N70 del WMV, justo el residuo equivalente a la fosfo-diana S118 de PPV-R. Así, la asparagina 70 interaccionaría con el ácido aspártico 180 en el virión del WMV, mientras que la serina 118 del virión de PPV-R lo haría con la asparagina 228. Más interesante aún es el hecho de que el único puente salino que interviene en la estabilización de las cadenas del mismo giro de hélice en el virión del WMV involucra al residuo R206 (interaccionando con E230). Según las predicciones del programa, este residuo también participaría en 2 puentes de hidrógeno y 10 uniones de *Van der Waals* entre cadenas del mismo giro de hélice (interaccionando con los residuos E230 y N226); además formaría parte de un puente de hidrógeno y 4 uniones de *Van der Waals* entre cadenas de hélices adyacentes (interaccionando con el residuo L247). Lo que sorprende es que justamente la arginina 206 del WMV es equivalente a otro residuo fosforilable de la CP de PPV-R, la T254, que, como se describe en los apartados anteriores, podía mutar a lisina, aparentemente para compensar la mutación S118D. Obviamente las interacciones N70:D180, R206:E230, R206:N226 y R206:L247 del WMV no podrían ocurrir entre las parejas equivalentes de PPV-R silvestre (S118:N228, T254:E278, T254:V274 y T254:L295), pero es

sugerente hipotetizar que éstas sí podrían tener lugar cuando S118 se encuentra fosforilado o mutado a ácido aspártico, o cuando T254 se ha mutado a lisina. Otra evidencia adicional, indirecta, que apoyaría el hipotético papel de la fosfo-diana S118 en la estabilización de los viriones proviene de la predicción que involucra a la arginina 189 de la CP del WMV en varias uniones de *Van der Waals* entre cadenas del mismo giro de hélice. Este residuo del WMV es equivalente a la arginina 237 de la CP de PPV-R, uno de los aminoácidos que se encontró espontáneamente mutado a glutamina como parte de la evolución del mutante 4SD (4SD^{D118N+R237Q}, **Fig. IV.8** y **Tabla IV.7**).

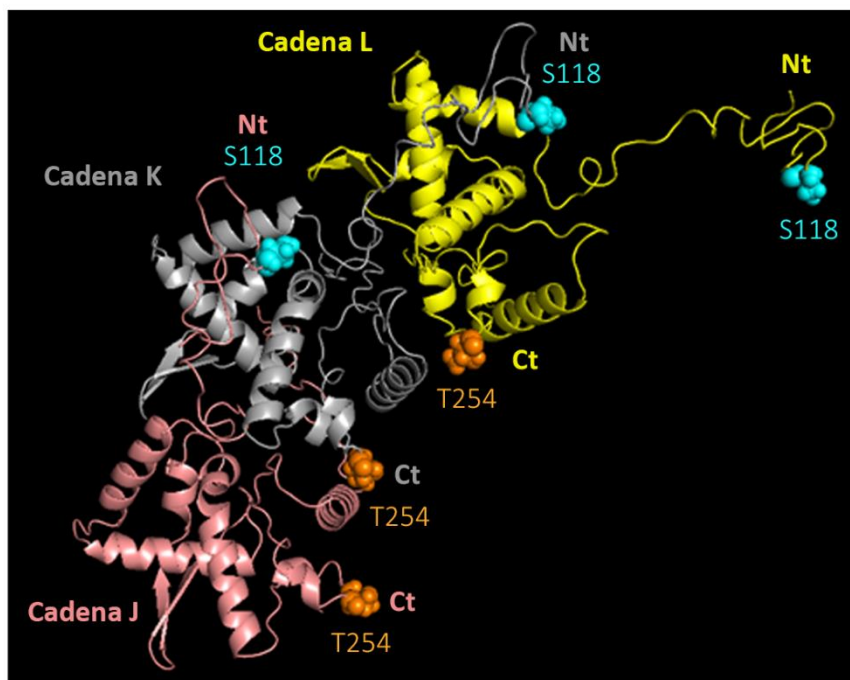


Figura IV.36. Fragmento del oligómero de PPV-R obtenido *in silico* mediante la superposición rígida de los monómeros de CP sobre el modelo del oligómero del WMV propuesto por Zamora *et al.* (2017). La imagen obtenida con el visualizador molecular PyMOL 1.7.4 (Schrödinger) muestra la disposición de tres monómeros de CP de PPV-R situados en el mismo giro de hélice: Cadenas J (salmón), K (gris) y L (amarillo). En la imagen se representan las regiones Nt y Ct de cada monómero, así como las dianas fosforilables de la CP: S118 (esferas azules) dispuesta hacia la parte exterior de la partícula y T254 (esferas naranjas) situada hacia la región interna del cilindro.

Aunque el residuo T265 de la CP del WMV, equivalente a la fosfo-diana T313 de la CP de PPV-R, no parece estar involucrado en interacciones entre cadenas, la selección en la progenie viral del mutante T313D de mutaciones secundarias en E235 y T254 (E235G y T254R) (Fig. IV.26B), ambas permitiendo una ganancia de carga neta +1, apoyaría la posible relevancia de la fosfo-diana T313 en la formación de viriones de PPV-R, evidenciada previamente por los análisis bioquímicos (**Fig. IV.30**).

En resumen, la extrapolación de la estructura del virión de WMV a PPV-R apoya la idea de que la fosforilación de ciertos residuos de la CP regula interacciones entre subunidades de la proteína involucradas activamente en el ensamblaje de las partículas virales.

Tabla IV.7. Residuos de la CP del WMV involucrados en las interacciones CP-CP en el oligómero de este virus, y que además son equivalentes a las fosfo-dianas S118 y T254 de la CP de PPV-R o a otros residuos de interés

Cadenas involucradas (aa que interactúan)	Tipo de enlace en WMV (totales)	Enlaces PPV-R/WMV	WMV	PPV-R
K : L (26 aa : 23 aa)	Puentes salinos (1)	1/1	R206 :E230	T254 :E278
	Enlaces de hidrógeno (8)	1/8	R206 :N226	T254 :V274
		1/8	R206 :E230	T254 :E278
		1/8	D180: N70	N228: S118
	Uniones de <i>Van der Waals</i> (101)	8/101	R206 :N226	T254 :V274
		2/101	R206 :E230	T254 :E278
		5/101	D180: N70	N228: S118
		2/101	R189 :P90	R237 :P138
1/101		R189 :Y88	R237 :Y136	
	1/101	R189 :K89	R237 :S137	
K : S (11 aa : 14 aa)	Puentes salinos (2)	0/2	-	-
	Enlaces de hidrógeno (8)	1/8	L247: R206	L295: T254
	Uniones de <i>Van der Waals</i> (53)	4/53	L247: R206	L295: T254
K : T (12 aa : 14 aa)	Puentes salinos (1)	0/1	-	-
	Enlaces de hidrógeno (1)	0/1	-	-
	Uniones de <i>Van der Waals</i> (43)	0/43	-	-
		1/43	G145: E187	G193: E235
	1/43	V146: E187	M194: E235	
K : U (5 aa : 4 aa)	Puentes salinos (0)	0/0	-	-
	Enlaces de hidrógeno (1)	0/1	-	-
	Uniones de <i>Van der Waals</i> (15)	0/15	-	-

En la tabla se muestran las interacciones específicas predichas *in silico* entre los monómeros de la CP del WMV (Zamora *et al.*, 2017), que involucra los residuos R206 y N70 de esta proteína, respectivamente equivalentes a las dianas fosforilables T254 y S118 (en rojo) mapeadas en la CP de PPV-R. Adicionalmente, sobre fondo azul, se muestran otras interacciones que involucran residuos del WMV (R189 y E187) equivalentes a aquellos que mutaron espontáneamente en la CP de PPV-R (R237 y E235, marcados en azul oscuro) después de mimetizar de forma permanente la fosforilación de las cuatro serinas fosforilables de la mitad N-terminal (mutante 4SD que evolucionó a 4SD^{D118N+R237Q}) o de la treonina 313 (mutante T313D que evolucionó a T313D^{E235G}). Los residuos de PPV-R equivalentes a aquellos del WMV que participan en las interacciones que estabilizan el oligómero de este virus (en negrita) fueron predichos en base al alineamiento entre las secuencias de las CP de ambos virus (Fig. IV.34). Se muestran los enlaces teóricos en el WMV incluyendo los puentes salinos, enlaces de hidrógeno y uniones de *Van der Waals* que tendrían lugar entre monómeros de la CP situados en un mismo giro de hélice (cadena K interactuando con cadena L), y entre monómeros que ocupan hélices contiguas (interacciones entre cadenas K : S, K : T y K : U). Se indica el número total de enlaces de cada tipo que estabilizarían los complejos oligoméricos del WMV (entre paréntesis), así como el número de uniones respecto al total que se predicen en el WMV y que involucrarían residuos equivalentes a las dianas S118 y T254 de la CP de PPV-R (enlaces PPV-R/WMV).

IV.6. Las modificaciones post-traduccionales de la CP del PPV pueden tener lugar fuera de un ambiente de infección viral, pero la O-GlcNAcilación depende de una estructura apropiada de la proteína

Estudios previos del laboratorio (Pérez *et al.*, 2013), y otros que han sido descritos ya en esta tesis, demuestran la importancia que tienen las MPT de la CP en la infección por PPV-R, regulando el

ensamblaje de los viriones y la estabilidad de la proteína. En este capítulo se ha analizado si la susceptibilidad de la CP a la *O*-GlcNAcilación y la fosforilación es una propiedad intrínseca de la proteína o si estas modificaciones solo tienen lugar asociadas a alguna etapa del ciclo viral del patógeno.

IV.6.1. La *O*-GlcNAcilación y la fosforilación de la CP del PPV también afectan a la proteína no ensamblada en partículas virales completas

La mayoría de los análisis descritos en capítulos anteriores se centraron en detectar las *O*-GlcNAcilaciones y fosforilaciones en la CP del PPV cuando la proteína se encontraba ensamblada formando viriones. Para determinar si estas MPT también afectan a la CP que se encuentra libre y/o ensamblada en oligómeros de menor tamaño, las partículas virales se separaron de los agregados de CP y de la proteína libre. El tejido de *N. benthamiana* sistémicamente infectado con PPV-R, recogido a 17 dpi, se homogenizó en tampón fosfato y el extracto obtenido se fraccionó por centrifugación en gradiente de sacarosa, analizándose las fracciones resultantes mediante *Western Blot* anti-CP. Las fracciones en las que se acumulan los viriones (fracciones 6+7), y la correspondiente a la parte superior del gradiente, donde permanece la posible CP libre y los agregados de pequeño tamaño (fracción 11), se inmunoprecipitaron por separado empleando un suero policlonal específico de la CP del PPV (**Fig. IV.37A**). El sedimento se sometió a digestión con tripsina y se analizó por MALDI-TOF. Los patrones de *O*-GlcNAcilación del péptido [1-39] de la CP ensamblada en viriones y la libre o ensamblada en complejos de pequeño tamaño resultaron ser similares, siendo muy parecidas las relaciones entre las intensidades de las señales de las formas no modificadas, mono- y di-*O*-GlcNAciladas de ambas muestras (**Fig. IV.37A**). Aunque esta técnica no permite diferenciar los residuos concretos que se encuentran modificados, lo más probable es que en ambos casos la *O*-GlcNAcilación afecte a los residuos T19 y T24, previamente mapeados en este péptido.

Siguiendo un procedimiento similar al anterior, se analizó el tejido de *N. benthamiana* sistémicamente infectado con el aislado PPV-BOR-3. Como ya se ha comentado, la CP de BOR-3 fosforilada tiene la peculiaridad de migrar en geles de SDS-PAGE como una doble banda, que se convierte en una banda sencilla tras el tratamiento con fosfatasa. Después de fraccionar por centrifugación en gradiente de sacarosa un extracto de plantas infectadas de *N. benthamiana*, el análisis por *Western Blot* de las fracciones detectó el doblete característico de la CP de PPV-BOR-3 tanto en la muestra de la fracción 7, donde se localizan los viriones, como en la fracción 11, donde se detecta la CP menos agregada (**Fig. IV.37B**). Este resultado indica que tampoco la fosforilación de la CP se restringe a las partículas virales completas, y que también esta modificación puede afectar a la proteína que no se encuentra en ese nivel de ensamblaje.

Para evaluar la relevancia del movimiento viral y la replicación en la *O*-GlcNAcilación de la CP, se emplearon mutantes basados en el plásmido pLONG. Este plásmido incluye la secuencia codificante de la poliproteína de PPV-R a partir de la proteína P3, flanqueada por cDNA de las secuencias 5' y 3' no codificantes del virus, y da lugar a un RNA viral capaz de replicarse eficientemente cuando se expresa junto con un supresor del silenciamiento de RNA (Gallo *et al.*, 2018). Para que la CP expresada a partir de pLONG se ensamble correctamente en viriones y se mantenga estable *in vitro*, también es necesaria la contribución de la proteína HCpro del mismo virus (Valli *et al.*, 2014).

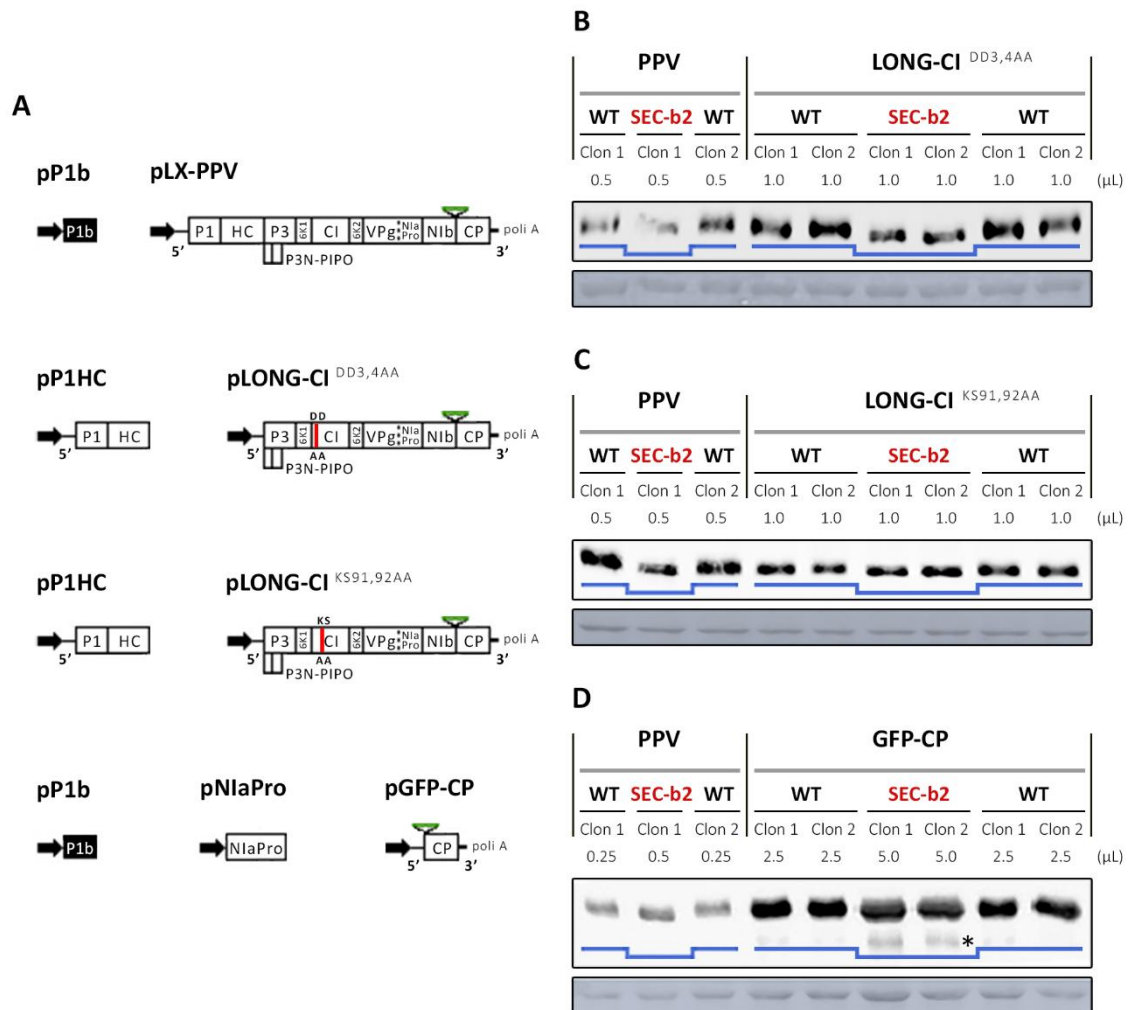


Figura IV.38. Análisis de la *O*-GlcNAcilación de la CP de PPV-R cuando se afectan diversas funciones virales o en ausencia de otras proteínas del virus. Las construcciones virales y subvirales de PPV-R (dos clones por construcción) se expresaron por agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* WT o SEC-b2, complementándose con los plásmidos indicados en cada caso. **(A)** Representación esquemática de los vectores binarios ensayados. **(B-D)** Análisis por *Western Blot* anti-CP de extractos crudos obtenidos a partir de tres plantas distintas, recogidas a los 5 dpi, para detectar posibles diferencias de movilidad electroforética de la proteína en un contexto en el que suprimió el movimiento (B) o la replicación viral (C), o en el que la CP se expresó en ausencia de otras proteínas virales (D). Se indica la construcción ensayada, el tipo de planta donde se ha expresado, el clon y el volumen de extracto cargado en el gel. La interpretación de las diferencias de movilidad electroforética de la proteína aparece representada con líneas azules. La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga. (*) Señal que podría corresponder con un producto de degradación de la CP.

El primer paso fue determinar si la *O*-GlcNAcilación de la CP estaba relacionada con el movimiento del virus. Para ello, se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* silvestres y SEC-b2, utilizando una mezcla de cultivos de bacterias que portaban las construcciones pLONG-CI^{DD3,4AA}, que expresa la proteína CI con la mutación que impide el movimiento que se menciona en el Capítulo IV.3, y pP1HC, que proporciona las actividades supresora del silenciamiento y facilitadora del ensamblaje propias de la proteína viral HCpro. Como control positivo de *O*-GlcNAcilación, se utilizó el plásmido pLX-PPV, que incluye una copia completa de cDNA del virus silvestre, suplementado en este caso con el plásmido pP1b, que expresa el supresor de silenciamiento P1b del CVYV. Se prepararon extractos a partir de hojas agroinfiltradas recogidas a los 5 dpi, y la movilidad electroforética de la CP de las muestras se evaluó por *Western Blot* anti-CP. Los resultados revelaron que, al igual que la CP del virus silvestre, la CP producida en ausencia de movimiento viral tenía una mayor movilidad electroforética si provenía de plantas SEC-b2 que, si lo hacía de plantas silvestres, lo que indica que el movimiento viral no es relevante para la *O*-GlcNAcilación de la proteína (**Fig. IV.38B**).

Para evaluar si la CP era capaz de *O*-GlcNAcilarse en ausencia de replicación viral, se siguió un esquema similar al anterior, analizando en este caso la movilidad electroforética de la proteína procedente de plantas silvestres y SEC-b2 infectadas con el mutante pLONG-CI^{K591,92AA}, cuya mutación, también descrita en un apartado previo, causa un defecto en la proteína CI que impide la replicación del RNA viral. Los resultados indicaron que la modificación por *O*-GlcNAcilación de la CP es independiente de la replicación del virus, ya que la migración en SDS-PAGE de la proteína expresada en plantas SEC-b2 fue más rápida que la producida en las plantas silvestres (**Fig. IV.38C**).

Aun cuando los resultados anteriores demostraron que ni el movimiento ni la replicación del RNA viral eran necesarios para la *O*-GlcNAcilación de la CP de PPV-R, faltaba por dilucidar si alguna proteína del virus contribuía a que tuviera lugar esta MPT. Para resolver esta cuestión, se expresó la CP en los dos tipos de plantas, silvestre y SEC-b2, a partir de la construcción pGFP-CP, que codifica la GFP y la CP de PPV-R conectadas por un sitio de corte de la proteasa viral NIaPro. En este caso, la mezcla de agroinfiltración además contenía los vectores pNIaPro y pP1b, que proporcionaban, respectivamente, la proteasa necesaria para separar la CP de la GFP y un supresor del silenciamiento de RNA. También en este caso las movilidades electroforéticas de la CP procedente de plantas silvestres y SEC-b2 fueron diferentes (**Fig. IV.38D**). Aunque no se puede descartar formalmente la participación de NIaPro en la *O*-GlcNAcilación, este resultado sugiere que dicha MPT tiene lugar sin necesidad de otras proteínas virales. Hay que destacar que en este ensayo la cantidad de CP derivada de GFP-CP acumulada en las plantas SEC-b2 era bastante menor que la acumulada en las plantas silvestres (en el gel se cargó el doble de cantidad de las muestras procedentes de plantas SEC-b2); además, la señal correspondiente a la CP era más difusa y se detectaba una posible banda de degradación. Estos datos concuerdan con la mayor inestabilidad de la CP sin *O*-GlcNAcilación previamente descrita (Pérez *et al.*, 2013), que en este caso sería más acusada por la ausencia de HCpro.

IV.6.3. La CP del PPV es capaz de fosforilarse fuera del contexto de la infección viral

Una vez comprobado que la O-GlcNAcilación de la CP de PPV-R no depende de factores virales adicionales, pasamos a estudiar si su segunda MPT, la fosforilación, es dependiente o no de la infección. Por los mismos motivos explicados en el apartado anterior, también en este caso se empleó un ensayo indirecto para evaluar la modificación de la proteína. Para ello, se aprovechó la propiedad ya comentada de la CP de PPV-BOR-3 de migrar como un doblete en SDS-PAGE cuando está fosforilada. La secuencia codificante de esta CP se introdujo en las construcciones pLONG, pLONG-CI^{DD3,4AA}, pLONG-CI^{KS91,92AA} y pGFP-CP sustituyendo a la de la CP de PPV-R, generándose las correspondientes construcciones pLONG-BOR-3-CP, pLONG-CI^{DD3,4AA}-BOR-3-CP, pLONG-CI^{KS91,92AA}-BOR-3-CP y pGFP-BOR-3-CP (Fig. IV.39A).

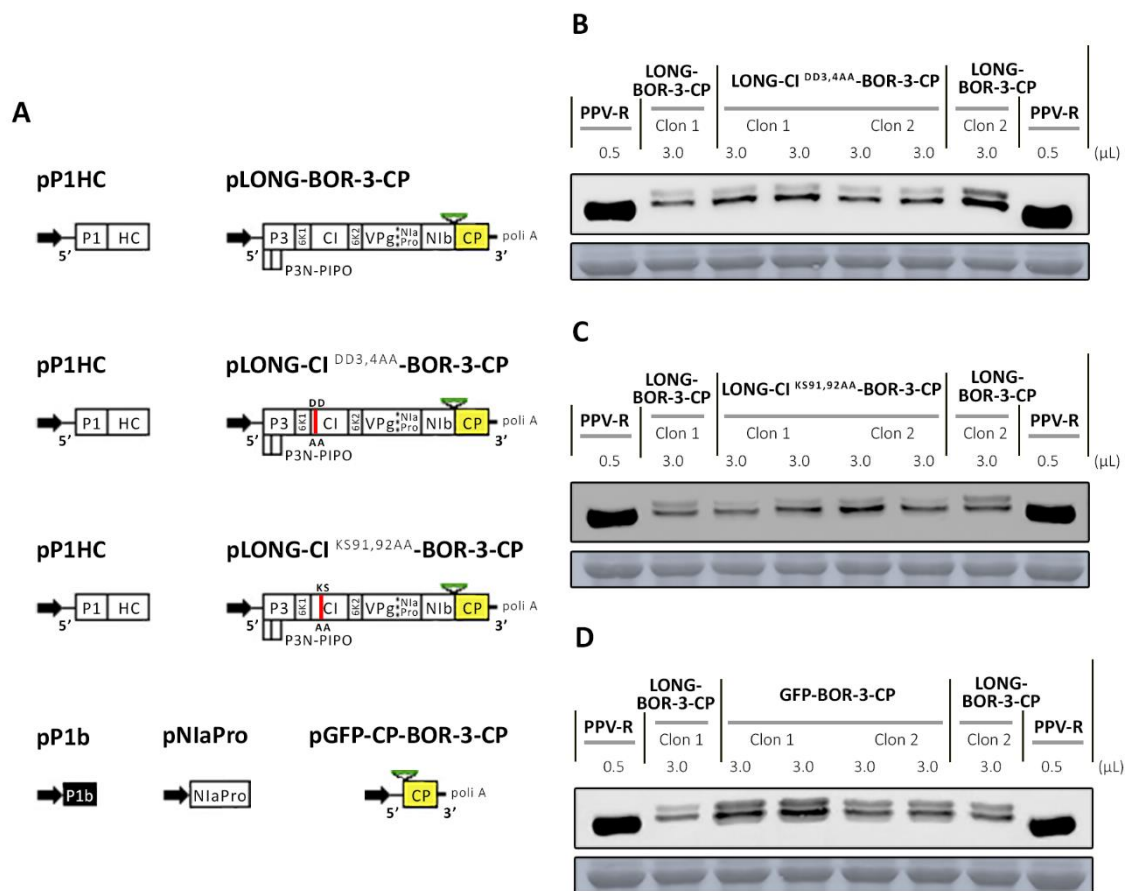


Figura IV.39. Análisis de la fosforilación de la CP de PPV-BOR-3 cuando se afectan diversas funciones virales o en ausencia del resto de proteínas del virus. Las construcciones virales y subvirales de PPV-R (dos clones por construcción) se expresaron por agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*, complementándose con los plásmidos indicados en cada caso. **(A)** Representación esquemática de los vectores binarios ensayados. **(B-D)** Análisis por *Western Blot* anti-CP de extractos crudos obtenidos a partir de tres plantas distintas, recogidas a los 5 dpi, para detectar si la CP de PPV-BOR-3 puede fosforilarse en un contexto en el que se suprimió el movimiento (B) o la replicación viral (C), o en el que la CP se expresó en ausencia de otras proteínas virales (D). Se indica la construcción ensayada, el clon y el volumen de extracto cargado en el gel. La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga.

Para determinar si la fosforilación tiene lugar en ausencia de movimiento viral, se evaluó la aparición de la doble banda de la CP de PPV-BOR-3 analizando mediante *Western Blot* los extractos de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con la construcción pLONG-CI^{DD3,4AA}-BOR-3-CP (defectuosa en movimiento viral), suplementada con pP1HC. Como control de fosforilación estándar de la CP de PPV-BOR-3, se utilizó tejido agroinfiltrado con pLONG-BOR-3-CP y pP1HC, y como control negativo de la migración como doble banda se incluyó tejido infectado con PPV-R. La detección de una señal en forma de doblete tanto en la CP derivada de pLONG-BOR-3-CP, como en la derivada de pLONG-CI^{DD3,4AA}-BOR-3-CP (**Fig. IV.39B**), indica que al igual que ocurría con la *O*-GlcNAcilación, la fosforilación de la proteína puede tener lugar en ausencia de movimiento viral de célula-a-célula.

Para comprobar si existía fosforilación en ausencia de replicación viral se analizó el tejido agroinfiltrado con pLONG-CI^{KS91,92AA}-BOR-3-CP y pP1HC. Una vez más se observó el patrón de doble banda (**Fig. IV.39C**), lo que indica que tampoco es necesario que tenga lugar la replicación del RNA viral para que la CP del PPV se fosforile. El mismo doblete se detectó cuando la CP se expresó a partir de pGFP-BOR-3-CP, junto con la proteasa NIapro de PPV-R y el supresor de silenciamiento P1b del CVYV (**Fig. IV.39D**). Este resultado sugiere claramente que la fosforilación de la CP del PPV no precisa de la colaboración de proteínas virales adicionales, aunque, como en el caso de la *O*-GlcNAcilación, la necesidad de utilizar NIapro para liberar la CP en las condiciones más parecidas posibles a las de la infección viral, impide una conclusión definitiva en lo que concierne a la proteasa. Curiosamente, debajo de la banda con mayor movilidad electroforética del doblete de la CP expresada a partir de pGFP-BOR-3-CP se apreciaba una sombra que no se detectaba cuando la CP se producía a partir de pLONG-BOR-3-CP. No se tiene información acerca del significado de esta peculiaridad de la CP expresada de manera independiente, pero podría atribuirse a la ausencia de HCpro.

Globalmente, los resultados de este apartado, y de los dos anteriores, muestran que las MPT, *O*-GlcNAcilación y fosforilación, de la CP pueden tener lugar con amplia independencia de la infección viral.

IV.6.4. Una mutación en un aminoácido implicado en el plegamiento y en el ensamblaje de la CP del PPV perturba su *O*-GlcNAcilación

En los apartados anteriores se comprobó que la CP del PPV podía *O*-GlcNAcilarse y fosforilarse sin necesidad de estar ensamblada en partículas virales completas, ni de expresarse en el entorno de la infección viral. Para comprobar si son necesarios requerimientos estructurales específicos para que la CP sea sustrato de estas MPT, aprovechamos el hecho de que el ácido aspártico de la posición 264, altamente conservado en posiciones equivalentes no solo en los potyvirus sino también en otros virus con cápsidas helicoidales, desempeña un papel fundamental en el plegamiento y ensamblaje de las subunidades de la CP (Dolja *et al.*, 1991). Para ello, se utilizó el plásmido pLONG-CP^{D264K}, que incluye

una mutación que da lugar a un cambio del ácido aspártico 264 de la CP por lisina (Gallo *et al.*, 2018). Experimentos anteriores habían mostrado que la mutación D264K causa un drástico aumento de la inestabilidad de la CP de PPV-R *in vitro*. Esta situación parece también tener lugar *in vivo*, ya que la proteína se acumula en muy poca cantidad cuando se expresa en plantas y estaría de acuerdo con los importantes defectos estructurales que se espera que produzca la mutación (Gallo *et al.*, 2018). Para evaluar el efecto de la mutación D264K en la capacidad de O-GlcNAcilarse de la CP, se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* WT y SEC-b2 con los plásmidos pLONG-CP^{D264K} y pP1HC (Fig. IV.40A), y se compararon las CP producidas en ambos casos (Fig. IV.40B). De acuerdo con los resultados precedentes, los niveles de acumulación de la proteína mutante eran muy bajos en ambas plantas, pero en contraste con lo que habíamos observado con la también inestable CP silvestre expresada desde pGFP-CP (Fig. IV.38D), la acumulación era algo mayor en las plantas SEC-b2 que en las plantas silvestres. No se detectaron diferencias apreciables entre las movilidades electroforéticas de la CP mutada producida en una u otra planta, siendo además similares a la de la CP no mutada producida en plantas SEC-b2, lo que sugiere que los cambios estructurales causados por la mutación D264K interfieren con la O-GlcNAcilación de la proteína.

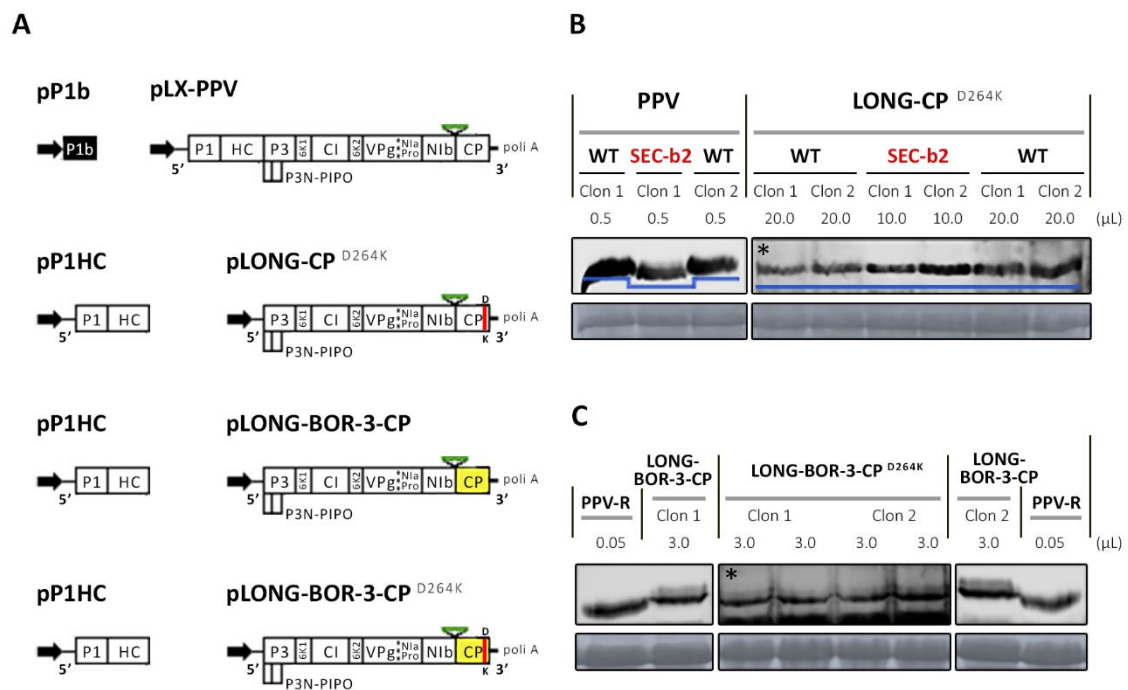


Figura IV.40. Análisis de la O-GlcNAcilación y fosforilación de la CP del PPV cuando se afecta el plegamiento de la proteína. Las construcciones virales y subvirales de PPV-R y PPV-BOR-3 (dos clones por construcción) se expresaron por agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* WT o SEC-b2, complementándose con los plásmidos indicados en cada caso. **(A)** Representación esquemática de los vectores binarios ensayados. **(B, C)** Análisis por *Western Blot* anti-CP de extractos crudos obtenidos a partir de tres plantas distintas, recogidas a los 5 dpi, para detectar posibles diferencias de movilidad electroforética de la CP de PPV-R (B) o en la fosforilación de la CP de PPV-BOR-3 (C) cuando el plegamiento de la proteína está afectado. En los geles se indica el plásmido ensayado, el tipo de planta donde se ha expresado (en el caso de B), el clon y el volumen de extracto de proteína cargado en la electroforesis. La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga. (*) La membrana de nitrocelulosa fue sobreexpuesta para detectar la señal de la CP.

El efecto diferente que tenía la supresión de la actividad SEC (planta SEC-b2) sobre la acumulación de CP, según se tratara de proteína silvestre expresada a partir de pGFP-CP o de proteína mutada CP^{D264K}, se confirmó realizando repetidas mediciones por *Western Blot* anti-CP en varios experimentos de agroinfiltración (**Fig. IV.41**). Este resultado sugiere que la actividad SEC tiene un efecto doble. Por un lado, estabiliza la CP, pero por otro estimula la actividad celular que la degrada; de manera que cuando la CP es incapaz de *O*-GlcNAcilarse (mutante D264K) su inestabilidad disminuye en ausencia de *O*-GlcNAcilación de factores celulares.

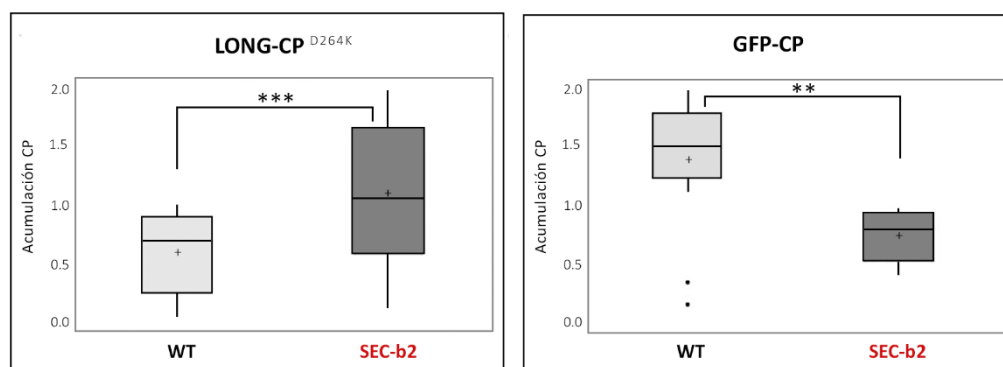


Figura IV.41. Cuantificación de la acumulación de la CP de PPV-R cuando el plegamiento de la proteína está afectado (LONG-CP^{D264K}) o en ausencia de otras proteínas virales (GFP-CP), en plantas de *N. benthamiana* WT y SEC-b2. Dos clones de cada construcción se expresaron por agroinfiltración complementándose con los plásmidos que aparecen en **Fig. III.38A** y **Fig.III.40A**. Los extractos crudos, obtenidos a partir de hojas agroinfiltradas recogidas a los 5 dpi, se analizaron por *Western Blot* anti-CP, a partir de los cuales se hicieron mediciones densitométricas. Cada réplica biológica estuvo compuesta por la mezcla de 3 plantas agroinfiltradas con el mismo clon, utilizándose 2 clones independientes por ensayo. Para las muestras LONG-CP^{D264K}, se hicieron un total de 32 y 22 mediciones en plantas WT y SEC-b2, respectivamente; distribuidas en 11 *Western Blot* distintos y utilizando el tejido de dos experimentos independientes (4 réplicas biológicas/condición). Para las muestras GFP-CP, se hicieron 14 (WT) y 8 (SEC-b2) mediciones, en 4 análisis *Western Blot*, utilizando el tejido procedente de un único ensayo (2 réplicas biológicas/condición). La densitometría se hizo con el programa *Image-Lab 6.01 (Bio-Rad)*, referenciando cada una de las mediciones a la de la señal de mayor intensidad. Para el análisis estadístico se utilizó el test de *Mann-Whitney*. (+) Media, (•) valores atípicos, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$.

Para averiguar si la CP con la mutación D264K se puede fosforilar, se generó la construcción correspondiente pLONG-BOR-3-CP^{D264K} (**Fig. IV.40A**), y se agroinfiltraron con ella y pP1HC plantas de *N. benthamiana* silvestres, y se analizó si aparecía la doble banda característica de la CP de PPV-BOR-3 fosforilada. El nivel de acumulación de la CP de PPV-BOR-3 con la mutación D264K (CP^{D264K}-BOR-3) también fue muy bajo, al igual que ocurría con la proteína mutante de PPV-R, lo que impidió una interpretación clara de los resultados (**Fig. IV.40B, C**). Parece evidente que la movilidad electroforética de CP^{D264K}-BOR-3 es mayor que la de la CP de BOR-3 sin mutar, probablemente debido a su falta de *O*-GlcNAcilación; pero aparentemente también continúa migrando como un doblete, lo que indicaría que la mutación D264K no impide a la CP de PPV-BOR-3 fosforilarse.

Globalmente, estos resultados indican que una distorsión importante de la estructura de la CP del PPV, que le impide ensamblarse correctamente, reprime su *O*-GlcNAcilación pero no su fosforilación.

IV.7. Búsqueda de factores virales y del huésped, distintos a SEC, que participan en la O-GlcNAcilación y/o fosforilación de la CP del PPV

La CP del PPV es modificada por la enzima SEC (Chen *et al.*, 2005), la OGT identificada en *A. thaliana* (Hartweck *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2016; Thornton *et al.*, 1999). Como se ha visto en los capítulos anteriores de esta tesis, la CP también puede fosforilarse. Teniendo en cuenta que tanto la O-GlcNAcilación como la fosforilación son MTP reversibles, es predecible que otras enzimas y/o factores diferentes de SEC participen en las modificaciones que sufre esta proteína. En el caso de mamíferos, se sabe que hay una OGA que elimina residuos O-GlcNAc; sin embargo, a pesar de que existen numerosas glicosil hidrolasas de plantas (en *A. thaliana* unas 400, Husaini *et al.*, 2018), con actividad demostrada o supuesta, hasta la fecha no se ha identificado ninguna OGA vegetal. En cuanto a la fosforilación, como ya se ha mencionado antes, se ha descrito que la proteína quinasa CK2 fosforila a la CP del potyvirus PVA, y se han propuesto a PKA y PKC como las quinasas que fosforilan a otras proteínas de virus de plantas (Atabekov *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2015). Sin embargo, no se sabe si estas o alguna otra de los centenares de proteína quinasas vegetales participan en la fosforilación de la CP del PPV. Tampoco se ha descrito ninguna fosfatasa (se calcula que *A. thaliana* tiene unas 150, Schweighofer & Meskiene, 2015) implicada en la eliminación de residuos fosfatos de la CP del PPV o de alguna otra proteína de virus que infectan plantas. Para tratar de identificar factores celulares implicados en las MTP de la CP del PPV se han seguido dos abordajes complementarios, un abordaje genético (búsqueda de candidatos) y otro bioquímico (aislamiento de complejos relacionados con SEC).

IV.7.1. Las hexosaminidasas HEXO1, HEXO2 y HEXO3 no eliminan los grupos O-GlcNAc de la CP del PPV

La primera etapa del abordaje genético pasa por identificar mediante el uso de búsquedas bibliográficas y análisis *in silico*, candidatos que podrían ser la OGA vegetal.

IV.7.1.1. Identificación de HEXO1, HEXO2 y HEXO3 como posibles candidatos de ser la OGA vegetal

Para tratar de encontrar en plantas hipotéticos ortólogos de la OGA animal, se llevó a cabo un exhaustivo estudio bioinformático en el genoma de *A. thaliana*, empleando como referencia la secuencia de aminoácidos de la OGA humana (MGEA5). Para encontrar en plantas proteínas homólogas a la OGA humana se utilizaron tres herramientas de alineamiento comparativo: *HMMER*, que identifica homologías entre secuencias nucleotídicas o aminoacídicas, *HHPRED*, que busca homologías entre proteínas remotas en base a su estructura/función y *PFAM*, que identifica familias de proteínas en base a similitudes entre dominios. Los resultados del análisis seleccionaron dos secuencias de *A. thaliana*, correspondientes a las β -N-Acetilglucosaminidasas (β -N-hexosaminidasas) 1 y 3.

Las β -hexosaminidasas de plantas (HEXO) son un tipo de enzima que participa en el procesamiento de las grandes cantidades de N-glicanos paucimanosídicos que contienen las plantas, escindiendo residuos terminales de GlcNAc de N-glicanos complejos. En *A. thaliana*, la familia de las HEXO está formada por tres miembros: hexosaminidasa 1 (HEXO1), hexosaminidasa 2 (HEXO2) y hexosaminidasa 3 (HEXO3) (Strasser *et al.*, 2007). Trabajos del grupo de R. Strasser (University of Natural Resources and Life Sciences, Viena) habían demostrado que las enzimas HEXO1 y HEXO3 son las principales responsables de la producción en plantas de N-glicanos paucimanosídicos, y que las tres HEXO son capaces de eliminar *in vitro* residuos GlcNAc de sustratos sintéticos, participando así en el procesamiento de glicanos en *A. thaliana* y *N. benthamiana* (Liebminger *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2017; Strasser *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta los resultados del análisis bioinformático y la relación de las enzimas HEXO1 y HEXO3 con las vías de maduración de N-glicanos, se analizó la posible actividad OGA sobre la CP del PPV de los tres miembros de la familia HEXO.

IV.7.1.2. La infección de *A. thaliana* por PPV-R no se ve alterada por mutaciones en los genes *hexo1*, *hexo2* y/o *hexo3* de la planta

Se utilizaron los mutantes de inserción de T-DNA de *A. thaliana hexo1-1*, *hexo2-1*, *hexo3-1* (fondo genético Col-0) y *hexo3-2* (fondo genético Col-3), así como los dobles mutantes *hexo1-1/hexo2-1* y *hexo2-1/hexo3-2*, y el triple mutante *hexo1-1/hexo2-1/hexo3-1* (Liebminger *et al.*, 2011), proporcionados por el laboratorio de R. Strasser. Aunque en todos los casos se trata de mutantes nulos, no se describen alteraciones fenotípicas apreciables en ninguno de ellos.

Para determinar si la deficiencia en alguno de los genes candidatos alteraba la infectividad y/o acumulación de PPV-R, los mutantes de *A. thaliana* afectados en una, dos o las tres enzimas HEXO se inocularon mediante bombardeo con el cDNA de la construcción viral picPPV-NK-IGFP. En paralelo, el mismo virus fue inoculado en plantas de *A. thaliana* silvestre. Un análisis por *Western Blot* anti-CP de tejido recogido a los 21 dpi, reveló que prácticamente la totalidad de las plantas, mutantes o silvestres, se habían infectado (**Tabla IV.8**), sin que se observaran diferencias apreciables de acumulación viral entre los distintos mutantes con respecto a las plantas silvestres (no mostrado). Estos resultados indican que la ausencia de actividad de las enzimas HEXO1, HEXO2 o HEXO3 no altera de manera apreciable la infección por PPV en *A. thaliana*.

IV.7.1.3. Los niveles de O-GlcNAcificación de la CP de PPV-R, de incrementarse en plantas de *A. thaliana* mutadas en los genes HEXO1, HEXO2 y HEXO3, lo harían muy ligeramente

Para averiguar si las hexosaminidasas HEXO1, HEXO2 y/o HEXO3 intervienen en la hidrólisis de los grupos O-GlcNAc presentes en la CP del PPV, se agroinocularon con PPV-R plantas del triple mutante de *A. thaliana hexo1-1/hexo2-1/hexo3-1* (triple hexo) y plantas silvestres. A partir de tejido

sistémicamente infectado recogido a 21 dpi, se purificaron viriones de PPV-R siguiendo el método de Sheveleva *et al.* (2016) modificado. Las muestras se digirieron con tripsina y los péptidos generados se analizaron por MALDI-TOF (Fig. IV.42). La abundancia relativa de las formas no modificada, mono- y di-*O*-GlcNAcificada del péptido [1-39] fue muy similar en los viriones procedentes del mutante triple hexo y de las plantas silvestres. Este resultado indica que la ausencia de las enzimas HEXO1, HEXO2 y HEXO3 en *A. thaliana* no afecta a la *O*-GlcNAcificación de la CP que forma parte de los viriones de PPV-R.

Tabla IV.8. Infectividad de PPV-R en distintos mutantes de *A. thaliana* afectados en uno o varios genes de hexosaminidasas

Genotipo de <i>A. thaliana</i> inoculado ^a	Infectividad*
<i>hexo 1-1</i>	10/10
<i>hexo 2-1</i>	10/10
<i>hexo 3-1</i>	10/10
<i>hexo 1-1 / hexo 3-1</i>	9/9
<i>hexo 2-1 / hexo 3-2</i>	6/6
<i>hexo 1-1 / hexo 2-1 / hexo 3-1</i>	8/9
WT	9/10

^aLas plantas fueron inoculadas por bombardeo con cDNA viral

*Plantas infectadas/plantas inoculadas

El hecho de que la carencia de las HEXO no afectara a los niveles de *O*-GlcNAcificación de viriones purificados, no excluía la posibilidad de que alguna de estas enzimas actuara fundamentalmente sobre CP libre o intermediarios de ensamblaje. Para estudiar esta posibilidad, se inmunoprecipitó el conjunto de la CP presente en el tejido sistémicamente infectado de las plantas inoculadas por bombardeo mencionadas en el Apartado IV.7.1.2. Nuevamente, las muestras se digirieron con tripsina y se analizaron por MALDI-TOF (Fig. IV.42). En este caso, la abundancia relativa de la forma no modificada del péptido [1-39] fue ligeramente inferior, y la de la forma mono-*O*-GlcNAcificada ligeramente superior, en la CP obtenida a partir del mutante triple hexo con respecto a la obtenida de plantas silvestres (36.6 % frente a 40.3 % y 41.1 % frente a 36.8 %, respectivamente). No se observaron grandes diferencias entre las intensidades relativas de las especies di-*O*-GlcNAcificadas de ambas muestras.

Estos resultados podrían estar sugiriendo que existe un cierto efecto de alguna o todas las enzimas HEXO en la eliminación de residuos *O*-GlcNAc de la CP cuando la proteína no se encuentra formando partículas virales completas.

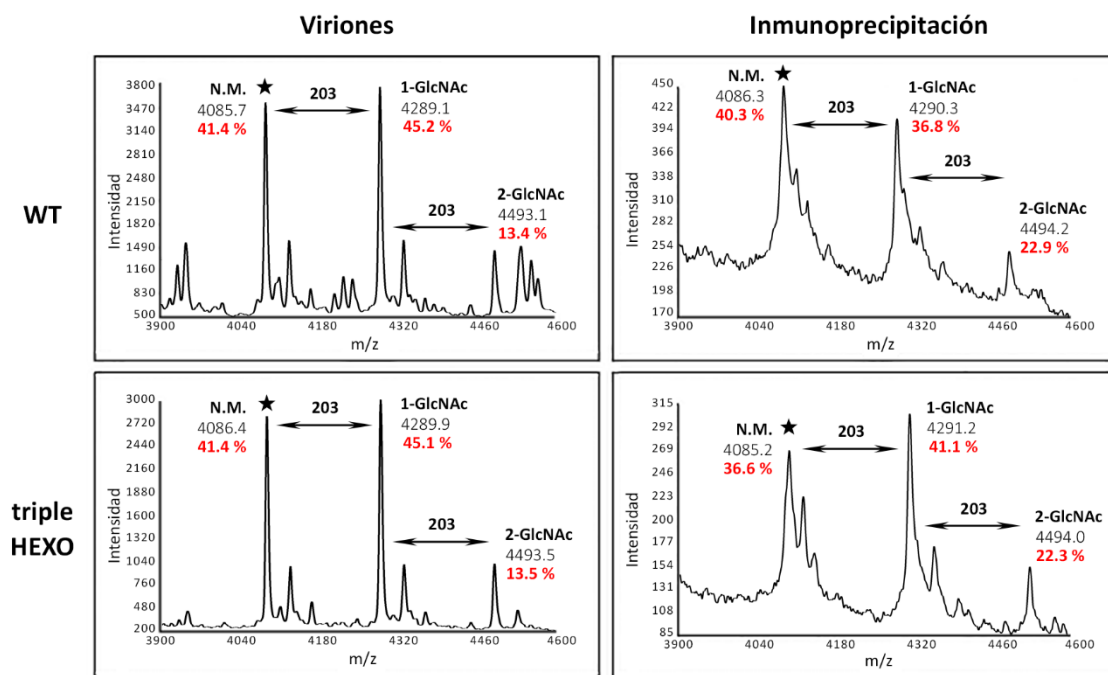


Figura IV.42. O-GlcNAcilación de la CP de PPV-R, ensamblada en viriones o inmunoprecipitada, obtenida a partir de plantas infectadas de *A. thaliana* silvestres y del mutante *hexo1-1/hexo2-1/hexo3-1* (triple HEXO). Las muestras se obtuvieron a partir de tejido sistémicamente infectado recogido a los 21 dpi, proveniente de plantas agroinfiltradas (viriones) o bombardeadas (inmunoprecipitación). Se muestran los espectros MALDI-TOF que cubren la región del péptido [1-39], los ratios m/z asignados a los picos relevantes y el número de residuos O-GlcNAc predichos para cada especie peptídica. En rojo se indica el porcentaje calculado para los péptidos N.M., 1-GlcNAc y 2-GlcNAc obtenido en base a la intensidad de cada señal mayoritaria con respecto a la suma de las intensidades de las tres especies peptídicas. Las estrellas señalan los picos precursores N.M. que se corresponden con el péptido tríptico [1-39].

IV.7.1.4. La expresión transitoria de las proteínas HEXO1, HEXO2 y/o HEXO3 en *N. benthamiana* no afecta sustancialmente a la O-GlcNAcilación de la CP de PPV-R

Como un abordaje alternativo para estudiar la posible implicación de las hexosaminidasas HEXO1, HEXO2 y HEXO3 en la O-GlcNAcilación de la CP de PPV-R, se analizaron los patrones de glicosilación de la proteína viral en un contexto en el cual las enzimas candidatas estuvieran sobre-expresadas.

Las secuencias codificantes de las tres HEXO de *A. thaliana* se clonaron fusionadas, o no, a una etiqueta TAP, bajo el control del promotor 35S y en el vector pCTAPi (Fig. IV.43A). Todas las construcciones se introdujeron en *Agrobacterium* para expresarlas transitoriamente mediante agroinfiltración. En el caso de las HEXO etiquetadas, se realizó un ensayo preliminar para verificar su correcta expresión. En este experimento se agroinfiltraron las correspondientes construcciones junto con el plásmido pP19 que expresa la proteína supresora del silenciamiento P19 del *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) (Voinnet *et al.*, 2003). El análisis por *Western Blot* utilizando el complejo soluble PAP que reconoce la etiqueta TAP, realizado sobre extractos de hojas agroinfiltradas recogidas a los 5 dpi, reveló en cada caso una señal a la altura del peso molecular teórico de las HEXO heterólogas de *A. thaliana*

etiquetadas, aunque también se detectó la acumulación de proteína truncada en las muestras donde se expresó HEXO2-TAP o, en menor medida, HEXO3-TAP (**Fig. IV.43B**).

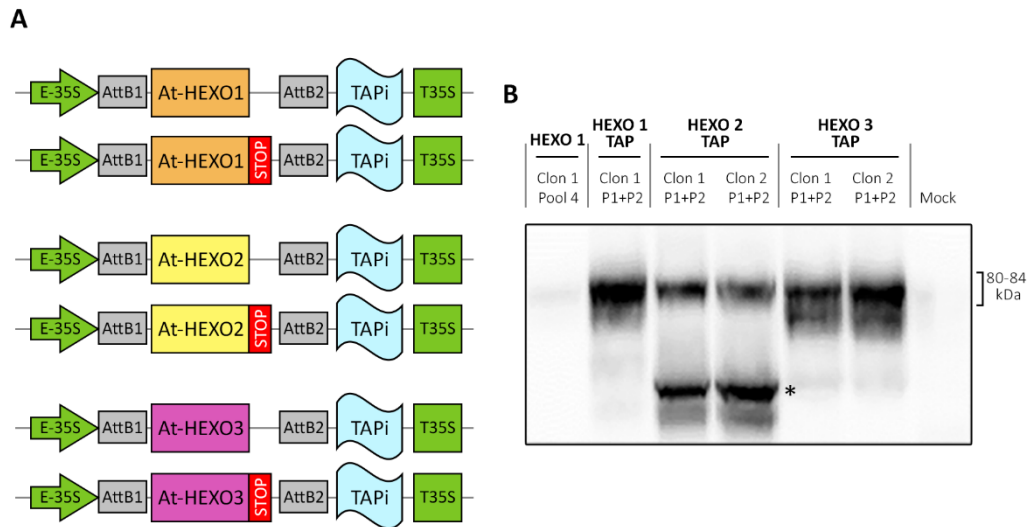


Figura IV.43. Expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* de las hexosaminidas de *A thaliana*, etiquetadas (HEXOx-TAP) o sin etiquetar (HEXOx). **(A)** Representación esquemática de las construcciones en las que los genes *HEXO1*, *HEXO2* y *HEXO3* se clonaron en el vector binario pCTAPi, fusionados o no en C-terminal a una etiqueta TAP. **(B)** Detección de las proteínas de fusión HEXO-TAP mediante *Western Blot* anti-TAP. Las hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con cada construcción, junto con el supresor del silenciamiento P19 del TBSV, se recogieron a los 5 dpi para obtener los extractos proteicos analizados. Se incluyeron dos clones por construcción, excepto en el caso de HEXO1-TAP que se utilizaron dos cultivos bacterianos del mismo clon. En la imagen se muestran las construcciones, los clones utilizados, las plantas combinadas para el análisis y el rango de peso molecular al que migran las tres proteínas de fusión. (*) Posible producto de degradación de HEXO2-TAP.

Para determinar si la sobreexpresión ectópica y conjunta de las tres HEXO afectaba al patrón de *O*-GlcNAcilación de la CP de PPV-R, se siguió el mismo procedimiento descrito en el Capítulo IV.2, mediante el cual se comparaban las movilidades electroforéticas de la proteína producida en plantas de *N. benthamiana* silvestres y SEC-b2. Para ello, ambos tipos de plantas se agroinocularon con PPV-R, junto con las construcciones que expresaban cada una de las HEXO, con o sin etiqueta, o GFP, incluyendo también células que expresan la proteína P19 en todas las mezclas de infiltración. El análisis por *Western Blot* anti-CP de los extractos de hojas inoculadas recogidas a 5 dpi no reveló cambios apreciables asociados a la coexpresión de las tres proteínas HEXO o HEXO-TAP de *A. thaliana* que acercaran la movilidad electroforética de la CP de plantas silvestres a la de la CP producida en plantas deficientes en SEC (**Fig. IV.44**). Esto sugiere que la actividad glicosidasa de las proteínas HEXO no está afectando el estado de *O*-GlcNAcilación de la proteína CP. Hay que destacar que en uno de los gels de este experimento la señal correspondiente a la CP procedente de plantas SEC-b2 se detectó como una doble banda, que también se intuía en la proteína presente en plantas silvestres (**Fig. IV.44**, gel de arriba). Este doblete de CP se ha observado en algún otro gel, y su detección parece estar asociada a factores de la electroforesis aún por identificar.

Igualmente está por determinar si el doblete se debe a alguna MPT selectiva, como en el caso de la doble banda característica de la CP de PPV-BOR-3 fosforilada.



Figura IV.44. Migración de la CP de PPV-R cuando la proteína se coexpresa simultáneamente con las hexosaminidasas HEXO1, HEXO2 y HEXO3 de *A. thaliana*, fusionadas (HEXOx-TAP) o no (HEXOx) a una etiqueta TAP, en plantas de *N. benthamiana* WT y SEC-b2. Las hojas se infiltraron con una mezcla de cultivos bacterianos que portaban las tres construcciones HEXOx-TAP o HEXOx, o la de la GFP, conjuntamente con la del plásmido que expresaba el PPV-R y otro que contenía el supresor del silenciamiento P19 del TBSV. Se incluyeron dos clones por construcción, excepto en el caso de HEXO1-TAP que se utilizaron dos cultivos bacterianos del mismo clon. El tejido procedente de tres plantas distintas, se recogió a 5 dpi y a partir del mismo se obtuvieron extractos de proteínas totales que se analizaron mediante *Western Blot* anti-CP. Se indica el tipo de planta agroinfiltrada, la construcción ensayada y el clon o el cultivo utilizado. La interpretación de las diferencias de movilidad electroforética de la CP aparece representada con líneas azules. La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga.

Para descartar la posibilidad de que la expresión conjunta de las tres HEXO estuviera diluyendo el efecto de una única enzima activa, se realizó un nuevo ensayo siguiendo un esquema similar al anterior, pero en este caso, expresando individualmente las tres enzimas etiquetadas. Tampoco en este caso se apreció que la co-expresión de alguna de las HEXO junto con el virus diera lugar a un aumento de la movilidad electroforética de la CP producida en plantas silvestres similar al causado por la deficiencia de *O*-GlcNAcilación en las plantas SEC-b2 (**Fig. IV.45**).

IV.7.2. Obtención de una versión funcional de la proteína SEC etiquetada para su utilización en el aislamiento de complejos proteicos relacionados con la modificación de la CP del PPV

Existen datos previos de que diferentes factores implicados en la modificación coordinada de proteínas de eucariotas por fosforilación y *O*-GlcNAcilación actúan en forma de complejos proteicos hetero-oligoméricos (van der Laarse *et al.*, 2018; Zeidan & Hart, 2010). En este apartado de la tesis nos hemos propuesto obtener una versión etiquetada de la OGT SEC, el único factor celular conocido implicado en la MPT de la CP del PPV, para usarla como anzuelo en el aislamiento e identificación

mediante técnicas de afinidad y MS de otros factores que participen en la fosforilación y O-GlcNAcilación de esta proteína.

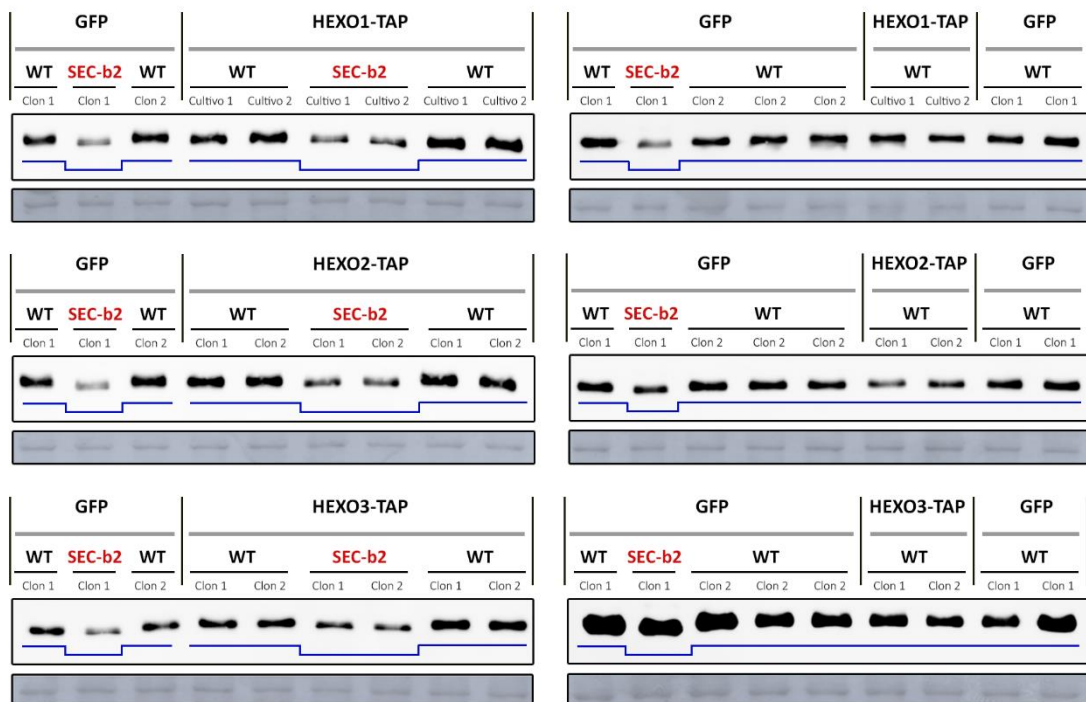


Figura IV.45. Migración de la CP de PPV-R cuando se coexpresa junto con alguna de las hexosaminidasas HEXO1, HEXO2 o HEXO3 de *A. thaliana* fusionadas a una etiqueta TAP, en plantas de *N. benthamiana* WT y SEC-b2. Las hojas se infiltraron con una mezcla de cultivos bacterianos que portaban cada una de las tres construcciones, o la de la GFP, conjuntamente con la del plásmido que expresaba el PPV-R y otro que contenía el supresor del silenciamiento P19 del TBSV. Se incluyeron dos clones por construcción, excepto en el caso de HEXO1-TAP que se utilizaron dos cultivos bacterianos del mismo clon. El tejido procedente de tres plantas distintas, se recogió a 5 dpi y a partir del mismo se obtuvieron extractos de proteínas totales que se analizaron mediante *Western Blot* anti-CP. Se indica el tipo de planta agroinfiltrada, la construcción ensayada y el clon o el cultivo utilizado. La interpretación de las diferencias de movilidad electroforética de la CP aparece representada con líneas azules. La señal de la RuBisCO teñida con rojo Ponceau se incluye como control de carga.

IV.7.2.1. La expresión transitoria del gen *SEC*, fusionado o no a una etiqueta TAP, es capaz de restablecer la O-GlcNAcilación de la CP de PPV-R in vivo en plantas de *N. benthamiana* SEC-b2

El cDNA correspondiente al gen *SEC* de *A. thaliana* se clonó fusionado a la etiqueta TAP en el vector binario de expresión en plantas pCTAPi, al igual que se había hecho con los de las hexosaminidasas. Para generar una variante control sin etiquetar, se obtuvo una construcción que incluía un codón de parada entre el final de la secuencia codificante del gen *SEC* y el comienzo de la de la etiqueta TAP (**Fig. IV.46A**).

Para verificar la actividad de la proteína *SEC* heteróloga, se agroinocularon plantas de *N. benthamiana* silvestre y SEC-b2 con PPV-R junto con las construcciones que expresaban las dos versiones de *SEC* (libre o etiquetada con TAP) o GFP, como control. En todos los casos las mezclas de agroinfiltración incluyeron un plásmido que expresa el supresor de silenciamiento P19 del TBSV. Un

primer análisis mediante *Western Blot* con reactivo PAP sobre extractos de hojas agroinoculadas recogidas a los 5 dpi, permitió detectar una señal a la altura de la proteína etiquetada, tanto en las plantas silvestres como en las SEC-b2 infiltradas con la construcción SEC-TAP (**Fig. IV.46B**). La acumulación de la proteína SEC-TAP parecía considerablemente superior en las plantas silvestres. No se han investigado las causas de esta diferencia, aunque podría deberse a que el transgén que silencia al gen *SEC* endógeno en las plantas SEC-b2 también afecte a la expresión del gen *SEC* heterólogo expresado transitoriamente, a pesar de la presencia del supresor de silenciamiento P19.

A continuación, la CP presente en los extractos de las hojas agroinoculadas se inmunoprecipitó con un suero policlonal que reconoce específicamente esta proteína y, los inmunoprecipitados se analizaron por SDS-PAGE (**Fig. IV.46C**). No se observaron grandes diferencias en cuanto a la cantidad de proteína inmunoprecipitada recuperada a partir de las distintas condiciones. La disminución de la movilidad electroforética de la CP producida en plantas SEC-b2 en las que se expresó el gen *SEC* heterólogo, etiquetado o sin etiquetar, con respecto a la detectada en las plantas SEC-b2 donde se expresó el control GFP, indicó que la enzima SEC heteróloga era funcional y capaz de restaurar la O-GlcNAcilación de la proteína en las plantas SEC-b2, deficientes en la proteína SEC endógena.

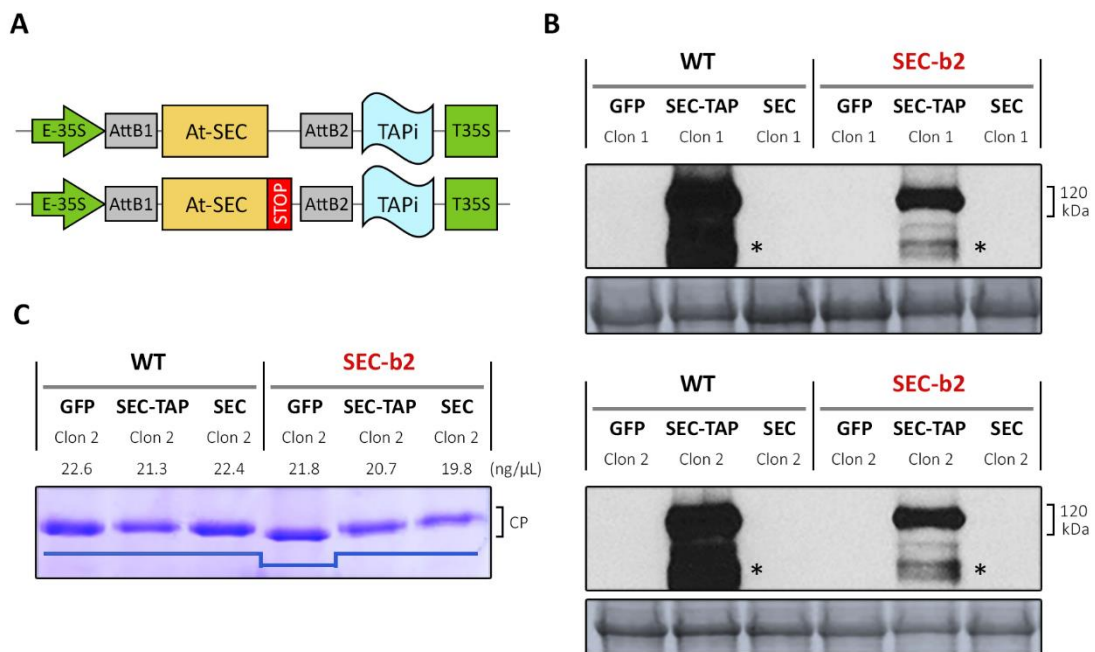


Figura IV.46. Expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* WT y SEC-b2 del gen *SEC* de *A. thaliana*. **(A)** Representación esquemática de las construcciones en las que el gen *SEC* se clonó en el vector binario pCTAPi, fusionado (SEC-TAP) o no (SEC) en C-terminal a una etiqueta TAP. **(B)** Detección de la proteína de fusión SEC-TAP mediante *Western Blot* anti-TAP. Las hojas agroinfiltradas con cada construcción, junto con un clon infeccioso del PPV y el supresor del silenciamiento P19 del TBSV, se recogieron a los 5 dpi para obtener los extractos proteicos analizados. La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga. (*) Posible producto de degradación de SEC-TAP. **(C)** Tinción con azul de *Coomassie* de la CP inmunoprecipitada a partir del tejido agroinfiltrado. La interpretación de las diferencias de movilidad electroforética de la proteína aparece representada con líneas azules. En las imágenes se indica el tipo de planta agroinfiltrada, la construcción ensayada, el clon utilizado, el peso molecular al que migra la proteína de fusión y la concentración estimada de la CP inmunoprecipitada (en el caso de (C)).

Los diferentes inmunoprecipitados de la CP se digirieron con tripsina, y los péptidos generados se analizaron por MALDI-TOF (**Fig. IV.47**). El porcentaje de péptido [1-39] no modificado respecto al total de variantes de este péptido producido en plantas de *N. benthamiana* silvestre donde el virus se co-expresó con las proteínas SEC o SEC-TAP (22.3 % y 20.0 %, respectivamente) fue aproximadamente dos veces inferior al obtenido en las plantas donde el virus se co-expresó con la GFP control (42 %). En concordancia con este dato, el porcentaje de la forma di-*O*-GlcNAcilada del péptido [1-39] de la CP co-expresada con SEC o SEC-TAP en las mismas plantas (29.0 % y 36.1 %, respectivamente) fue más de 1.5 veces mayor que el obtenido cuando la CP fue coexpresada con el control GFP (17.8 %). Este resultado sugiere claramente que la expresión transitoria del gen *SEC* heterólogo, independientemente de si su producto está o no etiquetado, estimula la *O*-GlcNAcilación de la CP, y también indica que es posible sobrepasar el umbral de *O*-GlcNAcilación de la proteína sin afectar notablemente la infección viral.

El resultado del análisis de la *O*-GlcNAcilación de la CP producida en las plantas deficientes en la enzima SEC endógena es aún más concluyente en cuanto a la actividad de la proteína SEC heteróloga expresada de forma transitoria. Como se esperaba, el porcentaje de la forma no modificada del péptido [1-39] de la CP co-expresada con el control GFP fue del 100 %. Por el contrario, en la misma línea del descenso de movilidad electroforética observado en el SDS-PAGE observado (**Fig. IV.46C**), la co-expresión de la CP con SEC o SEC-TAP restablecía los niveles de *O*-GlcNAcilación del péptido [1-39] de manera sustancial (37.5 % de forma mono-*O*-GlcNAcilada y 26.9 % de forma di-*O*-GlcNAcilada para la co-expresión con SEC, y 37.3 % de forma mono-*O*-GlcNAcilada y 28.1 % de forma di-*O*-GlcNAcilada para la co-expresión con SEC-TAP) (**Fig. IV.47**).

En su conjunto estos resultados ponen de manifiesto la funcionalidad del gen *SEC* heterólogo de *A. thaliana* en *N. benthamiana* en el contexto de la infección viral y la ausencia de distorsiones causadas por la etiqueta TAP fusionada al extremo carboxilo de la enzima.

IV.7.2.2. Generación de plantas transgénicas de A. thaliana en fondo silvestre y sec-2 que expresan de forma estable el gen SEC fusionado a una etiqueta

El mutante *sec-2* de *A. thaliana* (fondo genético Col-0) se caracteriza por la pérdida de función de la enzima SEC, al tener insertado un T-DNA en el intrón que separa los dos exones que codifican la región catalítica de la proteína (Hartweck *et al.*, 2002). Este mutante no presenta alteraciones fenotípicas apreciables (Hartweck *et al.*, 2002) y su infección por el PPV, aunque cursa con cierto retraso respecto a la del virus silvestre, produce una acumulación suficiente para poder purificar viriones susceptibles de ser analizados por MS (Chen *et al.*, 2005).

Con objeto de obtener plantas que expresaran la enzima SEC etiquetada de manera constitutiva, que pudieran ser utilizadas en el aislamiento de complejos proteicos funcionales sin tener que competir con la enzima SEC libre endógena, se transformaron plantas de *A. thaliana sec-2* con la

construcción SEC-TAP empleada en el ensayo de expresión transitoria descrito en el apartado anterior. También se transformaron con la misma construcción plantas de *A. thaliana* silvestres, en este caso para evaluar el posible efecto de un exceso de *O*-GlcNAcilación de la CP en la infección por el PPV. Para la transformación, se sumergieron tallos florales de cada tipo de planta en dos cultivos independientes de *Agrobacterium* portadores de la construcción SEC-TAP. Las semillas de estas plantas (semillas F0) en cuyo DNA genómico se habían insertado una o varias copias del transgén, se seleccionaron germinándolas *in vitro* en un medio que contenía el herbicida BASTA, cuya acción se neutraliza por el producto del gen *BAR* incluido en el T-DNA del plásmido pCTAPi, que albergaba la secuencia codificante de la proteína de fusión SEC-TAP (Fig. IV.48A).

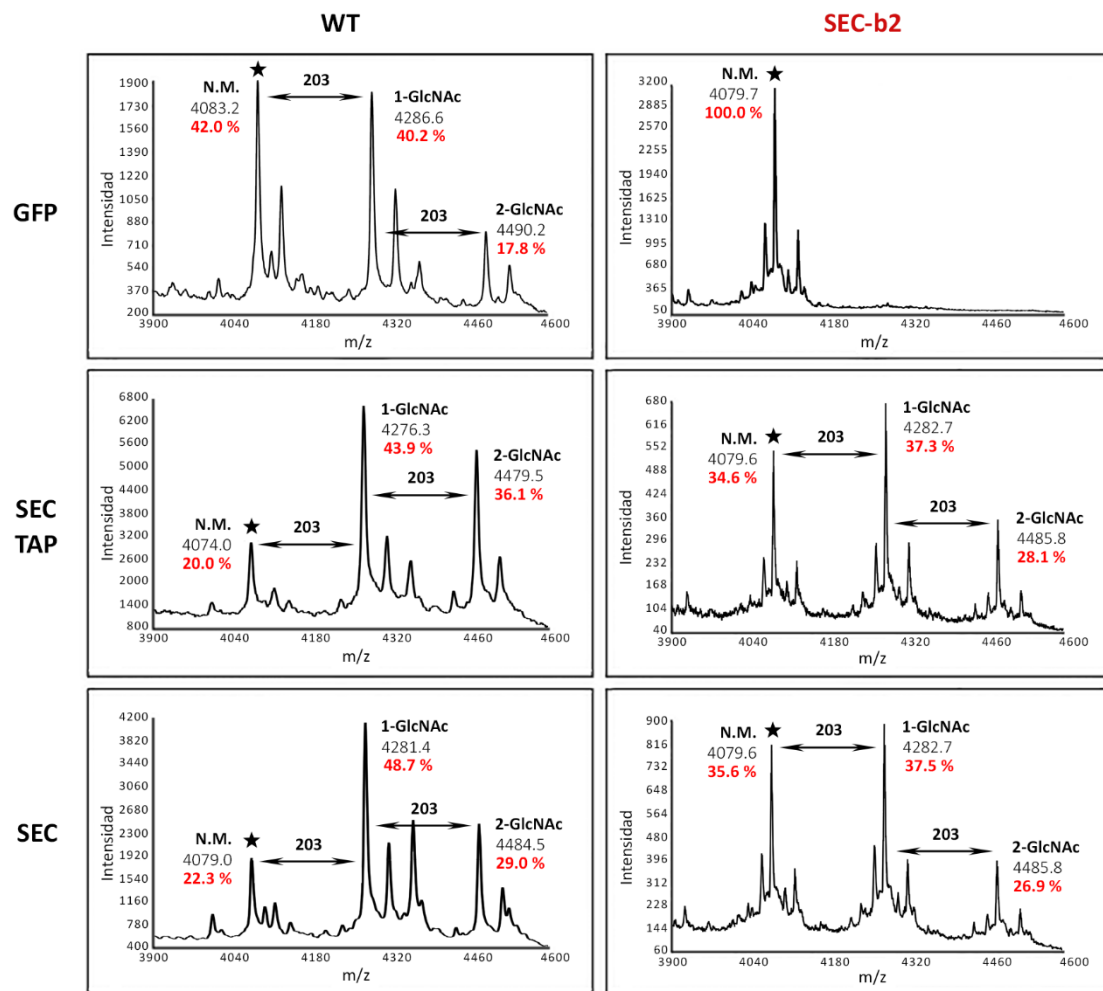


Figura IV.47. *O*-GlcNAcilación de la CP de PPV-R cuando la proteína se coexpresa con la proteína SEC fusionada (SEC-TAP) o no (SEC) a una etiqueta TAP, en plantas de *N. benthamiana* WT o SEC-b2. Las hojas se infiltraron con una mezcla de cultivos bacterianos que portaban las construcciones SEC-TAP o SEC, o la de la GFP, conjuntamente con la del plásmido que expresaba el PPV-R y otro que contenía el supresor del silenciamiento P19 del TBSV. El tejido se recogió a los 5 dpi y a partir del mismo la CP fue inmunoprecipitada y analizada mediante MALDI-TOF. Se muestran los espectros que cubren la región del péptido [1-39], los ratios m/z asignados a los picos relevantes y el número de residuos *O*-GlcNAc predichos para cada especie peptídica. En rojo se indica el porcentaje calculado para los péptidos N.M., 1-GlcNAc y 2-GlcNAc obtenido en base a la intensidad de cada señal mayoritaria con respecto a la suma de las intensidades de las tres especies peptídicas. Las estrellas señalan los picos precursores N.M. que se corresponden con el péptido tríptico [1-39].

En algunas de las plantas F0 de ambos fondos genéticos resistentes a BASTA se verificó la integración del transgén en su genoma mediante amplificación por PCR de parte de la región catalítica de la enzima SEC (datos no mostrados). Para determinar si el transgén se expresaba adecuadamente, inmediatamente después de que las plantas F0 se trasplantaran a tierra, se analizó la presencia de la proteína de fusión SEC-TAP mediante *Western Blot*, utilizando el reactivo PAP (Fig. IV.48B). La cantidad de proteína SEC-TAP detectada resultó ser muy variable entre las distintas plantas transformadas. Aunque los niveles más altos parecían corresponder a plantas con el fondo genético silvestre (ej. plantas 5.8 y 6.9), también había plantas con este fondo genético con niveles más bajos (en algunos casos prácticamente indetectables) muy inferiores al de algunas plantas con fondo genético *sec-2* (ej. plantas 5.7 y 6.18 frente a plantas 9.2 y 10.6).

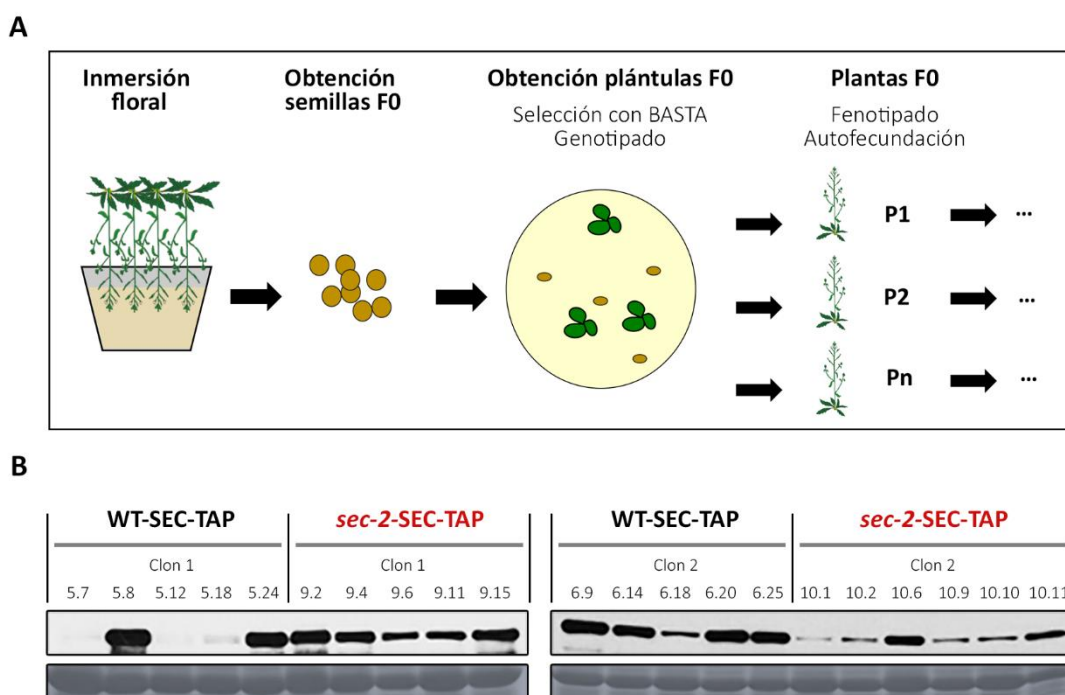


Figura IV.48. Generación de plantas transgénicas de *A. thaliana* WT o *sec-2*, que expresan la proteína SEC fusionada a una etiqueta TAP. **(A)** Esquema de la generación de plantas transgénicas WT-SEC-TAP y *sec-2*-SEC-TAP mediante inmersión floral en cultivos de *A. tumefaciens* que contenían la construcción SEC-TAP. Algunas de las plantas seleccionadas *in vitro* fueron genotipadas, fenotipadas y posteriormente propagadas. **(B)** Detección de la proteína de fusión SEC-TAP mediante *Western Blot* anti-TAP. El análisis se realizó en extractos de proteínas totales obtenidos a partir del tejido foliar de diversas plantas F0 (x.x). La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga.

Para el análisis posterior se escogieron plantas F0 de los dos fondos genéticos (5.7, 5.8, 5.12, 5.18, 5.24, 6.9, 6.14, 6.18 y 6.20, fondo silvestre y 9.2, 9.4, 9.6, 9.11, 9.15, 10.6, 10.9 y 10.10, fondo *sec-2*, Fig. IV.48B), que se autofecundaron y sus semillas se germinaron en medio selectivo. Las plantas F1 resultantes, resistentes a BASTA, se trasplantaron a tierra y cuatro de ellas se destinaron a evaluar su susceptibilidad a la infección por PPV-R. Las plantas F1 se agroinocularon con bacterias que expresan al plásmido pSN-PPV y los extractos de tejido sistémicamente infectado, recogido a 17 dpi,

se analizaron mediante *Western Blot* con reactivo PAP para detectar la acumulación de la proteína SEC etiquetada y con suero anti-CP para verificar el éxito de la infección y estimar la acumulación viral (Fig. IV.49).

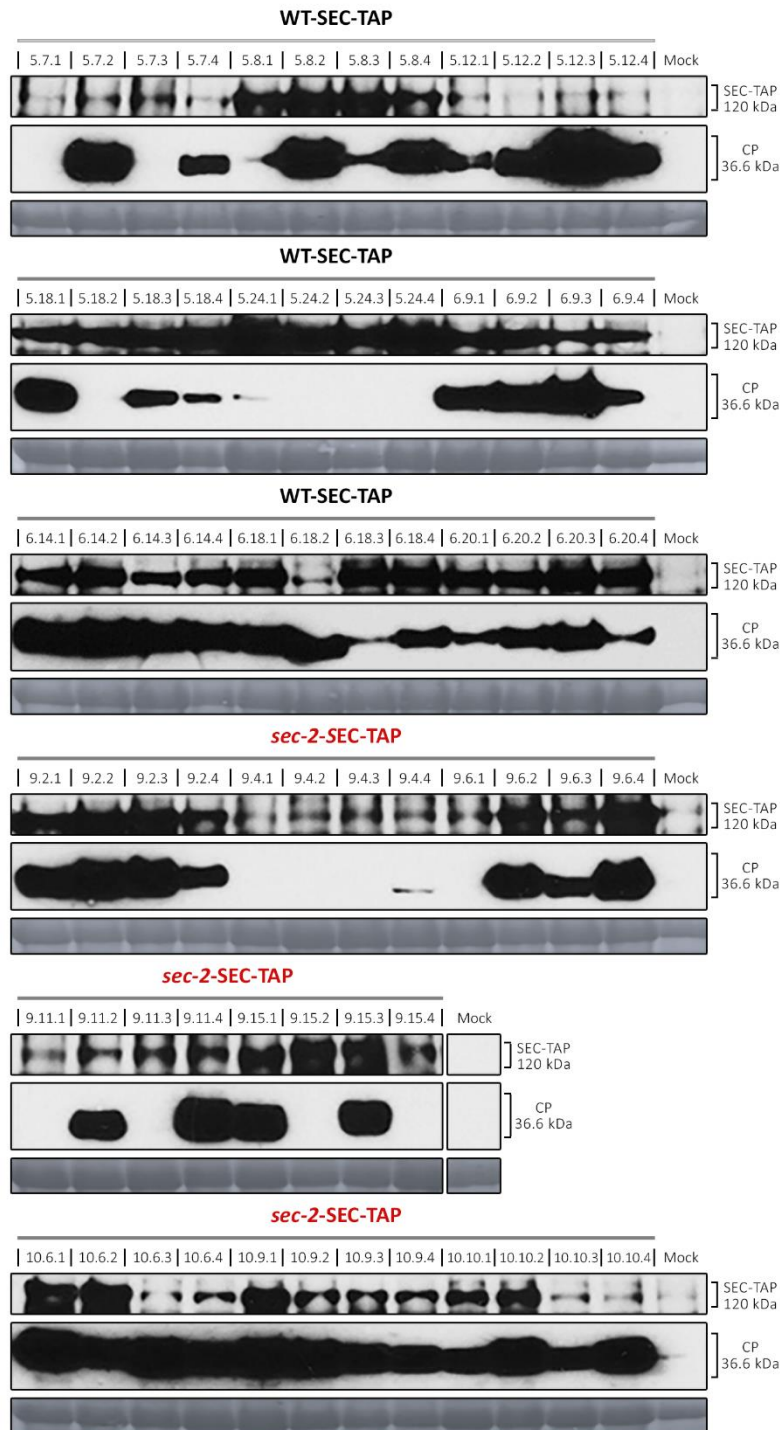


Figura IV.49. Evaluación de la expresión de la proteína SEC fusionada a una etiqueta TAP en la generación F1 de plantas transgénicas de *A. thaliana* WT-SEC-TAP y *sec-2*-SEC-TAP infectadas con PPV-R. Las plantas F1 (x.x.x) se agroinocularon con PPV-R y los extractos nativos de las hojas superiores a las inoculadas, colectadas a 17 dpi, se utilizaron para detectar la proteína de fusión por *Western Blot* anti-TAP. A continuación, la misma membrana se incubó con un anticuerpo anti-CP para detectar la CP del virus. La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga.

El primer resultado que llama la atención es que los niveles de acumulación de SEC-TAP en las plantas F1 no siempre se correspondían con los detectados en sus progenitoras F0 (comparar las **Fig. IV.48** y **Fig. IV.49**). Por ejemplo, el análisis de las plantas F0 mostró que la línea 6.18 exhibía un nivel de acumulación de SEC-TAP notablemente inferior al de las líneas 6.14 y 6.20; sin embargo, aunque la planta 6.18.2 seguía mostrando esta acumulación limitada, los niveles de SEC-TAP de las otras tres plantas F1 descendientes de la línea 6.18 fueron más elevados que los de la mayoría de plantas descendientes de 6.14 y 6.20. Igualmente, este era el caso de las plantas descendientes de 9.6, una planta F0 con acumulación de SEC-TAP no muy alta, entre las que 9.6.1 mostraba un nivel de acumulación muy bajo, mientras que los de sus tres hermanas se encontraban en el rango superior. Pero el caso más extremo era el de las plantas descendientes de la línea 9.4, que mostraron niveles de SEC-TAP extremadamente bajos, que contrastaban con los altos niveles de la planta F0.

Llama también la atención las diferencias en cuanto a la infectividad y los niveles de acumulación del PPV en las distintas plantas F1 (**Fig. IV.49**). En particular, hay dos líneas, 5.24 y 9.4, en las que solo una de sus plantas F1 resultó infectada, exhibiendo además niveles de acumulación viral muy bajos. Sin embargo, el hecho de que la expresión de SEC-TAP sea muy alta en las plantas 5.24.x y muy baja en las 9.4.x, junto con la existencia de plantas no infectadas en otras líneas tanto con niveles de SEC-TAP altos como bajos, impide concluir si existe o no una asociación entre la expresión de SEC y la susceptibilidad a la infección por PPV. No obstante, es importante destacar que, de forma general, en este experimento la eficiencia de infección fue baja, ya que de 8 plantas de *A. thaliana* silvestre que se inocularon como control solo 3 resultaron infectadas. Así pues, no podemos descartar una posible contribución de la sobreexpresión de SEC-TAP a la eficiente infección de algunas de las líneas transgénicas.

El objetivo principal de este experimento, sin embargo, era dilucidar si la expresión transgénica de SEC etiquetado era capaz de facilitar la O-GlcNAcilación de la CP del PPV. Para esto se eligieron las 4 plantas F1 descendientes de la línea 6.14 y las 4 descendientes de la línea 9.2, como representantes de la sobreexpresión de SEC-TAP en fondo silvestre y *sec-2*, respectivamente. Estas líneas se seleccionaron debido a sus altos niveles de acumulación tanto de SEC-TAP como de CP viral (**Fig. IV.49**). La CP del tejido sistémicamente infectado de estas plantas se inmunoprecipitó como se ha descrito en el apartado anterior. En paralelo, como control de O-GlcNAcilación estándar, se inmunoprecipitó en las mismas condiciones la CP presente en una cantidad de tejido equivalente procedente de una de las plantas de *A. thaliana* silvestre infectadas que mostraba un mayor nivel de acumulación viral.

El análisis por SDS-PAGE de los inmunoprecipitados reveló una cantidad muy superior de CP en las dos muestras de plantas transgénicas (WT-SEC-TAP y *sec-2*-SEC-TAP) que en la de la planta silvestre (**Fig. IV.50A**), sugiriendo que la sobreexpresión de la enzima con actividad OGT, tuviera o no

un efecto significativo sobre la infectividad del PPV en *A. thaliana*, podría incrementar su acumulación. Los tres inmunoprecipitados se digirieron con tripsina y se analizaron por MALDI-TOF. La abundancia relativa de la forma no modificada del péptido [1-39] fue casi dos veces inferior en las plantas transgénicas que expresaban la proteína SEC-TAP en fondo silvestre o *sec-2* (21.9 % y 23.6 %, respectivamente), que en las plantas silvestres (40.3 %) (**Fig. IV.50B**). En concordancia con este dato, las formas di-*O*-GlcNAc del péptido [1-39] estaban más representadas en las plantas que expresaban la enzima SEC-TAP que, en las plantas silvestres, aunque en este caso las diferencias no eran tan acusadas (29.8 % y 27.4 % en plantas WT-SEC-TAP y *sec-2*-SEC-TAP, respectivamente, y 22.9 % en plantas silvestres).

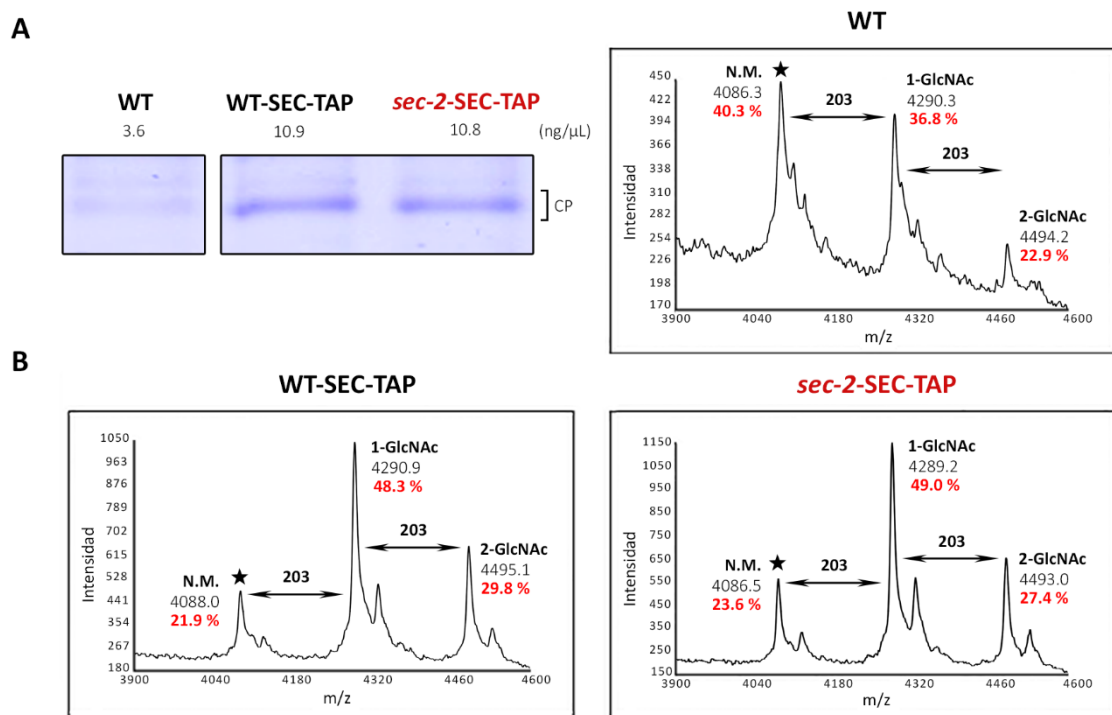


Figura IV.50. Evaluación de la funcionalidad de la proteína SEC fusionada a una etiqueta TAP en la generación F1 de plantas transgénicas de *A. thaliana* WT-SEC-TAP y *sec-2*-SEC-TAP infectadas con PPV-R. **(A)** Detección de la CP inmunoprecipitada a partir de muestras procedentes de 4 plantas descendientes de las líneas FO 6.14 (WT-SEC-TAP) y 9.2 (*sec-2*-SEC-TAP), cargadas en un gel SDS-PAGE y teñidas con azul de *Coomassie*. Como control de *O*-GlcNAcificación estándar de la CP, se utilizó una planta de *A. thaliana* silvestre (WT) infectada. Se indica la concentración estimada de la CP (ng/μL). **(B)** *O*-GlcNAcificación de la CP de PPV-R inmunoprecipitada. Se muestran los espectros MALDI-TOF que cubren la región del péptido [1-39] de la CP y en ellos, los ratios m/z asignados a los picos relevantes, así como el número de residuos *O*-GlcNAc predichos para cada especie peptídica. En rojo se indica el porcentaje calculado para los péptidos N.M., 1-GlcNAc y 2-GlcNAc obtenido en base a la intensidad de cada señal mayoritaria con respecto a la suma de las intensidades de las tres especies peptídicas. Las estrellas señalan los picos precursores N.M. que se corresponden con el péptido tríptico [1-39].

Estos resultados indican que la expresión transgénica de la proteína de fusión SEC-TAP no solo restablece la *O*-GlcNAcificación de la CP en un fondo genético *sec-2*, sino que, tanto en este fondo como en uno silvestre, incrementa la *O*-GlcNAcificación por encima del nivel observado en la infección

de plantas silvestres por PPV. Además, estos datos proporcionan una primera indicación de que al igual que la ausencia de *O*-GlcNAcilación de CP entorpece la infección (Chen *et al.*, 2005), su aumento podría facilitarla.

Los estudios previos del laboratorio habían demostrado que la menor eficiencia de la infección por PPV, derivada de la falta de *O*-GlcNAcilación de su CP, estaba asociada con una mayor inestabilidad de esta proteína *in vitro* (Pérez *et al.*, 2013). Para determinar si la restitución de *O*-GlcNAcilación era capaz de revertir el fenotipo de inestabilidad de la CP en plantas *sec-2*, los extractos nativos procedentes de plantas *sec-2* y *sec-2*-SEC-TAP infectadas con PPV-R se sometieron a ensayos de incubación *in vitro*. Para ello, se prepararon extractos en condiciones nativas de hojas sistémicamente infectadas de *A. thaliana sec-2* y de plantas transgénicas que expresan SEC-TAP en un fondo *sec-2* (F1 de la línea 9.2). Los extractos se incubaron a 25 °C y se analizó por *Western Blot* anti-CP la estabilidad y acumulación de la CP a los tiempos indicados. La acumulación de la CP procedente de plantas *sec-2* descendió drásticamente al cabo de las 2 horas de incubación, llegando a desaparecer casi totalmente a las 4 horas, mientras que en las plantas *sec-2*-SEC-TAP permaneció prácticamente inalterable incluso después de 4 horas de incubación (Fig. IV.51A). Este resultado confirma que el restablecimiento de la *O*-GlcNAcilación en plantas *sec-2* restituye la estabilidad de la CP *in vitro*.

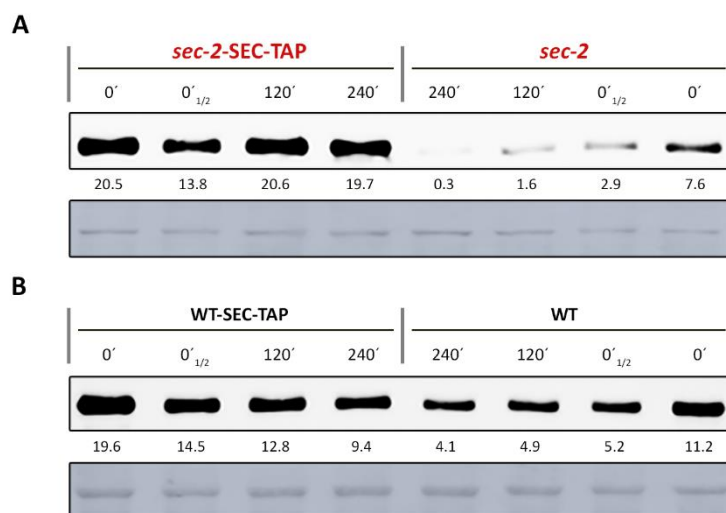


Figura IV.51. Ensayo de la estabilidad de la CP de PPV-R en el contexto de plantas transgénicas de *A. thaliana* WT-SEC-TAP y *sec-2*-SEC-TAP. Plantas transgénicas que expresaban eficientemente el transgen SEC-TAP fueron agroinfiltradas con un cultivo de *Agrobacterium* que expresaba el PPV-R. El tejido sistémicamente infectado, recogido a los 17 dpi, fue utilizado para preparar extractos nativos de proteínas totales en tampón fosfato que fueron analizados por *Western Blot* anti-CP, inmediatamente después de la extracción (0' y 0'_{1/2}, en el que se cargó la mitad de la muestra) o después de la incubación a 25 °C durante los tiempos indicados. **(A)** Estabilidad de la CP en ausencia de *O*-GlcNAcilación por SEC (*sec-2*) y cuando se restaura la función de esta enzima (*sec-2*-SEC-TAP). **(B)** Estabilidad de la CP en presencia de la enzima endógena (WT) y cuando además se está expresando la proteína SEC etiquetada (WT-SEC-TAP). Los valores relativos de intensidad de las bandas de CP que se muestran debajo de cada carril fueron calculados con el programa *Quantity One 1-D* (Bio-Rad). La señal de la RuBisCO teñida con rojo *Ponceau* se incluye como control de carga.

Aprovechando que nuestros análisis de MALDI-TOF muestran que la expresión transgénica de SEC-TAP da lugar a un aumento de la *O*-GlcNAcilación de la CP con respecto a los niveles basales observados en la infección de plantas silvestres (**Fig. IV.50B**), nos planteamos testar si, de la misma manera que la ausencia de *O*-GlcNAcilación en plantas *sec-2* está asociada con una mayor inestabilidad de la CP *in vitro*, el aumento en los niveles de *O*-GlcNAcilación podría tener el efecto contrario, dotando a la proteína de una mayor estabilidad. Para abordar esta cuestión, como en el experimento anterior, se prepararon extractos de hojas sistémicamente infectadas a partir de plantas de *A. thaliana* silvestre y de plantas transgénicas que expresan SEC-TAP en este mismo fondo (F1 de línea 6.14). Los extractos se incubaron a 25 °C, tomándose alícuotas a diferentes tiempos para estimar la estabilidad y la acumulación de la CP mediante *Western blot*. Una alta proporción de CP se mantenía estable después de 4 horas de incubación en ambos extractos, y, aunque la sensibilidad del experimento no permite sacar conclusiones cuantitativas rigurosas, no parece que la hiper-*O*-GlcNAcilación en las plantas WT-SEC-TAP contribuya a estabilizar la CP del PPV, lo que sugiere que existe un nivel umbral a partir del cual una mayor *O*-GlcNAcilación de la CP no supone una mayor protección de la proteína (**Fig. IV.51B**). Estos datos apuntan a que, aunque un aumento global de la *O*-GlcNAcilación podría estar facilitando la infección por PPV, esto no se debería a una menor tasa de degradación de la CP.

V. DISCUSIÓN



V. DISCUSIÓN

La *O*-GlcNAcilación y la fosforilación son dos de las MPT más comunes y ampliamente estudiadas en las proteínas de los organismos eucariotas (Bah & Forman-Kay, 2016; Corfield, 2017; Santos & Lindner, 2017), y los análisis de MS de los últimos años indican que ambas modificaciones son comparables en términos de dinamismo e impacto en las funciones de las proteínas (Zeidan & Hart, 2010). La *O*-GlcNAcilación y la fosforilación comparten las dianas de serina y treonina, y es habitual que estén involucradas en la regulación de los mismos procesos (Hart *et al.*, 2011; Leney *et al.*, 2017). Todas estas características comunes hacen que estas MPT puedan afectarse la una a la otra mediante distintos mecanismos de *cross-talk*, tanto a nivel del sustrato modificado como al de las propias enzimas que catalizan las reacciones químicas (van der Laarse *et al.*, 2018; Zeidan & Hart, 2010).

La interacción dinámica entre estas MPT ha sido extensamente estudiada en animales durante las últimas décadas, lo que ha dado lugar a múltiples revisiones sobre el tema (Butkinaree *et al.*, 2010; Hart *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2010; van der Laarse *et al.*, 2018; Slawson & Hart, 2003; Venne *et al.*, 2014; Zeidan & Hart, 2010). Aunque en los últimos años se han comenzado a identificar en plantas algunas proteínas que pueden ser modificadas por *O*-GlcNAcilación, solo conozco unos pocos estudios que demuestran que el *cross-talk* con la fosforilación también puede tener lugar en plantas (Taoka *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019).

En el caso de los virus que infectan animales se conocen múltiples ejemplos de proteínas fosforiladas, y cada vez se descubren más casos de proteínas que pueden ser *O*-GlcNAciladas. Sin embargo, el *cross-talk* entre ambas MPT ha sido muy poco estudiado, siendo el caso del antígeno T del SV40 el más conocido (Medina *et al.*, 1998). Por su parte, aunque en los virus que infectan plantas se han realizado comparativamente menos estudios, se han identificado varias proteínas que pueden ser fosforiladas y ninguna que pueda ser *O*-GlcNAcilada, con la excepción de la CP del *Potyvirus* PPV que es modificada por *O*-GlcNAcilación y fosforilación (Chen *et al.*, 2005; Fernández-Fernández *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2013; Šubr *et al.*, 2007). La modificación de la CP del PPV por ambas MPT hace de esta proteína un excelente modelo para estudiar cómo la *O*-GlcNAcilación y la fosforilación pueden afectar al ciclo viral.

V.1. La fosforilación de la CP del PPV es mucho más compleja de lo que se pensaba

Las posiciones *O*-GlcNAciladas previamente mapeadas *in vivo* en la CP de viriones de PPV-R (T19, T24, T41, T50, T53, T54/T58 y S65, Kim *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2013) no coinciden con ninguno de los sitios que hemos encontrado fosforilados en este aislado (**Fig. IV.1**, **Fig. IV.16**, **Tabla IV.1**, **Tabla IV.2** y **Anexo 5**). Aunque las fosfo-dianas S25, T71, S81, S101 y T106 de la CP de PPV-R (al igual que los residuos *O*-GlcNAcilados) se encuentran localizadas en lo que se puede

considerar la región N-terminal de la CP de los *Potyvirus*, en base a la estructura de los viriones del WMV determinada por criomicroscopía electrónica (Zamora *et al.*, 2017), también se han detectado aminoácidos fosforilables distribuidos en distintas localizaciones de la región central (S118, T254 y T313) (**Fig. IV.1** y **Fig. IV.16**). Esto indica que, a diferencia de las *O*-GlcNAcilaciones, las fosforilaciones no se encuentran restringidas a una región concreta de la CP, siendo su distribución más bien heterogénea. Es importante destacar que, aunque las dianas de fosforilación y *O*-GlcNAcilación no coinciden en la CP de PPV-R, sí se ha detectado un cierto solape y coexistencia de ambas MPT en la región N-terminal, al igual que ocurre en otras proteínas de plantas (Xu *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019). Concretamente, uno de los residuos fosforilados (S25) se sitúa al lado de la T24 *O*-GlcNAcilable. Hemos encontrado especies del péptido que va del aminoácido 1 al 39 ([1-39]) simultáneamente fosforiladas en la S25 y *O*-GlcNAciladas en la T24 (**Tabla IV.1** y **Tabla IV.2**), lo que demuestra que estas dos MPT no se bloquean competitivamente entre sí cuando se encuentran en estos residuos. Sin embargo, esto no implica necesariamente que la fosforilación y la *O*-GlcNAcilación en la CP del PPV sean independientes. De hecho, el aumento de fosforilación en la S25 en las plantas transgénicas deficientes en *O*-GlcNAcilación (SEC-b2) infectadas (**Fig. IV.4** y **Tabla IV.3**) indica que existe un *cross-talk* negativo entre ambas MPT que pueden coexistir sobre aminoácidos distintos. Hay dos evidencias adicionales que apoyan este *cross-talk*. La primera es el aumento en los niveles de *O*-GlcNAcilación detectados en el péptido [1-39] de la CP del mutante 4SA, en el que se ha abolido la fosforilación en las dianas S25, S81, S101 y S118, comparados con los de la CP del virus silvestre (**Fig. IV.14**). La segunda proviene de un artículo previamente publicado por nuestro laboratorio, en el que se también observó un aumento en la *O*-GlcNAcilación del péptido mencionado en un mutante en el que se impidió la fosforilación de la S25 (mutante S25A) con respecto al virus no mutado (Pérez *et al.*, 2006). No hemos encontrado evidencias de que ninguno de los otros tres residuos de serina detectados fosforilados en la CP de PPV-R (S81, S101 y S118) esté influenciado por el estado de *O*-GlcNAcilación de la proteína (**Fig. IV.5** y **Tabla IV.2**). Por otra parte, en el experimento iTRAQ llevado a cabo no fuimos capaces de detectar las fosforilaciones en los residuos T71, T106, T254 y T313 que fueron identificados fosforilados más tarde y después de análisis exhaustivos (**Fig. IV.16A**, **Anexo 5** y **Anexo 6**), por lo que no podemos descartar que exista un *cross-talk* no detectado entre alguna de las fosforilaciones que tienen lugar en las treoninas y la *O*-GlcNAcilación.

Aunque el *cross-talk* detectado entre la fosforilación de la S25 y la *O*-GlcNAcilación global en la CP de PPV-R podría ser importante para la infección, la aparición en la naturaleza del mutante NAT en el que se pierden las dianas gT19, gT24 y pS25 en huéspedes herbáceos sin que presente fuertes efectos en la eficacia biológica del patógeno (Fernández-Fernández *et al.*, 2002) y el hecho de que la diana S25 fosforilable no se conserve en todas las cepas del PPV (**Fig. IV.21** y **Anexo 7**), sugieren que esta interrelación no es imprescindible. Sin embargo, es importante destacar que los aislados de la cepa Rec (en los que no se mantiene la S25) están muy poco adaptados al melocotonero (García *et*

al., 2014), que es precisamente donde este *cross-talk* podría ser más relevante, ya que la mutación NAT reduce la eficacia biológica del PPV en este huésped natural (Salvador *et al.*, 2008). Estos datos podrían estar sugiriendo que, aunque mantener el *cross-talk* entre ambas MPT en la región N-terminal de la CP puede ser importante para el PPV, los residuos entre los que se establece la interrelación podrían ser distintos dependiendo del huésped o la cepa del patógeno.

La conservación de la fosforilación y la O-GlcNAcificación en la CP de al menos tres cepas distintas del PPV (**Fig. IV.24 y Anexo 6**), y el mantenimiento parcial de las dianas modificadas en distintas cepas del virus y en la proteína obtenida a partir de distintos huéspedes (**Fig. IV.20, Fig. IV.21, Anexo 6 y Anexo 7**), ponen de manifiesto que ambas MPT de la proteína podrían ser importantes en la interacción planta-patógeno. El mapeo de las fosforilaciones en distintos huéspedes y cepas del PPV (**Fig. IV.22 y Anexo 6**), y el alineamiento de las CP de diferentes cepas del virus (**Anexo 7**), han revelado que las dianas de fosforilación en la región N-terminal presentan distinto grado de conservación. Los datos sugieren que hay dianas fosforilables que son específicas de cada aislado, como es el caso de la S62 en la CP de PPV-BOR-3, que ya fue predicha por Šubr *et al.* (2010) y que presumiblemente es la responsable del fenotipo típico de doble banda de la CP de este aislado en geles SDS-PAGE. Estos resultados concuerdan con la alta variabilidad de secuencia que presenta la región N-terminal de la CP de los *Potyvirus* (Dolja *et al.*, 1991; Shukla & Ward, 1989) y sugieren, que lo esencial para el virus es que tenga lugar la fosforilación en esta región, pero no necesariamente en unos residuos concretos. Esta idea también está avalada por distintos resultados obtenidos con el mutante 4SA mencionado arriba. En primer lugar, en la CP de este mutante se detectó con mayor facilidad la fosforilación T71 en comparación con el resto de fosforilaciones denominadas “esporádicas” y, además en este mutante también fue donde se identificó la diana T106, que no fue detectada en ningún otro virus analizado (**Fig. IV.16A, Anexo 5 y Anexo 6**). Este posible aumento de fosforilación en la T71, sumado al surgimiento de una nueva diana fosforilable en la posición 106 cuando se impide la fosforilación en las serinas de la mitad amino de la CP de PPV-R, sugiere que el virus estaría tratando de compensar el estado de “hipofosforilación” irreversible en esta región de la proteína. No podemos descartar sin embargo, que el mapeo de las fosforilaciones en las T71 y T106 en la CP del mutante 4SA se deba principalmente a particularidades de la digestión, recuperación y posterior detección de los péptidos fosforilados por MS; o incluso, que las mutaciones de los residuos de serina fosforilables por alanina hayan afectado directamente a la fosforilación de las T71 y T106 debido a cambios conformacionales en la proteína que hayan desencadenado que la CP sea ahora reconocida por otras quinasas, al igual que se ha propuesto para la proteína nsP3 del alfavirus *Semliki Forest virus* (SFV) (Vihinen *et al.*, 2001). Sin embargo, esto último parece improbable debido a que un análisis realizado con el programa *NetPhos 3.1* de la CP del mutante 4SA y la del virus PPV-R silvestre no predice que haya un cambio en las quinasas que pueden fosforilar las treoninas 71 y 106. Además, la T71 también se detectó fosforilada en la CP de los viriones de PPV-R obtenidos a partir

de *A. thaliana*, lo que indica que la fosforilación de este residuo no depende de la presencia de las mutaciones del mutante 4SA.

Los análisis de MS realizados no nos han permitido mapear las posiciones donde la *O*-GlcNAcilación de la CP de PPV-R tiene lugar en el huésped natural del virus (*P. persica*) y tampoco en otras cepas del virus (C y Rec) distintas a D en *N. benthamiana*. Sin embargo, los análisis cualitativos por MALDI-TOF (**Fig. IV.20**) y *Western Blot* (**Fig. IV.24**) han confirmado que la *O*-GlcNAcilación de la CP también tiene lugar en los viriones obtenidos a partir del huésped natural y en distintas cepas del virus; y que, además, esta modificación se produce por la OGT SEC en las tres cepas analizadas. Estos resultados, unidos al hecho de que las dianas de *O*-GlcNAcilación en la CP de PPV-R no se conserven completamente en las distintas cepas del virus (**Fig. IV.21 y Anexo 7**), sugieren que, al igual que ocurre con la fosforilación en la mitad amino de la proteína, podría existir cierta variabilidad en las dianas *O*-GlcNAcificables. En este punto nos parece importante destacar que al comparar el patrón de *O*-GlcNAcilación de la CP de viriones producidos en *P. persica* frente al de aquellos procedentes de *N. benthamiana*, encontramos que la intensidad del pico del péptido [1-39] no modificado por *O*-GlcNAcilación en las muestras procedentes del huésped leñoso fue considerablemente inferior al que se obtuvo en los viriones purificados desde el huésped herbáceo (**Fig. IV.20**). Este resultado, que sugiere que la *O*-GlcNAcilación podría ser más importante para la infección del huésped natural que para la del experimental, concuerda perfectamente con el descenso de *fitness* causado por la mutación NAT en *P. persica* (Salvador *et al.*, 2008). Sin embargo, esta idea contrasta con resultados obtenidos previamente en el laboratorio en los que se observó que sustituciones de las treoninas *O*-GlcNAcificables de la CP por alaninas no causaban en *P. persica* un efecto sobre la infección del PPV mayor al que pudiera producirse en los huéspedes herbáceos analizados (Pérez *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2013). Esta aparente contradicción podría explicarse de dos formas. La primera es que el aumento de los niveles de *O*-GlcNAcilación detectado por MALDI-TOF en los viriones obtenidos de *P. persica* se deba a que la CP del virus multiplicado en este huésped pueda ser modificada en un número mayor de dianas *O*-GlcNAcificables en el péptido [1-39] que la del virus producido en *N. benthamiana*. Sin embargo, ésta no parece ser la hipótesis más probable, ya que en el péptido [1-39] únicamente se encuentran otras dos dianas teóricamente *O*-GlcNAcificables, la S16 y la S25, esta última se detectó (aunque de forma ambigua) fosforilada en *P. persica*. La segunda explicación es que, como se ha visto, la *O*-GlcNAcilación está fuertemente influenciada por el estado metabólico de la célula y protege contra distintos tipos de estrés (Biwi *et al.*, 2018; Bond & Hanover, 2015; Hanover *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010; Wells & Hart, 2003; Zachara & Hart, 2004). Por tanto, es posible que las condiciones celulares y ambientales propias del huésped leñoso repercutan en un aumento de *O*-GlcNAcilación en la CP del PPV con respecto a la que tiene lugar en los huéspedes herbáceos, sin que esto tenga que ver necesariamente con una mayor relevancia de esta modificación en el huésped natural. Podría ser interesante comparar los niveles de *O*-GlcNAcilación de la CP de los viriones obtenidos a partir de plantas de *P. persica* y *N. benthamiana*

sometidas a distintos tipos de estreses durante su crecimiento (ciclo luz/oscuridad, temperatura, concentración de azúcares). Por último, es importante no perder de vista que la construcción utilizada para comparar los niveles de O-GlcNAcilación en la CP de los viriones procedentes de *P. persica* y *N. benthamiana* fue pSN-PPV-5'BD, que expresa una quimera viral que infecta eficientemente plantas de *Prunus*, pero que lo hace con baja eficiencia en especies herbáceas (Salvador *et al.*, 2008). Aunque los valores relativos de los niveles de O-GlcNAcilación de la CP de los viriones procedentes de *N. benthamiana* calculados a partir de los análisis MALDI-TOF en este ensayo (**Fig. IV.20**) son similares a los que encontramos habitualmente en viriones purificados a partir de plantas de esta especie infectadas con el virus PPV-R (**Fig. IV.14**), bien adaptado a huéspedes herbáceos, no podemos descartar que las diferencias observadas entre *P. persica* y *N. benthamiana* se deban principalmente al tipo de construcción viral empleada.

Nuestros resultados de MS han mostrado que los residuos S118 y T254, localizados en la región central conservada de la CP y conservados ellos mismos en los 98 aislados del PPV analizados (**Anexo 7**), son los únicos residuos que se han detectado fosforilados en la proteína purificada a partir de todos los huéspedes y en todas las cepas del PPV estudiadas (**Anexo 5** y **Anexo 6**); por lo que la modificación de ambos aminoácidos parece ser especialmente importante. Ambas fosfo-dianas se diferenciaron sin embargo en su frecuencia de aparición, detectándose fosforilada la S118 prácticamente el cien por cien de las veces (**Tabla IV.1**, **Tabla IV.2**, **Anexo 5** y **Anexo 6**), mientras que la T254 se detectó fosforilada esporádicamente (**Anexo 5** y **Anexo 6**). Solo en una de las tres cepas analizadas (C, aislado PPV-SwCM) se detectó adicionalmente la fosforilación de un residuo situado al final de la región central de la CP, la T306, equivalente a la T304 en PPV-R (**Fig. IV.22A** y **Anexo 6**). Esta treonina se localiza precisamente en un motivo CK2 conservado en muchos potyvirus y es análoga a una de las dos treoninas que se fosforilan por la proteína quinasa CK2 en la CP del potyvirus PVA (Ivanov *et al.*, 2003; Löhmus *et al.*, 2017). Concretamente, se ha visto que la fosforilación de la T243 de la CP del PVA (equivalente a la fosfo-treonina 306 de la CP de PPV-SwCM) desempeña un papel fundamental en el control de la transición entre traducción y replicación, debido a que esta MPT regula la afinidad de la CP por el RNA viral (Ivanov *et al.*, 2001; Ivanov *et al.*, 2003; Löhmus *et al.*, 2017). Aunque la CP de PPV-SwCM puede fosforilarse en la T306, la relevancia funcional de esta modificación parece ser menor que en el caso del PVA. Las mutaciones que afectan a la T306 de la CP de PPV-SwCM causaron un leve enlentecimiento en la progresión de la infección, menor acumulación viral (**Fig. IV.23A**) y/o aparición de mutaciones espontáneas en distintas regiones de la proteína (**Fig. IV.23B**); sin embargo, en ningún caso provocaron el drástico efecto en la replicación viral observado con los mutantes en el sitio CK2 de la CP del PVA (Ivanov *et al.*, 2003; Löhmus *et al.*, 2017). Estos resultados sugieren que la fosforilación del motivo CK2 no es esencial en todos los potyvirus. De hecho, hay pruebas adicionales que apoyan esta hipótesis. Un análisis más exhaustivo que los descritos en Ivanov *et al.* (2003) y Löhmus *et al.* (2017) respecto a la conservación del motivo CK2 entre distintas CP potyvirales, revela que en el 17 % de las secuencias

analizadas procedentes de 112 especies virales del género *Potyvirus* no se conserva este motivo (Fig. V.1).

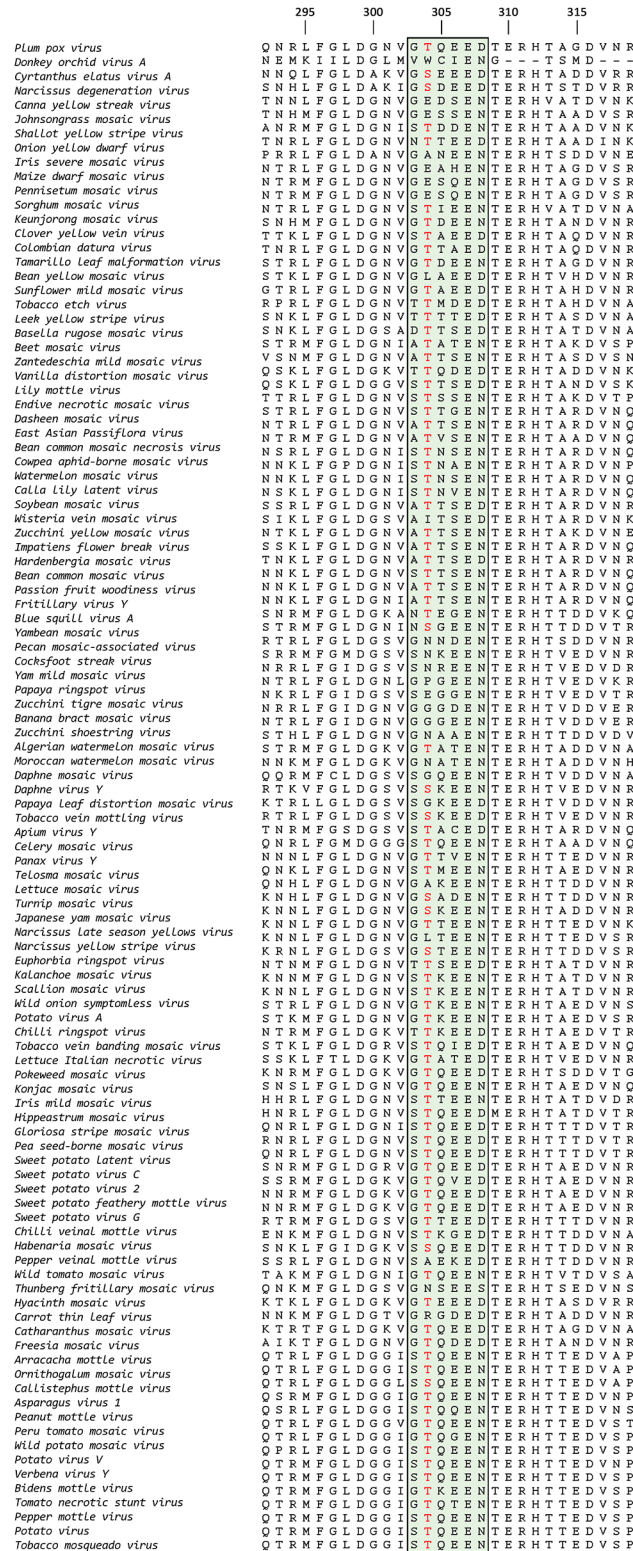


Figura V.1. Alineamiento de secuencias de la CP de 112 potyvirus en el que aparece recuadrado un motivo CK2 de fosforilación (verde). La conservación de los residuos diana (treonina o serina) en la localización correspondiente a la T304 de la CP de PPV-R se marca en rojo. La numeración de los aminoácidos hace referencia a la secuencia de la CP de PPV-R. Las proteínas se alinearon utilizando el programa *Clustal Omega* (European Bioinformatics Institute).

Además, la T304 del motivo CK2 de la CP de PPV-R no se ha detectado fosforilada en ninguno de los múltiples análisis de MS realizados, y tampoco se ha observado que la mutación de este residuo afecte apreciablemente a la infección viral (**Fig. IV.19**). Por tanto, parece que hay casos en los que, aunque se conserve una diana fosforilable en este motivo CK2, su presencia no es relevante para la infección. Es importante tener en cuenta que la fosforilación de la CP en el PVA y en el PPV presenta características bastante diferentes: i) la modificación de la CP del PVA no afecta a la proteína ensamblada en viriones, al contrario de lo que ocurre en PPV en el que las fosforilaciones tienen lugar tanto en la CP que se encuentra formando parte de las partículas virales como en la CP libre y los intermediarios de ensamblaje (**Fig. IV.37B**); ii) las fosforilaciones en la CP del PVA están confinadas en dos residuos adyacentes situados en el motivo CK2 cerca del extremo C-terminal, mientras que las del PPV se sitúan en múltiples regiones de la proteína; y iii) al contrario de lo que ocurre con el PVA, en la CP del PPV la fosforilación coexiste con su *O*-GlcNAcilación.

En el caso de la región central distal, únicamente se ha detectado fosforilado el residuo T313 en la CP de PPV-R multiplicado en *N. benthamiana* y se ha identificado de forma esporádica (**Anexo 5**). Los péptidos que contienen este residuo en general han sido pobremente detectados, por lo que no se han podido obtener datos en cuanto a su presencia en otras cepas del virus y en las infecciones en otros huéspedes. Sin embargo, el hecho de que este residuo se encuentre conservado en la totalidad de aislados del PPV analizados (**Anexo 7**), sugiere que su fosforilación podría ser relevante en el virus (como se discutirá más adelante).

Debido a la alta inestabilidad que presenta la CP expresada a partir de algunas de las construcciones utilizadas (Gallo *et al.*, 2018; Gallo & García, datos no publicados; Valli *et al.*, 2014), para determinar la posible asociación de las MPT de la CP del PPV con las distintas etapas del ciclo viral, fue necesario utilizar análisis de *Western Blot* de diferencias de movilidad electroforética como método alternativo a la MS. Esto hace que todas las conclusiones obtenidas sean limitadas. En el caso de la fosforilación, únicamente pudimos obtener datos sobre qué ocurría con la modificación del residuo S62, ya que la fosforilación de este aminoácido en la CP del aislado PPV-BOR-3 genera un patrón electroforético de doble banda característico (Šubr *et al.*, 2010). Por tanto, por el momento desconocemos qué ocurre con el resto de fosforilaciones que se distribuyen en las distintas regiones de la CP. Por su parte, en el caso de la *O*-GlcNAcilación, en la mayor parte de los experimentos ni siquiera pudimos obtener información acerca de la modificación de residuos concretos, de manera que los datos reflejan fundamentalmente el estado general de *O*-GlcNAcilación. Aún con estas limitaciones, los análisis cualitativos realizados nos han permitido concluir que las MPT de la CP del PPV pueden tener lugar incluso fuera del contexto de la infección viral (**Fig. IV.38** y **Fig. IV.39**), aunque parece ser necesario un estado conformacional apropiado de la CP para que se produzca su *O*-GlcNAcilación. Llegamos a esta conclusión tras utilizar el mutante D264K de la CP (**Fig. IV.40**). Hace unos años se sugirió que un aspartato equivalente al D264 del PPV, situado en un dominio

especialmente conservado en la CP de los potyvirus, participaba en un puente salino que tendría lugar entre las hélices α de la proteína y sería esencial para la unión entre monómeros (Dolja *et al.*, 1991). Aunque esta hipótesis no pudo ser confirmada, más tarde, la relevancia de este aspartato para la oligomerización de la proteína se confirmó plenamente (Dolja *et al.*, 1994; Jagadish *et al.*, 1993; Voloudakis *et al.*, 2004). Recientemente, la determinación de la estructura tridimensional de la partícula viral del WMV (Zamora *et al.*, 2017) demostró inambiguamente la participación del aminoácido D216 de la CP del WMV, el residuo equivalente al D264 de la CP del PPV, en un bolsillo de unión al RNA del virus. Sin embargo, el hecho de que la CP del potyvirus *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) mutada en su aspartato equivalente expresada en *E. coli* sea incapaz de autoensamblarse en ausencia del RNA viral (Jagadish *et al.*, 1993) y que mutar el residuo correspondiente del TEV tampoco afecte la unión CP-RNA *in vitro* (Voloudakis *et al.*, 2004), sugiere que la relevancia de D264 en la formación de partículas virales juega un papel en interacciones proteína-proteína independiente del que desempeña en la estabilización del RNA en la partícula viral.

El hecho de que las MPT de la CP del PPV puedan tener lugar con independencia de la infección sugiere que esta proteína tiene propiedades intrínsecas que la hacen susceptible constitutivamente a maquinarias celulares de fosforilación (aún por determinar) y *O*-GlcNAcilación (mediada por SEC). Sin embargo, que las modificaciones tengan lugar sin necesidad de infección viral no excluye la posibilidad de que éstas estén reguladas durante la infección, al mismo tiempo que las MPT pueden a su vez estar regulando la infección. Es interesante destacar que a diferencia de la *O*-GlcNAcilación, la fosforilación de la S62 en la CP de PPV-BOR-3 no parece verse afectada por el estado conformacional de la proteína (Fig. IV.40C); y sin embargo, este residuo fosforilable se sitúa relativamente cerca de algunas de las dianas de *O*-GlcNAcilación identificadas en la CP de PPV-R que se localizan expuestas en la superficie del virión (Allison *et al.*, 1985; Shukla *et al.*, 1988). Es decir, que, aunque ambas MPT parecen estar próximas espacialmente en la proteína, cuando la proteína está mal estructurada únicamente podría tener lugar la fosforilación. El hecho de que a pesar de conocerse multitud de sitios *O*-GlcNAcilados no haya sido posible establecerse una secuencia consenso que prediga residuos susceptibles de ser modificados por glicosilación, sugiere que elementos de estructura secundaria, terciaria o cuaternaria son relevantes para el reconocimiento de la maquinaria de *O*-GlcNAcilación, lo que está de acuerdo con la restricción estructural observada en la *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV.

V.2. Algunas MPT de la CP del PPV parecen regular la estabilidad de la proteína y la formación de las partículas virales

La cantidad de evidencias acumuladas durante los últimos años, indica que la fosforilación de la CP de virus ssRNA+ desempeña diferentes papeles reguladores en el desarrollo de la infección viral (Hoover & Kao, 2016). Con frecuencia, la adición de la carga negativa del residuo de fosfato altera la

actividad de unión al RNA. Se ha sugerido que esto facilita la activación de la traducción del RNA encapsulado del potexvirus PVX (Atabekov *et al.*, 2001) y que contribuye a regular el tiempo de expresión de los diferentes fragmentos genómicos del bromovirus BMV (Hoover *et al.*, 2016). También se ha demostrado que la modulación por fosforilación de la actividad de unión a RNA de la CP del BaMV, otro potexvirus, regula el movimiento viral de célula-a-célula (Hung *et al.*, 2014). El movimiento sistémico del necrovirus BBSV también parece depender de la fosforilación de la CP viral, sin embargo, en este caso la MPT está implicada en la morfogénesis y la estabilidad de las partículas virales con muy poco efecto (si alguno) en la actividad de unión al RNA.

La fosforilación de la CP puede ser también relevante para la replicación viral. Esto se ha descrito para diferentes virus animales (Law *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2018; Mondal *et al.*, 2015; Ranadheera *et al.*, 2018) y se ha estudiado en profundidad para la CP del potyvirus PVA (Löhmus *et al.*, 2017). En este último caso, se ha sugerido que la CP no fosforilada se une al RNA viral y detiene su traducción. A continuación, la fosforilación de la CP por la proteína quinasa CK2 promueve su ubiquitinación y degradación por el proteasoma, lo que facilita el ensamblaje del complejo de replicación. El requerimiento de CP no fosforilada y fosforilada justifica los drásticos efectos perjudiciales sobre la replicación del RNA que causan tanto las mutaciones que impiden la fosforilación como las que la mimetizan (Ivanov *et al.*, 2003; Löhmus *et al.*, 2017). Esto contrasta con la fosforilación de la CP del PPV, un potyvirus como PVA, para la que la emulación de fosforilación constitutiva tiene efectos mucho más drásticos que su abolición (**Fig. IV.7, Fig. IV.9, Fig. IV.10, Fig. IV.11 y Fig. IV.18**).

Impedir la fosforilación en las serinas fosforilables localizadas en la región N-terminal o sus proximidades (S25, S81, S101 y S118) por mutaciones a alanina mostró un efecto mínimo en la infección, solo detectado por un descenso de *fitness* del cuádruple mutante en experimentos de competición (**Fig. IV.12**). No se ha visto que la mutación T254A cause un efecto apreciable en la infección (**Fig. IV.18A, B**), pero al no haberse realizado experimentos de competición, no podemos descartar que también en este caso el defecto en fosforilación repercuta en una cierta disminución de *fitness*. El efecto deletéreo más acusado observado al abolir la fosforilación en T313 en comparación con el resto de fosfo-residuos (**Fig. IV.18C, D**) podría ser debido a que es especialmente importante disponer de un grupo fosfato en la posición 313 en algún momento del ciclo viral, pero también es posible que cualquier cambio de aminoácido en la posición 313 perturbe la infección viral en mayor o menor medida. Esto puede deberse a la necesidad de una treonina en esa posición o a que los nucleótidos que la codifican se sitúan en una región *cis* activa del RNA viral necesaria para que adquiera un plegamiento adecuado durante la replicación viral (Haldeman-Cahill *et al.*, 1998). Ambas ideas pueden verse avaladas por la evidencia de que la mutación T313N también resulta parcialmente deletérea para el virus (**Fig. IV.18C, D**).

En contraste con las anteriores, las mutaciones de serina/treonina a ácido aspártico que emulan la fosforilación permanente en los residuos diana causan efectos drásticos en el proceso infeccioso del PPV. En nuestros experimentos analizamos por separado el efecto de mimetizar las fosforilaciones de la CP de PPV-R localizadas en la región N-terminal y sus proximidades (S25D, S81D, S101D y S118D), y las situadas en la región central más próximas al extremo C-terminal (T254D y T313D) (**Fig. IV.16B**). Aunque las fosfo-mimetizaciones en las dianas 25, 81 y 101 parecen contribuir a la baja eficiencia de la infección del mutante 4SD (**Fig. IV.13**), la fosfo-emulación en 118 es la más importante. Las mutaciones potencialmente adaptativas en la progenie del mutante 4SD afectaron en muchos casos a la posición 118, pero nunca a 25, 81 o 101 (**Fig. IV.8**). De hecho, mientras que las mutaciones puntuales S25D, S81D y S101D resultaron estables, el ácido aspártico producto de la mutación S118D rápidamente evolucionó a asparagina. Estos datos indican que existe un efecto distintivo de imitar la fosforilación en la posición 118 con respecto al resto de dianas de la mitad amino de la CP. Ni en el mutante S118D ni en el 4SD se produjo una reversión a la serina original en 118, probablemente porque esta reversión conlleva dos cambios de nucleótidos (**Anexo 4**); sin embargo, sí se observó en esta posición un cambio a asparagina tanto en el mutante simple S118D como en el virus 4SD, detectándose también en este último un cambio a glicina en 118. Esto indica que existen diversos aminoácidos (serina, alanina, glicina y asparagina) que pueden ocupar la posición 118, y que podría ser la carga negativa emulando a la fosforilación (aspartato) la responsable de afectar la función de la CP. Se ha visto que la carga neta total de la región N-terminal de las CP potyvirales afecta a la infectividad del virus (Kimalov *et al.*, 2004). No obstante, el hecho de que las mutaciones puntuales S25D, S81D y S101D no tengan un fuerte efecto en la capacidad de infectar del virus (**Fig. IV.13A, B**) sugiere que los defectos producidos por la mutación S118D no son simplemente el resultado de un aumento en la carga neta de la proteína. De hecho, algunas de las mutaciones potencialmente adaptativas introducidas en el mutante 4SD no afectaron a la carga neta global de la CP (**Fig. IV.8**). Una de ellas, la P67S, introdujo un sitio fosforilable muy cerca de la diana de fosforilación específica de PPV-BOR-3 (S62) (**Fig. IV.22B**), lo que sugiere que aún con los efectos deletéreos causados por emular permanentemente la fosforilación en el brazo N-terminal, el virus necesita disponer de una diana fosforilable reversible en esta región. Otras tres mutaciones espontáneas encontradas en la progenie del mutante 4SD que no afectaron al residuo D118 (R237Q, T254K e Y266F), se localizan en una zona acotada de la región central de la CP. Estos cambios distantes, que en la mayoría de los casos también aparecieron en combinación con la mutación D118N (**Fig. IV.8**), parecen poder compensar el efecto de emular la fosforilación en la mitad amino de la CP, lo que sugiere que regiones muy distantes en la proteína podrían estar interactuando a nivel de estructura y/o función. Es importante destacar que la idea de la interacción a nivel estructural está de acuerdo con la predicción hecha por Baratova *et al.* (2001), en la que se propone que las regiones N- y C-terminal de la CP interactúan en los viriones potyvirales. Sin embargo, en

la estructura tridimensional de alta resolución de la partícula viral del WMV determinada por Zamora *et al.* (2017), las regiones N- y C-terminal que han podido ser resueltas no se sitúan próximas (ver más adelante).

En este punto es importante comentar una particularidad de la fosforilación en el residuo S118 que no se ha observado en el resto de dianas fosforilables de la CP del PPV. Los análisis de MS realizados en los viriones de distintas cepas del virus, purificados a partir de diferentes huéspedes, han mostrado que la fosfo-diana S118 se detecta prácticamente siempre fosforilada en las especies de péptidos que la contienen (**Tabla IV.1, Tabla IV.2, Anexo 5 y Anexo 6**). Este resultado contrasta bastante con el hecho de que la mutación que emula la fosforilación (S118D) tenga un efecto mucho más drástico que la que la impide. Una posible explicación de esta paradoja es que la mutación a ácido aspártico no reproduce exactamente la fosforilación del residuo de serina, lo que justificaría las anomalías estructurales observadas en los viriones del mutante 4SD (**Fig. IV.29A y Fig. IV.33B**). Por otro lado, también existe la posibilidad de que la fosforilación en la S118 contribuya a la estabilización de los viriones (o ayude a su desensamblaje cuando es necesario empezar una nueva ronda de infección), pero que este residuo no fosforilado sea necesario para la función óptima de la CP no ensamblada, probablemente en etapas tempranas de la infección. Tampoco podemos descartar la posibilidad comentada en el apartado de Resultados, de que la no detección de la S118 sin fosforilar en los experimentos de MS se deba a que la modificación en esta posición interfiera con el corte por las proteasas Lys-C y tripsina en la K116 (**Fig. IV.6**), lo que conlleva la aparición del péptido tríptico parcial [112-121], el que detectamos fosforilado. La ausencia de fosforilación en este aminoácido repercutiría en la generación de un péptido más corto [117-121] que muy probablemente no sería convincentemente identificado por MS. La fosfo-diana S118 también presenta otra característica distintiva con respecto al resto de las fosfo-serinas de la mitad amino de la CP. A diferencia de éstas, la fosfo-diana S118 se localiza en una región de la CP muy conservada entre los distintos potyvirus (Dolja *et al.*, 1991; Shukla & Ward, 1989), fuera del brazo N-terminal intrínsecamente desordenado de la proteína (Makarov & Kalinina, 2016; Solovyev & Makarov, 2016; Charon *et al.* 2016; Zamora *et al.*, 2017), y, como ya se ha mencionado, se conserva en todas las cepas analizadas del PPV (**Anexo 7**).

El residuo T254 parece estar estrechamente relacionado funcionalmente con la S118. Los resultados de esta tesis muestran que tanto la mutación D118N como la T254K, seleccionadas espontáneamente en la progenie del mutante 4SD (**Fig. IV.8**), son capaces de reestablecer parcialmente (**Fig. IV.33**) los efectos deletéreos de la fosfo-emulación en 118 relacionados con la inestabilidad *in vitro* de la CP (**Fig. IV.27B y Fig. IV.33A**) y la modificación del perfil de sedimentación en gradientes de sacarosa (**Fig. IV.29B y Fig. IV.33C**). Pensamos que la mayor tasa de degradación de la CP cuando se emula la fosforilación en la mitad amino (mutante 4SD) tendría dos orígenes: la fosfo-emulación en las posiciones 25, 81 y 101, que afectaría a la susceptibilidad intrínseca de la CP a la

degradación proteolítica (se discutirá más adelante), y la fosfo-emulación en 118 que causaría inestabilidad en la CP como efecto secundario de alterar la estructura de los viriones. El mutante 4SD^{T254K} resulta más estable que el 4SD porque la mutación T254K compensa parcialmente los defectos en la estructura del virión generados por la fosfo-emulación permanente en 118, como se puede comprobar por el perfil de sedimentación de sus viriones en gradiente de sacarosa (**Fig. IV.33C**). En cualquier caso, no parece hacerlo con mucha eficiencia, ya que el virus continúa evolucionando y muta adicionalmente el residuo D118 a asparagina (surgiendo el mutante 4SD^{D118N+T254K}, **Fig. IV.8**). De cualquier forma, ninguna de las dos mutaciones compensatorias corrige por completo los defectos del virus 4SD, como evidencia el que la microscopía electrónica siga mostrando viriones de morfología anómala (**Fig. IV.33B**). Es importante destacar que, aunque la K254 es funcional en un virus silvestre (**Fig. IV.31**), la T254 es preferible en ausencia de fosfo-emulación constitutiva en 118 (**Fig. IV.32**), lo que apoya la relevancia funcional de la fosforilación reversible en la T254.

La relación funcional entre la S118 y la T254 se ve apoyada por las conclusiones obtenidas al extrapolar al PPV la estructura de alta resolución de la partícula viral del WMV ya mencionada (**Fig. IV.36**). Los resultados sugieren que, aunque las dianas fosforilables S118 y T254 no se localizan próximas en la conformación de la proteína, ambos residuos parecen estar involucrados en interacciones que regulan la estabilidad de la cápsida del PPV. Concretamente, los análisis presentados en esta tesis indican que la T254 de la CP de PPV-R (equivalente a R206 en WMV) podría estar jugando un papel clave en las interacciones que tienen lugar entre monómeros del mismo giro de hélice, a la vez que intervendría en las interacciones entre monómeros de distintos giros de hélice (**Tabla IV.7**). Es importante destacar que el único puente salino que se establece entre subunidades de CP del mismo giro de hélice en la partícula del WMV (R206:E230) no podría tener lugar en los viriones de PPV-R, debido a que la T254 no puede establecer este tipo de enlace con el E278 (el residuo de PPV-R equivalente al E230 del WMV). Sin embargo, la introducción de una carga positiva sustituyendo a T254 (mutación T254K) sí podría permitir la formación de un puente salino (**Fig. V.2**), estabilizando posiblemente la estructura del oligómero. Por otro lado, la S118 de la CP de PPV-R (equivalente a la N70 en WMV) también podría tener cierta contribución en la estabilización de las interacciones inter-monoméricas en el mismo giro de hélice. En el caso del WMV, estas interacciones involucrarían a los residuos D180:N70; mientras que en el PPV-R, la pareja equivalente N228:S118, no contendría ningún aminoácido negativamente cargado, a no ser que la S118 se encontrase fosforilada. La interpretación de estos datos sugiere que mientras que la fosforilación de la T254 tendría un efecto desestabilizador al propiciar la repulsión reversible entre pT254:E278 (que se verifica en el mutante T254D, el cual no puede formar viriones, **Fig. IV.30**), la fosforilación de la S118 tendría un efecto estabilizador al permitir la formación de la interacción pS118:N228 (emulando a N70:D180 en el WMV). Esta hipótesis encajaría con los datos de MS obtenidos de los viriones de PPV-R analizados *in vivo*, en los que se ha observado que a diferencia de la fosfo-diana T254, donde la

fosforilación se detecta de forma esporádica, el residuo S118 casi siempre se ha detectado fosforilado (**Tabla IV.2, Anexo 5 y Anexo 6**). El efecto deletéreo de mimetizar la fosforilación constitutiva en la posición 118 podría justificarse, como he discutido antes, por diferencias estructurales entre una serina fosforilada y un aspartato. Estas diferencias podrían dar cuenta también de la formación de partículas morfológicamente deformes (**Fig. IV.29A y Fig. IV.33B**).

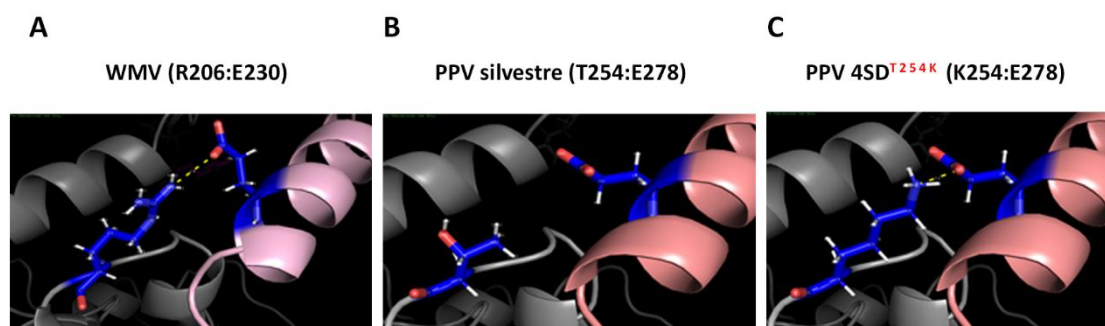


Figura V.2. Puente salino predicho en el modelo atómico del oligómero del WMV de Zamora *et al.* (2017), entre los residuos R206 de la Cadena K (gris) y E230 de la Cadena L (rosa), que estabiliza las interfaces entre monómeros de CP del mismo giro de hélice (**A**). Este puente salino no podría establecerse entre los residuos homólogos, T254 de la cadena K (gris) y E278 de la cadena L (salmón), en el oligómero de PPV-R silvestre (**B**). La fosfo-emulación en las serinas 25, 81, 101 y 118 (mutante 4SD) de la CP de PPV-R promueve la aparición de la mutación espontánea T254K (mutante 4SD^{T254K}), lo que hipotéticamente permitiría la formación de un puente salino entre los residuos K254:E278 (**C**). Se muestran vistas ampliadas con el visualizador molecular *PyMOL 1.7.4* (*Schrödinger*), incluyendo los residuos que se encuentran o no interactuando (representación *stick*) y las distancias menores de 4 Å que teóricamente permitirían la formación de puentes salinos.

El caso de la diana fosforilable T313 es ligeramente distinto al de los dos fosfo-residuos comentados anteriormente. Aunque los datos obtenidos del modelo del virión de PPV-R no indican que la fosfo-diana T313 próxima a la región C-terminal de la CP esté directamente involucrada en la interacción entre subunidades, la aparición de mutaciones espontáneas (T254R y E235G) cuando se emula la fosforilación constitutiva en 313 (**Fig. IV.26B**) en aminoácidos que sí parecen estar implicados en estas interacciones (**Tabla IV.7**), sugiere que esta fosfo-diana también podría intervenir en la formación de partículas. Sin embargo, no tenemos una explicación sencilla para la aparente contradicción entre la estabilización de la partícula cuando se introduce la mutación T254R en el mutante T313D (T313D^{T254R}, generación teórica del puente salino R254:E278) y la estabilización de la partícula al introducir la mutación E235G (mutante T313D^{E235G}, anulación de la unión de *Van der Waals* E235:G193).

A diferencia de los virus helicoidales rígidos, como los tobamovirus, en los que el oligómero se estabiliza mediante interacciones electrostáticas que involucran a la región central de la CP, en los virus helicoidales flexuosos (como los pertenecientes a los géneros *Potexvirus* y *Potyvirus*) se ha observado que la formación de las partículas virales depende principalmente de interacciones hidrofóbicas en las que participan las regiones amino y carboxilo del núcleo central de la proteína (Agirrezabala *et al.*, 2015; DiMaio *et al.*, 2015; Solovyev & Makarov, 2016; Yang *et al.*, 2012; Zamora

et al., 2017). Concretamente, en el caso de la partícula viral del WMV, los brazos N- y C-terminales de la estructura resuelta median la polimerización de las subunidades de CP en el virión y facilitan un cierto movimiento entre subunidades, lo que explica la naturaleza flexuosa de las partículas (Zamora *et al.*, 2017). Cada brazo N-terminal sirve de puente con la subunidad adyacente y mediante un giro de 90° alcanza una segunda subunidad en el siguiente giro de hélice. De esta forma, el brazo N-terminal de la CP del WMV actúa de soporte doble, lateral y longitudinal, para facilitar la elongación helicoidal. Las cápsidas virales deben ser capaces de conseguir una conformación que sea lo suficientemente firme para proporcionar una protección estable al genoma, pero que no comprometa la liberación del contenido genético en una nueva célula. Este conflicto provoca que los virus, en particular los helicoidales flexuosos, hayan evolucionado para producir viriones relativamente robustos, pero conformacionalmente dinámicos y metaestables (Mateu, 2013). Esto puede explicar porqué las fosforilaciones de las dianas T254 y T313 aparecen solo de manera esporádica en los viriones de PPV-R o porqué una mutación teóricamente estabilizadora como la T254K únicamente es ventajosa en un contexto en el que la estructura de la proteína puede haberse relajado al emularse una fosforilación constitutiva en otra región de la CP (**Fig. IV.32**).

El nivel de precisión del modelado *in silico* de la CP de PPV-R basado en la estructura del virión del WMV no permite una caracterización exacta del efecto de la fosforilación en las interacciones intra- e inter-moleculares de las subunidades de CP en la partícula viral. Sin embargo, como he discutido antes, identifica a la S118, la T254 y la T313 como residuos probablemente involucrados en interacciones que contribuyen a mantener la estructura del virión, las cuales podrían verse moduladas por la fosforilación. Estos datos, junto con los fenotipos de las mutaciones que impiden o que emulan fosforilaciones en esos residuos, apuntan a un escenario en el que mientras que partículas del PPV no fosforiladas son funcionales, cierta inestabilidad causada por la fosforilación de aminoácidos implicados en el mantenimiento de la estructura del virión facilita la desencapsidación del RNA genómico (necesaria para comenzar una nueva ronda de infección). En este contexto, el defecto en movimiento viral de los mutantes T254D y T313D (**Fig. IV.25**) parece ser secundario a su incapacidad de formar partículas virales (**Fig. IV.30**). Este resultado está de acuerdo con publicaciones anteriores que muestran que mutaciones en la región central de la CP de los potyvirus impiden el ensamblaje de las partículas y, como consecuencia, la propagación de célula a célula, sin afectar a la replicación del RNA viral (Dolja *et al.*, 1995; Dolja *et al.*, 1994; Varrelmann *et al.*, 2000), lo que demuestra que la CP es necesaria durante el movimiento viral.

La implicación de los fosfo-residuos de la región central de la CP del PPV en la formación de los viriones y en el movimiento viral de célula-a-célula, en vez de en la replicación (**Fig. IV.26A**) como ocurre en el PVA (Löhmus *et al.*, 2017), evidencia que las fosforilaciones en las CP potyvirales pueden jugar distintos papeles durante la infección. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región central de la CP de 41 virus del género *Potyvirus* revela que únicamente la diana T313 se

conserva mayoritariamente (**Anexo 8**). El fosfo-residuo T254 solo se conserva en aproximadamente la mitad de las CP analizadas, mientras que la fosfo-diana S118 es muy minoritaria entre los *Potyvirus*. Tampoco encontramos covariación en los residuos que ocupan las posiciones equivalentes a 118 y 228 de la CP de PPV-R (70 y 188 en la del WMV) en otros potyvirus, para mantener parejas D:N o S:N. Por otro lado, la conservación de los residuos mencionados en las distintas cepas del PPV es total (**Anexo 7**). Parece, por tanto, que la fosforilación de los residuos adecuados es una importante contribución a la infección del PPV, pero podría ser solo una de las múltiples estrategias que los potyvirus han encontrado para solucionar el problema de necesitar una cápsida robusta, pero capaz de desensamblarse con facilidad cuando es necesario.

Aunque no hemos estudiado el efecto de mutar las tres serinas fosforilables situadas en la región N-terminal de la CP de PPV-R (S25, S81 y S101) sin alterar también la diana S118, parece claro que los fosfo-residuos de N-terminal son menos relevantes en el ciclo viral. Es común que las actividades de las proteínas multifuncionales estén reguladas diferencialmente por distintos sitios de fosforilación (Grindheim *et al.*, 2017). De hecho, se conoce que los residuos fosforilables que tienen funciones reguladoras similares suelen estar agrupados en secuencia y espacio, y esta tendencia a la agrupación es más pronunciada para los sitios pT/pS (Nishi *et al.*, 2015). Por otro lado, hay estudios que han correlacionado las regiones intrínsecamente desordenadas (IDR) de las proteínas eucariotas y las MPT, de forma que los sitios modificables se localizan predominantemente en IDR fácilmente accesibles y flexibles (Dunker *et al.*, 2002; Kurotani *et al.*, 2014). En las proteínas de plantas, se ha encontrado una relación directa entre la preferencia de la localización en las regiones desordenadas de sitios predichos de fosforilación y O-glicosilación (Kurotani *et al.*, 2014). En el caso de la CP de PPV-R, las dianas fosforilables S25, S81 y S101, al igual que las dianas O-GlcNAcificables, se localizan en la protusión N-terminal de la proteína (**Fig. IV.1B** y **Fig. IV.16B**) que está intrínsecamente desordenada (Charon *et al.*, 2016; Makarov & Kalinina, 2016). Esta región está muy poco conservada entre los potyvirus, y su equivalente en la CP del WMV no pudo ser resuelta (Zamora *et al.*, 2017), pero se sabe que está expuesta hacia el exterior de la partícula potyviral (Shukla *et al.*, 1988). Por tanto, no creemos que la fosforilación en esta región contribuya a modular la estabilidad de las partículas virales. Más bien, contemplamos una situación en la que la actuación dinámica conjunta de fosforilación y O-GlcNAcificación de la región N-terminal de la CP del PPV afecta a su susceptibilidad a la maquinaria proteolítica celular, probablemente por el sistema ubiquitina-proteasoma. Esto contribuiría a un ajuste fino de la estabilidad de la proteína que permitiría proporcionar la cantidad de CP adecuada en cada fase de la infección viral.

Esta hipótesis concuerda plenamente con el resultado observado con la RNA polimerasa 66K del timovirus TYMV, para la que impedir la fosforilación de dos fosfo-dianas localizadas en su región N-terminal (T64 y S80) no afecta visiblemente la infección, mientras que emular su fosforilación reduce notablemente los niveles de 66K (Jakubiec *et al.*, 2006). Estas fosfo-dianas se localizan dentro de un

dominio PEST conservado en las RNA polimerasas de los timovirus (Héricourt *et al.*, 2000), por lo que los autores propusieron que la fosforilación de T64 y S80 actúa regulando los niveles de acumulación de 66K mediante la activación de estos dominios PEST por ubiquitinación, lo cual se verificó años más tarde (Camborde *et al.*, 2010). Los motivos cortos que median en el reconocimiento dependiente de fosforilación por una ubiquitina E3 ligasa se conocen actualmente como fosfodegrones (Hunter, 2007; van der Laarse *et al.*, 2018; Ryšlavá *et al.*, 2013; Swaney *et al.*, 2013), que en muchas ocasiones están compuestos por prolina, glutámico, serina y treonina (los denominados motivos PEST) (Hunter, 2007; Rechsteiner & Rogers, 1996; Rogers *et al.*, 1986). Estos fosfodegrones sirven de señal para que una proteína determinada sea ubiquitinada y posteriormente degradada por el proteasoma. De hecho, se ha visto que en ciertas ocasiones, los fosfodegrones están compuestos por múltiples sitios de fosforilación, y que la combinación de estas dianas en una misma proteína puede aumentar su inestabilidad (Kõivomägi *et al.*, 2011).

Además de la proteína 66K del TYMV, se conocen otras proteínas virales en las que la fosforilación está relacionada con el reconocimiento de fosfodegrones por la ubiquitina, como son el antígeno T del SV40 (Welcker & Clurman, 2005), la NS5B del HBV (Chen *et al.*, 2016), la E2 del BPV (Penrose & McBride, 2000) o la p44 del CaMV (Karsies *et al.*, 2001). En el caso de la CP de PPV-R, el programa *Epestfind* no predice motivos PEST en la proximidad de los residuos fosforilables, y tampoco los hemos encontrado en las CP de otros potyvirus. Sin embargo, la región amino de la CP de PPV-R está enriquecida en aminoácidos de prolina, serina y treonina (**Fig. IV.6**), una característica típica de los motivos PEST (Rechsteiner & Rogers, 1996; Rogers *et al.*, 1986). Además, no es estrictamente necesario que los residuos fosforilables de la región N-terminal de la CP sean fosfodegrones, ya que también puede ocurrir que la exposición de degrones se induzca por cambios conformacionales causados por la fosforilación, de manera que el grupo fosfato por sí mismo no contribuya al reconocimiento del degrón (Hunter, 2007). Lo que sí se ha observado es que la CP del potyvirus PVA, además de ser diana de fosforilación, también es diana de degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma, el cual limita la cantidad de la proteína disponible durante el ciclo viral (Besong-Ndika *et al.*, 2015; Hafrén *et al.*, 2010; Löhmus *et al.*, 2017). Se ha visto que las dianas de O-GlcNAcilación en las proteínas en muchas ocasiones también se sitúan cerca de motivos PEST (Butkinaree *et al.*, 2010; Guinez *et al.*, 2008; Hart & Akimoto, 2009; Leney *et al.*, 2017; Zachara *et al.*, 2017) y que esta modificación habitualmente protege a las proteínas de la degradación actuando en el sistema ubiquitina-proteasoma a distintos niveles (Guinez *et al.*, 2008; Ruan *et al.*, 2013).

El *cross-talk* negativo entre la fosforilación de la S25 y la O-GlcNAcilación global mostrado por el experimento de iTRAQ (**Fig. IV.4** y **Tabla IV.2**) apoya la idea de que las fosforilaciones y O-GlcNAcilaciones en la región N-terminal intrínsecamente desordenada de la CP de PPV-R podrían contribuir a la regulación de la estabilidad de la proteína realizando actividades contrapuestas. No tenemos evidencia experimental inequívoca de que la fosforilación de la S25, la S81 y la S101

aumente la susceptibilidad a la degradación proteolítica de la CP, ya que a la mayor inestabilidad *in vitro* de la CP del mutante 4SD comparada con la proteína silvestre (**Fig. IV.27B**) parece contribuir fuertemente el efecto desestabilizador en la partícula viral de la mutación S118D, que se ve parcialmente compensada por la mutación T254K (**Fig. IV.33**). Sí que se ha comprobado el efecto estabilizador de la *O*-GlcNAcilación, tanto por la mayor susceptibilidad a la degradación de la CP de un mutante del PPV en el que se impidió su *O*-GlcNAcilación mediante una séptuple mutación de treoninas del extremo amino de la proteína (Pérez *et al.*, 2013), como por la demostración de que la ausencia de *O*-GlcNAcilación en las plantas deficientes en la OGT SEC reduce la estabilidad de la CP del PPV (Pérez *et al.*, 2013 y **Fig. IV.51A**).

En cualquier caso, los resultados de esta tesis apuntan a funciones independientes para las fosforilaciones en la región N-terminal y en la S118, la T254 y la T313 de la CP del PPV. Funciones duales para la fosforilación de una misma proteína viral, pueden no ser excepcionales. Un caso bien estudiado en plantas es la mencionada proteína 66K del TYMV, que además de la fosforilación de los residuos T64 y S80 que regula los niveles de acumulación de la proteína, sufre una modificación en la S326 que modula la actividad de la proteína en la síntesis del RNA viral (Jakubiec *et al.*, 2006). Aunando todas las evidencias presentadas en esta tesis, y teniendo en cuenta las limitaciones que supone trabajar con mutantes en los que no podemos discernir con seguridad entre un efecto causado por la fosfo-emulación o por el cambio de aminoácido en sí mismo, proponemos que la fosforilación de la CP del PPV lleva a cabo dos funciones durante el ciclo viral, las dos distintas a la propuesta para la fosforilación de la CP del PVA. Las fosforilaciones y las *O*-GlcNAcilaciones situadas en la región N-terminal de la CP regulan los niveles de proteína mediante su susceptibilidad a la degradación (probablemente mediada por el sistema ubiquitina-proteasoma), mientras que las fosforilaciones localizadas en el núcleo central de la CP modulan el ensamblaje viral. Podemos proponer un modelo de trabajo hipotético muy simplificado en el que a tiempos tempranos de la infección la fosforilación de la CP en su extremo N-terminal facilita su degradación y la fosforilación en los residuos de T254 y T313 limitaría la formación de partículas virales, contribuyendo ambos efectos a mantener al RNA viral accesible a las factorías de traducción y replicación (**Fig. V.3**). En etapas posteriores, conforme aumenta la acumulación de CP la maquinaria de fosforilación se iría saturando. El descenso de fosforilación en el extremo amino de la CP haría más significativo el efecto estabilizador de la *O*-GlcNAcilación, lo que proporcionaría más proteína disponible para la encapsidación del RNA. A su vez, la mayor acumulación de proteína con la T254 y la T313 no fosforiladas ayudaría a la formación de partículas virales funcionales. Teniendo en cuenta el papel que se ha descrito para HCpro en la formación de viriones estables (Valli *et al.*, 2014), el aumento de esta proteína en etapas avanzadas de la infección también contribuiría al salto de traducción/replicación a encapsulación como principal destino del RNA viral. La fosforilación residual de la T254 y la T313 en la CP de los viriones daría lugar

a la conformación dinámica metaestable de las partículas que permitiría que éstas liberasen su genoma en nuevas células.

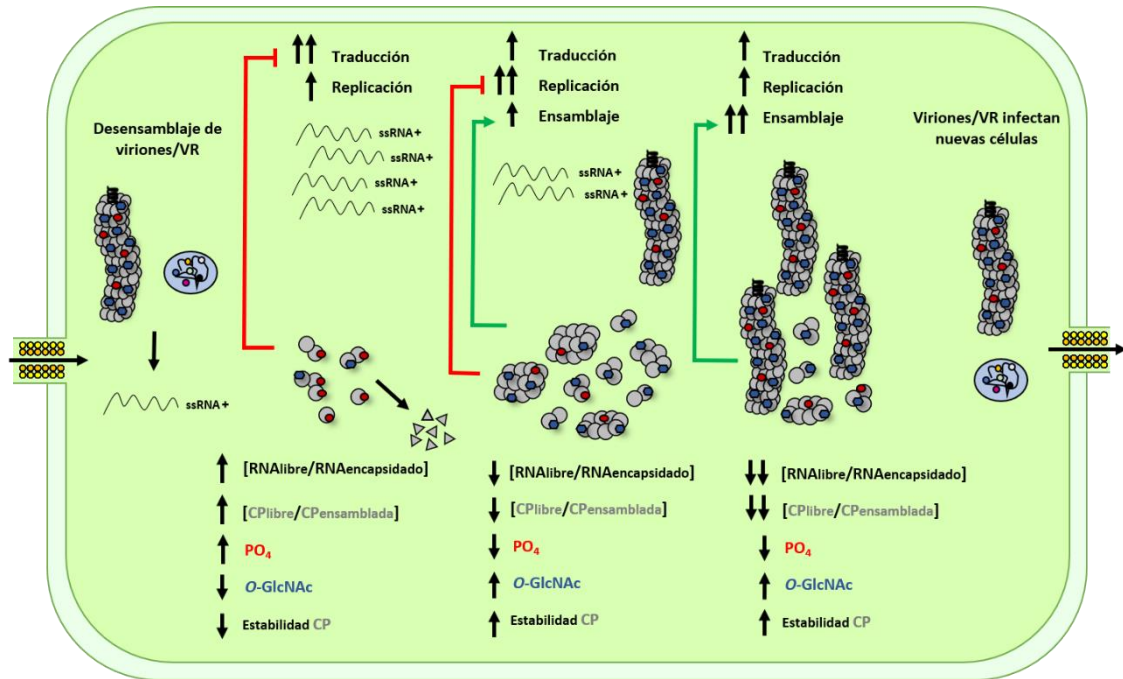


Figura V.3. Representación esquemática de la participación de las MPT de la CP, fosforilación (elipses rojas) y O-GlcNAc (hexágonos azules), en las diferentes etapas de la infección del PPV. Tras entrar en la célula, los viriones y/o las vesículas de replicación (VR) liberan el genoma al citoplasma, dando comienzo a la traducción y la replicación del virus. La CP resultante de la traducción a tiempos tempranos de la infección es O-GlcNAc y mayoritariamente fosforilada por la maquinaria celular, lo que facilita la degradación de la proteína y limita la formación de viriones estructuralmente estables, permitiendo que el RNA viral siga siendo accesible a los complejos de traducción y replicación. A tiempos más tardíos de la infección, la gran acumulación de CP satura a la maquinaria de fosforilación celular de forma que el efecto estabilizador de la O-GlcNAc unido a la baja fosforilación de la CP permite que la proteína estable disponible comience a ensamblarse formando viriones. El mantenimiento residual de monómeros fosforilados en las partículas virales conlleva a que los viriones se encuentren en un estado conformacional dinámico y metaestable, lo cual les permitirá desensamblarse más fácilmente en las nuevas células infectadas.

He dejado fuera de este modelo a propósito a la importante fosforilación de la S118. Si los resultados de MS (S118 mayoritariamente fosforilada, **Tabla IV.1**, **Tabla IV.2**, **Anexo 5** y **Anexo 6**) reflejan el estado real de la partícula viral, o bien la diana S118 es tan buen sustrato de la maquinaria de fosforilación que se sigue modificando con gran eficiencia incluso cuando la fosforilación del resto de las dianas se ve muy restringida, o bien la fosforilación de la S118 ayuda fuertemente a la CP a incorporarse a la partícula viral. Sin embargo, el escaso efecto en la infección viral de la mutación S118A, nos hace ser cautelosos en estas especulaciones.

V.3. Las hexosaminidasas HEXO1, HEXO2 y HEXO3 no están implicadas en el ciclo de la O-GlcNAc de la CP del PPV

Como hemos visto hasta ahora la CP del PPV es modificada por dos MPT reversibles, la fosforilación y la O-GlcNAc, pero de las cuatro enzimas que se supone que deben controlar

estas dos modificaciones, únicamente se conoce una, SEC, la OGT encargada de la glicosilación (Chen *et al.*, 2005). Aunque en mamíferos las enzimas involucradas en añadir o eliminar el grupo *O*-GlcNAc de las proteínas (OGT y OGA, respectivamente) están bien caracterizadas (Biwi *et al.*, 2018; Bond & Hanover, 2015; Zachara *et al.*, 2017), en plantas únicamente se ha identificado la OGT SEC (Olszewski *et al.*, 2010). Mediante análisis *in silico* y revisión de bibliografía (Liebminger *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2017; Strasser *et al.*, 2007) elegimos las β -hexosaminidasas denominadas HEXO1, HEXO2 y HEXO3 como candidatas de ser la OGA de la CP del PPV. Sin embargo, las mutaciones en *A. thaliana* que impiden la producción de estas tres hexosaminidasas (mutante triple HEXO) no afectaron a la infectividad del PPV (Tabla IV.8). Este podría ser el resultado esperable, aunque alguna de las HEXO fuera la OGA, si la *O*-GlcNAcilación continua de la CP no tuviera un efecto muy grave en la infección viral. Sin embargo, hemos visto que el aumento de *O*-GlcNAcilación de la CP en las plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan un gen SEC etiquetado (Fig. IV.50) podría facilitar la infección del virus (Fig. IV.49 y Fig. IV.50). Por otro lado, los resultados MALDI-TOF de la CP inmunoprecipitada a partir del mutante triple HEXO parecían sugerir que podía existir un ligero aumento en el patrón de *O*-GlcNAcilación de la CP en sus distintos estados de agregación con respecto a la CP procedente de plantas silvestres (Fig. IV.42). Sin embargo, los experimentos posteriores en los que se expresaron transitoriamente en *N. benthamiana* las hexosaminidasas por agroinfiltración no detectaron ninguna disminución de la *O*-GlcNAcilación de la CP que pudiera sugerir actividad OGA (Fig. IV.44 y Fig. IV.45). Esta posible contradicción podría explicarse de dos formas. La primera es que efectivamente ninguna de las tres HEXO sea la OGA de plantas, y las ligeras diferencias que se encontraron en la CP inmunoprecipitada a partir de plantas de *A. thaliana* WT y triple HEXO se deban únicamente a variaciones propias de la técnica de MS, o a las condiciones en las que las plantas infectadas crecieron. Esta teoría es bastante probable ya que únicamente se analizó una réplica biológica de la CP inmunoprecipitada de ambas condiciones. La segunda opción es que las construcciones HEXO expresadas en *N. benthamiana* (Fig. IV.43) no sean funcionales, y por ello, aunque alguna de estas enzimas sea la hipotética OGA, no hayamos sido capaces de ver ningún efecto en el patrón de *O*-GlcNAcilación de la CP. Para poder descartar esta última opción sería necesario realizar un experimento en el que verificásemos en nuestras construcciones la funcionalidad de las HEXO sobre su sustrato celular conocido, los N-glicanos complejos (Liebminger *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2017; Strasser *et al.*, 2007). Además, en este experimento utilizaríamos como control positivo de desglicosilación de los N-glicanos complejos y de la CP del PPV una β -hexosaminidasa de judía sable (Li & Li, 1970), la cual se ha descrito que es capaz de catalizar la hidrólisis de los grupos *O*-GlcNAc de la CP del PPV *in vitro* (Scott *et al.*, 2006) y que tiene unas propiedades enzimáticas similares a las de HEXO1 y HEXO3 (Strasser *et al.*, 2007).

Por el momento, en plantas no se ha detectado ninguna hipotética OGA contraparte de SEC. El hecho de que en mamíferos el ciclo de la *O*-GlcNAcilación sea un proceso enzimático reversible lleva

a pensar que en plantas podría estar ocurriendo algo similar. Sin embargo, las rutas de glicanos no son idénticas en ambos tipos de organismos (Shin *et al.*, 2017), por lo que no podemos descartar que en plantas la eliminación de los residuos *O*-GlcNAc no sea catalizada por ninguna OGA, sino que tenga lugar por hidrólisis pasiva no enzimática.

V.4. La proteína SEC etiquetada expresada en plantas transgénicas podrá utilizarse en la búsqueda de enzimas que participan en la MPT de la CP del PPV

En animales hay multitud de estudios en los que se ha visto que las enzimas OGT y OGA forman complejos activos holoenzimáticos con otras proteínas, incluidas fosfatasa y quinasas (Ding *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2018; Groves *et al.*, 2017; Wells *et al.*, 2004; Zeidan & Hart, 2010; Zhang *et al.*, 2016). De hecho, la modulación de la especificidad de sustrato de la OGT (y previsiblemente la OGA) por proteínas accesorias parece uno de los principales mecanismos para regular la adición de grupos *O*-GlcNAc a sustratos concretos (Cheung *et al.*, 2008; Cheung & Hart, 2008; Wells *et al.*, 2003; Zeidan & Hart, 2010). Teniendo en cuenta estos estudios, hemos obtenido líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresan una versión de SEC fusionada a una etiqueta TAP (**Fig. IV.50B**), con el objetivo futuro de utilizarlas para identificar factores que interaccionan con esta enzima *in vivo* y participan en la modificación de la CP del PPV.

La recuperación del patrón de *O*-GlcNAcilación de la CP del PPV y de su estabilidad *in vitro* en plantas transgénicas de *A. thaliana* deficientes en SEC en las que se expresa el transgén SEC-TAP (*sec-2*-SEC-TAP) demuestra que la etiqueta TAP fusionada al extremo C-terminal de SEC no altera su actividad OGT, ni tampoco el reconocimiento de la CP del PPV como su diana (**Fig. IV.50B** y **Fig. IV.51A**). Este resultado era el esperable, ya que es el extremo N-terminal de la OGT el que lleva a cabo el reconocimiento del sustrato a través de las TPR (Bond & Hanover, 2015), y nos permite suponer que esta proteína SEC etiquetada va a poder realizar las mismas interacciones funcionales con otras proteínas que la enzima SEC silvestre. Las plantas *sec-2*-SEC-TAP son especialmente importantes, porque toda la enzima SEC presente en las células va a estar etiquetada, lo que debería traducirse en un mayor rendimiento en la captación de interactores de SEC con respecto a las plantas transgénicas con fondo silvestre (WT-SEC-TAP).

Por otro lado, aunque no hemos evaluado en términos absolutos el nivel de expresión del transgén SEC-TAP, el aumento de *O*-GlcNAcilación observado en la CP de plantas que expresan el transgén con respecto a la condición silvestre, tanto en plantas de *N. benthamiana* que lo expresan transitoriamente por agroinfiltración como en las plantas de *A. thaliana* transgénicas WT-SEC-TAP (**Fig. IV.47** y **Fig. IV.50B**), sugiere que se estaría produciendo en los dos casos una sobre-expresión de SEC. Hay que destacar que la producción de la proteína SEC-TAP no fue la misma en todas las líneas transgénicas y podía variar entre diferentes generaciones (**Fig. IV.48B** y **Fig. IV.49**), sin que hayamos analizado los factores implicados en estas diferencias.

Hemos realizado algunos intentos preliminares para analizar el efecto de la sobre-expresión de SEC en la eficiencia de la infección por PPV, pero la baja eficiencia de la inoculación en estos experimentos no ha permitido alcanzar resultados concluyentes. La mayor concentración de la CP inmunoprecipitada a partir de las plantas transgénicas sobre-expresoras de SEC, tanto WT-SEC-TAP como *sec-2*-SEC-TAP, respecto a la obtenida de plantas silvestres (**Fig. IV.50A**) parece sugerir que el aumento de *O*-GlcNAcilación podría estimular la infección, pero no encontramos una correlación clara entre la acumulación de SEC-TAP y la infectividad o la acumulación de CP en las distintas plantas transgénicas (**Fig. IV.49**). Teniendo en cuenta la disparidad de los datos, sería conveniente realizar experimentos en condiciones de inoculación óptima, en los que se comparasen la infectividad viral y la acumulación de la CP en plantas que sobre-expresan SEC y en plantas silvestres a distintos tiempos de la infección, ya que los efectos mayores de la ausencia de SEC en la infección del PPV en *A. thaliana* (mutante *sec-2*) se visualizan a tiempos tempranos (Chen *et al.*, 2005).

Nuestros resultados no mostraron que el aumento en la *O*-GlcNAcilación de la CP conllevara un incremento apreciable en la estabilidad de la proteína (**Fig. IV.51B**). Este resultado podría justificarse si a un posible aumento de la estabilidad de la proteína causado por la mayor *O*-GlcNAcilación se juntara el que algún factor del huésped, no identificado, implicado en la degradación de la CP pudiera estar siendo activado por *O*-GlcNAcilación. Esta es la argumentación empleada por Pérez *et al.* (2013) para explicar que la estabilidad de un mutante no *O*-GlcNAcilable (por tener modificadas sus dianas de *O*-GlcNAcilación) fuera mayor en plantas de *A. thaliana sec-2* que en plantas silvestres, a pesar de que la CP del virus silvestre era más estable en las plantas silvestres. También podría explicar la mayor acumulación de la CP del mutante D264K (que no es susceptible a *O*-GlcNAcilación en plantas silvestres) en plantas de *N. benthamiana* deficientes en SEC (SEC-b2) que en plantas WT, cuando la CP del virus no mutado (*O*-GlcNAcilable) es más inestable en las plantas SEC-b2 (**Fig. IV.40B** y **Fig. IV.41**). En los últimos años se han encontrado numerosas evidencias que demuestran que la *O*-GlcNAcilación regula la mono y poliubiquitinación y el funcionamiento del proteasoma (Ruan *et al.*, 2013). De hecho, entre los interactores de la OGT de mamíferos se encuentran proteínas involucradas en la ubiquitinación, como precursores de ubiquitina, ubiquitina E3 ligasas o deubiquitininas (Ruan *et al.*, 2012; Ruan *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta las evidencias presentadas arriba, proponemos que la *O*-GlcNAcilación podría estar regulando la estabilidad de la CP del PPV mediante dos mecanismos contrapuestos: *O*-GlcNAcilando directamente la región N-terminal de la proteína aumentando así su estabilidad (como se ha discutido durante la tesis) y modificando alguna de las proteínas del sistema ubiquitina-proteasoma, incrementando la tasa de degradación de la CP.

VI. CONCLUSIONES



VI. CONCLUSIONES

1. La fosforilación de la CP del PPV es muy compleja, afectando a residuos localizados a lo largo de toda la proteína.
2. Aunque las dianas de fosforilación de la región N-terminal de la CP del PPV no coinciden con las dianas de *O*-GlcNAcilación, esta segunda modificación post-traducciona parece condicionar la fosforilación de, al menos, la fosfo-diana más cercana al extremo N-terminal de la proteína.
3. Las dianas de la fosforilación y su función en la infección no están conservadas entre los diferentes potyvirus.
4. Las modificaciones post-traduccionales de la CP del PPV pueden tener lugar fuera del contexto de la infección viral, aunque un estado conformacional apropiado de la CP parece necesario para su *O*-GlcNAcilación.
5. La fosforilación de la CP del PPV podría tener dos funciones independientes: una acoplada a la *O*-GlcNAcilación del extremo amino de la proteína implicada en la regulación de su susceptibilidad a la degradación, y una segunda afectando al núcleo de la proteína que participaría en el ensamblaje correcto de las partículas virales.
6. Las hexosaminidasas HEXO1, HEXO2 y HEXO3 no desempeñan un papel importante en la hidrólisis de los grupos *O*-GlcNAcilo de la CP del PPV.
7. La proteína SEC etiquetada con una marca TAP retiene su actividad *O*-GlcNAcil transferasa sobre la CP del PPV tanto cuando se expresa transitoriamente por agroinfiltración como constitutivamente en plantas transgénicas. Esta proteína SEC etiquetada podría utilizarse para identificar factores adicionales celulares implicados en la dinámica de *O*-GlcNAcilación y fosforilación de la CP durante la infección del virus.

VII. BIBLIOGRAFÍA



VII. BIBLIOGRAFÍA

- Afrikanova, I., Miozzo, M.C., Giambiagi, S. & Burrone, O. (1996) Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *J. Gen. Virol.* **77**, 2059–2065.
- Agirrezabala, X., Méndez-López, E., Lasso, G., Sánchez-Pina, M.A., Aranda, M. & Valle, M. (2015) The near-atomic cryoEM structure of a flexible filamentous plant virus shows homology of its coat protein with nucleoproteins of animal viruses. *Elife* **4**, 1–11.
- Ala-Poikela, M., Goytia, E., Haikonen, T., Rajamaki, M.-L. & Valkonen, J.P.T. (2011) Helper Component Proteinase of the Genus Potyvirus Is an Interaction Partner of Translation Initiation Factors eIF(iso)4E and eIF4E and Contains a 4E Binding Motif. *J. Virol.* **85**, 6784–6794.
- Allison, R.F., Dougherty, W.G., Parks, T.D., Willis, L., Johnston, R.E., Kelly, M. & Armstrong, F.B. (1985) Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology* **147**, 309–316.
- Andersen, K. & Johansen, I.E. (1998) A Single Conserved Amino Acid in the Coat Protein Gene of Pea Seed-Borne Mosaic Potyvirus Modulates the Ability of the Virus to Move Systemically in *Chenopodium quinoa*. *Virology* **241**, 304–311.
- Angelova, M., Ortiz-Meoz, R.F., Walker, S. & Knipe, D.M. (2015) Inhibition of O-Linked *N*-Acetylglucosamine Transferase Reduces Replication of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus. *J. Virol.* **89**, 8474–8483.
- Anindya, R., Chittori, S. & Savithri, H.S. (2005) Tyrosine 66 of *Pepper vein banding virus* genome-linked protein is uridylylated by RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **336**, 154–162.
- Anindya, R. & Savithri, H.S. (2003) Surface-exposed amino- and carboxy-terminal residues are crucial for the initiation of assembly in *Pepper vein banding virus*: a flexuous rod-shaped virus. *Virology* **316**, 325–336.
- Aquino-Gil, M., Pierce, A., Perez-Cervera, Y., Zenteno, E. & Lefebvre, T. (2017) OGT: a short overview of an enzyme standing out from usual glycosyltransferases. *Biochem. Soc. Trans.* **45**, 365–370.
- Arazi, T., Shibolet, Y.M. & Gal-On, A. (2001) A Nonviral Peptide Can Replace the Entire N Terminus of Zucchini Yellow Mosaic Potyvirus Coat Protein and Permits Viral Systemic Infection. *J. Virol.* **75**, 6329–6336.
- Atabekov, J.G., Rodionova, N.P., Karpova, O.V., Kozlovsky, S.V., Novikov, V.K. & Arkhipenko, M.V. (2001) Translational Activation of Encapsidated Potato Virus X RNA by Coat Protein Phosphorylation. *Virology* **286**, 466–474.
- Bah, A. & Forman-Kay, J.D. (2016) Modulation of Intrinsically Disordered Protein Function by Post-translational Modifications. *J. Biol. Chem.* **291**, 6696–6705.
- Baratova, L.A., Efimov, A. V., Dobrov, E.N., Fedorova, N. V, Hunt, R., Badun, G.A., Ksenofontov, A.L., Torrance, L. & Lilian, J. (2001) In Situ Spatial Organization of Potato Virus A Coat Protein Subunits as Assessed by Tritium Bombardment. *J. Virol.* **75**, 9696–9702.
- Beauchemin, C., Boutet, N. & Laliberte, J.-F. (2007) Visualization of the Interaction between the Precursors of VPg, the Viral Protein Linked to the Genome of *Turnip Mosaic Virus*, and the Translation Eukaryotic Initiation Factor iso 4E In Planta. *J. Virol.* **81**, 775–782.
- Benko, D.M., Haltiwanger, R.S., Hart, G.W. & Gibson, W. (1988) Virion basic phosphoprotein from human cytomegalovirus contains O-linked *N*-acetylglucosamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 2573–2577.
- Bergström Lind, S., Artemenko, K.A., Elfineh, L., Zhao, Y., Bergquist, J. & Pettersson, U. (2012) The phosphoproteome of the adenovirus type 2 virion. *Virology* **433**, 253–261.
- Besong-Ndika, J., Ivanov, K.I., Hafrèn, A., Michon, T. & Mäkinen, K. (2015) Cotranslational Coat Protein-Mediated Inhibition of Potyviral RNA Translation. *J. Virol.* **89**, 4237–4248.

- Biwi, J., Biot, C., Guerardel, Y., Vercoutter-Edouart, A.-S. & Lefebvre, T.** (2018) The Many Ways by Which O-GlcNAcylation May Orchestrate the Diversity of Complex Glycosylations. *Molecules* **23**, 1–22.
- Blanc, S., López-Moya, J.J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D.W. & Pirone, T.P.** (1997) A Specific Interaction between Coat Protein and Helper Component Correlates with Aphid Transmission of a Potyvirus. *Virology* **231**, 141–147.
- Bond, M.R. & Hanover, J.A.** (2015) A little sugar goes a long way: The cell biology of O-GlcNAc. *J. Cell Biol.* **208**, 869–880.
- Bond, M.R. & Hanover, J.A.** (2013) O-GlcNAc Cycling: A Link Between Metabolism and Chronic Disease. *Annu. Rev. Nutr.* **33**, 205–29.
- Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E. & Blanc, S.** (2010) Aphids as transport devices for plant viruses. *Comptes Rendus - Biol.* **333**, 524–538.
- Britto-Borges, T. & Barton, G.J.** (2017) A study of the structural properties of sites modified by the O-linked 6-N-acetylglucosamine transferase. *PLoS One* **12**, 1–14.
- Buck, K.W.** (1996) Comparison of the replication of positive-stranded RNA virus of plants and animals. *Adv. Virus Res.* **47**, 159–251.
- Burland, T.G.** (2000) DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol. Biol.* **132**, 71–91.
- Butkinaree, C., Park, K. & Hart, G.W.** (2010) O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 96–106.
- Caillet-Boudin, M. -L., Strecker, G. & Michalski, J. -C.** (1989) O-Linked GlcNAc in serotype-2 adenovirus fibre. *Eur. J. Biochem.* **184**, 205–211.
- Calvo, M., Malinowski, T. & García, J.A.** (2014) Single Amino Acid Changes in the 6K1-CI Region Can Promote the Alternative Adaptation of *Prunus* - and *Nicotiana* -Propagated *Plum pox virus* C Isolates to Either Host. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **27**, 136–149.
- Calvo, M., Martínez-Turiño, S. & García, J.A.** (2014) Resistance to *Plum pox virus* Strain C in *Arabidopsis thaliana* and *Chenopodium foetidum* Involves Genome-Linked Viral Protein and Other Viral Determinants and Might Depend on Compatibility With Host Translation Initiation Factors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **27**, 1291–1301.
- Camborde, L., Planchais, S., Tournier, V., Jakubiec, A., Drugeon, G., Lacassagne, E., Pflieger, S., Chenon, M. & Jupin, I.** (2010) The Ubiquitin-Proteasome System Regulates the Accumulation of *Turnip yellow mosaic virus* RNA-Dependent RNA Polymerase during Viral Infection. *Plant Cell* **22**, 3142–3152.
- Carbonell, A., Maliogka, V.I., Pérez, J.D.J., Salvador, B., León, D.S., García, J.A. & Simón-Mateo, C.** (2013) Diverse Amino Acid Changes at Specific Positions in the N-Terminal Region of the Coat Protein Allow *Plum pox virus* to Adapt to New Hosts. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **26**, 1211–1224.
- Carrington, J.C., Jensen, P.E. & Schaad, M.C.** (1998) Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J.* **14**, 393–400.
- Casteel, C.L., Yang, C., Nanduri, A.C., Jong, H.N. De, Whitham, S.A. & Jander, G.** (2014) The NIa-Pro protein of *Turnip mosaic virus* improves growth and reproduction of the aphid vector, *Myzus persicae* (green peach aphid). *Plant J.* **77**, 653–663.
- Champagne, J., Laliberte-Gagne, M.-E. & Leclerc, D.** (2007) Phosphorylation of the Termini of *Cauliflower mosaic virus* Precapsid Protein Is Important for Productive Infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**, 648–658.
- Chanas, A.C. & Johnson, B.K.** (1980) Sucrose density gradient formation by freezing and thawing. *Med. Lab. Sci.* **37**, 89–90.
- Charon, J., Theil, S., Nicaise, V. & Michon, T.** (2016) Protein intrinsic disorder within the *Potyvirus* genus: from proteome-wide analysis to functional annotation. *Mol. Biosyst.* **12**, 634–652.

- Chen, D., Juárez, S., Hartweck, L., Alamillo, J.M., Simón-Mateo, C., Pérez, J.J., Fernández-Fernández, M.R., Olszewski, N.E. & García, J.A. (2005) Identification of Secret Agent as the O-GlcNAc Transferase That Participates in Plum pox virus Infection. *J. Virol.* **79**, 9381–9387.
- Chen, J., Wu, X., Chen, Shiyong, Chen, Shuliang, Xiang, N., Chen, Y. & Guo, D. (2016) Ubiquitin ligase Fbw7 restricts the replication of hepatitis C virus by targeting NS5B for ubiquitination and degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **470**, 697–703.
- Cheung, W.D. & Hart, G.W. (2008) AMP-activated Protein Kinase and p38 MAPK Activate O-GlcNAcylation of Neuronal Proteins During Glucose Deprivation. *J. Biol. Chem.* **283**, 13009–13020.
- Cheung, W.D., Sakabe, K., Housley, M.P., Dias, W.B. & Hart, G.W. (2008) O-linked β -N-Acetylglucosaminyltransferase Substrate Specificity is Regulated by Myosin Phosphatase Targeting and Other Interacting Proteins. *J. Biol. Chem.* **283**, 33935–33941.
- Chirkov, S., Ivanov, P., Sheveleva, A., Kudryavtseva, A. & Mitrofanova, I. (2018) Molecular characterization of Plum pox virus Rec isolates from Russia suggests a new insight into evolution of the strain. *Virus Genes* **54**, 328–332.
- Chirkov, S., Sheveleva, A., Ivanov, P. & Zakubanskiy, A. (2018) Analysis of genetic diversity of Russian sour cherry Plum pox virus isolates provides evidence of a new strain. *Plant Dis.* **102**, 569–575.
- Chung, B.Y.-W., Miller, W.A., Atkins, J.F. & Firth, A.E. (2008) An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 5897–5902.
- Ciordia, S., Robertson, L., Arcos, S.C., González, M.R., Mena, M. del C., Zamora, P., Vieira, P., Abrantes, I., Mota, M., Castagnone-Sereno, P. & Navas, A. (2016) Protein markers of *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhner, 1934 (Nickle, 1970) populations using quantitative proteomics and character compatibility. *Proteomics* **16**, 1006–1014.
- Citovsky, V., McLean, B.G., Zupan, J.R. & Zambryski, P. (1993) Phosphorylation of tobacco mosaic-virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant-cell wall-associated protein-kinase. *Genes Dev.* **7**, 904–910.
- Clemente-Moreno, M.J., Hernández, J.A. & Diaz-Vivancos, P. (2014) Sharka: How do plants respond to Plum pox virus infection? *J. Exp. Bot.* **66**, 25–35.
- Cohen, P. (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation - a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 596–601.
- Cohen, P. (2001) The role of protein phosphorylation in human health and disease: Delivered on June 30th 2001 at the FEBS meeting in Lisbon. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5001–5010.
- Corfield, A. (2017) Eukaryotic protein glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochem. Cell Biol.* **147**, 119–147.
- Cosson, P., Schurdi-Levraud, V., Le, Q.H., Sicard, O., Caballero, M., Roux, F., Gall, O. Le, Candresse, T. & Revers, F. (2012) The RTM Resistance to Potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: Natural Variation of the RTM Genes and Evidence for the Implication of Additional Genes. *PLoS One* **7**, 1–10.
- Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T., Wang, A. & Laliberte, J.-F. (2009) Turnip Mosaic Virus RNA Replication Complex Vesicles Are Mobile, Align with Microfilaments, and Are Each Derived from a Single Viral Genome. *J. Virol.* **83**, 10460–10471.
- Cozzone, A.J. (2005) Role of Protein Phosphorylation on Serine/Threonine and Tyrosine in the Virulence of Bacterial Pathogens. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 198–213.
- Cui, H. & Wang, A. (2016) Plum Pox Virus 6K1 Protein Is Required for Viral Replication and Targets the Viral Replication Complex at the Early Stage of Infection. *J. Virol.* **90**, 5119–5131.
- Cui, X., Yaghmaiean, H., Wu, G., Wu, X., Chen, X., Thorn, G. & Wang, A. (2017) The C-terminal region of the Turnip mosaic virus P3 protein is essential for viral infection via targeting P3 to the viral replication complex. *Virology* **510**, 147–155.

- Culleton, S.P., Kanginakudru, S., DeSmet, M., Gilson, T., Xie, F., Wu, S.-Y., Chiang, C.-M., Qi, G., Wang, M. & Androphy, E.J. (2017) Phosphorylation of the Bovine Papillomavirus E2 Protein on Tyrosine Regulates its Transcription and Replication Functions. *J. Virol.* **91**, 1–15.
- Decroocq, V., Salvador, B., Sicard, O., Glasa, M., Cosson, P., Svanella-Dumas, L., Revers, F., García, J.A. & Candresse, T. (2009) The Determinant of Potyvirus Ability to Overcome the RTM Resistance of *Arabidopsis thaliana* Maps to the N-terminal Region of the Coat Protein. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **22**, 1302–1311.
- DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. Delano Scientific, San Carlos.
- Delporte, A., Zaeytijd, J. De, Storme, N. De, Azmi, A., Geelen, D., Smagghe, G., Guisez, Y. & Damme, E.J.M.M. Van (2014) Cell cycle-dependent O-GlcNAc modification of tobacco histones and their interaction with the tobacco lectin. *Plant Physiol. Biochem.* **83**, 151–158.
- Deng, P., Wu, Z. & Wang, A. (2015) The multifunctional protein CI of potyviruses plays interlinked and distinct roles in viral genome replication and intercellular movement. *Virology* **12**, 1–11.
- Deribe, Y.L., Pawson, T. & Dikic, I. (2010) Post-translational modifications in signal integration. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 666–672.
- Desbiez, C., Chandeysson, C. & Lecoq, H. (2014) A short motif in the N-terminal part of the coat protein is a host-specific determinant of systemic infectivity for two potyviruses. *Mol. Plant Pathol.* **15**, 217–221.
- Dias, W.B., Cheung, W.D., Wang, Z. & Hart, G.W. (2009) Regulation of Calcium / Calmodulin-dependent Kinase IV by O-GlcNAc Modification. *J. Biol. Chem.* **284**, 21327–21337.
- DiMaio, F., Chen, C.-C., Yu, X., Frenz, B., Hsu, Y.-H., Lin, N.-S. & Egelman, E.H. (2015) The molecular basis for flexibility in the flexible filamentous plant viruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 642–644.
- Ding, X., Jiang, W., Zhou, P., Liu, L., Wan, X., Yuan, X., Wang, X., Chen, M., Chen, J., Yang, J., Kong, C., Li, B., Peng, C., Wong, C.C.L., Hou, F. & Zhang, Y. (2015) Mixed Lineage Leukemia 5 (MLL5) Protein Stability Is Cooperatively Regulated by O-GlcNAc Transferase (OGT) and Ubiquitin Specific Protease 7 (USP7). *PLoS One* **10**, 1–21.
- Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A. & Carrington, J.C. (1995) Capsid Protein Determinants Involved in Cell-to-Cell and Long Distance Movement of Tobacco Etch Potyvirus. *Virology* **206**, 1007–1016.
- Dolja, V. V., Boyko, V.P., Agranovsky, A.A. & Koonin, E. V (1991) Phylogeny of Capsid Proteins of Rod-Shaped and Filamentous RNA Two Families with Distinct Patterns of Sequence and Probably Structure Conservation. *Virology* **184**, 79–86.
- Dolja, V.V., Haldeman, R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G. & Carrington, J.C. (1994) Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J.* **13**, 1482–1491.
- Dufresne, P.J., Thivierge, K., Cotton, S., Beauchemin, C., Ide, C., Ubalijoro, E., Laliberté, J.-F. & Fortin, M.G. (2008) Heat shock 70 protein interaction with *Turnip mosaic virus* RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. *Virology* **374**, 217–227.
- Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L.M. & Obradovic, Z. (2002) Intrinsic Disorder and Protein Function. *Biochemistry* **41**, 6573–6582.
- Dzananovic, E., McKenna, S.A. & Patel, T.R. (2018) Viral proteins targeting host protein kinase R to evade an innate immune response: a mini review. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **34**, 33–59.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797.
- Edwards, S.J., Hayden, M.B., Hamilton, R.C., Haynes, J.A., Nisbet, I.T. & Jagdish, M.N. (1994) High level production of potyvirus-like particles in insect cells infected with recombinant baculovirus. *Arch Virol* **136**, 375–380.
- Eisfeld, A.J., Turse, S.E., Jackson, S.A., Lerner, E.C. & Kinchington, P.R. (2006) Phosphorylation of the Varicella-Zoster Virus (VZV) Major Transcriptional Regulatory Protein IE62 by the VZV Open Reading Frame 66 Protein Kinase.

J. Virol. **80**, 1710–1723.

- Eskelin, K., Varjosalo, M., Ravantti, J. & Mäkinen, K. (2019) Ribosome profiles and riboproteomes of healthy and Potato virus A- and *Agrobacterium*-infected *Nicotiana benthamiana* plants. *Mol. Plant Pathol.* **20**, 392–409.
- Fernández-Fernández, M.R., Camafeita, E., Bonay, P., Méndez, E., Albar, J.P. & García, J.A. (2002) The Capsid Protein of a Plant Single-stranded RNA Virus Is Modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **277**, 135–140.
- Fernandez, A., Guo, H.S., Sáenz, P., Simón-Buela, L., Gómez de Cedrón, M. & García, J.A. (1997) The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4474–4480.
- Friso, G. & Wijk, K.J. van (2015) Posttranslational Protein Modifications in Plant Metabolism. *Plant Physiol.* **169**, 1469–1487.
- Gabrenaite-Verkhovskaya, R., Andreev, I.A., Kalina, N.O., Torrance, L., Taliansky, M.E. & Mäkinen, K. (2008) Cylindrical inclusion protein of potato virus A is associated with a subpopulation of particles isolated from infected plants. *J. Gen. Virol.* **89**, 829–838.
- Gallo, A., Valli, A., Calvo, M. & García, J.A. (2018) A Functional Link Between RNA Replication and Virion Assembly in the Potyvirus *Plum pox virus*. **92**, 1–18.
- Gao, J., Yang, Y., Qiu, R., Zhang, K., Teng, X., Liu, R. & Wang, Y. (2018) Proteomic analysis of the OGT interactome: novel links to epithelial-mesenchymal transition and metastasis of cervical cancer. *Carcinogenesis* **39**, 1222–1234.
- García Cabanillas, D., Jiang, J., Movahed, N., Germain, H., Yamaji, Y., Zheng, H. & Laliberté, J.-F. (2018) Turnip Mosaic Virus Uses the SNARE Protein VTI11 in an Unconventional Route for Replication Vesicle Trafficking. *Plant Cell* **30**, 2594–2615.
- García, J.A., Glasa, M., Cambra, M. & Candresse, T. (2014) *Plum pox virus* and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Mol. Plant Pathol.* **15**, 226–241.
- Geng, C., Cong, Q.-Q., Li, X.-D., Mou, A.-L., Gao, R., Liu, J.-L. & Tian, Y.-P. (2015) DEVELOPMENTALLY REGULATED PLASMA MEMBRANE PROTEIN of *Nicotiana benthamiana* Contributes to Potyvirus Movement and Transports to Plasmodesmata via the Early Secretory Pathway and the Actomyosin System. *Plant Physiol.* **167**, 394–410.
- Geng, C., Yan, Z.-Y., Cheng, D.-J., Liu, J., Tian, Y.-P., Zhu, C.-X., Wang, H.-Y. & Li, X.-D. (2017) *Tobacco vein banding mosaic virus* 6K2 Protein Hijacks NbPsbO1 for Virus Replication. *Sci. Rep.* **7**, 1–16.
- Gibbs, A.J., MacKenzie, A.M., Wei, K.-J. & Gibbs, M.J. (2008) The potyviruses of Australia. *Arch. Virol.* **153**, 1411–1420.
- Gómez De Cedrón, M., Osaba, L., López, L. & García, J.A. (2006) Genetic analysis of the function of the plum pox virus CI RNA helicase in virus movement. *Virus Res.* **116**, 136–145.
- Gomord, V., Fitchette, A.-C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D. & Faye, L. (2010) Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnol. J.* **8**, 564–587.
- González, S.A. & Burrone, O.R. (1991) Rotavirus NS26 Is Modified by Addition of Single O-Linked Residues of N-Acetylglucosamine. *Virology* **182**, 8–16.
- Grangeon, R., Agbeci, M., Chen, J., Grondin, G., Zheng, H. & Laliberte, J.-F. (2012) Impact on the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus of Turnip Mosaic Virus Infection. *J. Virol.* **86**, 9255–9265.
- Grangeon, Romain., Jiang, J. & Laliberté, J.-F. (2012) Host endomembrane recruitment for plant RNA virus replication. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 683–690.
- Grangeon, R., Jiang, J., Wan, J., Agbeci, M., Zheng, H. & Laliberté, J.-F. (2013) 6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection. *Front. Microbiol.* **4**, 1–10.

- Greis, K.D., Gibson, W. & Hart, G.W.** (1994) Site-Specific Glycosylation of the Human Cytomegalovirus Tegument Basic Phosphoprotein (UL32) at Serine 921 and Serine 952. *J. Virol.* **68**, 8339–8349.
- Grindheim, A.K., Saraste, J. & Vedeler, A.** (2017) Protein phosphorylation and its role in the regulation of Annexin A2 function. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* **1861**, 2515–2529.
- Groves, J.A., Maduka, A.O., O’Meally, R.N., Cole, R.N. & Zachara, N.E.** (2017) Fatty acid synthase inhibits the O-GlcNAcase during oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **292**, 6493–6511.
- Guinez, C., Mir, A.-M., Dehennaut, V., Cacan, R., Harduin-Lepers, A., Michalski, J.-C. & Lefebvre, T.** (2008) Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation. *FASEB J.* **22**, 2901–2911.
- Hafrén, A., Eskelin, K. & Mäkinen, K.** (2013) Ribosomal Protein P0 Promotes *Potato Virus A* Infection and Functions in Viral Translation Together with VPg and eIF(iso)4E. *J. Virol.* **87**, 4302–4312.
- Hafrén, A., Hofius, D., Rönholm, G., Sonnewald, U. & Mäkinen, K.** (2010) HSP70 and Its Cochaperone CPIP Promote Potyvirus Infection in *Nicotiana benthamiana* by Regulating Viral Coat Protein Functions. *Plant Cell* **22**, 523–535.
- Haldeman-Cahill, R., Daròs, J.-A. & Carrington, J.C.** (1998) Secondary Structures in the Capsid Protein Coding Sequence and 3’ Nontranslated Region Involved in Amplification of the Tobacco Etch Virus Genome. *J. Virol.* **72**, 4072–4079.
- Hammond, J.M., Sproat, K.W., Wise, T.G., Hyatt, A.D., Jagadish, M.N. & Coupar, B.E.H.** (1998) Expression of the potyvirus coat protein mediated by recombinant vaccinia virus and assembly of potyvirus-like particles in mammalian cells. *Arch. Virol.* **143**, 1433–1439.
- Hanover, J.A., Krause, M.W. & Love, D.C.** (2010) The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 80–95.
- Harmel, R. & Fiedler, D.** (2018) Features and regulation of non-enzymatic post-translational modifications. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 244–252.
- Hart, G.W. & Akimoto, Y.** (2009) Chapter 18: The O-GlcNAc Modification. In *Essentials of Glycobiology*. (Ajit Varki, University of California, San Diego; Richard D. Cummings, Harvard Medical School, Boston, MA; Jeffrey D. Esko, University of California, San Diego; Pamela Stanley, Albert Einstein College of Medicine, New York; Gerald W. Hart, Johns, G., ed), pp. 1–823. Segunda edición, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hart, G.W. & Copeland, R.J.** (2010) Glycomics Hits The Big Time. *Cell* **143**, 672–676.
- Hart, G.W., Greis, K.D., Dong, L.Y.D., Blomberg, M.A., Chou, T.Y., Jiang, M.S., Roquemore, E.P., Snow, D.M., Kreppel, L.K., Cole, R.N., Comer, F.I., Arnold, C.S. & Hayes, B.H.** (1995) O-linked N-acetylglucosamine: the “yin-yang” of Ser/Thr phosphorylation? Nuclear and cytoplasmic glycosylation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **376**, 115–123.
- Hart, G.W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G. & Lagerlof, O.** (2011) Cross Talk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 825–58.
- Hartweck, L.M., Scott, C.L. & Olszewski, N.E.** (2002) Two O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase Genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Have Overlapping Functions Necessary for Gamete and Seed Development. *Genetics* **161**, 1279–1291.
- Hashiguchi, A. & Komatsu, S.** (2017) Chapter Six: Posttranslational Modifications and Plant-Environment Interaction. In *Methods in Enzymology*. (Shukla, A.K., ed), pp. 1–515. Primea edición, Elsevier.
- Heese-Peck, A., Cole, R.N., Borkhsenius, O.N., Hart, G.W. & Raikhel, N. V.** (1995) Plant Nuclear Pore Complex Proteins Are Modified by Novel Oligosaccharides with Terminal N-Acetylglucosamine. *Plant Cell* **7**, 1459–1471.
- Heese-Peck, A. & Raikhel, N. V.** (1998) A Glycoprotein Modified with Terminal N-Acetylglucosamine and Localized at the Nuclear Rim Shows Sequence Similarity to Aldose-1-Epimerases. *Plant Cell* **10**, 599–612.
- Héricourt, F., Blanc, S., Redeker, V. & Jupin, I.** (2000) Evidence for phosphorylation and ubiquitinylation of the turnip yellow mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase domain expressed in a baculovirus–insect cell system.

Biochem. J. **349**, 417–425.

- Herlitz, S. & Koenen, M.** (1990) A general and rapid mutagenesis method using polymerase chain reaction. *Gene* **91**, 143–147.
- Hipp, K., Zikeli, K., Kepp, G., Schmid, L., Shoeman, R.L., Jurkowski, T.P., Kleinow, T. & Jeske, H.** (2019) Different forms of African cassava mosaic virus capsid protein within plants and virions. *Virology* **529**, 81–90.
- Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V. & Revers, F.** (2013) Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Front. Plant Sci.* **4**, 1–24.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. & Pease, L.R.** (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51–59.
- Höfgen, R. & Willmitzer, L.** (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9877.
- Hofius, D., Maier, A.T., Dietrich, C., Jungkunz, I., Börnke, F., Maiss, E. & Sonnewald, U.** (2007) Capsid Protein-Mediated Recruitment of Host DnaJ-Like Proteins Is Required for *Potato Virus Y* Infection in Tobacco Plants. *J. Virol.* **81**, 11870–11880.
- Hong, Y. & Hunt, A.G.** (1996) RNA Polymerase Activity Catalyzed by a Potyvirus-Encoded RNA-Dependent RNA Polymerase. *Virology* **226**, 146–151.
- Hoover, H., Wang, J.C.-Y., Middleton, S., Ni, P., Zlotnick, A., Vaughan, R.C.R. & Kao, C.C.** (2016) Phosphorylation of the Brome Mosaic Virus Capsid Regulates the Timing of Viral Infection. *J. Virol.*, 7748–7760.
- Hoover, H.S. & Kao, C.C.** (2016) Phosphorylation of the viral coat protein regulates RNA virus infection. *Virus Adapt. Treat.* **8**, 13–20.
- Housley, M.P., Rodgers, J.T., Udeshi, N.D., Kelly, T.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Puigserver, P. & Hart, G.W.** (2008) O-GlcNAc Regulates FoxO Activation in Response to Glucose. *J. Biol. Chem.* **283**, 16283–16292.
- Hu, P., Shimoji, S. & Hart, G.W.** (2010) Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation. *FEBS Lett.* **584**, 2526–2538.
- Hu, Y., Li, Z., Yuan, C., Jin, X., Yan, L., Zhao, X., Zhang, Y., Jackson, A.O., Wang, X., Han, C., Yu, J. & Li, D.** (2015) Phosphorylation of TGB1 by protein kinase CK2 promotes barley stripe mosaic virus movement in monocots and dicots. *J. Exp. Bot.* **66**, 4733–4747.
- Huber, S.C.** (2007) Exploring the role of protein phosphorylation in plants: from signalling to metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 28–32.
- Huet, H., Gal-On, A., Meir, E., Lecoq, H. & Raccach, B.** (1994) Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J. Gen. Virol.* **75**, 1407–1414.
- Humphrey, S.J., James, D.E. & Mann, M.** (2015) Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* **26**, 676–687.
- Hung, C.-J., Huang, Y.-W., Liou, M.-R., Lee, Y.-C., Lin, N.-S., Meng, M., Tsai, C.-H., Hu, C.-C. & Hsu, Y.-H.** (2014) Phosphorylation of Coat Protein by Protein Kinase CK2 Regulates Cell-to-Cell Movement of *Bamboo mosaic virus* Through Modulating RNA Binding. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **27**, 1211–1225.
- Hunter, T.** (2007) The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. *Mol. Cell* **28**, 730–738.
- Husaini, A.M., Morimoto, K., Chandrasekar, B., Kelly, S., Kaschani, F., Palmero, D., Jiang, J., Kaiser, M., Ahrazem, O., Overkleeft, H.S. & Hoorn, R.A.L. van der** (2018) Multiplex Fluorescent, Activity-Based Protein Profiling Identifies Active α -Glycosidases and Other Hydrolases in Plants. *Plant Physiol.* **177**, 24–37.
- Inoue, T., Yamaguchi, S., Seaki, T. & Sekiguchi, K.** (1990) Production of infectious swine vesicular disease virus from cloned cDNA in mammalian cells. *J. Gen. Virol.* **71**, 1835–1838.

- Ivanov, K.I. & Mäkinen, K. (2012) Coat proteins, host factors and plant viral replication. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 712–718.
- Ivanov, K.I., Puustinen, P., Gabrenaite, R., Vihinen, H., Rönstrand, L., Valmu, L., Kalkkinen, N. & Mäkinen, K. (2003) Phosphorylation of the Potyvirus Capsid Protein by Protein Kinase CK2 and Its Relevance for Virus Infection. *Plant Cell* **15**, 2124–2139.
- Ivanov, K. I., Puustinen, P., Merits, A., Saarma, M. & Mäkinen, K. (2001) Phosphorylation Down-regulates the RNA-Binding Function of the Coat Protein of Potato Virus A. *J. Biol. Chem.* **276**, 13530–13540.
- Jagadish, M.N., Huang, D. & Ward, C.W. (1993) Site-directed mutagenesis of a potyvirus coat protein and its assembly in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* **74**, 893–896.
- Jagadish, M.N., Ward, C.W., Gough, K.H., Tulloch, P.A., Whittaker, L.A. & Shukla, D.D. (1991) Expression of potyvirus coat protein in *Escherichia coli* and yeast and its assembly into virus-like particles. *J. Gen. Virol.* **72**, 1543–1550.
- Jakubiec, A. & Jupin, I. (2007) Regulation of positive-strand RNA virus replication: The emerging role of phosphorylation. *Virus Res.* **129**, 73–79.
- Jakubiec, A., Tournier, V., Drugeon, G., Pflieger, S., Camborde, L., Vinh, J., Héricourt, F., Redeker, V. & Jupin, I. (2006) Phosphorylation of Viral RNA-dependent RNA Polymerase and Its Role in Replication of a Plus-strand RNA Virus. *J. Biol. Chem.* **281**, 21236–21249.
- Jefferis, R. (2016) Posttranslational Modifications and the Immunogenicity of Biotherapeutics. *J. Immunol. Res.* **2016**, 1–15.
- Jia, C., Zuo, Y. & Zou, Q. (2018) O-GlcNAcPRED-II: an integrated classification algorithm for identifying O-GlcNAcylation sites based on fuzzy undersampling and a K-means PCA oversampling technique. *Bioinformatics* **34**, 2029–2036.
- Jiang, J. & Laliberté, J.-F. (2011) The genome-linked protein VPg of plant viruses - a protein with many partners. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 347–354.
- Jiang, J., Patarroyo, C., Cabanillas, D.G., Zheng, H. & Laliberté, J.-F. (2015) The Vesicle-Forming 6K2 Protein of Turnip Mosaic Virus Interacts with the COPII Coatomer Sec24a for Viral Systemic Infection. *J. Virol.* **89**, 6695–6710.
- Jin, X., Cao, X., Wang, X., Jiang, J., Wan, J., Laliberté, J.-F. & Zhang, Y. (2018) Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Plant Virus Replication. *Front. Plant Sci.* **9**, 1–17.
- Jochmann, R., Pfannstiel, J., Chudasama, P., Kuhn, E., Konrad, A. & Stürzl, M. (2013) O-GlcNAc transferase inhibits KSHV propagation and modifies replication relevant viral proteins as detected by systematic O-GlcNAcylation analysis. *Glycobiology* **23**, 1114–1130.
- Jochmann, R., Thurau, M., Jung, S., Hofmann, C., Naschberger, E., Kremmer, E., Harrer, T., Miller, M., Schaft, N. & Sturzl, M. (2009) O-Linked N-Acetylglucosamylation of Sp1 Inhibits the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Promoter. *J. Virol.* **83**, 3704–3718.
- Källsten, M., Gromova, A., Zhao, H., Valdés, A., Konzer, A., Pettersson, U. & Bergström Lind, S. (2017) Temporal characterization of the non-structural Adenovirus type 2 proteome and phosphoproteome using high-resolving mass spectrometry. *Virology* **511**, 240–248.
- Kamemura, K., Hayes, B.K., Comer, F.I. & Hart, G.W. (2002) Dynamic Interplay between O-Glycosylation and O-Phosphorylation of Nucleocytoplasmic Proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 19229–19235.
- Kang, S.-H., Lim, W.-S., Hwang, S.-H., Park, J.-W., Choi, H.-S. & Kim, K.-H. (2006) Importance of the C-terminal domain of soybean mosaic virus coat protein for subunit interactions. *J. Gen. Virol.* **87**, 225–229.
- Karsies, A., Hohn, T. & Leclerc, D. (2001) Degradation signals within both terminal domains of the cauliflower mosaic virus capsid protein precursor. *Plant J.* **27**, 335–343.
- Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. (2001) Long-Distance Movement and Replication Maintenance Functions Correlate with Silencing Suppression Activity of Potyviral HC-Pro. *Virology* **285**, 71–81.

- Kato, A., Oda, S., Watanabe, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Koyanagi, N., Maruzuru, Y., Arai, J. & Kawaguchi, Y.** (2018) Roles of the Phosphorylation of Herpes Simplex Virus 1 UL51 at a Specific Site in Viral Replication and Pathogenicity. *J. Virol.* **92**, 1–21.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. & Drummond, A.** (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**, 1647–1649.
- Keating, J.A. & Striker, R.** (2012) Phosphorylation events during viral infections provide potential therapeutic targets. *Rev. Med. Virol.* **22**, 166–181.
- Keck, F., Ataey, P., Amaya, M., Bailey, C. & Narayanan, A.** (2015) Phosphorylation of Single Stranded RNA Virus Proteins and Potential for Novel Therapeutic Strategies. *Viruses* **7**, 5257–5273.
- Kendall, A., McDonald, M., Bian, W., Bowles, T., Baumgarten, S.C., Shi, J., Stewart, P.L., Bullitt, E., Gore, D., Irving, T.C., Havens, W.M., Ghabrial, S.A., Wall, J.S. & Stubbs, G.** (2008) Structure of Flexible Filamentous Plant Viruses. *J. Virol.* **82**, 9546–9554.
- Kim, B.-S., Halk, E.L., Merlo, D.J., Nelson, S.E. & Loesch-Fries, L.S.** (2014) Phosphorylation of alfalfa mosaic virus movement protein *in vivo*. *Arch. Virol.* **159**, 1787–1791.
- Kim, S.H., Palukaitis, P. & Park, Y.I.** (2002) Phosphorylation of cucumber mosaic virus RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex. *EMBO J.* **21**, 2292–2300.
- Kim, Y.-C., Udeshi, N.D., Balsbaugh, J.L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. & Olszewski, N.E.** (2011) O-GlcNAcylation of the *Plum pox virus* capsid protein catalyzed by SECRET AGENT: characterization of O-GlcNAc sites by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Amino Acids* **40**, 869–876.
- Kimalov, B., Gal-On, A., Stav, R., Belausov, E. & Arazi, T.** (2004) Maintenance of coat protein N-terminal net charge and not primary sequence is essential for zucchini yellow mosaic virus systemic infectivity. *J. Gen. Virol.* **85**, 3421–3430.
- Klein, P.G., Klein, R.R., Rodríguez-Cerezo, E., Hunt, A.G. & Shaws, J.G.** (1994) Mutational Analysis of the Tobacco Vein Mottling Virus Genome. *Virology* **204**, 759–769.
- Ko, Y.-C., Tsai, W.-H., Wang, P.-W., Wu, I.-L., Lin, S.-Y., Chen, Y.-L., Chen, J.-Y. & Lin, S.-F.** (2012) Suppressive Regulation of KSHV RTA with O-GlcNAcylation. *J. Biomed. Sci.* **19**, 1–13.
- Kõivomägi, M., Valk, E., Venta, R., Iofik, A., Lepiku, M., Balog, E.R.M., Rubin, S.M., Morgan, D.O. & Loog, M.** (2011) Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase. *Nature* **480**, 128–131.
- Kollerová, E., Glasa, M. & Šubr, Z.W.** (2008) WESTERN BLOTTING ANALYSIS OF THE *PLUM POX VIRUS* CAPSID PROTEIN. *J. plant Pathol.* **90**, S1.19-S1.22.
- Koncz, C. & Schell, J.** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genet. MGG* **204**, 383–396.
- Kurotani, A., Tokmakov, A.A., Kuroda, Y., Fukami, Y., Shinozaki, K. & Sakurai, T.** (2014) Correlations between predicted protein disorder and post-translational modifications in plants. *Bioinformatics* **30**, 1095–1103.
- Laarse, S.A.M. van der, Leney, A.C. & Heck, A.J.R.** (2018) Crosstalk between phosphorylation and O-GlcNAcylation: friend or foe. *FEBS J.* **285**, 3152–3167.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lain, S., Riechmann, J.L. & García, J.A.** (1989) The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Res.* **13**, 157–172.
- Lain, S., Riechmann, J.L., Méndez, E. & García, J.A.** (1988) Nucleotide sequence of 3' terminal region of plum pox potyvirus RNA. *Virus Res.* **10**, 325–342.

- Laliberté, J.-F. & Zheng, H. (2014) Viral Manipulation of Plant Host Membranes. *Annu. Rev. Virol.* **1**, 237–59.
- Law, L.M.J., Everitt, J.C., Beatch, M.D., Holmes, C.F.B. & Hobman, T.C. (2003) Phosphorylation of Rubella Virus Capsid Regulates Its RNA Binding Activity and Virus Replication. *J. Virol.* **77**, 1764–1771.
- Lazo, G.R., Stein, P.A. & Ludwig, R.A. (1991) A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium. *Biotechnology* **9**, 963–967.
- Leney, A.C., Atmioui, D. El, Wu, W., Ovaa, H. & Heck, A.J.R. (2017) Elucidating crosstalk mechanisms between phosphorylation and O-GlcNAcylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E7255–E7261.
- Lerich, A., Langhans, M., Sturm, S. & Robinson, D.G. (2011) Is the 6 kDa tobacco etch viral protein a bona fide ERES marker? *J. Exp. Bot.* **62**, 5013–5023.
- Li, S.-C. & Li, Y.-T. (1970) Studies on the Glycosidases of Jack Bean Meal. *J. Biol. Chem.* **245**, 5153–5160.
- Li, X., Slawson, C., Hart, G.W., Liu, M., Lane, M.D., Dias, W.B., Qian, S., Molina, H., Huang, H., Tang, Q.-Q., Zhang, Y. & Pandey, A. (2009) O-Linked N-Acetylglucosamine Modification on CCAAT Enhancer-binding Protein β . *J. Biol. Chem.* **284**, 19248–19254.
- Li, X., Wilmanns, M., Thornton, J. & Köhn, M. (2013) Elucidating Human Phosphatase-Substrate Networks. *Sci. Signal.* **6**, 1–15.
- Li, Y., Sun, L., Zheng, W., Madina-Mahesutihan, Li, J., Bi, Y., Wang, H., Liu, W. & Luo, T.R. (2018) Phosphorylation and dephosphorylation of threonine 188 in nucleoprotein is crucial for the replication of influenza A virus. *Virology* **520**, 30–38.
- Li, Y., Xiong, R., Bernards, M. & Wang, A. (2016) Recruitment of *Arabidopsis* RNA Helicase AtRH9 to the Viral Replication Complex by Viral Replicase to Promote Turnip Mosaic Virus Replication. *Sci. Rep.* **6**, 1–12.
- Liebming, E., Veit, C., Pabst, M., Batoux, M., Zipfel, C., Altmann, F., Mach, L. & Strasser, R. (2011) β -N-acetylhexosaminidases HEXO1 and HEXO3 are responsible for the formation of paucimannosidic N-glycans in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **286**, 10793–10802.
- Liu, J.-Z., Blancaflor, E.B. & Nelson, R.S. (2005) The Tobacco Mosaic Virus 126-Kilodalton Protein, a Constituent of the Virus Replication Complex, Alone or within the Complex Aligns with and Traffics along Microfilaments. *Plant Physiol.* **138**, 1853–1865.
- Llácer, G. (2006) Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Herbaceous hosts. *EPPO Bull.* **36**, 227–228.
- Löhmus, A., Hafrén, A. & Mäkinen, K. (2017) Coat Protein Regulation by CK2, CPIP, HSP70, and CHIP Is Required for Potato Virus A Replication and Coat Protein Accumulation. *J. Virol.* **91**, 1–14.
- Löhmus, A., Varjosalo, M. & Mäkinen, K. (2016) Protein composition of 6K2-induced membrane structures formed during *Potato virus A* infection. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 943–958.
- López-Moya, J.J. & García, J.A. (2000) Construction of a stable and highly infectious intron-containing cDNA clone of plum pox potyvirus and its use to infect plants by particle bombardment. *Virus Res.* **68**, 99–107.
- López-Moya, J.J. & Pirone, T.P. (1998) Charge changes near the N terminus of the coat protein of two potyviruses affect virus movement. *J. Gen. Virol.* **79**, 161–165.
- Lu, Z.-S., Chen, Q.-S., Zheng, Q.-X., Shen, J.-J., Luo, Z.-P., Fan, K., Xu, S.-H., Shen, Q. & Liu, P.-P. (2019) Proteomic and Phosphoproteomic Analysis in Tobacco Mosaic Virus-Infected Tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Biomolecules* **9**, 1–20.
- Lucini, C. (2004) *Expresión de proteínas heterólogas en plantas por medio del virus de la sharka (PPV)*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Ma, J. & Hart, G.W. (2014) O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes. *Clin. Proteomics* **11**, 1–16.

- Mahajan, S., Dolja, V. V & Carrington, J.C.** (1996) Roles of the Sequence Encoding Tobacco Etch Virus Capsid Protein in Genome Amplification: Requirements for the Translation Process and a *cis*-Active Element. *J. Virol.* **70**, 4370–4379.
- Makarov, V. V & Kalinina, N.O.** (2016) Structure and Noncanonical Activities of Coat Proteins of Helical Plant Viruses. *Biochemistry* **81**, 35–55.
- Maliogka, V.I., Calvo, M., Carbonell, A., García, J.A. & Valli, A.** (2012) Heterologous RNA-silencing suppressors from both plant- and animal-infecting viruses support plum pox virus infection. *J. Gen. Virol.* **93**, 1601–1611.
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T. & Sudarsanam, S.** (2002) Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 514–520.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S.** (2002) The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* **298**, 1912–1934.
- Manoussopoulos, I.N., Maiss, E. & Tsagris, M.** (2000) Native electrophoresis and Western blot analysis (NEWeb): a method for characterization of different forms of potyvirus particles and similar nucleoprotein complexes in extracts of infected plant tissues. *J. Gen. Virol.* **81**, 2295–2298.
- Martinez-Izquierdo, J. & Hohn, T.** (1987) Cauliflower mosaic virus coat protein is phosphorylated *in vitro* by virion-associated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 1824–1828.
- Martínez, F. & 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.
- Mateu, M.G.** (2013) Structure and physics of viruses: An integrated textbook. (Mateu, M. G., ed). Primera edición, Springer Dordrecht Heidelberg New York London.
- McDonald, J.G. & Bancroft, J.B.** (1977) Assembly Studies on Potato Virus Y and its Coat Protein. *J. Gen. Virol.* **35**, 251–263.
- McDonald, J.G., Beveridge, T.J. & Bancroft, J.B.** (1976) Self-Assembly of Protein from a Flexuous Virus. *Virology* **69**, 327–331.
- Medina, L., Grove, K. & Haltiwanger, R.S.** (1998) SV40 large T antigen is modified with O-linked N-acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation. *Glycobiology* **8**, 383–391.
- Mei, Y., Wang, Y., Hu, T., Yang, X., Lozano-Duran, R., Sunter, G. & Zhou, X.** (2018) Nucleocytoplasmic Shuttling of Geminivirus C4 Protein Mediated by Phosphorylation and Myristoylation Is Critical for Viral Pathogenicity. *Mol. Plant* **11**, 1466–1481.
- Merits, A., Rajamäki, M.-L., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., Mäkeläinen, K., Valkonen, J.P.T. & Saarma, M.** (2002) Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *J. Gen. Virol.* **83**, 1211–1221.
- Mijakovic, I. & Macek, B.** (2012) Impact of phosphoproteomics on studies of bacterial physiology. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 877–892.
- Mink, G.I.** (1993) Pollen- and seed-transmitted viruses and viroids. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**, 375–402.
- Miranda-Saavedra, D. & Barton, G.J.** (2007) Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. *Proteins* **68**, 893–914.
- Módena, N.A., Zelada, A.M., Conte, F. & Mentaberry, A.** (2008) Phosphorylation of the TGBp1 movement protein of Potato virus X by a *Nicotiana tabacum* CK2-like activity. *Virus Res.* **137**, 16–23.
- Modrof, J., Lymperopoulos, K. & Roy, P.** (2005) Phosphorylation of Bluetongue Virus Nonstructural Protein 2 Is Essential for Formation of Viral Inclusion Bodies. *J. Virol.* **79**, 10023–10031.
- Mohr, I.** (2006) Phosphorylation and dephosphorylation events that regulate viral mRNA translation. *Virus Res.* **119**,

- Mondal, A., Potts, G.K., Dawson, A.R., Coon, J.J. & Mehle, A.** (2015) Phosphorylation at the Homotypic Interface Regulates Nucleoprotein Oligomerization and Assembly of the Influenza Virus Replication Machinery. *PLoS Pathog.* **11**, 1–24.
- Moorhead, G.B.G., De Wever, V., Templeton, G. & Kerk, D.** (2009) Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem. J.* **417**, 401–409.
- Movahed, N., Patarroyo, C., Sun, J., Vali, H., Laliberte, J.-F. & Zheng, H.** (2017) Cylindrical Inclusion of Turnip Mosaic Virus Serves as a Docking Point for the Intercellular Movement of Viral Replication Vesicles. *Plant Physiol.* **175**, 1732–1744.
- Movahed, N., Sun, J., Vali, H., Laliberté, J.-F. & Zheng, H.** (2019) A Host ER Fusogen Is Recruited by *Turnip Mosaic Virus* for Maturation of Viral Replication Vesicles. *Plant Physiol.* **179**, 507–518.
- Mullis, K.G., Haltiwanger, R.S., Hart, G.W., Marchase, R.B. & Engler, J.A.** (1990) Relative Accessibility of *N*-Acetylglucosamine in Trimers of the Adenovirus Types 2 and 5 Fiber Proteins. *J Virol* **64**, 5317–5323.
- Murashige, T. & Skoog, F.** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, 473–497.
- Navajas, R., Paradela, A. & Albar, J.P.** (2011) Immobilized metal affinity chromatography/reversed-phase enrichment of phosphopeptides and analysis by CID/ETD tandem mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* **681**, 337–348.
- Nemes, K., Gellért, Á., Almási, A., Vági, P., Sáray, R., Kádár, K. & Salánki, K.** (2017) Phosphorylation regulates the subcellular localization of Cucumber Mosaic Virus 2b protein. *Sci. Rep.* **7**, 1–12.
- Nicaise, V. & Candresse, T.** (2017) *Plum pox virus* capsid protein suppresses plant pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity. *Mol. Plant Pathol.* **18**, 878–886.
- Niehl, A. & Heinlein, M.** (2011) Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* **248**, 75–99.
- Ning, X., Basagoudanavar, S.H., Liu, K., Luckenbaugh, L., Wei, D., Wang, C., Wei, B., Zhao, Y., Yan, T., Delaney, W. & Hu, J.** (2017) Capsid Phosphorylation State and Hepadnavirus Virion Secretion. *J. Virol.* **91**, 1–16.
- Nishi, H., Demir, E. & Panchenko, A.R.** (2015) Crosstalk between Signaling Pathways provided by Single and Multiple Protein Phosphorylation Sites. *J. Mol. Biol.* **427**, 511–520.
- Norrandner, J., Kempe, T. & Messing, J.** (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**, 101–106.
- O’Leary, N.A., Wright, M.W., Brister, J.R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., Farrell, C.M., Goldfarb, T., Gupta, T., Haft, D., Hatcher, E., Hlavina, W., Joardar, V.S., Kodali, V.K., Li, W., Maglott, D., Masterson, P., McGarvey, K.M., Murphy, M.R., O’Neill, K., Pujar, S., Rangwala, S.H., Rausch, D., Riddick, L.D., Schoch, C., Shkeda, A., Storz, S.S., Sun, H., Thibaud-Nissen, F., Tolstoy, I., Tully, R.E., Vatsan, A.R., Wallin, C., Webb, D., Wu, W., Landrum, M.J., Kimchi, A., Tatusova, T., DiCuccio, M., Kitts, P., Murphy, T.D. & Pruitt, K.D.** (2016) Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* **44**, D733–D745.
- Olszewski, N.E., West, C.M., Sassi, S.O. & Hartweck, L.M.** (2010) O-GlcNAc protein modification in plants: Evolution and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 49–56.
- Park, C.-J., Caddell, D.F. & Ronald, P.C.** (2012) Protein phosphorylation in plant immunity: insights into the regulation of pattern recognition receptor-mediated signaling. *Front. Plant Sci.* **3**, 1–9.
- Pasin, F., Bedoya, L.C., Bernabé-Orts, J.M., Gallo, A., Simón-Mateo, C., Orzaez, D. & García, J.A.** (2017) Multiple T-DNA Delivery to Plants Using Novel Mini Binary Vectors with Compatible Replication Origins. *ACS Synth. Biol.* **6**, 1962–1968.

- Pasin, F., Simón-Mateo, C. & García, J.A. (2014) The Hypervariable Amino-Terminus of P1 Protease Modulates Potyviral Replication and Host Defense Responses. *PLoS Pathog.* **10**, 1–16.
- Pasquini, G. & Barba, M. (2006) The question of seed transmissibility of *Plum pox virus*. *EPPO Bull.* **36**, 287–292.
- Peng, Y.H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y. & Raccah, B. (1998) Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *J. Gen. Virol.* **79**, 897–904.
- Penrose, K.J. & McBride, A.A. (2000) Proteasome-Mediated Degradation of the Papillomavirus E2-TA Protein Is Regulated by Phosphorylation and Can Modulate Viral Genome Copy Number. *J. Virol.* **74**, 6031–6038.
- Pérez, J. de J. (2014) *Caracterización de la modificación por O-GlcNAc de la proteína de la cápside del potyvirus Plum pox virus y su relevancia para la infección viral*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Pérez, J. de J., Juárez, S., Chen, D., Scott, C.L., Hartweck, L.M., Olszewski, N.E. & García, J.A. (2006) Mapping of two O-GlcNAc modification sites in the capsid protein of the potyvirus *Plum pox virus*. *FEBS Lett.* **580**, 5822–5828.
- Pérez, J. de J., Udeshi, N.D., Shabanowitz, J., Ciordia, S., Juárez, S., Scott, C.L., Olszewski, N.E., Hunt, D.F. & García, J.A. (2013) O-GlcNAc modification of the coat protein of the potyvirus *Plum pox virus* enhances viral infection. *Virology* **442**, 122–131.
- Pirone, T.P. & Blanc, S. (1996) Helper-Dependent Vector Transmission of Plant Viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**, 227–47.
- Puustinen, P. & Mäkinen, K. (2004) Uridylylation of the Potyvirus VPg by Viral Replicase N1b Correlates with the Nucleotide Binding Capacity of VPg. *J. Biol. Chem.* **279**, 38103–38110.
- Puustinen, P., Rajamäki, M.-L., Ivanov, K.I., Valkonen, J.P.T. & Mäkinen, K. (2002) Detection of the Potyviral Genome-Linked Protein VPg in Virions and its Phosphorylation by Host Kinases. *J. Virol.* **76**, 12703–12711.
- Rajamäki, M.-L. & Valkonen, J.P.T. (1999) The 6K2 Protein and the VPg of Potato Virus A Are Determinants of Systemic Infection in *Nicandra physaloides*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**, 1074–1081.
- Rajamäki, M.-L., Xi, D., Sikorskaite-Gudziuniene, S., Valkonen, J.P.T. & 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.
- Rakitina, D. V., Kantidze, O.L., Leshchiner, A.D., Solovyev, A.G., Novikov, V.K., Morozov, S.Y. & Kalinina, N.O. (2005) Coat proteins of two filamentous plant viruses display NTPase activity in vitro. *FEBS Lett.* **579**, 4955–4960.
- Ranadheera, C., Coombs, K.M. & Kobasa, D. (2018) Comprehending a Killer: The Akt/mTOR Signaling Pathways Are Temporally High-Jacked by the Highly Pathogenic 1918 Influenza Virus. *EBioMedicine* **32**, 142–163.
- Rechsteiner, M. & Rogers, S.W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 267–271.
- Reinders, J. & Sickmann, A. (2007) Modificomics: Posttranslational modifications beyond protein phosphorylation and glycosylation. *Biomol. Eng.* **24**, 169–177.
- Reiser, L., Subramaniam, S., Li, D. & Huala, E. (2017) Using the *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) to Find Information About *Arabidopsis* Genes. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **60**, 1.11.1-1.11.45.
- Revers, F. & García, J.A. (2015) Molecular Biology of Potyviruses. *Adv. Virus Res.* **92**, 101–199.
- Riechmann, J.L., Laín, S. & García, J.A. (1989) The Genome-linked Protein and 5' End RNA Sequence of Plum Pox Potyvirus. *J. Gen. Virol.* **70**, 2785–2789.
- Rieder, F.J.J., Kastner, M.-T., Hartl, M., Puchinger, M.G., Schneider, M., Majdic, O., Britt, W.J., Djinović-Carugo, K. & Steininger, C. (2017) Human cytomegalovirus phosphoproteins are hypophosphorylated and intrinsically disordered. *J. Gen. Virol.* **98**, 471–485.

- Rimbaud, L., Dallot, S., Gottwald, T., Decroocq, V., Jacquot, E., Soubeyrand, S. & Thébaud, G. (2015) Sharka Epidemiology and Worldwide Management Strategies: Learning Lessons to Optimize Disease Control in Perennial Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **53**, 357–78.
- Rodamilans, B., Valli, A. & García, J.A. (2013) Mechanistic divergence between P1 proteases of the family *Potyviridae*. *J. Gen. Virol.* **94**, 1407–1414.
- Rodamilans, B., Valli, A., Mingot, A., San León, D., Baulcombe, D., López-Moya, J.J. & García, J.A. (2015) RNA Polymerase Slippage as a Mechanism for the Production of Frameshift Gene Products in Plant Viruses of the *Potyviridae* Family. *J. Virol.* **89**, 6965–6967.
- Rodríguez-Cerezo, E., Findlay, K., Shaw, J.G., Lomonosoff, G.P., Qiu, S.G., Linstead, P., Shanks, M. & Risco, C. (1997) The Coat and Cylindrical Inclusion Proteins of a Potyvirus Are Associated with Connections between Plant Cells. *Virology* **236**, 296–306.
- Rogers, S., Wells, R. & Rechsteiner, M. (1986) Amino Acid Sequences Common to Rapidly Degraded Proteins : The PEST Hypothesis. *Science* **234**, 364–368.
- Rohila, J.S., Chen, M., Cerny, R. & Fromm, M.E. (2004) Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J.* **38**, 172–181.
- Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L. & Lucas, W.J. (1997) Capsid Protein and Helper Component-Proteinase Function as Potyvirus Cell-to-Cell Movement Proteins. *Virology* **237**, 283–295.
- Roy, J. & Cyert, M.S. (2009) Cracking the Phosphatase Code: Docking Interactions Determine Substrate Specificity. *Sci. Signal.* **2**, 1–7.
- Ruan, H.-B., Han, X., Li, M.-D., Singh, J.P., Qian, K., Azarhoush, S., Zhao, L., Bennett, A.M., Samuel, V.T., Wu, J., Yates III, J.R. & Yang, X. (2012) O-GlcNAc Transferase/Host Cell Factor C1 Complex Regulates Gluconeogenesis by Modulating PGC-1 α Stability. *Cell Metab.* **16**, 226–237.
- Ruan, H.-B., Nie, Y. & Yang, X. (2013) Regulation of Protein Degradation by O-GlcNAcylation: Crosstalk with Ubiquitination. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 3489–3497.
- Ryšlavá, H., Doubnerová, V., Kavan, D. & Vaněk, O. (2013) Effect of posttranslational modifications on enzyme function and assembly. *J. Proteomics* **92**, 80–109.
- Sacco, F., Perfetto, L., Castagnoli, L. & Cesareni, G. (2012) The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *FEBS Lett.* **586**, 2732–2739.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350–1354.
- Salazar, C. & Höfer, T. (2009) Multisite protein phosphorylation - from molecular mechanisms to kinetic models. *FEBS J.* **276**, 3177–3198.
- Salvador, B., Delgado, M.O., Sáenz, P., García, J.A. & Simón-Mateo, C. (2008) Identification of *Plum pox virus* Pathogenicity Determinants in Herbaceous and Woody Hosts. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **21**, 20–29.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.*, 2 ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor laboratory.
- Samuilova, O., Santala, J. & Valkonen, J.P.T. (2013) Tyrosine Phosphorylation of the Triple Gene Block Protein 3 Regulates Cell-to-Cell Movement and Protein Interactions of *Potato Mop-Top Virus*. *J. Virol.* **87**, 4313–4321.
- Santos, A.L. & Lindner, A.B. (2017) Protein Posttranslational Modifications: Roles in Aging and Age-Related Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **5716409**, 1–19.
- Schaad, M. C., Jensen, P.E. & Carrington, J.C. (1997) Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J.* **16**, 4049–4059.

- Schaad, M.C., Lellis, A.D. & Carrington, J. (1997) VPg of Tobacco Etch Potyvirus Is a Host Genotype-Specific Determinant for Long-Distance Movement. *J. Virol.* **71**, 8624–8631.
- Scholthof, K.-B.G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C. & Foster, G.D. (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 938–954.
- Schoupe, D., Ghesquière, B., Menschaert, G., Vos, W.H. De, Bourque, S., Trooskens, G., Proost, P., Gevaert, K. & Damme, E.J.M. Van (2011) Interaction of the Tobacco Lectin with Histone Proteins. *Plant Physiol.* **155**, 1091–1102.
- Schulze zur Wiesch, J., Schmitz, H., Borowski, E. & Borowski, P. (2003) The proteins of the *Hepatitis C virus*: Their features and interactions with intracellular protein phosphorylation. *Arch. Virol.* **148**, 1247–1267.
- Schweighofer, A. & Meskiene, I. (2015) Chapter 2: Phosphatases In Plants. In Plant Phospho-proteomics.roteomics. (Schulze, W.X., ed), pp. 1–234. Primera edición, Springer New York Heidelberg Dordrecht London.
- Scott, C.L., Hartweck, L.M., Pérez, J. de J., Chen, D., García, J.A. & Olszewski, N.E. (2006) SECRET AGENT, an *Arabidopsis thaliana* O-GlcNAc transferase, modifies the *Plum pox virus* capsid protein. *FEBS Lett.* **580**, 5829–5835.
- Seo, J.-K., Phan, M.S.V., Kang, S.-H., Choi, H.-S. & Kim, K.-H. (2013) The charged residues in the surface-exposed C-terminus of the *Soybean mosaic virus* coat protein are critical for cell-to-cell movement. *Virology* **446**, 95–101.
- Shafi, R., Iyer, S.P.N., Ellies, L.G., O'Donnell, N., Marek, K.W., Chui, D., Hart, G.W. & Marth, J.D. (2000) The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *PNAS* **97**, 5735–5739.
- Shapka, N., Stork, J. & Nagy, P.D. (2005) Phosphorylation of the p33 replication protein of *Cucumber necrosis tobusvirus* adjacent to the RNA binding site affects viral RNA replication. *Virology* **343**, 65–78.
- Shen, Q., Liu, Z., Song, F., Xie, Q., Hanley-Bowdoin, L. & Zhou, X. (2011) Tomato SlSnRK1 Protein Interacts with and Phosphorylates β C1, a Pathogenesis Protein Encoded by a Geminivirus β -Satellite. *Plant Physiol.* **157**, 1394–1406.
- Shen, W., Bobay, B.G., Greeley, L.A., Reyes, M.I., Rajabu, C.A., Blackburn, R.K., Dallas, M.B., Goshe, M.B., Ascencio-Ibáñez, J.T. & Hanley-Bowdoin, L. (2018) Sucrose Nonfermenting 1-Related Protein Kinase 1 Phosphorylates a Geminivirus Rep Protein to Impair Viral Replication and Infection. *Plant Physiol.* **178**, 372–389.
- Shen, W., Dallas, M.B., Goshe, M.B. & Hanley-Bowdoin, L. (2014) SnRK1 Phosphorylation of AL2 Delays *Cabbage Leaf Curl Virus* Infection in *Arabidopsis*. *J. Virol.* **88**, 10598–10612.
- Sheveleva, A.A., Nikitin, N.A., Trifonova, E.A., Zakubanskiy, A. V. & Chirkov, S.N. (2016) IMPROVED METHOD OF PURIFICATION OF *Plum pox virus* AND SEROLOGICAL ANALYSIS OF THE COAT PROTEIN. *Agric. Biol.* **51**, 385–391.
- Shin, Y.-J., Castilho, A., Dicker, M., Sádio, F., Vavra, U., Grünwald-Gruber, C., Kwon, T.-H., Altmann, F., Steinkellner, H. & Strasser, R. (2017) Reduced paucimannosidic *N*-glycan formation by suppression of a specific β -hexosaminidase from *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnol. J.* **15**, 197–206.
- Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H. & Ward, C.W. (1988) The N and C Termini of the Coat Proteins of Potyviruses Are Surface-located and the N Terminus Contains the Major Virus-specific Epitopes. *J. Gen. Virol.* **69**, 1497–1508.
- Shukla, D.D. & Ward, C.W. (1989) Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Adv. Virus Res.* **36**, 273–314.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D. & Higgins, D.G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 1–6.
- Simón-Buela, L., Guo, H.S. & García, J.A. (1997) Long Sequences in the 5' Noncoding Region of Plum Pox Virus Are Not Necessary for Viral Infectivity but Contribute to Viral Competitiveness and Pathogenesis. *Virology* **233**,

157–162.

- Singh, V., Ram, M., Kumar, R., Prasad, R., Roy, B.K. & Singh, K.K.** (2017) Phosphorylation: Implications in Cancer. *Protein J.* **36**, 1–6.
- Slawson, C. & Hart, G.W.** (2003) Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 631–636.
- Sokolova, M., Prüfer, D., Tacke, E. & Rohde, W.** (1997) The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Lett.* **400**, 201–205.
- Solovyev, A.G. & Makarov, V. V.** (2016) Helical capsids of plant viruses: architecture with structural lability. *J. Gen. Virol.* **97**, 1739–1754.
- Sotelo, P.H., Schümann, M., Krause, E. & Chnaiderman, J.** (2010) Analysis of rotavirus non-structural protein NSP5 by mass spectrometry reveals a complex phosphorylation pattern. *Virus Res.* **149**, 104–108.
- Spiro, R.G.** (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**, 43R–56R.
- Steiner, E., Livne, S., Kobinson-Katz, T., Tal, L., Pri-Tal, O., Mosquna, A., Tarkowská, D., Muller, B., Tarkowski, P. & Weiss, D.** (2016) The Putative O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase SPINDLY Inhibits Class I TCP Proteolysis to Promote Sensitivity to Cytokinin. *Plant Physiol.* **171**, 1485–1494.
- Strasser, R., Bondili, J.S., Schoberer, J., Svoboda, B., Liebminger, E., Glössl, J., Altmann, F., Steinkellner, H. & Mach, L.** (2007) Enzymatic Properties and Subcellular Localization of Arabidopsis β -N-Acetylhexosaminidases. *Plant Physiol.* **145**, 5–16.
- Šubr, Z. & Glasa, M.** (1999) PLUM POX VIRUS CAPSID PROTEIN MOBILITY IN SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS. *Acta Virol.* **43**, 259–262.
- Šubr, Z. & Glasa, M.** (2013) Unfolding the secrets of plum pox virus: from epidemiology to genomics. *Acta Virol.* **57**, 217–228.
- Šubr, Z., Ryšlavá, H. & Kollerová, E.** (2007) ELECTROPHORETIC MOBILITY OF THE CAPSID PROTEIN OF THE PLUM POX VIRUS STRAIN PPV-REC INDICATES ITS PARTIAL PHOSPHORYLATION. *Acta Virol.* **51**, 135–138.
- Šubr, Z.W., Kamencayová, M., Nováková, S., Nagyová, A., Nosek, J. & Glasa, M.** (2010) A single amino acid mutation alters the capsid protein electrophoretic double-band phenotype of the *Plum pox virus* strain PPV-Rec. *Arch. Virol.* **155**, 1151–1155.
- Sun, H., Shen, L., Qin, Y., Liu, X., Hao, K., Li, Y., Wang, F., Yang, J. & Wang, J.** (2018) *CLC-Nt1* affects *Potato Virus Y* infection via regulation of endoplasmic reticulum luminal Ph. *New Phytol.* **220**, 539–552.
- Swaney, D.L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., Krogan, N.J. & Villén, J.** (2013) Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat. Methods* **10**, 676–682.
- Tanaka, Y., Nakamura, S., Kawamukai, M., Koizumi, N. & Nakagawa, T.** (2011) Development of a Series of Gateway Binary Vectors Possessing a Tunicamycin Resistance Gene as a Marker for the Transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 804–807.
- Taoka, K.-I., Ham, B.-K., Xoconostle-Cázares, B., Rojas, M.R. & Lucas, W.J.** (2007) Reciprocal Phosphorylation and Glycosylation Recognition Motifs Control NCAPP1 Interaction with Pumpkin Phloem Proteins and Their Cell-to-Cell Movement. *Plant Cell* **19**, 1866–1884.
- Tatineni, S.** (2017) Wheat streak mosaic virus coat protein is a host-specific long-distance transport determinant in oat. *Virus Res.* **242**, 37–42.
- Tatineni, S. & French, R.** (2014) The C-terminus of *Wheat streak mosaic virus* Coat Protein Is Involved in Differential Infection of Wheat and Maize through Host-Specific Long-Distance Transport. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **27**, 150–162.

- Tatineni, S., Winkle, D.H. Van & French, R.** (2011) The N-Terminal Region of *Wheat Streak Mosaic Virus* Coat Protein Is a Host- and Strain-Specific Long-Distance Transport Factor. *J. Virol.* **85**, 1718–1731.
- Taurino, M., Abelenda, J.A., Río-Alvarez, I., Navarro, C., Vicedo, B., Farmaki, T., Jiménez, P., García-Agustín, P., López-Solanilla, E., Prat, S., Rojo, E., Sánchez-Serrano, J.J. & Sanmartín, M.** (2014) Jasmonate-dependent modifications of the pectin matrix during potato development function as a defense mechanism targeted by *Dickeya dadantii* virulence factors. *Plant J.* **77**, 418–429.
- Thivierge, K., Cotton, S., Dufresne, P.J., Mathieu, I., Beauchemin, C., Ide, C., Fortin, M.G. & Laliberté, J.-F.** (2008) Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles. *Virology* **377**, 216–225.
- Thornton, T.M., Swain, S.M. & Olszewski, N.E.** (1999) Gibberellin signal transduction presents...the SPY who O-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci.* **4**, 424–428.
- Torrance, L., Andreev, I.A., Gabrenaite-Verhovskaya, R., Cowan, G., Mäkinen, K. & Taliansky, M.E.** (2006) An Unusual Structure at One End of Potato Potyvirus Particles. *J. Mol. Biol.* **357**, 1–8.
- Trost, B. & Kusalik, A.** (2011) Computational prediction of eukaryotic phosphorylation sites. *Bioinformatics* **27**, 2927–2935.
- Tsai, W.-H., Wang, P.-W., Lin, S.-Y., Wu, I.-L., Ko, Y.-C., Chen, Y.-L., Li, M. & Lin, S.-F.** (2012) Ser-634 and Ser-636 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA are involved in transactivation and are potential CDK9 phosphorylation sites. *Front. Microbiol.* **3**, 1–14.
- Uchiyama, A., Shimada-Beltran, H., Levy, A., Zheng, J.Y., Javia, P.A. & Lazarowitz, S.G.** (2014) The Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates the cell-to-cell movement of diverse plant viruses. *Front. Plant Sci.* **5**, 1–17.
- Valli, A., Gallo, A., Calvo, M., Pérez, J. de J. & García, J.A.** (2014) A Novel Role of the Potyviral Helper Component Proteinase Contributes To Enhance the Yield of Viral Particles. *J. Virol.* **88**, 9808–9818.
- Varki, A. & Kornfeld, S.** (2017) Chapter 1: Historical Background and Overview. In *Essentials of Glycobiology*. (Ajit Varki, University of California, San Diego; Richard D. Cummings, Harvard Medical School, Boston, MA; Jeffrey D. Esko, University of California, San Diego; Pamela Stanley, Albert Einstein College of Medicine, New York; Gerald W. Hart, Johns Hopkins Un, G., ed), pp. 1–823. Tercera edición, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Varrelmann, M. & Maiss, E.** (2000) Mutations in the coat protein gene of *Plum pox virus* suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* **81**, 567–576.
- Venne, A.S., Kollipara, L. & Zahedi, R.P.** (2014) The next level of complexity: Crosstalk of posttranslational modifications. *Proteomics* **14**, 513–524.
- Verchot, J. & Carrington, J.C.** (1995) Debilitation of Plant Potyvirus Infectivity by P1 Proteinase-Inactivating Mutations and Restoration by Second-Site Modifications. *J. Virol.* **69**, 1582–1590.
- Vihinen, H., Ahola, T., Tuittila, M., Merits, A. & Kääriäinen, L.** (2001) Elimination of Phosphorylation Sites of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP3. *J. Biol. Chem.* **276**, 5745–5752.
- Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-Takekuchi, N. & Miller, W.A.** (2012) Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3N-PIPO with Host Protein PCaP1 Facilitates Potyvirus Movement. *PLoS Pathog.* **8**, 1–15.
- Vizcaíno, J.A., Csordas, A., Del-Toro, N., Dianes, J.A., Griss, J., Lavidas, I., Mayer, G., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ternent, T., Xu, Q.W., Wang, R. & Hermjakob, H.** (2016) 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* **44**, D447–D456.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. & Baulcombe, D.** (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **33**, 949–956.
- Voloudakis, A.E., Malpica, C.A., Aleman-Verdager, M.-E., Stark, D.M., Fauquet, C.M. & Beachy, R.N.** (2004) Structural characterization of *Tobacco etch virus* coat protein mutants. *Arch. Virol.* **149**, 699–712.

- Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S. & Gatto, G.J. (2005) Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **44**, 7342–7372.
- Wan, J., Basu, K., Mui, J., Vali, H., Zheng, H. & Laliberté, J.-F. (2015) Ultrastructural Characterization of Turnip Mosaic Virus-Induced Cellular Rearrangements Reveals Membrane-Bound Viral Particles Accumulating in Vacuoles. *J. Virol.* **89**, 12441–12456.
- Wan, J., García Cabanillas, D., Zheng, H. & Laliberté, J.-F. (2015) Turnip mosaic virus Moves Systemically through Both Phloem and Xylem as Membrane-Associated Complexes. *Plant Physiol.* **167**, 1374–1388.
- Wang, X., Goshe, M.B., Soderblom, E.J., Phinney, B.S., Kuchar, J.A., Li, J., Asami, T., Yoshida, S., Huber, S.C. & Clouse, S.D. (2005) Identification and Functional Analysis of in Vivo Phosphorylation Sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 Receptor Kinase. *Plant Cell* **17**, 1685–1703.
- Wang, Y., Banerjee, S., Ding, L., Cai, C., Wei, F. & Cai, Q. (2017) The regulatory role of protein phosphorylation in human gammaherpesvirus associated cancers. *Viol. Sin.* **32**, 357–368.
- Wei, T., Huang, T.-S., McNeil, J., Laliberte, J.-F., Hong, J., Nelson, R.S. & Wang, A. (2010) Sequential Recruitment of the Endoplasmic Reticulum and Chloroplasts for Plant Potyvirus Replication. *J. Virol.* **84**, 799–809.
- Wei, T. & Wang, A. (2008) Biogenesis of Cytoplasmic Membranous Vesicles for Plant Potyvirus Replication Occurs at Endoplasmic Reticulum Exit Sites in a COPI- and COPII-Dependent Manner. *J. Virol.* **82**, 12252–12264.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington, J.C. & Wang, A. (2010) Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog.* **6**, 1–12.
- Wei, T., Zhang, C., Hou, X., Sanfaçon, H. & Wang, A. (2013) The SNARE Protein Syp71 Is Essential for Turnip Mosaic Virus Infection by Mediating Fusion of Virus-Induced Vesicles with Chloroplasts. *PLoS Pathog.* **9**, 1–11.
- Welcker, M. & Clurman, B.E. (2005) The SV40 Large T Antigen Contains a Decoy Phosphodegron That Mediates Its Interactions with Fbw7/hCdc4. *J. Biol. Chem.* **280**, 7654–7658.
- Wells, L. & Hart, G.W. (2003) O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett.* **546**, 154–158.
- Wells, L., Kreppel, L.K., Comer, F.I., Wadzinski, B.E. & Hart, G.W. (2004) O-GlcNAc Transferase Is in a Functional Complex with Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunits. *J. Biol. Chem.* **279**, 38466–38470.
- Wells, L., Whelan, S.A. & Hart, G.W. (2003) O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 435–441.
- Wen, R.-H. & Hajimorad, M.R. (2010) Mutational analysis of the putative *pipo* of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology* **400**, 1–7.
- Whitford, M. & Faulkner, P. (1992) A Structural Polypeptide of the Baculovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Contains O-Linked N-acetylglucosamine. *J. Virol.* **66**, 3324–3329.
- Wu, X. & Shaw, J.G. (1998) Evidence that assembly of a potyvirus begins near the 5' terminus of the viral RNA. *J. Gen. Virol.* **79**, 1525–1529.
- Wylie, S.J., Adams, M., Chalam, C., Kreuze, J., López-Moya, J.J., Ohshima, K., Praveen, S., Rabenstein, F., Stenger, D., Wang, A., Zerbini, F.M. & Consortium, I.R. (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 352–354.
- Xiao, J., Xu, S., Li, C., Xu, Y., Xing, L., Niu, Y., Huan, Q., Tang, Y., Zhao, C., Wagner, D., Gao, C. & Chong, K. (2014) O-GlcNAc-mediated interaction between VER2 and TaGRP2 elicits *TaVRN1* mRNA accumulation during vernalization in winter wheat. *Nat. Commun.* **5**, 1–13.
- Xing, L., Li, J., Xu, Y., Xu, Z. & Chong, K. (2009) Phosphorylation Modification of Wheat Lectin VER2 Is Associated with Vernalization-Induced O-GlcNAc Signaling and Intracellular Motility. *PLoS One* **4**, 1–13.

- Xing, L., Liu, Y., Xu, S., Xiao, J., Wang, B., Deng, H., Lu, Z., Xu, Y. & Chong, K. (2018) *Arabidopsis* O-GlcNAc transferase SEC activates histone methyltransferase ATX1 to regulate flowering. *EMBO J.* **37**, e98115.
- Xu, S.-L., Chalkley, R.J., Maynard, J.C., Wang, W., Ni, W., Jiang, X., Shin, K., Cheng, L., Savage, D., Hühmer, A.F.R., Burlingame, A.L. & Wang, Z.-Y. (2017) Proteomic analysis reveals O-GlcNAc modification on proteins with key regulatory functions in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E1536–E1543.
- Xu, S., Xiao, J., Yin, F., Guo, X., Xing, L., Xu, Y. & Chong, K. (2019) The protein modifications of O-GlcNAcylation and phosphorylation mediate vernalization response for flowering in winter wheat. *Plant Physiol.*, pp.00081.2019.
- Yang, A., Cho, K. & Park, H.-S. (2018) Chemical biology approaches for studying posttranslational modifications. *RNA Biol.* **15**, 427–440.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. & Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **12**, 7–8.
- Yang, S., Wang, T., Bohon, J., Gagné, M.-È.L., Bolduc, M., Leclerc, D. & Li, H. (2012) Crystal Structure of the Coat Protein of the Flexible Filamentous Papaya Mosaic Virus. *J. Mol. Biol.* **422**, 263–273.
- Yang, X., Ongusaha, P.P., Miles, P.D., Havstad, J.C., Zhang, F., So, W.V., Kudlow, J.E., Michell, R.H., Olefsky, J.M., Field, S.J. & Evans, R.M. (2008) Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* **451**, 964–969.
- Yang, X. & Qian, K. (2017) Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 452–465.
- Yao, Q. & Xu, D. (2017) Chapter 6: Bioinformatics Analysis of Protein Phosphorylation in Plant Systems Biology Using P3DB. In Protein Bioinformatics. From Protein Modifications and Networks to proteomics. (1 ed., Wu, C. H., Arighi, C. N., Ross, K.E., ed), pp. 1–474. Springer Science+Business Media LLC.
- Zachara, N., Akimoto, Y. & Hart, G.W. (2017) Chapter 19: The O-GlcNAc modification. In Essentials of Glycobiology. (Ajit Varki, University of California, San Diego; Richard D. Cummings, Harvard Medical School, Boston, MA; Jeffrey D. Esko, University of California, San Diego; Pamela Stanley, Albert Einstein College of Medicine, New York; Gerald W. Hart, Johns Hopkins Un, G., ed), pp. 1–823. Tercera edición, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Zachara, N.E. & Hart, G.W. (2004) O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1673**, 13–28.
- Zamora, M., Méndez-López, E., Agirrezabala, X., Cuesta, R., Lavín, J.L., Sánchez-Pina, M.A., Aranda, M.A. & Valle, M. (2017) Potyvirus virion structure shows conserved protein fold and RNA binding site in ssRNA viruses. *Sci. Adv.* **3**, 1–7.
- Zeidan, Q. & Hart, G.W. (2010) The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J. Cell Sci.* **123**, 13–22.
- Zentella, R., Hu, J., Hsieh, W.-P., Matsumoto, P.A., Dawdy, A., Barnhill, B., Oldenhof, H., Hartweck, L.M., Maitra, S., Thomas, S.G., Cockrell, S., Boyce, M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Olszewski, N.E. & Sun, T. (2016) O-GlcNAcylation of master growth repressor DELLA by SECRET AGENT modulates multiple signaling pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **30**, 164–176.
- Zentella, R., Sui, N., Barnhill, B., Hsieh, W.-P., Hu, J., Shabanowitz, J., Boyce, M., Olszewski, N.E., Zhou, P., Hunt, D.F. & Sun, T. (2017) The *Arabidopsis* O-fucosyltransferase SPINDLY activates nuclear growth repressor DELLA. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 479–485.
- Zhang, X., Dong, K., Xu, K., Zhang, K., Jin, X., Yang, M., Zhang, Y., Wang, X., Han, C., Yu, J. & Li, D. (2018) *Barley stripe mosaic virus* infection requires PKA-mediated phosphorylation of yb for suppression of both RNA silencing and the host cell death response. *New Phytol.* **218**, 1570–1585.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W. & Chua, N.-H. (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat. Protoc.* **1**, 641–646.

- Zhang, Z., Costa, F.C., Tan, E.P., Bushue, N., DiTacchio, L., Costello, C.E., McComb, M.E., Whelan, S.A., Peterson, K.R. & Slawson, C.** (2016) *O*-Linked *N*-Acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) Transferase and *O*-GlcNAcase Interact with Mi2 β Protein at the $\text{A}\gamma$ -Globin Promoter. *J. Biol. Chem.* **291**, 15628–15640.
- Zhao, X., Wang, X., Dong, K., Zhang, Y., Hu, Y., Zhang, X., Chen, Y., Wang, Xianbing, Han, C., Yu, J. & Li, D.** (2015) Phosphorylation of Beet black scorch virus coat protein by PKA is required for assembly and stability of virus particles. *Sci. Rep.* **5**, 1–16.
- Zilian, E. & Maiss, E.** (2011) Detection of plum pox potyviral protein-protein interactions *in planta* using an optimized mRFP-based bimolecular fluorescence complementation system. *J. Gen. Virol.* **92**, 2711–2723.
- Zulawski, M. & Schulze, W.X.** (2015) Chapter 1: The plant kinome. In *Plant Phospho-proteomics*. (Schulze, W.X., ed), pp. 1–234. Primera edición, Springer New York Heidelberg Dordrecht London.

VIII. ANEXOS



VIII. ANEXOS

Anexo 1. Plásmidos disponibles en el laboratorio

Plásmidos infecciosos				
Nombre	Vector	Antibiótico	Hospedador	Referencia
pICPPV-NK-IGFP	pGG556	Amp	Herbáceo	Sáenz, Fernández-Fernández & García, datos no publicados, citado en Pérez <i>et al.</i> , 2013
pICPPV-5'BD-GFP	pGG556	Amp	Leñoso	Salvador <i>et al.</i> , 2008
pLX-PPV	pBBR1	Kan	Herbáceo	Pasin <i>et al.</i> , 2017
pSN-PPV	pSN-ccdB	Kan	Herbáceo	Pasin <i>et al.</i> , 2014
pSN-PPV-5'BD	pSN-ccdB	Kan	Herbáceo y leñoso	Pasin & García, datos no publicados
pPPV-CI ^{KS91,92AA}	pBIN19	Kan	Herbáceo	Gallo & García, datos no publicados
pPPV-CI ^{DD3,4AA}	pBIN19	Kan	Herbáceo	Gallo & García, datos no publicados
pLONG	pBIN19	Kan	Herbáceo	Lucini, 2004
pLONG-CI ^{KS91,92AA}	pBIN19	Kan	Herbáceo	Gallo <i>et al.</i> , 2018
pLONG-CI ^{DD3,4AA}	pBIN19	Kan	Herbáceo	Gallo & García, datos no publicados
pLONG-CP ^{D264K}	pBIN19	Kan	Herbáceo	Gallo <i>et al.</i> , 2018
CP-SwCM-R	pGG556	Amp	Herbáceo	Calvo, Martínez-Turiño, <i>et al.</i> , 2014
Plásmidos no infecciosos				
Nombre	Vector	Antibiótico	Referencia	
pGFP	pPTN289	Esp	Martínez-Turiño & García, datos no publicados	
pP19	pBIN61	Kan	Voinnet <i>et al.</i> , 2003	
pP1b	pMDC32	Kan	Rodamilans <i>et al.</i> , 2013	
pP1HC	pMDC32	Kan	Valli <i>et al.</i> , 2014	
pRFP	pGWB761	Esp	Tanaka <i>et al.</i> , 2011	
pNlaPro	pMDC32	Kan	Maliogka <i>et al.</i> , 2012	
pGFP-CP	pBIN19	Kan	Gallo <i>et al.</i> , 2018	
pDONR	pDONR207	Gen	<i>Invitrogen</i>	
pCTAPi	pPTN289	Esp	Rohila <i>et al.</i> , 2004	
pUC-CPB3 80-116	pUC18	Amp	Loera & García, datos no publicados	
pUC18	M13mp18	Amp	Norrandar <i>et al.</i> , 1983	
pUC19	M13mp19	Amp	Norrandar <i>et al.</i> , 1983	

Anexo 2. Plásmidos construidos específicamente para esta tesis

Plásmidos infecciosos				
Nombre	Vector	Antibiótico	Hospedador	Experimento
pICPPV-NK-IGFP-4SA	pGG5S6	Amp	Herbáceo	Análisis del efecto de mutar dianas fosforilables de la CP de PPV-R sobre su ciclo infeccioso
pICPPV-5'BD-GFP-4SA	pGG5S6	Amp	Leñoso	
pICPPV-NK-IGFP-4SD	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pICPPV-5'BD-GFP-4SD	pGG5S6	Amp	Leñoso	
pICPPV-NK-IGFP-S25D	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pICPPV-NK-IGFP-S81D	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pICPPV-NK-IGFP-S101D	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pICPPV-NK-IGFP-S118D	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pICPPV-5'BD-GFP-S118D	pGG5S6	Amp	Leñoso	
pICPPV-NK-IGFP-T254A	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pICPPV-NK-IGFP-T254D	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pICPPV-NK-IGFP-T254T*	pGG5S6	Amp	Herbáceo	Análisis del efecto de mutar dianas fosforilables de la CP de PPV-R sobre su ciclo infeccioso
pICPPV-NK-IGFP-T254K	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pICPPV-NK-IGFP-T313A	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pICPPV-NK-IGFP-T313D	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pICPPV-NK-IGFP-T313N	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pLX-PPV-T254D	pBBR1	Kan	Herbáceo	
pLX-PPV-T313D	pBBR1	Kan	Herbáceo	Análisis del efecto de mutar la Thr del motivo CK2 de la CP de PPV-R sobre su ciclo infeccioso
pICPPV-NK-IGFP-T304A	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pICPPV-NK-IGFP-T304D	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pICPPV-NK-IGFP-T304N	pGG5S6	Amp	Herbáceo	Análisis del efecto de mutar la Thr fosforilable del motivo CK2 de la CP de PPV-SwCM sobre su ciclo infeccioso
CP-SwCM-R-T306A	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
CP-SwCM-R-T306D	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
CP-SwCM-R-T306N	pGG5S6	Amp	Herbáceo	Estudio del efecto sobre la fosforilación de la CP de PPV-BOR-3 cuando distintas etapas del ciclo viral se encuentran afectadas
pICPPV-NK-IGFP-BOR-3-CP	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pICPPV-NK-IGFP-BOR-3-CP ^{D264K}	pGG5S6	Amp	Herbáceo	
pLONG-BOR-3-CP	pBIN19	Kan	Herbáceo	
pLONG-CI ^{KS91,92AA} -BOR-3-CP	pBIN19	Kan	Herbáceo	
pLONG-CI ^{DD3,4AA} -BOR-3-CP	pBIN19	Kan	Herbáceo	
pLONG-BOR-3-CP ^{D264K}	pBIN19	Kan	Herbáceo	

Plásmidos no infecciosos			
Nombre	Vector	Antibiótico	Experimento
pGFP-BOR-3-CP	pBIN19	Kan	Estudio del efecto sobre la fosforilación de la CP de PPV-BOR-3 en ausencia de otras proteínas del virus
pUC19-HEXO1	pUC19	Amp	Búsqueda de la hipotética OGA de plantas que elimina los residuos O-GlcNAcilo de la CP del PPV
pUC19-HEXO1GW	pUC19	Amp	
pUC19-HEXO1-STOPGW	pUC19	Amp	
pDONR-HEXO1	pDONR207	Gen	
pDONR-HEXO1-STOP	pDONR207	Gen	
pCTAPi-HEXO1	pPTN289	Esp	
pCTAPi-HEXO1-STOP	pPTN289	Esp	
pUC19-HEXO2	pUC19	Amp	
pDONR-HEXO2	pDONR207	Gen	
pDONR-HEXO2-STOP	pDONR207	Gen	
pCTAPi-HEXO2	pPTN289	Esp	
pCTAPi-HEXO2-STOP	pPTN289	Esp	
pUC19-HEXO3	pUC19	Amp	
pDONR-HEXO3	pDONR207	Gen	
pDONR-HEXO3-STOP	pDONR207	Gen	
pCTAPi-HEXO3	pPTN289	Esp	
pCTAPi-HEXO3-STOP	pPTN289	Esp	
pUC18-SEC	pUC18	Amp	
pUC18-SEC-STOP	pUC18	Amp	
pDONR-SEC	pDONR207	Gen	
pDONR-SEC-STOP	pDONR207	Gen	
pCTAPi-SEC	pPTN289	Esp	
pCTAPi-SEC-STOP	pPTN289	Esp	

Anexo 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

<i>Mutagénesis dirigida^a</i>	
Nombre	Secuencia 5' ---→ 3'
S25D-rev	GTATTGG <u>ATC</u> AGTTGCTGC
S81D-rev	GTTGCTAGG <u>GTC</u> TGCATCCTC
S101D-rev	GTTCCAAC <u>GTC</u> TCCTGCATCG
S118D-rev	CCTTTGGCAG <u>ATC</u> TAGTTTCG
SM27-F-mut-Ala	GAATTCAGCGCAACCTG <u>GCA</u> GACTACAGCCTCGCC
SM27-R-mut-Ala	CTGGCGAGGCTGTAGT <u>CTGCC</u> CAGGTTGCGCTGAATTC
SM28-F-mut-Asp	GAATTCAGCGCAACCTG <u>GAT</u> GACTACAGCCTCGCCAG
SM28-R-mut-Asp	CTGGCGAGGCTGTAGT <u>CATC</u> CAGGTTGCGCTGAATTC
SM29-F-mut-Thr*	GAATTCAGCGCAACCTG <u>ACC</u> GACTACAGCCTCGCCAG
SM29-R-mut-Thr*	CTGGCGAGGCTGTAGT <u>CGT</u> CAGGTTGCGCTGAATTC
SM35-F-mut-Ala	TGGATGGAACGTCGGG <u>GCA</u> CAAGAAGAGGACACAGAG
SM35-R-mut-Ala	CTCTGTGTCTCTTCTT <u>TGCC</u> TCCGACGTTTCCATCCA
SM36-F-mut-Asp	TGGATGGAACGTCGGG <u>GAT</u> CAAGAAGAGGACACAGAG
SM36-R-mut-Asp	CTCTGTGTCTCTTCTT <u>GATC</u> TCCGACGTTTCCATCCA
SM37-F-mut-Asn	TGGATGGAACGTCGGG <u>AAU</u> CAAGAAGAGGACACAGAG
SM37-R-mut-Asn	CTCTGTGTCTCTTCTT <u>GATT</u> TCCGACGTTTCCATCCA
SM38-F-mut-Ala	CACAGAGAGACAC <u>GCC</u> GCTGGTGATGTTAATCGCA
SM38-R-mut-Ala	TGCGATTAACATCACCAGC <u>GGC</u> GTGTCTCTCTGTG
SM39-F-mut-Asp	CACAGAGAGACAC <u>GAC</u> GCTGGTGATGTTAATCGCA
SM39-R-mut-Asp	TGCGATTAACATCACCAGC <u>GTC</u> GTGTCTCTCTGTG
SM40-F-mut-Asn	CACAGAGAGACAC <u>AAC</u> GCTGGTGATGTTAATCGCA
SM40-R-mut-Asn	TGCGATTAACATCACCAGC <u>GTT</u> GTGTCTCTCTGTG
SM50-F-mut-Lys	GAATTCAGCGCAACCTG <u>AAA</u> GACTACAGCCTCGCC
SM50-R-mut-Lys	TGGCGAGGCTGTAGT <u>TTT</u> CAGGTTGCGCTGAATTC
SM56-F-mut-T306A	TGGATGGAACGTCGGG <u>GCA</u> CAAGAAGAGGACACAGAG
SM56-R-mut-T306A	CTCTGTGTCTCTTCTT <u>TGCC</u> TCCGACGTTTCCATCCA
SM57-F-mut-T306D	TGGATGGAACGTCGGG <u>GAT</u> CAAGAAGAGGACACAGAG
SM57-R-mut-T306D	CTCTGTGTCTCTTCTT <u>GATC</u> TCCGACGTTTCCATCCA
SM58-F-mut-T306N	TGGATGGAACGTCGGG <u>AAT</u> CAAGAAGAGGACACAGAG
SM58-R-mut-T306N	CTCTGTGTCTCTTCTT <u>GATT</u> TCCGACGTTTCCATCCA
SM69-BOR3-CP-Lys-F	TCGCCAGATACGCCTT <u>TAA</u> GTTTTACGAAATGACTT
SM69-BOR3-CP-Lys-R	AAGTCATTCGTA <u>AAACCTT</u> AAAGGCGTATCTGGCGA
<i>Clonajes y/o identificación de plásmidos y progenie viral del PPV</i>	
Nombre	Secuencia 5' ---→ 3'
SM13-GFP	CTACCTGAGCACCCAG

SM13-IGFP	TTACCTGTCCACAC
2429	GTCTCTTGCACAAGAACTAT
55	CTATGCACCAAACC
80	TTGGGTTCTTGAACAAGC
SM30-F-ext	AGTCCTGCACAGGTTGACTTGTCAAACAC
SM30-R-ext	CGATTTAGGTGACACTATAGAATACAAGCTTCTAG
SM59-F-ext	GTTTGATCCCATATTCCTCCAGCAACAAC
SM60-F-BOR-3-KpnI	TTGGTACCAACGTTGTGTGCACCAAGCTGATGAAAAGGAGGACGATGA
SM61-R-OV-BOR-3	TAGAGTTTATGATAGATACCGAGACCACTACACTCC
SM62-R-TNOS-XbaI	CAAGCTTCTAGAGATCTAGTAACATAGATGACA
SM70-F	GTACAGTCTGCACAAGTTGATTT
Genotipado de mutantes de <i>A. thaliana</i>	
Nombre	Secuencia 5' ---→ 3'
SM34-Hexo 1-F	CTGGCCATGCGGAATCGTG
SM34-Hexo 1-R	AGTGAAAAGCTCAAATGGGAATA
SM35-Hexo 2-F	TATTAAGGCCATGAGTGCAAACAAAC
SM35-Hexo 2-R	CCCTAGAAACCCGCCGTGACC
SM36-Hexo 3-1-F	AAAATGAGAGGTAGCGGAGCAAAGAT
SM36-Hexo 3-1-R	TCGGTAGAGGAGGAGATGATGACG
SM37-Hexo 3-2-F	GTCTGCAACACCCGGAATAGCCC
SM37-Hexo 3-2-R	GAATCACTGAGCGAGACAAGAACCTG
NS4R	AAACCAAGACAAAATCCAGATCCTCATCA
GSP33	ACACTTCGCCTGATATGTTCACTCTTC)
Clonaje de genes de <i>A. thaliana</i> en vectores GW y/o secuenciación de plásmidos	
Nombre	Secuencia 5' ---→ 3'
SM3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCATGATCTCGTCCAAAAACGGAGCTGCCATGATCTCCCGACCTGT C
SM4	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATCTGTTCATGTGGGAATTCAGGTCGTTTTCCAACACCTTGA AGTGTGTGGC
SM5	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCTGTTCATGTGGGAATTCAGGTCGTTTTCCAACACCTTGAAGT GTTGTGGC
SM8	ATGATCTCGTCCAAAAACG
SM9	TTATCTGTTCATGTGGGAATTC
SM10	TCTGTTCATGTGGGAATTCAG
SM41-F-HEXO1	ATGTCAACGAATCTTCTTCGTC
SM41-R-HEXO1	CTGAGCATAGCAAGAGCCAGGTC
SM42-F-bis-GW-HEXO1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCATGTCAACGAATCTTCTTCGTCCTTATCTCCTATTTCATCAC
SM42-R-bis-GW-HEXO1	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACTGAGCATAGCAAGAGCCAGGTCCTCAAG
SM42-R-bis-GW-stop-HEXO1	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACTGAGCATAGCAAGAGCCAGGTCCTCAAGG
SM43-F-HEXO2	ATGCTAACTCTTCCAAGTTTC
SM43-R-HEXO2	TTGATCTTGAAGAGCACCATGG

SM44-F-GW-HEXO2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCATGCTAACTCTTTCCAAGTTTC
SM44-R-GW-HEXO2	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTGATCTTGAAGAGCACCATGG
SM44-R-GW-stop-HEXO2	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATTGATCTTGAAGAGCACCATGG
SM45-F-HEXO3	ATGAGAGGTAGCGGAGCAAAGATC
SM45-R-HEXO3	CTGAGCGAGACAAGAACCTGGTTC
SM46-F-GW-HEXO3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCATGAGAGGTAGCGGAGCAAAGATCGCCGGCGTTTGGCCGTTG
SM46-R-GW-HEXO3	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTGAGCGAGACAAGAACCTGGTTC
SM46-R-GW-stop-HEXO3	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACTGAGCGAGACAAGAACCTGGTTCAAAAGGCACAACCTCGT
SM53-H1-secu-F	GGAAAGGAGCTTATTCGAGATG
SM53-H1-secu-R	GAAATCACATCGAATGTAAG
SM54-H2-secu-F	CCTGGTCATACAGGATCATG
SM54-H2-secu-R	GATTAACGATATCTTGATGACG
SM55-H3-secu-F	CTTACTCTTCCTCTCAGCGATAC
SM55-H3-secu-R	GAATGTGAAGTCACTGCTCAC
M13-F	GTA AACGACGGCCAG
M13-R	CAGGAAACAGCTA
attL1-F	CTACAAACTCTTCCTGTTAGTTAG
attL2-R	ATGGCTCATAACACCCCTTG
Generación de cDNA y qPCR^b	
Nombre	Secuencia 5' ---→ 3'
Q29-F	<u>GCAACACCTCTACAATGTGATAACCGACTGATG</u> CAGGAACTGGAGCAAGC
Q30-F	CTCTACAATGTGATAACCGACTGATG
Q31-R	CGCCGCTCTTTGGGATGAA

^aLos codones mutadores aparecen subrayados y en negrita

^bLa etiqueta no viral introducida se muestra en negrita y el final de la cola del oligo aparece subrayado

Anexo 4. Mutaciones artificiales/espontáneas en la CP del PPV que se han generado/encontrado en esta tesis

Aislado	Mutación	Codón mutador ^a	Codón silvestre	Nº de cambios
PPV-R	S25D	GAT	AGC	3
	S25D (en 4SD)	GAC		2
	S25A (en 4SA)	GCC		2
	S81D	GAC	TCA	3
	S81D (en 4SD)	GAT		3
	S81A (en 4SA)	GCA		1
	S101D	GAC	TCA	3
	S101D (en 4SD)	GAT		3
	S101A (en 4SA)	GCA		1
	S118D	GAT	TCT	2
	S118D (en 4SD)	GAT		2
	S118A (en 4SA)	GCT		1
	T254A	GCA	ACA	1
	T254D	GAT		3
	T254T*	ACC		1
	T254K	AAA		1
	T304A	GCA	ACA	1
	T304D	GAT		3
	T304N	AAT		2
	T313A	GCC	ACC	1
T313D	GAC	2		
T313N	AAC	1		
PPV-SwCM	T306A	GCA	ACA	1
	T306D	GAT		3
	T306N	AAT		2
PPV-BOR-3	D264K	AAG	GAT	2

Aislado	Mutación	Codón mutante ^b	Codón silvestre o artificial	Nº de cambios
PPV-R	P67S	TCT	CCT	1
	D118G	GGT	GAT	1
	D118N	AAT		1
	E235G	GGA	GAA	1
	R237Q	CAA	CGA	1
	D254I	ATT	GAT	2
	D254N	AAT		1
	T254K	AAA	ACA	1
	T254R	AGA		1
	Y266F	TTC	TAC	1
PPV-SwCM	N301K	AAA	AAC	1
	I77S	ATT	AGT	1
	N88D	AAT	GAT	1
	L121F	CTC	TTC	1
	A128T	GCC	ACC	1
	T273K	ACA	AAA	1
A306T	GCA	ACA	1	

^aLos nucleótidos mutados artificialmente se marcan en rojo y ^blos mutados espontáneamente en azul

Anexo 5. Residuos esporádicamente detectados fosforilados en la CP de viriones de PPV-R mediante TTOF de alta resolución y/o ETD-trampa iónica de baja resolución

M	25	71	81	101	106	118	254	313
WT 1	<ul style="list-style-type: none"> ▫ [1-39]; 9/32 [12-39]; 3/9 [20-39]; 0/3 [24-39]; 1/4 [25-39]; 0/4 	[71-93]; 5/8	<ul style="list-style-type: none"> ▫ [71-93]; 5/8 [73-93]; 0/1 [74-93]; 1/2 [75-93]; 1/1 [80-93]; 3/5 [81-93]; 0/2 	<ul style="list-style-type: none"> [94-105]; 0/3 ▫ [94-109]; 9/40 [95-109]; 0/1 ▫ [96-109]; 2/15 [97-109]; 0/3 [99-109]; 0/2 [101-109]; 0/2 	<ul style="list-style-type: none"> [94-109]; 9/40 [95-109]; 0/1 [96-109]; 2/15 [97-109]; 0/3 [99-109]; 0/2 [101-109]; 0/2 	-	[252-260]; 0/10 [253-260]; 0/2	[295-319]; 0/6
WT 2-1	-	-	-	<ul style="list-style-type: none"> ▫ [94-109]; 2/4 [96-109]; 0/2 	<ul style="list-style-type: none"> [94-109]; 2/4 [96-109]; 0/2 	[117-121]; 0/1	* [252-260]; †1/6	-
WT 2-2	-	[71-93]; 5/6	<ul style="list-style-type: none"> ▫ [71-93]; 5/6 [72-93]; 1/1 [73-93]; 2/3 [74-93]; 2/3 [75-93]; 0/1 [76-93]; 2/3 [77-93]; 1/1 [78-93]; 2/2 [80-93]; 1/2 	<ul style="list-style-type: none"> [94-105]; 0/1 ▫ [94-109]; 8/12 [96-109]; 2/7 ▫ [96-109]; 2/7 [97-109]; 0/1 [99-109]; 0/2 [100-109]; 0/1 [101-109]; 0/2 	<ul style="list-style-type: none"> [94-109]; 8/12 [96-109]; 2/7 [97-109]; 0/1 [99-109]; 0/2 [100-109]; 0/1 [101-109]; 0/2 	<ul style="list-style-type: none"> ▫ [112-121]; 5/5 [114-121]; 1/1 	* [252-260]; †3/16 [253-260]; 0/1	[295-319]; 0/1
WT 3	<ul style="list-style-type: none"> ▫ [1-39]; 20/50 [20-39]; 0/2 	[60-93]; 1/3 [71-93]; 4/7 [71-95]; 2/4	<ul style="list-style-type: none"> ▫ [60-93]; 1/3 [71-93]; 4/7 [71-95]; 2/4 	<ul style="list-style-type: none"> [91-109]; 0/2 [94-105]; 0/1 ▫ [94-109]; 10/33 [96-109]; 0/9 [97-109]; 0/1 [99-109]; 0/2 	<ul style="list-style-type: none"> [91-109]; 0/2 [94-105]; 0/1 [94-109]; 10/33 [96-109]; 0/9 [97-109]; 0/1 [99-109]; 0/2 	<ul style="list-style-type: none"> ▫ [112-121]; 5/5 	[250-260]; 0/2 [252-260]; 0/17 [252-261]; 0/1 [253-260]; 0/2	* [290-319]; §1/12 [295-319]; 0/8
4SA 1	[1-39]; 0/28	[60-93]; 0/2 [71-93]; 0/2	<ul style="list-style-type: none"> [60-93]; 0/2 [71-93]; 0/2 [73-93]; 0/1 [76-93]; 0/1 [78-93]; 0/1 [80-93]; 0/1 	<ul style="list-style-type: none"> [94-105]; 0/1 [94-109]; 0/15 [96-105]; 0/1 [96-109]; 0/6 [97-109]; 0/1 [99-109]; 0/1 	<ul style="list-style-type: none"> [94-105]; 0/1 [94-109]; 0/15 [96-105]; 0/1 [96-109]; 0/6 [97-109]; 0/1 [99-109]; 0/1 	-	* [252-260]; 2/12 [253-260]; 0/1	[295-319]; 0/8
4SA 2	[1-39]; 0/39 [20-39]; 0/4	[37-93]; 0/1 [40-93]; 0/4 [41-93]; 1/1 [47-93]; 0/1 [48-93]; 0/1 [50-93]; 0/2 [53-93]; 0/4 [60-93]; 0/3 [61-93]; 1/1 [63-93]; 0/1 [65-93]; 1/1 [66-93]; 0/3 * [71-93]; 2/8 [71-95]; 0/2	<ul style="list-style-type: none"> [37-93]; 0/1 [40-93]; 0/4 [41-93]; 1/1 [47-93]; 0/1 [48-93]; 0/1 [50-93]; 0/2 [53-93]; 0/4 [60-93]; 0/3 [61-93]; 1/1 [63-93]; 0/1 [65-93]; 1/1 [66-93]; 0/3 * [71-93]; 2/8 [71-95]; 0/2 	<ul style="list-style-type: none"> [93-109]; 0/2 [94-105]; 0/4 [94-106]; 0/1 * [94-109]; 1/74 [96-109]; 0/13 [98-109]; 0/1 [99-109]; 0/2 [101-109]; 0/1 [102-109]; 0/2 	<ul style="list-style-type: none"> [93-109]; 0/2 [94-105]; 0/4 [94-106]; 0/1 * [94-109]; 1/74 [96-109]; 0/13 [98-109]; 0/1 [99-109]; 0/2 [101-109]; 0/1 [102-109]; 0/2 	-	[251-260]; 0/1 * [252-260]; 1/26 [253-260]; 0/2	[290-319]; 0/1 * [295-319]; 1/29 [295-320]; 0/2 [297-319]; 0/1 [300-319]; 0/1 [302-319]; 0/2

<p>4SA 3</p>	<p>[1-39]; 0/36 [2-39]; 0/1 [3-39]; 0/1 [15-39]; 0/1 [20-39]; 0/3</p>	<p>[40-93]; 0/3 [53-93]; 0/3 [55-93]; 0/2 [60-93]; 0/3 [63-93]; 0/1 [71-93]; 0/3 [71-95]; 0/2 [71-109]; 0/2 [73-93]; 0/2 [74-93]; 0/1 [76-93]; 0/2 [76-109]; 0/1 [78-93]; 0/2 [80-93]; 0/2</p>	<p>[72-93]; 0/3 [73-93]; 0/5 [74-93]; 0/3 [75-93]; 0/1 [76-93]; 0/3 [77-93]; 0/2 [78-93]; 0/1 [79-93]; 0/1 [80-93]; 0/2</p>	<p>[71-109]; 0/2 [76-109]; 0/1 [78-109]; 0/1 [85-109]; 0/2 [87-109]; 0/5 [90-109]; 0/2 [91-109]; 0/2 [93-109]; 0/1 [94-109]; 0/108 [96-109]; 0/9 [98-109]; 0/1 [99-109]; 0/2</p>	<p>[71-109]; 0/2 [76-109]; 0/1 [78-109]; 0/1 [85-109]; 0/2 [87-109]; 0/5 [90-109]; 0/2 [91-109]; 0/2 [93-109]; 0/1 [94-109]; 0/108 [96-109]; 0/9 [98-109]; 0/1 [99-109]; 0/2</p>	<p>[251-260]; 0/2 [252-260]; 0/19 [252-261]; 0/1 [253-260]; 0/3 [254-260]; 0/1</p>	<p>[295-319]; 0/25 [297-319]; 0/1 [300-319]; 0/1 [312-328]; 0/1</p>	
<p>4SA 4</p>	<p>[1-39]; 0/28 [20-39]; 0/2</p>	<p>[60-93]; 0/4 [71-93]; 0/3</p>	<p>[60-93]; 0/4 [71-93]; 0/3 [73-93]; 0/1</p>	<p>[94-109]; 0/18 [96-109]; 0/7 [97-109]; 0/1 [99-109]; 0/1 [101-109]; 0/1 [104-109]; 0/1</p>	<p>[94-109]; 0/18 [96-109]; 0/7 [97-109]; 0/1 [99-109]; 0/1 [101-109]; 0/1 [104-109]; 0/1</p>	<p>[252-259]; 0/1 [252-260]; 0/22 [252-261]; 0/1 [253-260]; 0/3 [254-260]; 0/2</p>	<p>[295-319]; 0/9</p>	

En la tabla se muestran los distintos péptidos identificados por MS en la CP de PPV-R silvestre (WT) y en la del mutante 4SA (en el que se habían sustituido por alanina las serinas fosforilables 25, 81, 101 y 118), que albergan alguno de los ocho residuos fosforilables detectados en la proteína (S25, T71, S81, S101, T106, S118, T254 y T313). Los péptidos que contienen más de uno de esos potenciales sitios de fosforilación se incluyen en las columnas correspondientes a cada uno de ellos. Al lado de cada péptido se muestra el ratio entre el número de veces en que se detectó modificado por fosforilación en alguno de sus aminoácidos y el número total de veces detectado (modificado o no por fosforilación). Se señalan los péptidos cuyos espectros de fragmentación permitieron identificar los aminoácidos S25, S81, S101 y S118 (R), y T71, T106, T254 y T313 (*) fosforilados. Aunque no todos los espectros de fragmentación de esos péptidos permiten la identificación inambigua de su sitio fosforilado, en el caso de los péptidos [71-93], [94-109] y [96-109] de la CP del virus silvestre, el análisis manual de los espectros excluye la posibilidad de que estén fosforilados en T71 y T106. Los listados de péptidos de cada muestra (M) se obtuvieron utilizando el motor de búsqueda Mascot sin aplicar restricción enzimática con un umbral de confianza de 30 excepto en los casos indicados con \$, † (en azul), en los que fue necesario reducir el umbral a 20, o bien para identificar el péptido fosforilado y mapear su residuo modificado (\$), o para localizar la diana de fosforilación del péptido identificado con el umbral de 30 (†). Se muestran los resultados de 3 réplicas biológicas (4 réplicas técnicas) de viriones silvestres y de 4 réplicas biológicas de viriones del mutante 4SA. Las celdas coloreadas de gris indican que en esa muestra se identificó al menos un péptido fosforilado en el que se pudo mapear con fiabilidad alguna de las nuevas dianas (T71, T106, T254 o T313) encontradas inicialmente en el mutante 4SA. (-) No se recuperaron péptidos que albergaran esa posición.

Anexo 6. Residuos detectados fosforilados en la CP de viriones obtenidos de distintos huéspedes y pertenecientes a distintos aislados del PPV mediante TTOF de alta resolución

M	25/30	62/64	71/73	81/83	101/103	106/108	118/120	254/256	304/306	313/315
PPV-R (A.t)	[1-39]; 10/21 [2-39]; 1/1 [3-39]; 3/4	[50-109]; 1/1	[50-109]; 1/1 [66-93]; 1/1 *[70-93]; 1/1 [71-93]; 2/2	[50-109]; 1/1 [66-93]; 1/1 [70-93]; 1/1 *[71-93]; 2/2 *[73-93]; 3/4 *[73-95]; 1/1 *[73-109]; 1/1 *[74-109]; 1/1 *[75-93]; 1/1 *[75-109]; 1/1 *[76-93]; 2/3 [76-109]; 2/2 [77-109]; 1/1 [80-109]; 1/1	[50-109]; 1/1 [73-109]; 1/1 [74-109]; 1/1 [75-109]; 1/1 [76-109]; 2/2 [77-109]; 1/1 [80-109]; 1/1 [85-109]; 0/1 *[87-109]; 1/3 [88-109]; 0/3 [90-109]; 0/1 *[91-109]; 1/3 [93-109]; 0/1 [94-109]; 2/5 [95-109]; 0/1 [96-109]; 2/4 [97-109]; 0/2 [99-109]; 0/1	[50-109]; 1/1 [73-109]; 1/1 [74-109]; 1/1 [75-109]; 1/1 [76-109]; 2/2 [77-109]; 1/1 [80-109]; 1/1 [85-109]; 0/1 *[87-109]; 1/3 [88-109]; 0/3 [90-109]; 0/1 *[91-109]; 1/3 [93-109]; 0/1 [94-109]; 2/5 [95-109]; 0/1 [96-109]; 2/4 [97-109]; 0/2 [99-109]; 0/1	*[110-121]; 2/3 *[110-123]; 1/1 *[112-121]; 7/8 *[112-123]; 6/6 *[112-125]; 1/1	[247-260]; 0/1 [252-260]; 0/5 *[252-260]; 63/3 [253-260]; 0/1	[285-319]; 0/1 [290-311]; 0/2 [290-313]; 0/3 [290-328]; 0/4 [290-330]; 0/1 [294-319]; 0/1 [295-319]; 0/6 [295-328]; 0/2 [295-330]; 0/4 [312-328]; 0/1 [312-330]; 0/1	[285-319]; 0/1 [290-311]; 0/2 [290-313]; 0/3 [290-328]; 0/4 [290-330]; 0/1 [294-319]; 0/1 [295-319]; 0/6 [295-328]; 0/2 [295-330]; 0/4
PPV-R (P.p) 1-1	[1-39]; 2/7	-	-	-	*[94-109]; 3/7 [96-109]; 0/3	[94-109]; 3/7 [96-109]; 0/3	-	[252-260]; 0/6	[295-311]; 0/4 [295-319]; 0/3 [300-311]; 0/1	[295-319]; 0/3
PPV-R (P.p) 1-2	-	-	[71-93]; 1/2	[71-93]; 1/2 [73-93]; 2/4 *[73-95]; 1/1 [74-93]; 1/1 [76-93]; 3/4 *[76-95]; 2/2 [78-93]; 0/1 [80-93]; 1/2	[94-105]; 0/1 [94-109]; 1/4 *[96-109]; 1/4 [99-109]; 0/1 [100-109]; 0/1	[94-109]; 1/4 [96-109]; 1/4 [100-109]; 0/1	*[112-121]; 1/1	*[252-260]; 1/8 [253-260]; 0/1	[295-311]; 0/1 [300-311]; 0/1	-
PPV-R (P.p) 2	-	-	[71-93]; 3/3	[71-93]; 3/3 [73-93]; 3/5 *[73-95]; 1/2 [74-93]; 1/1 [75-93]; 0/1 [76-93]; 2/2 *[76-95]; 1/1 [77-93]; 1/1 [78-93]; 0/1 [80-93]; 1/2 [81-93]; 1/1	[94-105]; 0/1 *[94-109]; 3/6 *[96-109]; 2/4 [97-109]; 0/1 [101-109]; 0/1	[94-109]; 3/6 [96-109]; 2/4 [97-109]; 0/1 [101-109]; 0/1	*[112-121]; 1/1	*[252-260]; 1/10 [253-260]; 0/1 [254-260]; 0/1	[295-311]; 0/3	-

PPV-SwCM (N.b) 1-1	-	N.F.	[73-94]; 0/1	[81-94]; 0/1	[95-111]; 0/1 [96-107]; 0/1 [96-111]; 0/11 [98-111]; 0/4	[95-111]; 0/1 [96-111]; 0/11 [98-111]; 0/4	*[114-123]; 1/1	[254-262]; 0/10 [255-262]; 0/1	*[297-313]; 1/7 [297-321]; 0/2	[297-321]; 0/2
PPV-SwCM (N.b) 1-2	-	N.F.	-	*[80-94]; 1/1 [80-95]; 1/1 [81-94]; 0/1 [82-94]; 1/2	[96-107]; 0/3 [96-111]; 0/1 [98-107]; 0/1 [98-111]; 0/1	[96-111]; 0/1 [98-111]; 0/1	*[114-123]; 2/2	[252-262]; 0/1 *[254-262]; 1/9 [255-262]; 0/1 [256-262]; 0/1	[297-313]; 0/2	-
PPV-BOR-3 (N.c) 1	N.F.	-	[71-93]; 0/1	[76-93]; 2/4 [78-93]; 0/1 [79-93]; 0/2 *[80-93]; 2/5 [81-93]; 0/2	[94-105]; 0/3 [94-109]; 0/9 [96-109]; 0/5 *[100-109]; 1/5	N.F.	*[112-121]; 7/9	[252-260]; 0/22 [253-260]; 0/2	[295-311]; 0/5 [295-319]; 0/3	[295-319]; 0/3
PPV-BOR-3 (N.c) 2	N.F.	-	-	[81-93]; 0/1	[94-109]; 0/1 [96-109]; 0/1 *[100-109]; 3/6	N.F.	*[112-121]; 6/6	*[252-260]; 2/11 [253-260]; 0/2	[295-319]; 0/2	[295-319]; 0/2
PPV-BOR-3 (N.b) 3	N.F.	*[53-93]; 1/2	[71-93]; 3/5	*[71-93]; 3/5 [76-93]; 1/3 [79-93]; 0/1 [80-93]; 0/2	[94-105]; 0/2 [94-109]; 0/7 [96-109]; 0/5	N.F.	*[112-121]; 2/2	[251-260]; 0/1 [252-260]; 0/12 [253-260]; 0/1	[295-311]; 0/5 [295-319]; 0/4	[295-319]; 0/4

En la tabla se muestran los distintos péptidos identificados por MS en la CP de viriones obtenidos de distintos huéspedes y aislados del PPV, los cuales albergan los diez residuos que han podido detectarse fosforilados en la proteína (S25, S62, T/S71, S81, S101, T106, S118, T254, T304 y T313 en la CP de PPV-R/PPV-BOR-3 o sus equivalentes en la CP de PPV-SwCM, S30, A64, S73, T83, T103, S106, S120, T256, T306 y T315). Los péptidos que albergan más de uno de esos potenciales sitios de fosforilación se incluyen en las columnas correspondientes a cada uno de ellos. Al lado de cada péptido se muestra el ratio entre el número de veces en que se detectó modificado por fosforilación en alguno de sus aminoácidos y el número total de veces detectado (modificado o no por fosforilación). Se señalan los péptidos cuyos espectros de fragmentación permitieron identificar los aminoácidos diana (*). Aunque no todos los espectros de fragmentación de esos péptidos permiten la identificación inambigua de su sitio fosforilado, en el caso de los péptidos que contienen las dianas 71 y 106 (o 73 y 108 en PPV-SwCM), el análisis manual de los espectros excluye la posibilidad de que estén fosforilados en T/S71 y T106 (exceptuando el caso de *A. thaliana*, donde se detectó la T71 fosforilada). Los listados de péptidos que aparecen para cada muestra (M) se obtuvieron utilizando el motor de búsqueda *Mascot* con un umbral de confianza de CP-R de *A. thaliana* y *P. persica*, respectivamente, y con un valor por encima de 29 y 30 para las muestras de CP-SwCM y CP-BOR-3, respectivamente. No se aplicó restricción enzimática. En un caso (S, en azul) fue necesario reducir el umbral de confianza de la búsqueda *Mascot* a 20 para identificar el péptido fosforilado y mapear su residuo modificado. Se muestran los resultados procedentes de 1 réplica biológica de viriones CP-R obtenidos de *A. thaliana*, de 2 réplicas biológicas (3 réplicas técnicas) de viriones CP-R obtenidos de *P. persica*, de 1 réplica biológica de viriones CP-SwCM obtenidos de *N. benthamiana*, de 2 réplicas biológicas de viriones CP-BOR-3 obtenidos de *N. cleavelandii* y de 1 réplica biológica de viriones CP-BOR-3 obtenidos de *N. benthamiana*. Los distintos huéspedes a partir de los que se obtuvieron los viriones se indican con A.t para *A. thaliana*, P.p para *P. persica*, N.b para *N. benthamiana* y N.c para *N. cleavelandii*. Las celdas coloreadas de gris indican que se ha identificado al menos un péptido fosforilado en el que se ha podido mapear con fiabilidad la diana correspondiente a esa posición. (N.F.) Residuo no fosforilable en ese aislado del PPV. (-) No se recuperaron péptidos que albergaran esa posición.

	S118	N228	T254	T313
<i>Plum pox virus</i>	... T S K L S L P K V ...	H F S N V A R E A ...	R N L T O Y S L ...	E R H T A G D V ...
<i>Pokeweed Mosaic Virus</i>	... I S K M S L P K L ...	H F S D L R E A R ...	R N L T O M T L ...	E R H T A E D V ...
<i>Wild tomato mosaic virus</i>	... S S K L T L P K T ...	H F S N L R E A R ...	R N L T O M S L ...	E R H T A E D V ...
<i>Daphne virus Y</i>	... S S S L M L P M F ...	H F S N V A R E A ...	R N L T O M S L ...	E R H T A A D V ...
<i>Zucchini shoestring virus</i>	... N D K M L L P K V ...	H F S N A R E A R ...	R N L T D I S L ...	E R H T V E D V ...
<i>Papaya ringspot virus</i>	... T D K M I L P R T ...	H F S N A R E A R ...	R N L T D I S L ...	E R H T V E D V ...
<i>Wild melon vein banding virus</i>	... N D K M M L P R V ...	H F S N A R E A R ...	R N L T D I S L ...	E R H T V E D V ...
<i>Papaya ringspot virus</i>	... T D K M V L P R I ...	H F S N A R E A R ...	R N L T D I S L ...	E R H T V E D V ...
<i>Algerian watermelon mosaic virus</i>	... N D R M M L P R S ...	H F S N A R E A R ...	R N L T D I S L ...	E R H T V D D V ...
<i>Platygodon mild mottle virus</i>	... S S K L A L P R V ...	H F S P L R E A R ...	R N L T O M S L ...	E R H T A N D V ...
<i>Hubei poty-like virus 1</i>	... S S K L N L P K I ...	H F S Q V A R E A ...	R N L T O Y G L ...	E R H T A G D V ...
<i>Lily yellow mosaic virus</i>	... L S K L H L P R V ...	H F S S L R E A R ...	R N L T O M S L ...	E R H T A Q D V ...
<i>Dasheen mosaic virus</i>	... S S K L R L P K V ...	H F S D L S E S ...	R N L T D V S L ...	E H P T S G D V ...
<i>Cucurbit vein banding virus</i>	... H T G H R L P K S ...	H F S D A R E A R ...	R N L T O M S L ...	E R H T A H D V ...
<i>Turnip mosaic virus</i>	... T S K M R V P R Y ...	H F S D V A R E A ...	R N L T O M S L ...	E R H T E D V ...
<i>Tobacco etch virus</i>	... A T K Q V P R M ...	H F S D L R E A R ...	R N L T O M S L ...	E R H T A H D V ...
<i>Pecan mosaic-associated virus</i>	... T G K T R L P R M ...	H F S D A R E A R ...	R G L N D R N L ...	E R H T T O D V ...
<i>Johansgrass mosaic potyvirus</i>	... S P K M R L P M V ...	H F S D A R E A R ...	R N L N O K S L ...	E R H T A A D V ...
<i>Banana bract mosaic virus</i>	... T G K M R L P R Y ...	H F S D A R E A R ...	R G L N D I S L ...	E R H T V E D V ...
<i>Lettuce mosaic virus</i>	... T Q K M K L P H I ...	H F S D A R E A R ...	R G L N D M G L ...	E R H T A A D V ...
<i>Sudan watermelon mosaic virus</i>	... A N N M K L P K V ...	H F S N L A R E A ...	R G L V O R N L ...	E R H T V D D V ...
<i>Moroccan watermelon mosaic virus</i>	... N D K M I L P R I ...	H Y S N A R E A R ...	R N L K D I S L ...	E R H T V D D V ...
<i>Potato virus A</i>	... N D K M I L P R V ...	H Y S N A R E A R ...	R N L R D I S L ...	E R H T V D D V ...
<i>Potato yellow blotch virus</i>	... T S K L T L P M L ...	H F S A L A R E A ...	R N L R Q Q S L ...	E R H T A T D V ...
<i>Potato virus Y</i>	... A S K L T L P T L ...	H F S E L A R E A ...	R N L R Q Q S L ...	E R H T A S D V ...
<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	... T S K M R M P K S ...	H F S D V A R E A ...	R N L R D G S L ...	E R H T E D V ...
<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>	... T K K M S L P R V ...	H F S D A R E A R ...	R N L R D R S L ...	E R H T A R D V ...
<i>Pleione flower breaking virus</i>	... S A K I R M P K H ...	H F S D V A R E A ...	R N L R D P S L ...	E R H T A E D V ...
<i>Keunjong mosaic virus</i>	... A K G M R M P R V ...	H F S D A R E A R ...	R N L R Q Q S L ...	E R H T A D V ...
<i>Gomphocarpus mosaic virus</i>	... G R N M K M P K V ...	H F S D A R E A R ...	R N L R D V S L ...	E R H V A T D V ...
<i>Beet mosaic virus</i>	... G S S M K M P K T ...	H F S D A R E A R ...	R N L R D A S L ...	E R H V A T D V ...
<i>Sunflower ring blotch virus</i>	... S - K M R M P V S ...	H F S D A R E A R ...	R N L R D R T L ...	E R H T A T D V ...
<i>Bidens mosaic virus</i>	... T S K M R M P K A ...	H F S D V A R E A ...	R N L R D M S L ...	E R H T E D V ...
<i>Bean common mosaic virus</i>	... T S K M R M P K S ...	H F S D V A R E A ...	R N L R D M S L ...	E R H T E D V ...
<i>Peanut stripe virus</i>	... T K R M N L P M V ...	H F S D A R E A R ...	R N L R D K S L ...	E R H T A R D V ...
<i>Staffion latent virus</i>	... T K R M N L P M W ...	H F S D A R E A R ...	R N L R D K N L ...	E R H T A R D V ...
<i>Soybean mosaic virus</i>	... T K R M N L P T V ...	H F S D A R E A R ...	R N L R D R S L ...	E R H T A K D V ...
<i>Telfairia mosaic virus</i>	... T R K M N L P M V ...	H F S D A R E A R ...	R N L R D R E L ...	E R H T A R D V ...
<i>Paris mosaic necrosis virus</i>	... T K K M N L P M V ...	H F S D A R E A R ...	R N L R D K S L ...	E R H T A R D V ...
<i>Watermelon mosaic virus</i>	... T K K M N L P T W ...	H F S D A R E A R ...	R N L R D K S L ...	E R H T A R D V ...

Anexo 8. Alineamiento de secuencias de la región central de la CP provenientes de 41 virus del género *Potyvirus*. En rojo se indican los fosfo-residuos encontrados en la región central de la CP de PPV-R (S118, T254 y T313) y en negro se marca el residuo N228, homólogo a D180 en la CP de WMV, el cual parece ser importante en las interacciones entre los monómeros de CP. Las proteínas fueron alineadas utilizando el método MUSCLE (Edgar, 2004) integrado en el programa DNASTAR (<https://www.dnastar.com>, Burland, 2000).