



**IBMCP**  
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

# Proteínas de movimiento de la familia 30K: interacción con membranas biológicas y factores proteicos y su implicación en el transporte viral

Memoria presentada por  
ANA PEIRÓ MORELL

para optar al grado de  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

Directores  
Profesor VICENTE PALLÁS BENET  
Doctor JESÚS ÁNGEL SÁNCHEZ NAVARRO

Noviembre 2014



Esta Tesis Doctoral se ha realizado con la financiación del proyecto: "Tráfico intracelular, intercelular y vascular de RNAs y proteínas virales y subvirales en plantas" del Ministerio de Ciencia e Innovación- Programa Biotecnología (BIO 2011-25018) y con la Beca del Programa JAE-PreDoc del CSIC.



# ÍNDICE

---



<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>19</b>
<b>1.- EL CONCEPTO DE VIRUS</b>	<b>21</b>
<b>2.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS VIRUS DE PLANTAS</b>	<b>23</b>
<b>3.- CICLO INFECTIVO DE UN VIRUS DE PLANTAS</b>	<b>24</b>
3.1. Entrada y desensamblaje de la cubierta viral	
3.2. Expresión y replicación del genoma viral	
3.3. Movimiento viral	
<b>4.- LAS PROTEÍNAS DE MOVIMIENTO</b>	<b>29</b>
4.1. Características y clasificación de las MPs	
4.2. Modelos de sistemas de transporte célula a célula	
4.2.1. Transporte intracelular	
4.2.2. Los plasmodesmos	
4.2.3. Transporte intercelular	
- Movimiento basado en la formación de complejos ribonucleoproteicos: el <i>Virus del mosaico del tabaco</i> (TMV)	
- Movimiento viral guiado por túbulos	
4.3. Movimiento sistémico	
4.4. Las MPs como determinantes de la especificidad del huésped	
<b>5.- LAS MPs COMO DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD</b>	<b>58</b>
<b>6.- GENES DE RESISTENCIA</b>	<b>63</b>
6.1. Barreras frente a patógenos	
6.2. Genes de resistencia	
- Gen de resistencia Sw-5	
<b>7.- TOPOLOGÍA DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA</b>	<b>68</b>
7.1. Clasificación	

<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>71</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>75</b>
The <i>Tobacco mosaic virus</i> movement protein associates with but does not integrate into biological membranes	
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>103</b>
Systemic transport of <i>Alfalfa mosaic virus</i> can be mediated by the movement proteins of several viruses assigned to five genera of the 30K family	
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>119</b>
Patellins 3 and 6, two members of the plant patellin family, interact with the movement protein of <i>Alfalfa mosaic virus</i> and interfere with viral movement	
<b>CAPÍTULO 4</b>	<b>143</b>
The movement protein (NSm) of <i>Tomato spotted wilt virus</i> is the avirulence determinant in the tomato <i>Sw-5</i> gene-based resistance	
<b>DISCUSIÓN FINAL</b>	<b>169</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>179</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>183</b>



# **ABREVIATURAS**

---



## **VIRUS**

AMV	<i>Alfalfa mosaic virus (Virus del mosaico de la alfalfa)</i>
AbMV	<i>Abutilon mosaic virus (Virus del mosaico del abutilón)</i>
ACLSV	<i>Apple chlorotic leaf spot virus (Virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano)</i>
BMV	<i>Brome mosaic virus (Virus del mosaico del bromo)</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus (Virus del mosaico de la coliflor)</i>
CarMV	<i>Carnation mosaic virus (Virus del moteado del clavel)</i>
CCMV	<i>Cowpea chlorotic mottle virus (Virus del moteado clorótico del caupí/chícharo)</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus (Virus del mosaico del pepino)</i>
CPMV	<i>Cowpea mosaic virus (Virus del mosaico del chícharo)</i>
GFLV	<i>Grapevine fanleaf virus (Virus del entrenudo corto infeccioso de la vid)</i>
GRV	<i>Groundnut rosette virus (Virus de la roseta del cacahuete)</i>
MNSV	<i>Melon necrotic spot virus (Virus de las manchas necróticas del melón)</i>
ORSV	<i>Odontoglossum ringspot virus (Virus de las manchas anulares del odontoglossum)</i>
PMTV	<i>Potato mop-top virus (Virus del mop-top de la patata)</i>
PNRSV	<i>Virus de los anillos necróticos de los prunus (Virus de los anillos necróticos de los prunus)</i>
TCV	<i>Turnip crinkle virus (Virus del arrugamiento del nabo)</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus (Virus del mosaico del tabaco)</i>
ToMV	<i>Tomato mosaic virus (Virus del mosaico del tomate)</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus (Virus del bronceado del tomate)</i>
TuYMV	<i>Virus del mosaico amarillo del nabo (Turnip yellow mosaic virus)</i>

## OTRAS

aa	Amino ácidos
ANK	Ankyrin
Avr	Avirulence (Avirulencia)
BiFC	Bimolecular fluorescence complementation (Reconstitución de la fluorescencia por complementación bimolecular)
BFA	Brefeldina A
BS	Bundle sheath (Células de la vaina)
CC	Companion cell (Células acompañantes)
C-C	Coiled-coil
CLSM	Confocal laser-scanning microscopy (Microscópio confocal láser)
CP	Coat protein (Proteína de cubierta o de la cápsida)
Ca <sup>2+</sup>	Iones calcio
Ct	Carboxi terminal (Extremo carboxilo)
DCLs	Dicer-Like
DdRp	DNA dependent RNA polimerase (RNA polimerasa DNA dependiente)
DGB	Double gene block (Bloque de dos genes)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxiribonucleico)
dsRNA	Double strand RNA (RNAs de doble cadena)
dsDNA	Double strand DNA (DNAs de doble cadena)
EB1	Microtubule end-binding protein 1
ECD	Endocytosis cell signaling domain (Motivo de señalización de endocitosis)
ER	Endoplasmic reticulum (Retículo endoplasmático)
GCN	General control pathway
GFP	Green fluorescent protein (Proteína de fluorescencia verde)

HA	Hemagglutinin (Hemaglutinina)
HELD	Helicase-like domain (Dominio NTPasa/helicasa)
HR	Hydrophobic region (Región hidrofóbica)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Comité internacional de taxonomía de virus)
ID	Internal domain (Dominio interno)
KIN	Kinase (Quinasa)
Lep	Protein leader peptidase (Peptidasa de la secuencia señal de <i>E.Coli</i> )
LUC	Luciferase (Luciferasa)
LRR	Leucine rich repeats (Repeticiones ricas en leucina)
ME	Mesophyll cell (Célula del mesófilo)
MP	Movement protein (Proteína de movimiento)
mRNA	Messenger RNA (RNA mensajero)
MT	Microtúbulos
MFs	Microfilamentos
NBS	Nucleotide-binding site (Región de unión a nucleótidos)
NLS	Nuclear localization signal (Señal de localización nuclear)
NRB	Non resistance breaking (No rompe la resistencia)
Nt	Amino-terminal (Extremo amino)
NTD	Nt domain (Dominio Nt)
ORF	Open reading frame (Pauta de lectura abierta)
OD	Optical density (Densidad óptica)
PATLs	Patellinas
PD	Plasmodesmos
PDLP	Plasmodesmata located proteins (Proteínas localizadas en los plasmodesmos)
PDCB1	Callosa binding protein (Proteínas que interaccionan con la calosa)

PEST	Protein degradation domain (Dominio para la degradación de proteínas)
PK	Proteínasa K
PME	Pectin metil esterasa (Pectina metilesterasa)
PR	Pathogenesis related proteins (Proteína relacionadas con la patogénesis)
R	Resistance (Resistencia)
RB	Resistance breaking (Rompe la resistencia)
PTGS	Post-Transcriptional Gene Silencing (Silenciamiento génico postranscripcional)
RdRp	RNA dependent RNA polimerase (RNA polimerasa RNA dependiente)
RISC	RNA-induced silencing complex (Complejo de silenciamiento inducido por RNA)
RM <sub>s</sub>	Rough microsomal membranes (Membranas microsomales)
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
SA	Salicylic acid (Ácido salicílico)
SE	Sieve elements (Elementos cribosos)
SEL	Size exclusion limit (Límite del tamaño de exclusión molecular)
sgRNA	Subgenomic RNA (RNA subgenómico)
sRNA	small RNAs (Pequeños RNAs)
ssRNA	Single strand RNA (RNA de simple cadena)
ssDNA	Single strand DNA (DNA de simple cadena)
TGB	Triple gene block (Bloque de los tres genes)
TM	Transmembrane (Transmembrana)
tRNA	Transference RNA (RNA de transferencia)
vRNA	Viral RNA (RNA viral)
vRNP	Viral ribonucleoproteic complex (Complejo ribonucleoproteico viral)

VRC	Viral replication factories (Factorías de replicación viral)
VP	Vascular parenchyma (Parénquima vascular)
VPg	Viral protein (Proteína del virus unida a su genoma)
Wt	Wild type (Silvestre)
YFP	Yellow fluorescent protein (Proteína de fluorescencia amarilla)
$\Delta G_{app}$	Incremento de la energía libre aparente de Gibbs

# **RESUMEN**

---





## CASTELLANO

Para que el proceso infeccioso de un virus de plantas tenga éxito la progenie viral tiene que propagarse desde las primeras células infectadas al resto de la planta; inicialmente se moverá célula a célula a través de los plasmodesmos (PDs) hasta alcanzar el sistema vascular, lo cual le permitirá invadir las partes distales de la planta. En este proceso, las proteínas de movimiento (MPs), junto con la colaboración de otros actores secundarios, desempeñan un papel relevante. El conocimiento de la posible asociación de las MPs con estructuras u orgánulos celulares así como de la interacción con factores del huésped es de vital importancia para poder desarrollar estrategias antivirales que permitan una mejora en la producción de los cultivos. Además, este tipo de estudios no sólo han permitido alcanzar un mayor conocimiento de las respuestas al estrés en plantas sino que han sido pioneros en desentrañar los mecanismos de translocación intercelular de factores celulares implicados en los procesos de desarrollo de las plantas.

Las MPs virales se clasifican en familias/grupos en función de su grado de similitud. Los virus cuyas MPs pertenecen a la Superfamilia 30K expresan una única MP encargada de orquestar el movimiento intra- e intercelular del genoma viral. En el Capítulo 1 de la presente Tesis se ha caracterizado la asociación de la MP del *Virus del mosaico del tabaco* (TMV), miembro tipo de la familia de proteínas de movimiento 30K, al sistema de endomembranas. Mediante el uso de aproximaciones *in vivo* se ha estudiado la eficiencia de inserción de sus regiones hidrofóbicas (HRs) en la membrana del retículo endoplasmático (ER). Nuestros resultados demuestran que ninguna de las dos HRs de la MP es capaz de atravesar las membranas biológicas y que la alteración de la hidrofobicidad de la primera HR es suficiente para modificar su asociación a la membrana. En base a los resultados obtenidos, proponemos un modelo topológico en el cual la MP del TMV se encontraría fuertemente asociada a la cara citosólica de la membrana del ER, sin llegar a atravesarla. La observación de que i), el modelo propuesto es compatible con otros motivos, previamente caracterizados, de la MP de TMV y ii), concuerda con la topología descrita para otras MPs de la familia 30K, permite cuestionar el modelo establecido desde el año 2000 para la MP de TMV así

como predecir, en base a la conservada estructura secundaria de las MPs de esta familia, una topología similar para todos sus componentes.

Para el transporte intercelular de los virus de plantas se han descrito tres modelos en base a la capacidad de transportar complejos ribonucleoprotéicos, a través de PD modificados, formados por el RNA viral y la MP (ej. MP de TMV) más la proteína de cubierta (ej. MP del *Virus del mosaico del pepino*, CMV) o a la capacidad de transportar viriones a través estructuras tubulares formadas por la MP (ej. MP del *Virus del mosaico del caupí*, CPMV). A pesar de las diferencias observadas entre los tres modelos, las MPs representativas de cada uno de ellos pertenecen a la misma familia 30K y son funcionalmente intercambiables (MPs de TMV, CMV, CPMV, *Virus del mosaico del Bromo* -BMV- o *Virus de los anillos necróticos de los prunus* -PNRSV-) por la MP del *Virus del mosaico de la alfalfa* (AMV), para el transporte a corta distancia. Con el objeto de comprender la versatilidad que presentan las MPs en cuanto al movimiento viral, hemos analizado la capacidad de estas MPs heterólogas de transportar sistémicamente el genoma quimérico del AMV. El estudio ha revelado que todas las MPs analizadas permiten el transporte del genoma quimera a las partes distales de la planta, independientemente del modelo descrito para el transporte a corta distancia, aunque requieren la extensión de los 44 aminoácidos C-terminales de la MP del AMV. Además, para todas ellas, excepto para la MP del TMV, se ha establecido una relación entre la capacidad de movimiento local y la presencia del virus en las hojas no inoculadas de la planta, indicando la existencia de un umbral de transporte célula a célula, por debajo del cual, el virus es incapaz de invadir sistémicamente la planta.

Durante el proceso de infección viral, las MPs interactúan tanto con otras proteínas de origen viral como de la planta huésped. La interacción entre las MPs y dichos factores de la planta afectan a la patogénesis viral, facilitando u obstaculizando el movimiento intra- o intercelular del virus. En el Capítulo 3 del presente trabajo hemos demostrado la interacción entre la MP del AMV y dos miembros de la familia de patellinas de *Arabidopsis*, patellin 3 (atPATL3) y patellin 6 (atPATL6), mediante el sistema de los dos híbridos de levadura y ensayos de reconstitución bimolecular de la fluorescencia. Nuestros resultados, en general, demuestran que la interacción entre la MP-PATLs obstaculizaría un correcto direccionamiento de la MP al PD, dando lugar a

un movimiento intracelular menos eficiente de los complejos virales, que forma la MP, disminuyendo el movimiento célula a célula del virus. Estos resultados sugieren la existencia de un posible mecanismo de defensa de la planta, dirigido a evitar la invasión sistémica del huésped. En este sentido, las MPs virales pueden ser buenos candidatos para el desarrollo de estrategias antivirales dado que cualquier respuesta de defensa de la planta que, a priori, reduzca el transporte célula a célula del virus, puede representar la diferencia entre una infección local o sistémica, como hemos observado en el Capítulo 2 del presente trabajo. Los virus, a su vez, también son capaces de evolucionar hacia variantes más eficaces, que permitan superar las diferentes barreras defensivas de la planta huésped. En este contexto hemos identificado a la MP del *Virus del bronceado del tomate* (TSWV) como determinante de avirulencia en la resistencia mediada por el gen *Sw-5*. Del mismo modo, comprobamos que el cambio de 1-2 residuos de amino ácidos de la MP de TSWV fue suficiente para superar la resistencia pero que a la vez, y posiblemente debido a las altas restricciones que conlleva el reducido genoma de un virus, estos cambios afectaron a la eficiencia de la MP.

## VALENCIÀ

Perquè el procés infecció d'un virus de plantes tinga èxit cal que la progènie viral es propague des de les primeres cèl·lules infectades fins a la resta de la planta; inicialment, es mourà cèl·lula a cèl·lula a través dels plasmodesmes (PDs) fins assolir el sistema vascular, la qual cosa li permetrà envair les parts distals de l'hoste. En aquest procés, les proteïnes de moviment (MPs), amb la col·laboració d'altres actors secundaris, tenen una importància cabdal. El coneixement de la possible associació de les MPs amb estructures o orgànuls cel·lulars, així com de la seua interacció amb factors de l'hoste, és clau per al desenvolupament d'estratègies antivirals que permetrien una millora en la producció de cultius. Aquest tipus d'estudis han permès assolir un major coneixement de les respostes de les plantes a l'estrès i han constituït una recerca pionera per a esbrinar els mecanismes de translocació intercel·lular dels factors cel·lulars implicats en els processos de desenvolupament en plantes.

Les MPs virals es classifiquen en famílies/grups segons el seu grau de semblança. Els virus, les MPs dels quals pertanyen a la Superfamília 30K, es caracteritzen per tenir una única MP encarregada d'orquestrar el moviment intra- i intercel·lular del genoma viral. Al Capítol 1 de la present Tesi s'ha caracteritzat l'associació de la MP del *Virus del mosaic del tabac* (TMV), membre tipus de la família 30K, al sistema d'endomembranes cel·lular. Mitjançant l'ús d'aproximacions *in vivo* hem estudiat l'eficiència d'integració de les seues regions hidrofòbiques (HRs) en la membrana del reticle endoplasmàtic (ER). Els nostres resultats demostren que cap de les dues HRs de la MP és capaç de travessar les membranes biològiques i que l'alteració de la hidrofobicitat de la primera HR és suficient per a modificar la seua associació a la membrana. D'acord amb els resultats obtinguts, proposem un model topològic en el qual la MP del TMV es trobaria fortament associada a la part citosòlica de la membrana del ER, sense arribar a travessar-la. L'observació que i) el model proposat és compatible amb altres motius, prèviament caracteritzats, de la MP del TMV i ii) concorda amb la topologia descrita per a altres MPs de la família 30K, permet posar en dubte el model establert des de l'any 2000 per a la MP del TMV, així com predir, en base a l'estructura secundària conservada a les MPs d'aquesta família, una topologia similar per a tots els seus components. Pel que fa al transport intercel·lular dels virus de plantes, s'han descrit tres models pel que respecta a la capacitat de transportar complexos ribonucleoproteïcs, a través de PDs modificats, formats pel RNA viral i la MP (ex. MP del TMV) junt amb la proteïna de coberta (ex. MP del *Virus del mosaic del cogombre*, CMV) o la capacitat de transportar virions a través d'estructures tubulars formades per la MP (ex. MP del *Virus del mosaic del caupí*, CPMV). Tot i les diferències observades entre els tres models descrits, les MPs representatives de cadascun d'ells pertanyen a la mateixa família 30K i són funcionalment intercanviables (MPs de TMV, CMV, CPMV, *Virus del mosaic del bromo* -BMV- o *Virus dels anells necròtics dels prunus* -PNRSV-) per la MP del *Virus del mosaic de l'alfalfa* (AMV), per al transport a curta distància. Amb l'objectiu d'entendre la versatilitat que presenten les MPs respecte al moviment viral, hem analitzat la capacitat d'aquestes MPs heteròlogues de transportar sistèmicament el genoma quimèric del AMV. L'estudi ha mostrat—que totes les MPs analitzades permeten el transport del genoma quimèric a les parts distals de la planta, independentment del model de transport a curta distància que segueixen, encara que

necessiten l'extensió dels 44 aminoàcids C-terminals de la MP del AMV. A més a més, per a totes les MPs, excepte per a la del TMV, s'ha establert una relació entre la capacitat de moviment local i la presència del virus a les fulles no inoculades de la planta, tot assenyalant l'existència d'un llindar de transport cèl·lula a cèl·lula, per sota del qual, el virus és incapaç d'envair sistèmicament la planta.

Durant el procés d'infecció viral, les MPs interaccionen tant amb altres proteïnes d'origen víric com de la planta hoste. La interacció entre les MPs i els esmentats factors cel·lulars afecten a la patogènesi viral, facilitant o obstaculitzant el moviment intra- o intercel·lular del virus. Al Capítol 3 d'aquest treball hem demostrat la interacció entre la MP del AMV i dos membres de la família de patellines d'*Arabidopsis*, patellin 3 (atPATL3) i patellin 6 (atPATL6), mitjançant el sistema dels dos híbrids de llevat i assajos de reconstitució bimolecular de la fluorescència. En general, els nostres resultats, demostren que la interacció MP-PATLs dificultaria un correcte adreçament de la MP al PD, ocasionant un moviment intracel·lular dels complexos virals, que forma la MP, menys eficient i disminuint el moviment cèl·lula a cèl·lula del virus. Aquest procés podria constituir un possible mecanisme de defensa de la planta, que tracta d'evitar la invasió sistèmica de l'hoste. En aquest sentit, les MPs virals poden ser bones candidates per al desenvolupament d'estratègies antivirals, ja que qualsevol resposta de defensa de la planta que, inicialment, reduïska el transport cèl·lula a cèl·lula del virus, pot representar la diferència entre infectar o no sistèmicament un determinat hoste, com hem observat al Capítol 2 d'aquest treball. Els virus, alhora, també són capaços d'evolucionar cap a variants més eficaces, que permeten superar els diferents obstacles defensius de la planta hoste. En aquest context, hem identificat la MP del *Virus del bronzejat de la tomaca* (TSWV) com a determinant d'aviorulència a la resistència deguda al gen *Sw-5*. De la mateixa manera, vam comprovar que el canvi d' 1 o 2 aminoàcids a la MP del TSWV va ser suficient per a superar la resistència però alhora, i possiblement a causa de les altes restriccions que particularitza el reduït genoma del virus, aquests canvis van afectar l'eficiència de la MP.

## ENGLISH

To enable a successful infection, plant viruses must spread from the initial infected cells to the rest of the plant. Firstly, virus moves cell to cell through plasmodesmata (PDs) to reach vascular system, which allows it to infect distal parts of the plant. In this process, the viral movement proteins (MPs), with other supporting actors, play an important role. How the MPs are associated to membranous structures and organelles and which cellular factors may interact with them in the infectious process, is essential in order to develop antiviral strategies, which would permit an improvement in crop production. Moreover, these types of studies not only had made possible to expand our insight into the stress responses in plants, but also had been pioneers in unraveling the intercellular translocation mechanisms of the cellular factors implicated in the plant development.

Viral MPs are classified into families/groups depending on their degree of similarity. Viruses whose MPs belong to 30K Superfamily express a unique MP responsible to lead the intra- and intercellular movement of the viral genome. In the Chapter 1 of the present Thesis, the membrane association of the *Tobacco mosaic virus* (TMV) MP, classified as a type member of the 30K family, was characterized. *In vivo* approaches were used to study the insertion of the hydrophobic regions (HRs) assigned to TMV MP in the endoplasmic reticulum (ER). The analysis demonstrated that neither of the two HR are able to span the membrane but also that the N- and C-terminus of the MP were oriented to the cytosolic face of ER membranes. According to these results, we propose a topological model in which the TMV MP would be peripherally associated to the cytosolic surface of the ER membranes. The observation that i), the proposed model is compatible with other characteristics, previously assigned to the TMV MP and ii), it agreed with the topology described for other MPs belonging to 30K family, permits questioning the model assigned to the TMV MP since 2000. The observation that all members of the 30K family share a conserved secondary structure, permit us to predict that the topology described for the TMV MP could be extended to the rest of the members of the family.

Three different models have been described for the intracellular transport of plant virus. The classification depends on the capacity of virus to transport i)

ribonucleoprotein complexes, through modified PD, formed by viral RNA and MP (e.g. TMV MP), plus the capsid protein (CP) (e.g. MP of *Cucumber mosaic virus*, CMV), or ii) virions through tubular structures formed by the MP (e.g. MP of *Cowpea mosaic virus*, CPMV). Despite the differences observed among the three models described, the MPs representative of each model have been assigned to the 30K family and are functionally exchangeable (MPs of TMV, CMV, CPMV, *Brome mosaic virus* –BMV- or *Prunus necrotic ringspot virus* –PNRSV) by the MP of *Alfalfa mosaic virus* (AMV) for the local transport. In order to shed light on the adaptability observed in the MPs, we have analyzed their capacity to transport systemically the chimeric genome of AMV. The study revealed that all the analyzed MPs support the transport of the chimeric genome to distal parts of the plant, although they required the presence at their C terminus of the C-terminal 44 amino acids of AMV MP to permit a compatible interaction with the AMV CP. Additionally and with the exception of the TMV MP, it has been established a correlation between the capacity to move locally and the ability of virus to infect non-inoculated leaves, indicating the requirement of a minimal cell-to-cell speed to reach the upper part of the plant.

During the viral infection, MPs interact with other viral proteins as well as with cellular factors from the plant host. The interaction between MPs and plant factors may affect the viral pathogenesis, facilitating or interfering the intra- or intercellular movement of the virus. In this sense, we observed in Chapter 2, that a modification of the viral local transport may be critical to reach the upper parts of a host. In the Chapter 3, the interaction between the AMV MP and two members of the patellin family, patellin 3 (atPATL3) y patellin 6 (atPATL6), was demonstrated by using two yeast hybrids (Y2H) and the Bimolecular Fluorescence complementation (BiFC) assays. The results, in general, demonstrated that the interaction MPs- PATLs impairs the viral movement and interferes with AMV MP targeting to PD. It is tempting to speculate that the interaction could negatively affect the transport of viral complexes towards and through PDs, resulting in a less efficient intracellular viral movement. Thus, we suggest that PATLs could be acting as a defensive barrier not only against AMV infection, but also against PNRSV since we observed a similar effect with this MP. In this sense, viral MPs could result very useful in the development of antiviral strategies, since any defense mechanism with the capacity to reduce the cell to cell transport of



the virus could represent the difference between a local and systemic infection. At the same time, plant viruses are also able to evolve toward more effective variants, permitting to overcome the different defensive barriers of the host plant. In this context, the MP of TSWV was identified as the avirulence protein in the resistance mediated by the Sw-5 gene. In the same way, we identify 1-2 residues in the TSWV MP sequence responsible to overcome the resistance; however, we also observed that the critical residues affected the efficiency of the MP, probably due to the high restrictions related to the reduced genome of virus.

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**

---



## 1.- EL CONCEPTO DE VIRUS

Para apreciar lo que supuso a finales del siglo XIX el descubrimiento de un nuevo agente infeccioso, el virus, debemos considerar el conocimiento que se tenía sobre la etiología de las enfermedades por aquellos tiempos. Los primeros trabajos realizados sobre enfermedades infecciosas, permitieron en 1882 formular los postulados de Koch, los cuales revolucionaron a la comunidad científica de la época al establecer con detalle los requerimientos necesarios para la identificación del agente causal de una enfermedad: 1) El organismo debe asociarse a una enfermedad y a unos síntomas; 2) El organismo debe de ser aislado y obtenido en un cultivo puro a partir de lesiones de la enfermedad; 3) La inoculación del agente a partir del cultivo debe reproducir la enfermedad y; 4) El organismo debe de poder recuperarse nuevamente a partir de las lesiones del huésped.

Las diferentes contribuciones aportadas por tres científicos tuvieron como resultado el descubrimiento de un agente infeccioso de características fisico-químicas totalmente nuevas al que se acuñó con el nombre de virus, el *Virus del mosaico del tabaco* (*Tobacco mosaic virus*; TMV). La descripción general de la enfermedad causada por el TMV la inició Adolf Mayer, director de la Estación Experimental Agrícola de Wageningen, en los Países Bajos. En 1879, A. Mayer se interesó por la aparición de decoloraciones en hojas de plantas de tabaco, que entonces se cultivaban en Holanda. A. Mayer centró su investigación en demostrar el origen de la enfermedad, a la que denominó "mosaico del tabaco". En 1886 publicó un informe donde describía los síntomas con detalle y establecía que se trataba de una enfermedad infecciosa (Mayer, 1886). Demostró que la enfermedad podía transmitirse de unas plantas a otras a partir de un extracto de planta infectada, mediante simple frotación en las hojas de plantas sanas. Trató de averiguar el agente infeccioso causante de la enfermedad, y tras una serie de investigaciones llegó a la conclusión de que se trataba de una especie bacteriana inusualmente pequeña incapaz de cultivarse *in vitro* y de observarse al microscopio.

Pasarían años hasta que el botánico holandés Martinus Beijerinck, experto en microbiología, y por encargo de A. Mayer, retomase la búsqueda del agente causal de la enfermedad. M. Beijerinck observó que el jugo de la planta enferma era capaz de transmitir la enfermedad incluso después de pasar a través de filtros de porcelana que

eran capaces de retener todas las bacterias aerobias posibles. Pero M. Beijerinck fue más allá y demostró que la infectividad del jugo extraído de una planta enferma permanecía constante durante diferentes pases seriados a plantas de tabaco, lo que descartaba la implicación de una toxina. Basándose en la sintomatología que la enfermedad causaba, también observó que únicamente las hojas jóvenes eran susceptibles a la infección y sugirió una posible migración a través del floema. Estos y otros experimentos le llevaron a concluir que el agente infeccioso estaba constituido por lo que él denominó “fluido vivo infeccioso”. A este nuevo agente infeccioso lo denominó virus, un término que proviene del latín y que se utilizaba para definir un cierto tipo de veneno (Beijerinck, 1898).

En Rusia, D. Iwanowsky con el mismo objetivo que M. Beijerinck llevó a cabo diferentes experimentos de filtración con el jugo infeccioso extraído de una planta enferma y tras varios intentos de cultivar el microorganismo llegó a la conclusión de que se trataba de una bacteria incapaz de cultivarse. A diferencia de Beijerinck, Iwanowsky sí que consiguió observar al microscopio dos tipos de inclusiones en células de tejido infectado (Iwanowski, 1892).

Aunque existe cierta controversia sobre quien fue merecedor del descubrimiento, si D. Iwanowsky o M. Beijerinck, sin duda, ambos científicos junto con A. Mayer serán recordados por el papel relevante que desempeñaron en el descubrimiento del concepto de virus.

Años más tarde, Friedrich Loeffler fue quien, trabajando con una enfermedad del ganado conocida como fiebre aftosa, propondría la naturaleza corpuscular de los virus (ver revisión en Pallás, 2007). En 1931, el bacteriólogo inglés William Elford logró determinar el tamaño del virus con el que trabajaba (100 nm de diámetro) utilizando diferentes membranas con orificios microscópicos de tamaños inferiores a los poros de los filtros de porcelana. En 1935 Wendell M. Stanley publicó en “Science” el “aislamiento de una proteína cristalina cuyas propiedades correspondían con las del TMV” (Stanley, 1935).

Posteriormente y hasta nuestros días una larga serie de descubrimientos ha permitido conocer y observar las características físicas, químicas y biológicas de los virus.

Los virus infectan una amplia gama de organismos: arqueobacterias, bacterias, algas, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados. Al carecer de la maquinaria necesaria para realizar su ciclo vital, los virus solo pueden multiplicarse dentro de las células de otros organismos, por lo que se les considera parásitos moleculares de la maquinaria celular.

Los virus se componen de material genético que puede ser de distinta naturaleza (DNA or RNA, de polaridad positiva o negativa) y estructura (simple o doble cadena, monopartito o multipartito, lineal o circular). Generalmente el genoma viral se encuentra protegido por una cubierta proteica externa, la cápsida, que a su vez puede tener una o más envueltas adicionales constituidas por componentes lipídicos o glucídicos derivados de la membrana celular del huésped. Los virus expresan los capsómeros (*capsid protein*; CP), subunidades proteicas que se autoensamblan formando la cápsida, generalmente necesitando la presencia del genoma viral. Al conjunto de material genético y cubierta se le conoce como virión o partícula vírica. Su morfología puede variar desde simples helicoides o icosaedros hasta estructuras más complejas.

Durante la infección se sintetizan nuevos genomas virales que serán transportados primero a las células adyacentes, en lo que se denomina movimiento a corta distancia, y posteriormente a las partes distales del huésped o transporte a larga distancia. En todos estos procesos, el virus necesita tanto proteínas expresadas por el propio genoma viral como proteínas de la célula huésped.

## **2.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS VIRUS DE PLANTAS**

La clasificación de los virus se revisa y actualiza continuamente. Según los criterios del 'Comité Internacional de Taxonomía de Virus' (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) hasta la fecha, los virus de plantas se han clasificado en 25 familias y 109 géneros (9<sup>th</sup> report of ICTV con actualizaciones según la web oficial del ICTV; <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>).

### **3.- CICLO INFECTIVO DE UN VIRUS DE PLANTAS**

Los virus de plantas originan gran variedad de enfermedades en las plantas y daños serios en los cultivos. Al igual que el resto de virus, los virus de plantas requieren de otros organismos para realizar su ciclo vital.

#### **3.1. Entrada y desensamblaje de la cubierta viral**

El ciclo infectivo de un virus de plantas se inicia con la entrada de partículas virales en las células vegetales. Para que la penetración del virus tenga éxito, se deben producir lesiones, que dañen la cutícula y la pared de pectocelulosa de la célula vegetal, bien mecánicamente, bien con la ayuda de vectores biológicos (insectos, nemátodos, hongos). No existen evidencias de la presencia de receptores específicos en la membrana plasmática que desencadenen el proceso de infección. Una vez en el interior celular se produce el desensamblaje de la cubierta proteica, un proceso acoplado al inicio de la traducción del genoma viral que permite su liberación para la replicación y traducción. De esta forma, a medida que se va desestructurando la cubierta proteica, la maquinaria de traducción celular se va uniendo al RNA evitando así su desprotección completa y la posible degradación por nucleasas celulares.

Todavía se desconocen los factores que inician el desensamblaje de la cubierta. Sin embargo, se ha propuesto que este proceso podría desencadenarse a través de un mecanismo de desestabilización como consecuencia de cambios sutiles en el ambiente, tales como cambios en el pH o en la concentración de calcio en el interior celular (Inoue *et al.*, 2011; Mundry *et al.*, 1991; Shaw, 1999). En el caso del TMV se ha descrito que, en un ambiente extracelular la presencia de cationes cargados positivamente, como iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o protones, estabilizarían las interacciones repulsivas de los grupos carboxilos, negativamente cargados, presentes en la CP (Caspar, 1963). De hecho se ha descrito de forma generalizada la presencia de dominios de unión a calcio en la CP. De esta forma, cuando el virión entra en la célula, dónde la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y de protones es menor (pH básico), se produce la eliminación de  $\text{Ca}^{2+}$  y protones que estabilizaban las interacciones de los grupos carboxilos y consecuentemente se da una interacción repulsiva que debilita la estructura del virión e inicia su desensamblaje (Caspar and Namba, 1990). Se especula con que la pérdida de calcio podría producir la energía libre necesaria para provocar un

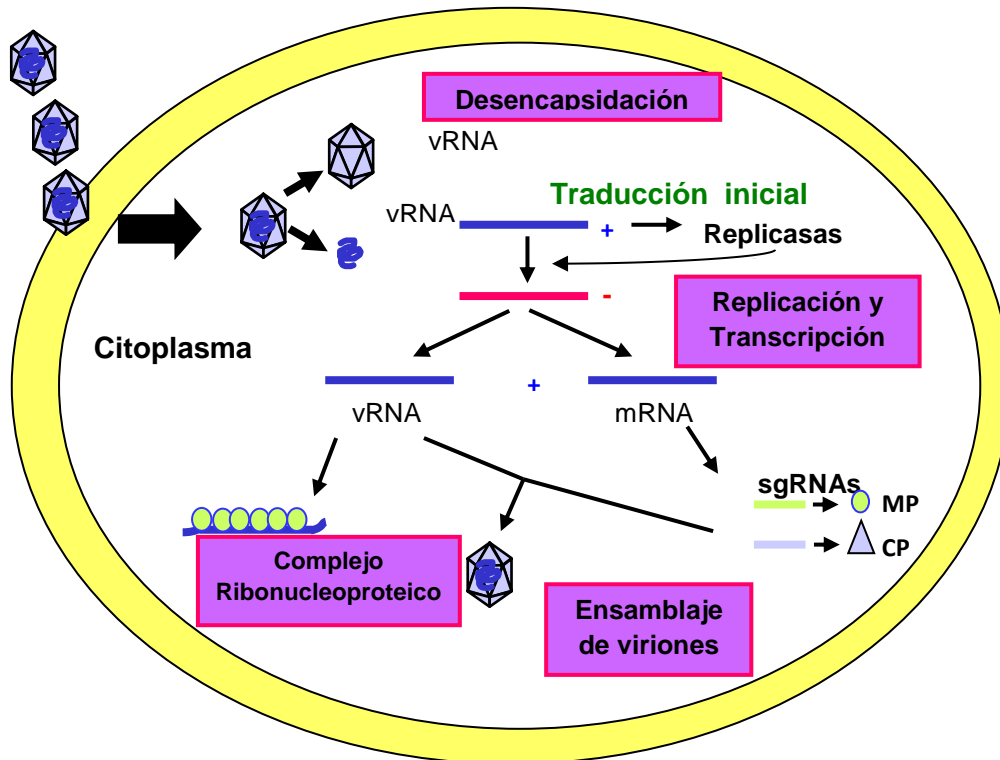
cambio conformacional en la proteína dando lugar al desensamblaje de la cubierta viral. Durham *et al.* sugirieron en 1977 que los dominios de interacción con  $\text{Ca}^{2+}$  podrían controlar el desensamblaje del TMV en el interior celular. Este proceso de desencapsidación se inicia por ambos extremos del genoma, de manera que a medida que la cubierta se va desplegando, la maquinaria de traducción celular se une al extremo 5' iniciando así la traducción de los genes presentes en esta zona del genoma. Normalmente, en los virus de plantas estos genes se corresponden con los genes que expresan las RNA polimerasa RNA dependientes (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) virales, que iniciarán los procesos de replicación.

### **3.2. Replicación y expresión del genoma viral**

Para los virus de plantas la acumulación viral en la célula vegetal, dependerá de los procesos de replicación, traducción y degradación (Buck, 1999; Drugeon *et al.*, 1999; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004; Ishikawa and Okada, 2004). La naturaleza del genoma viral determinará la secuencia de eventos que dará lugar a la multiplicación del virus y la síntesis de sus componentes fundamentales. La expresión de todos los virus requiere la participación de un RNA mensajero (messenger RNA; mRNA).

En caso de los virus de RNA de simple cadena de polaridad positiva (single strand RNA(+); ssRNA(+)), que constituyen la mayor parte de los virus de plantas, el RNA viral (viral RNA; vRNA) actúa directamente como mRNA. Las RdRp se sintetizan a partir del vRNA introducido en la célula y parcialmente expuesto durante el desensamblaje de la cubierta. La función de estas proteínas es sintetizar el RNA genómico de polaridad negativa complementario al vRNA original y que a su vez servirá de molde para la síntesis de nuevos ssRNA(+). Estas proteínas se encargan de sintetizar los RNAs subgenómicos (subgenomic RNA; sgrNA), los cuales funcionan como mRNA para la traducción de proteínas virales cuya secuencia está localizada bien en regiones internas o bien en el extremo 3' del genoma (Maia *et al.*, 1996; Miller and Koev, 2000; Sztuba-Solinska *et al.*, 2011).





**Figura I. 3. 1.** Esquema simplificado del ciclo viral de los virus. **1.** El vRNA (ssRNA +), liberado al citoplasma tras la desencapsidación del virus, funciona como mRNA para la expresión de las RNA polimerasas virales. **2.** Las RNA polimerasas sintetizan el RNA de simple cadena de polaridad negativa (single strand RNA (-); ssRNA(-)) a partir del vRNA. El ssRNA(-) forma intermediarios de doble cadena constituyendo los complejos de replicación asociados a membranas. **3.** El ssRNA(-) funciona como molde para la síntesis de nuevos vRNA y de mRNA. **4.** A partir del mRNA se sintetizan las proteínas estructurales y no estructurales que participan en el ciclo infeccioso. **5.** Los nuevos componentes virales se ensamblan formando viriones o complejos ribonucleoproteicos (viral ribonucleoproteic complex; vRNP), que infectarán las células vecinas.

Para los virus de ssRNA(-), la RdRp encargada de copiar las cadenas positivas es encapsidada en el virión, mientras el ssRNA(+) sintetizado a partir del genoma viral servirá de mensajero de las proteínas virales y de molde de nuevas cadenas de ssRNA(-), material genómico de la progenie. Los genomas de virus de ssRNA(-) suelen caracterizarse por estar segmentados (Kormelink *et al.*, 2011).

A pesar de que los genomas virales de RNA de doble cadena (double strand RNA; dsRNA) presentan una gran estabilidad, se han descrito pocos virus que presenten genomas de esta naturaleza. En este caso, la RdRp, que forma parte de los viriones,

será la encargada de sintetizar los mRNA de las proteínas virales y los dsRNAs de los viriones.

Los *Retrovirus* poseen dos copias de RNA monoténico, que sirven de molde para generar DNA viral doble hebra, que se integra en el genoma desde donde es tratado como el resto de genes celulares. La actividad enzimática que permite este proceso es una DNA polimerasa RNA dependiente expresada por el virus e incluida en los viriones.

Por último, los virus de DNA transcriben y traducen sus genes igual que los sistemas biológicos celulares, de esta forma se sintetiza el mRNA a partir del DNA viral mediante el enzima RNA polimerasa DNA dependiente (DNA-dependent RNA polymerase, DdRp) localizada en el núcleo de la célula. La DdRp transcribe dos mRNA a partir de virus DNA de doble cadena (double strand DNA; dsDNA) mientras que los virus de DNA de simple cadena (simple strand DNA; ssDNA) se transcriben bidireccionalmente a partir de una región intergénica.

Dada su limitada capacidad para expresar proteínas, los virus han desarrollado una serie de estrategias que les capacita para competir con los genes celulares y así pues, lograr una eficiente expresión y replicación del genoma viral (Bustamante and Hull, 1998; Drugeon, 1999; Firth and Brierley, 2012). Entre ellas cabe destacar, (a) la organización multipartita del genoma, (b) la síntesis de sgRNAs, (c) el procesamiento proteolítico de una poliproteína, (d) el solapamiento de pautas abiertas de lectura (open reading frame; ORF), (e) la síntesis alternativa de proteínas de mayor tamaño obviando codones de parada ("*read-through*") y (f) el desplazamiento de lectura (frameshift), para la síntesis de proteínas de mayor tamaño.

Además, los virus incorporan en el mRNA estructuras que favorecen la unión de factores de iniciación de la traducción y de los ribosomas al mRNA (Leathers *et al.*, 1993; Pestova *et al.*, 2001) con el objeto de conseguir una mejor eficiencia en la traducción. Para ello algunos virus de plantas pueden incorporar en su extremo 5' un fosfato, un grupo 7-metilguanosina trifosfato conocido como estructura CAP o presentar una proteína pequeña de origen viral (viral protein; VPg), covalentemente unida. Otros virus poseen sitios internos de entrada al ribosoma (internal ribosome entry site; IRES), que permiten la traducción sin necesidad del complejo de iniciación eIF4F. Por otro lado, en el extremo 3' se han descrito secuencias Poly A (colas poliadeniladas) o una estructura secundaria similar a un RNA de transferencia

(transference RNA; tRNA) (Thivierge *et al.*, 2005). Los niveles de expresión de cada una de las proteínas que expresan el genoma viral vendrán determinados por la afinidad de las polimerasas al promotor del gen correspondiente. Producto de la traducción se obtienen las proteínas estructurales como la CP, y no estructurales como la replicasa o las proteínas de movimiento (movement protein; MP) y otras proteínas virales específicas.

La mayoría de virus se replican en las membranas celulares. Los complejos de replicación (replication complex; RC) dependiendo del virus pueden asociarse a distintos componentes del sistema de endomembranas como el retículo endoplasmático (endoplasmic reticulum; ER), Golgi, vacuola, cloroplasto, peroxisoma o endosoma (Netherton *et al.*, 2007; Sanfaçon, 2005; Hwang *et al.*, 2008). En estos compartimentos se concentran los componentes necesarios, tanto de origen viral como del huésped, para la traducción y replicación del vRNA (Miller, 2000; Nagy and Pogany, 2006; Reichel and Beachy, 1998; Zhang *et al.*, 2005). Además, estos compartimentos desempeñan un papel fundamental en la protección de los RNAs de doble cadena, generados durante el proceso de replicación, susceptibles de ser degradados por el sistema de defensa de la planta. Una vez superados los mecanismos de defensa de la planta, que describiremos más adelante, y conseguir replicarse, el virus ha de moverse a otras partes de la planta para que el proceso de infección tenga éxito.

### **3.3. Movimiento viral en la planta infectada**

La propagación del virus en la planta consta de varias etapas y esta mediada principalmente por una o varias MPs expresadas por el genoma viral. El genoma viral es transportado desde las primeras células infectadas hasta las células vecinas en una primera etapa que se conoce como movimiento local o célula a célula (Fernández-Calviño *et al.*, 2011b). Tras la invasión de las células adyacentes, el virus necesita invadir las células especializadas del sistema vascular para infectar las partes distales de la planta, proceso conocido como movimiento sistémico o a larga distancia (Pallás *et al.*, 2011). Para estos procesos el virus utiliza tanto proteínas expresadas por el genoma viral como factores de la célula huésped.

## 4. - LAS PROTEÍNAS DE MOVIMIENTO

### 4.1. Características y clasificación de las MPs

#### ***Capacidad de unión a ácidos nucleicos***

Las MPs de la mayoría de géneros de virus de plantas tienen la capacidad de interaccionar con moléculas de ssRNA o ssDNA. Con la MP del TMV se demostró por primera vez que una MP viral era capaz de unirse a moléculas de ssRNA y ssDNA, pero no a moléculas de doble cadena (Citovsky *et al.*, 1990). Se trata de una unión fuerte, inespecífica de secuencia y cooperativa. Análisis mutacionales realizadas sobre la MP del TMV han demostrado que la actividad de unión a ácidos nucleicos de cadena simple esta mediada por dos dominios con actividad independiente localizados entre las posiciones de residuos de aminoácidos 112 a 185 y 186 a 268 de la MP (Citovsky *et al.*, 1992). La unión tiene lugar a través de un dominio  $\alpha$ -helicoidal rico en aminoácidos con carga neta positiva y aminoácidos apolares (Citovsky *et al.*, 1992; Fujita *et al.*, 1998; Giesman-Cookmeyer *et al.*, 1995; Herranz and Pallás, 2004; Marcos *et al.*, 1999; Vilar *et al.*, 2001). Para la MP del *Virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano* (*Apple chlorotic leaf spot virus*; ACLSV) también se han delimitado dos dominios independientes de unión a RNA (Isogai and Yoshikawa, 2005) y para la p7A del *Virus del cribado del melón* (*Melon necrotic spot virus*; MNSV) se ha demostrado que las regiones adyacentes al dominio de unión al RNA postulado favorecen bien la afinidad por el RNA o la cooperatividad del proceso (Navarro *et al.*, 2006). En el *Virus de los anillos necróticos de los prunus* (*Prunus necrotic ringspot virus*; PNRSV), sin embargo, se ha delimitado un único dominio de unión a RNA rico en amino ácidos básicos (Herranz *et al.*, 2005). En este contexto, se ha propuesto que la interacción entre la MP y el vRNA podría establecerse entre los residuos cargados positivamente y el esqueleto de fosfatos del vRNA, explicando así la inespecificidad del proceso. Cambios mutacionales realizados sobre la proteína p7 del *Virus del moteado del clavel* (*Carnation mottle virus*, CarMV) en donde residuos cargados positivamente se sustituyeron por alaninas han puesto de manifiesto una mayor relevancia de los amino ácidos cargados en el proceso de unión a RNA y de las cadenas laterales de los amino ácidos hidrofóbicos en la estabilización del complejo (Vilar *et al.*, 2001). Aunque todavía se desconocen los detalles moleculares de esta interacción, Vilar *et al.*

propusieron en 2001 que debía responder a un mecanismo de ‘unión adaptativa’ mediante el cual tanto la  $\alpha$ -hélice central como el RNA sufren un cambio conformacional que estabiliza dicha unión.

El hecho de que la interacción entre los ácidos nucleicos de cadena simple y la MP ocurra de forma inespecífica justifica la observación de que MPs heterólogas sean capaces de complementar el movimiento de virus no relacionados y transportar su genoma viral. En este sentido se ha comprobado que MPs pertenecientes a siete géneros virales, incluyendo virus de RNA y DNA, son funcionalmente intercambiables por la MP del *Virus del mosaico de la alfalfa* (*Alfalfa mosaic virus*; AMV) para el transporte local y sistémico (Fajardo *et al.*, 2013; Sánchez-Navarro and Bol, 2001; Sánchez-Navarro *et al.*, 2006; Sánchez-Navarro *et al.*, 2010). También se ha observado que MPs expresadas transitoriamente (Morozov *et al.*, 1997) o constitutivamente (Dasgupta *et al.*, 2001) en planta complementan el movimiento de virus no relacionados incapaces de moverse. Esta inespecificidad de secuencia que permite a las MPs unir y transportar diferentes genomas virales en mayor o menor medida obliga a los virus a adoptar diferentes estrategias, como la compartimentalización, para incrementar la especificidad.

La afinidad por los ácidos nucleicos no es una propiedad exclusiva de la MP del TMV, sino que, más bien, se trata de una característica general para una gran mayoría de MPs de virus de plantas. De hecho, se ha demostrado esta capacidad para un gran número de géneros virales como *Tobamo-*, *Caulimo-*, *Diantho-*, *Alfamo-*, *Tospo-*, *Umbr-*, *Bromo-*, *Cucumo-*, *Faba-*, *Sobemo-*, *Carmo-*, *Gemini-*, *Hordei-*, *Potex-*, *Pomo-*, *Luteovirus*, etc ... Sin embargo, no todas las MPs muestran las mismas características con respecto a la afinidad por los ácidos nucleicos de DNA o RNA, de simple o doble cadena o si la unión se produce de forma cooperativa o no. Por ejemplo, el *Virus del mosaico del pepino* (*Cucumber mosaic virus*, CMV) expresa una MP (3a) que une de forma cooperativa ssRNA y ssDNA, pero no dsRNA ni dsDNA; la MP del *Virus de la roseta del cacahuete* (*Groundnut rosette virus*; GRV) también une ssDNA y ssRNA, sin embargo la unión no es cooperativa (Nurkiyanova *et al.*, 2001). La TGB1 del *Virus del mosaico del estriado de la cebada* y el *Virus semilatente* de la poa contiene varios dominios con actividad de unión a RNA que presentan distintas preferencias por ssRNA y dsRNA.

### **Localización y acumulación en PDs**

En los estadios iniciales del ciclo infectivo del TMV, la MP se localiza en estructuras punteadas en la pared celular. Esta observación ha sido corroborada por diferentes aproximaciones en: (i) plantas transgénicas expresando la MP; (ii) plantas infectadas por el TMV (Tomenius *et al.*, 1987); (iii) plantas que expresan la MP fusionada a la proteína de fluorescencia verde (green fluorescence protein; GFP) en su extremo C-terminal (Ct) durante una infección viral (Boyko *et al.*, 2000), transitoriamente (Crawford and Zambryski, 2001) o constitutivamente desde un transgen (Roberts *et al.*, 2001). Estas estructuras punteadas que la MP del TMV forma en la pared celular se corresponden con los plasmodesmos celulares (plasmodesmata; PD; ver estructura más adelante) (Oparka *et al.*, 1997b). Además, MPs de otros virus que también pertenecen a la Superfamilia 30K, como el AMV, el CMV, el *Virus del mosaico del bromo* (*Brome mosaic virus*, BMV) o el PNRSV, se han observado también formando el mismo tipo de punteaduras en la pared celular (Canto *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 1998; Itaya *et al.*, 1998; Sánchez-Navarro and Bol, 2001). El mismo patrón se ha observado para la fusión GFP-MPs que no pertenecen a la Superfamilia 30K, como la MP del ACLSV (Sato *et al.*, 2000). Cuando se expresa la fusión GFP-TGB1 del *Virus del mop-top de la patata* (*Potato mop-top virus*; PMTV) se observa la formación de unas estructuras granulares en la pared celular que co-localizan con las deposiciones de calosa de los PDs. Los estudios de localización subcelular de un gran número de mutantes de las MPs o de sus versiones silvestres fusionadas a la GFP junto con el uso de inhibidores de diversos procesos/orgánulos intracelulares han permitido esclarecer los distintos mecanismos por los cuales las MPs se dirigen a los PDs. (Canto and Palukaitis, 2005; Genovés *et al.*, 2010; Pouwels *et al.*, 2002; Samuels *et al.*, 2007; Verchot-Lubicz *et al.*, 2007).

### **Capacidad de aumentar el SEL de los PDs**

Las MPs facilitan el transporte del genoma viral modificando el límite del tamaño de exclusión (size exclusion limit; SEL) de los PDs. Este proceso necesario puede ocurrir mediante dos mecanismos diferentes. En el primero de ellos la MP se une y dilata el PD sin modificar sustancialmente su estructura. Esta propiedad fue descrita por primera vez en plantas transgénicas de tabaco que expresaban la MP del TMV (Wolf *et al.*, 1989) en las cuales se observaron PDs con un SEL de 10kDa, superior al de las

plantas control (1kDa), y que contenían un material fibroso, el cual se detectó mediante anticuerpos contra la MP (Atkins *et al.*, 1991; Zambryski, 1995). Sin embargo, se desconoce si el material fibroso está implicado en la modificación del PD o en el transporte del vRNA a través del poro. En este sentido una serie de mutantes de delección realizados sobre la MP del TMV ha permitido la identificación de una región localizada entre el amino ácido 126 y 224, denominada dominio E, relacionada con la capacidad de modificar el PD (Waigmann *et al.*, 1994). En un contexto viral la apertura de los PDs por parte de la MP del TMV se da únicamente en el frente por donde avanza la infección (Oparka *et al.*, 1997a).

Del mismo modo, plantas de tabaco que expresan constitutivamente las MPs bien del CMV, del AMV, del *Virus del enrollamiento de la hoja de la patata* o la TGB1 del *Virus del mosaico del trébol blanco*, tienen aumentada la permeabilidad de sus PDs (Ding *et al.*, 1995; Hofius *et al.*, 2001; Howard *et al.*, 2004; Lough *et al.*, 1998). El aumento de la difusión de la GFP a través del PD cuando se co-expresa junto con la TGB2 del PVX ha puesto de manifiesto que la TGB2 también es capaz de aumentar el SEL de estos microcanales (Tamai and Meshi, 2001). Del mismo modo ocurre con TGB2 y TGB3 del PMTV (Haupt *et al.*, 2005). Es probable que las células vegetales restablezcan la estructura de los PDs después de ser modificados por las MPs (Moore *et al.*, 1992; Wolf *et al.*, 1989)

El otro mecanismo que utilizan las MPs virales para aumentar el SEL de los PDs consiste en eliminar el desmotúbulo que éstos albergan en su interior, cuyas características se encuentran detalladas más adelante. Este mecanismo únicamente se observa en las MPs, conocidas como formadoras de túbulos, que son capaces de formar unas estructuras tubulares que albergan en su interior viriones y atraviesan y desestructuran completamente los PDs. El *Virus del mosaico del chícharo* (*Cowpea mosaic virus*; CPMV) fue el primer virus en el que se describió la capacidad de formar túbulos (van der Scheer and Groenewegen, 1971). La sobreexpresión de la MP en protoplastos y la observación de que mutantes de la CP, incapaces de formar viriones, seguían generando túbulos demostraron que la MP era el único componente viral necesario y suficiente para la generación de estas estructuras (Kasteel *et al.*, 1997; Perbal *et al.*, 1993; Storms *et al.*, 1995). El análisis de la infectividad de mutantes de delección realizados sobre la MP permitió identificar un dominio Ct más largo en las

MPs formadoras de túbulos, necesario para su ensamblaje (Thomas and Maule, 1995; Thomas and Maule, 1999). Las MPs que presentan esta propiedad se encuentran fundamentalmente en las especies de las familias *Comoviridae*, *Bromoviridae* y *Caulimoviridae*.

A pesar de que existen numerosas evidencias que demuestran la implicación de las MPs en la modificación de los PDs y que en los últimos años se han descrito distintas proteínas que también estarían implicadas en este proceso, el mecanismo mediante el cual las MPs modificarían el SEL de los PDs aún se desconoce.

### ***Interacción con los componentes del citoesqueleto***

La interacción de una MP viral con los componentes del citoesqueleto fue descrita por primera vez con la MP tipo Hsp70 del *Virus del amarillamiento de la remolacha* (Karasev *et al.*, 1992). Posteriormente se observó dicha interacción para la MP del TMV (Heinlein *et al.*, 1995; Heinlein *et al.*, 1998). La interacción entre los microtúbulos (MT) y la MP resulta evidente cuando se expresa la MP fusionada a la GFP durante una infección, ya que permite observar una localización subcelular que corresponde con los MT (Heinlein *et al.*, 1995). Esta localización es independiente de la infección, dado que también se observa cuando la expresión es ectópica (Boutant *et al.*, 2009). Experimentos *in vitro* han puesto de manifiesto la capacidad de la MP del TMV de unirse a la tubulina libre así como ensamblada en MT, indicando que se trata de una interacción directa proteína- proteína (Ashby *et al.*, 2006; Ferralli *et al.*, 2006). La interacción de las MPs con los MT se ha descrito también para otros virus. La MP del *Virus del mosaico del tomate Ob* (*Tomato mosaic virus*; ToMV) muestra una asociación a MT similar a la de la MP del TMV, aunque ambas MPs presentan una baja homología de secuencia (Padgett *et al.*, 1996). La infección de plantas de *Nicotiana benthamiana* con una construcción del PMTV en la que la TGB1 se encontraba fusionada a un marcador fluorescencia reveló que esta proteína en algún momento del proceso de infección se acumulaba a lo largo de los MTs (Wright *et al.*, 2010).

La función de esta interacción dependerá del virus y a pesar de que en la mayoría de los casos se relaciona con el transporte del genoma viral hacia los PDs, el papel concreto de los MTs en este proceso todavía está por resolver.

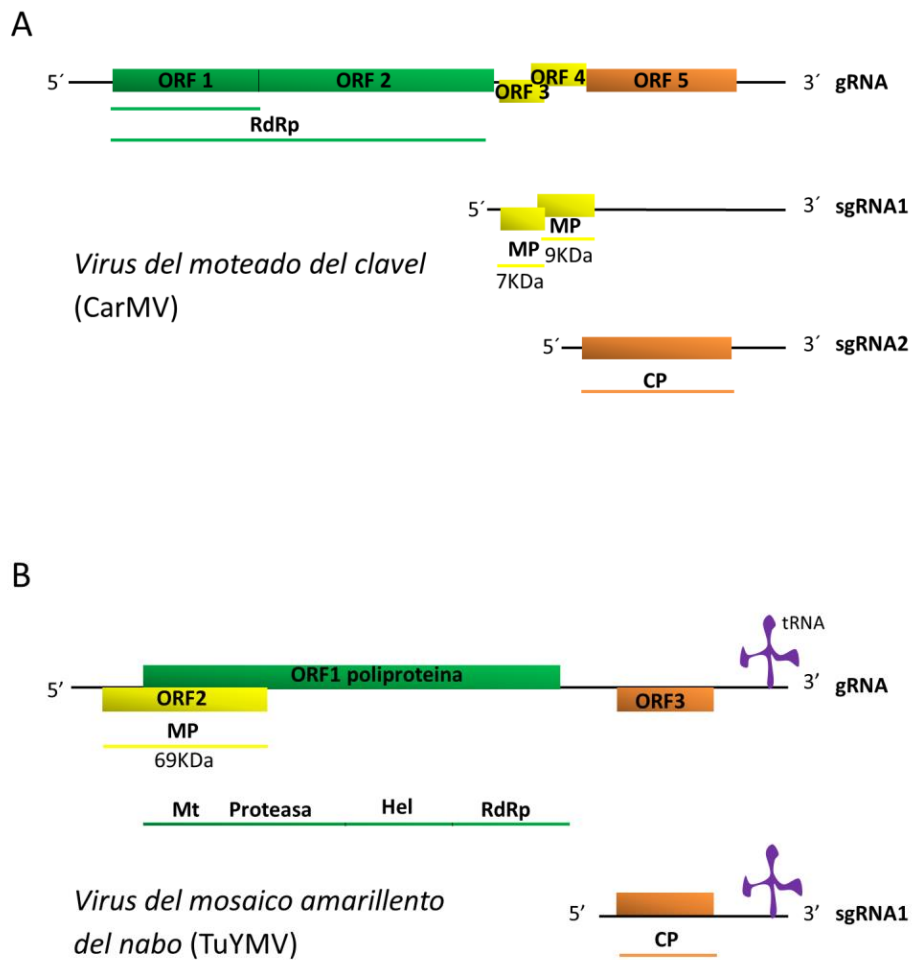
Además de los MTs, los microfilamentos (MFs) de actina también están implicados en el movimiento del TMV. Una prueba de ello, es que el transporte de la



MP del TMV a través de los MFs se bloquea cuando se sobreexpresa una proteína que se une a la actina. La asociación de MPs virales con filamentos de actina también se ha demostrado para otros grupos de virus (ej. p7A del MNSV, (Genovés *et al.*, 2009).

### **Clasificación de las MPs**

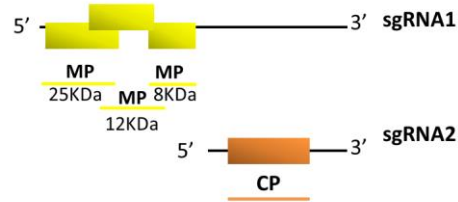
Basándonos en la secuencia de aminoácidos, las MPs de los virus de plantas se pueden clasificar en cuatro familias, tal y como se representa en la Figura I.4.1:



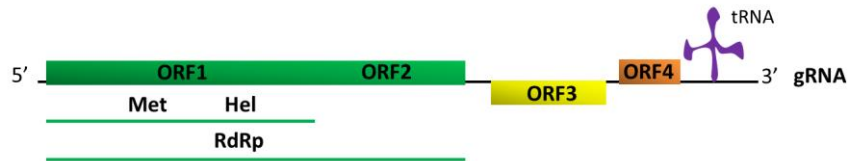
C



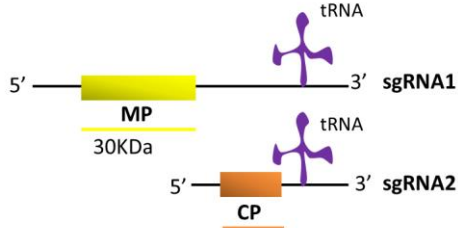
Virus X de la patata (PVX)



D



Virus del mosaico del tabaco (TMV)



**Figura I.4.1.** Representación esquemática de la organización y expresión del genoma del CarMV (A), del TuYMV (B), del PVX (C) y del TMV (D). Los rectángulos representan las ORFs y las líneas inferiores el producto de su traducción. Se indica el nombre de la proteína que expresa cada ORF en la parte superior de las líneas y el tamaño de las MPs en la parte inferior.

MPs de pequeño tamaño. Se trata de **pequeños polipeptidos** (Figura I.4.1A.), menores de 10KDa, expresadas por *Carmovirus*. Los *Carmovirus* presentan, en la región central de su genoma, dos pequeñas ORFs adyacentes que se conocen como el bloque de dos genes (Double Gene Block, DGB). Las proteínas correspondientes se han denominado de forma general como DGB1 y DGB2, según su posición en el genoma viral aunque en cada especie reciben un nombre específico de acuerdo con su masa molecular. La implicación de estas proteínas en el movimiento local ha sido descrita en el caso del *Virus del arrugamiento del nabo* (*Turnip crinkle virus*; TCV) (Hacker *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1998), el CarMV (Marcos *et al.*, 1999; Genovés *et al.*, 2006; Genovés *et al.*, 2009; Sauri *et al.*, 2005; Thomas and Maule, 1999) especie tipo del género, y el MNSV (Genovés *et al.*, 2009; Genovés *et al.*, 2006).

La utilización de programas informáticos de predicción de estructura secundaria junto con una serie de datos experimentales de espectroscopia por resonancia magnética nuclear, han permitido aproximarse a la estructura secundaria de estas proteínas. La DGB1 del CarMV (p7), del MNSV (p7A) o del TCV (p8) presentan tres dominios: el N-terminal (Nt), variable y desestructurado, el Ct, plegado en una  $\beta$ -hoja estable y el dominio central, con estructura en  $\alpha$ -hélice el cual es responsable de la unión a RNA tanto a nivel de estructura primaria como secundaria (Hacker *et al.*, 1992; Marcos *et al.*, 1999; Vilar *et al.*, 2001; Vilar *et al.*, 2005).

Por otro lado, las DGB2 de los *Carmovirus* presentan dominios transmembrana (transmembrane; TM) característicos que posibilitan su asociación o inserción en el ER. Así, la p9 del CarMV y del TCV es estructuralmente una proteína integral de membrana con dos dominios hidrofóbicos, capaz de insertarse *in vitro* en la membrana del ER en forma de U y exponiendo los extremos Nt y Ct hacia el lado citoplasmático de la misma en un proceso co-traducciona l asistido por la maquinaria del translocón (Martínez-Gil *et al.*, 2010; Saurí *et al.*, 2005; Vilar *et al.*, 2002). La DGB2 del MNSV (p7B), sin embargo, presenta un único dominio TM y se comporta como una proteína integral de membrana tipo II con el Nt citosólico y el Ct luminal (Martínez-Gil *et al.*, 2007; Genovés *et al.*, 2011).

**MPs grandes entre 69 y 85 KDa** (Figura I.4.1B.), expresadas por *Tymovirus*. Las ORFs que expresan la replicasa y la MP solapan en gran medida. La MP es esencial tanto para el transporte célula a célula como para el transporte a larga distancia (Bozarth *et al.*, 1992).

**MPs expresadas por virus pertenecientes al grupo del bloque de los tres genes (Triple gen block; TGB)** (Figura I.4.1C.). Este grupo presenta hasta tres ORFs esenciales en el movimiento célula a célula de manera contigua o muy poco solapada en su genoma constituyendo el característico bloque de 3 genes (Morozov and Solovyev, 2003). El factor proteico correspondiente a cada gen se denomina, TGB1, TGB2 y TGB3, en sentido 5'-3'. Los virus que presentan este sistema de MPs pueden dividirse en dos clases: la clase 1 o tipo *Hordeivirus* incluye los géneros *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus* y *Benyvirus* y presentan una morfología de varilla; en la clase 2 o tipo *Potexvirus* se encuentran virus filamentosos pertenecientes a los géneros *Potexvirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus* y *Allexivirus*. Las TGB1 del tipo *Hordeivirus* presentan un tamaño

comprendido entre 42 y 63 kDa y consisten en tres dominios estructuralmente y funcionalmente distintos: un dominio Nt (Nt domain; NTD), un dominio interno (internal domain; ID) y un dominio NTPasa/helicasa (helicase-like domain; HELD) en el extremo Ct (Makarov *et al.*, 2009). Análisis de predicción de estructura secundaria y de espectroscopia de dicroísmo circular revelaron que el dominio NTD se encuentra desplegado y que el ID presenta una estructura secundaria pronunciada (Makarov *et al.*, 2009). Las TGB1 del tipo *Potexvirus*, en cambio, presentan una masa molecular menor (24-26 kDa) y contienen un dominio HELD que ocupa prácticamente la totalidad de la molécula pero además se caracteriza por presentar una prolongación de 25 aminoácidos en el extremo Nt que incluye tres residuos de arginina conservados y necesarios para que la proteína TGB1 realice su actividad ATPasa, de unión a RNA y de transporte célula a célula (Lin *et al.*, 2004; Liou *et al.*, 2000; Wung *et al.*, 1999). La proteína TGB1 de este grupo, además presenta otras funciones que incluyen aumentar el tamaño de exclusión molecular SEL de los PDs con el objeto de facilitar la translocación del vRNA (Howard *et al.*, 2004), suprimir el silenciamiento (Bayne *et al.*, 2005; Senshu *et al.*, 2009) y promover la desencapsidación de los viriones para la traducción del vRNA liberado (Atabekov *et al.*, 2000). En ambas familias TGB1 es una proteína soluble, y estudios de predicción para el plegamiento de ésta revelan que está constituida por dos dominios con disposiciones características de  $\alpha$ -hélice y elementos-  $\beta$  (Kalinina *et al.*, 2002). Por otro lado, las TGB2 y TGB3 contienen dominios hidrofóbicos capaces de integrarse en la membrana. En ambos casos se ha descrito la capacidad de modificar el tamaño del SEL (Hsu *et al.*, 2009; Haupt *et al.*, 2005). TGB2 presenta una masa molecular entre 12 y 14 kDa y dos secuencias hidrofóbicas internas y separadas por una región central hidrofílica muy conservada, mientras que TGB3 presenta una estructura más variable y menos conservada (Morozov and Solovyev, 2003). Las TGB3 del tipo *Hordeivirus* poseen dos posibles fragmentos TM mientras que las correspondientes a los del tipo *Potexvirus* presentan un único dominio hidrofóbico. Además, los motivos de secuencia conservados difieren en cada grupo (Morozov and Solovyev, 2003). Existen evidencias experimentales que demuestran que ambas proteínas son capaces de insertarse en la membrana del ER. TGB2 lo hace en forma de U y exponiendo ambos extremos al lado citoplasmático (Hsu *et al.*, 2008) mientras que las TGB3 que tienen un sólo fragmento TM, dejan el extremo Nt en el lumen del ER

(Krishnamurthy *et al.*, 2003) y las que tienen dos, exponen tanto el Nt como el Ct en el lado citosólico (Tilsner *et al.*, 2010).

**La Superfamilia 30K** (Figura I.4.1D), o grupo de proteínas relacionadas con la MP de 30kDa, del *Virus del mosaico del tabaco* (*Tobacco mosaic virus*, TMV). Se ha identificado 20 géneros como miembros de la Superfamilia 30K: *Alfamovirus*, *Badnavirus*, *Begomovirus*, *Bromovirus*, *Capilovirus*, *Caulimovirus*, *Comovirus*, *Cucumovirus*, *Diantovirus*, *Furovirus*, *Ilarvirus*, *Idaeovirus*, *Nepovirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Tospovirus*, *Tricovirus*, *Tombusvirus*, *Sequivirus*, *Umbravirus*. La estructura y función de las MPs virales pertenecientes a la Superfamilia 30K están relativamente bien caracterizadas. A pesar de compartir gran parte de sus funciones, los miembros de esta familia poseen pocos motivos conservados en su secuencia de aminoácidos y engloba tanto a proteínas formadoras de túbulos como no formadoras. El motivo LDX<sub>50-60</sub>G es la única característica conservada que destaca en un estudio de un número limitado de secuencias (Melcher, 1990). También se observó la presencia de una secuencia hidrofóbica conservada justo en la parte Nt del motivo LDX<sub>50-60</sub>G (Koonin, 1991). La baja similitud de secuencia observada entre las MPs de la familia 30K podría sugerir una estructura terciaria común. De hecho, el alineamiento de estructuras secundarias correspondientes a secuencias consenso de las MPs de 18 géneros de virus pertenecientes a la Superfamilia 30K revela una estructura “core” común flanqueada por dominios Nt y Ct variables. La estructura “core”, consiste en cuatro  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ -A-D) y siete elementos- $\beta$  ( $\beta$ -1-7). La región Nt posee numerosas  $\alpha$ -hélices y tiene una longitud variable, siendo más larga en aquellas MPs conocidas como formadoras de túbulos y para la MP de *Idaeovirus*. La parte Ct es mayoritariamente desestructurada (random coil) (Berna *et al.*, 1991) y se ha comprobado que no es necesaria para el movimiento célula a célula, pero está implicada tanto en la regulación de la función de la MP como en la interacción con la CP (Aparicio *et al.*, 2010; Sánchez-Navarro and Bol, 2001; Stabolone *et al.*, 2005; Waigmann *et al.*, 2000). Además se han determinado cinco regiones con una cierta similitud dentro de la Superfamilia 30K: cuatro de ellas se localizan dentro de la estructura “core”, y la quinta consiste en variaciones del tripéptido SIS localizado en la parte Ct de la proteína, el cual podría tener una actividad reguladora dependiente de fosforilación (Melcher, 2000). En consonancia con estos resultados se ha comprobado

que MPs de la familia 30K pertenecientes a siete géneros virales, incluyendo virus RNA y DNA, son funcionalmente intercambiables por la MP del AMV para el transporte local y sistémico cuando se les fusiona los últimos 44 amino ácidos (aa) del extremo Ct de la MP del AMV, indicando que una o más propiedades básicas de las MPs tienen que estar asociadas con las estructuras secundarias/terciarias conservadas (Fajardo *et al.*, 2013; Sánchez-Navarro and Bol, 2001; Sánchez-Navarro *et al.*, 2006; Sánchez-Navarro *et al.*, 2010).

Aunque la mayor parte de las MPs de la familia 30K se localizan en el ER la manera en cómo lo hacen es todavía una materia de controversia. Se ha descrito que la MP del TMV se integra en la membrana (Brill *et al.*, 2000) mientras que la MP del PNRSV se asocia (Martinez-Gil *et al.*, 2009). Dado que el esclarecimiento de esta controversia es uno de los temas principales de la presente Tesis se discutirá con detalle más adelante.

## **4.2. Modelos de sistemas de transporte célula a célula**

El movimiento célula a célula o local comprende el **transporte intracelular** mediante el cual el virus se desplaza desde los sitios de replicación, normalmente asociados a estructuras membranosas, hasta la periferia celular y el **transporte intercelular**, proceso por el cual la progenie viral en forma de vRNP o de virión atraviesa la pared celular a través de las comunicaciones intercelulares o PDs.

### **4.2.1. Transporte intracelular**

Se ha descrito que moléculas de pequeño tamaño difunden libremente por el citoplasma (Luby-Phelps, 2000; Seksek *et al.*, 1997). Sin embargo, los viriones y los complejos vRNP requieren de componentes celulares y mecanismos de transporte activos para alcanzar los PDs. Como hemos dicho previamente, la mayoría de los virus se asocian al sistema de endomembranas de la planta huésped para replicarse (Laliberté and Sanfaçon, 2010). Incluso, recientemente se ha sugerido que los cuerpos de inclusión de origen viral donde algunos virus se replican también estarían asociados al ER y al citoesqueleto (Harries *et al.*, 2009a). El dinamismo que caracteriza al ER y su prolongación entre células vecinas, mediante el desmotúbulo, permitiría que los complejos vRNP y las partículas virales se transportasen a lo largo de la membrana. A

su vez, el ER de la planta se asocia a los filamentos de actina que impulsan el transporte de macromoléculas a lo largo de la membrana con la ayuda de las proteínas motoras, las miosinas (Griffing, 2010; Sparkes *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que la MP del TMV sigue un patrón temporal de distribución en el interior de la célula. Durante las primeras etapas de la infección viral esta proteína se acumula en el ER así como en los PDs celulares pero, más tarde, se detecta en cuerpos de inclusión asociados con la membrana del ER y en los MTs. Finalmente, la proteína desaparece de todas las localizaciones excepto de los PDs (Heinlein *et al.*, 1998). Se especula con que el TMV se replicaría y acumularía en compartimentos irregulares, conocidos como cuerpos de inclusión, que contienen tanto complejos de replicación como de traducción. En este contexto de replicación y movimiento, el TMV podría moverse intra- e intercelularmente en forma de cuerpos de inclusión o vesículas derivadas del ER que incluirían a la MP y a las factorías de replicación viral (viral replication factories; VRCs) a través de las membranas del ER utilizando filamentos de actina y las proteínas motoras miosinas (Hofmann *et al.*, 2009; Kawakami *et al.*, 2004; Sambade and Heinlein, 2009). La implicación de la actina y la miosina se ha demostrado tanto en el transporte de varias proteínas virales como en la propagación de la infección de distintos virus (Avisar *et al.*, 2008; Cotton *et al.*, 2009; Harries *et al.*, 2009a; Ju *et al.*, 2005; Vogel *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2007). Sin embargo, se necesitan más estudios para aclarar si el tráfico ocurre directamente mediante las miosinas motoras a lo largo de los filamentos de actina o si por el contrario la proteína viral y/o los complejos vRNP se mueven asociados al ER con la ayuda de actina/miosina. Del mismo modo, el transporte de los complejos virales asociados al ER puede ser mediante las proteínas motoras de forma directa a través de un reconocimiento específico como carga de miosina o de forma indirecta utilizando el flujo a través de la membrana que dirige la miosina. Estudios basados en la inhibición de filamentos de actina/miosina mediante silenciamiento o el tratamiento con determinadas drogas, provoca una disminución de la eficiencia de movimiento de algunos virus, incluido el TMV (Harries *et al.*, 2009a; Hofmann *et al.*, 2009; Kawakami *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005).

Adicionalmente a la asociación al RE, se ha descrito de forma generalizada para los *Tobamovirus* la capacidad de las MPs de interactuar con los MTs (Ashby *et al.*,

2006; Boyko *et al.*, 2007; Heinlein *et al.*, 1995; Padgett *et al.*, 1996). En este sentido, la mayoría de los estudios se han realizado con el TMV. En rasgos generales, las evidencias sugieren que el sistema de MT actúa de forma coordinada con la red del ER asociada a los MFs. Mientras que la red ER/actina proporciona el medio fluido para el transporte de los VRC por el citoplasma hacia los PDs, los MTs están implicados en el anclaje y el posicionamiento de los VRCs en la parte cortical del RE y en su liberación para el transporte a lo largo de la membrana ayudado por los MFs (Hofmann *et al.*, 2007; Kawakami *et al.*, 2004; Sambade *et al.*, 2008). Se ha identificado en la MP del TMV un dominio, conservado entre las MPs de los *Tobamovirus*, que contiene un motivo estructural corto similar al M-loop (lazo) que presentan las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -tubulinas, en las superficies de contacto entre los protofilamentos de los MT (Boyko *et al.*, 2000). Se ha propuesto que las MPs mimetizarían estas superficies para co-ensamblarse con los MT. Dado que esta MP es capaz de dimerizar, se ha especulado que una subunidad interaccionaría con la tubulina de los MT mientras que la otra lo haría con el ER. De esta forma, el homodímero de la MP actuaría como un puente entre los MT y el ER, facilitando el transporte a través del citoesqueleto (Ferralli *et al.*, 2006).

De manera análoga a lo que ocurre con la MP del TMV, las MPs de los virus que contienen virus del TGB como *Potex*- y *Hordeivirus* alcanzarían los PDs mediante su asociación al RE (Cowan *et al.*, 2002; Gorshkova *et al.*, 2003; Ju *et al.*, 2005; Krishnamurthy *et al.*, 2003; Solovyev *et al.*, 2000; Tilsner *et al.*, 2010). La TGB1, dada su capacidad de unión a RNA/DNA de simple cadena, sería la encargada de transportar el genoma viral al PD. Sin embargo, existen determinadas diferencias funcionales entre las TGB1 de ambos grupos. Las TGB1 del tipo *Potexvirus* son capaces de alcanzar los PDs, aumentar el SEL y translocarse a la célula vecina de forma autónoma, facilitando el tránsito del genoma viral. Sin embargo, las TGB1 del tipo *Hordeivirus* no pueden modificar el SEL y necesitan de TGB2 y TGB3 para alcanzar el PD, siendo ambas proteínas las responsables de aumentar el diámetro de los mismos (Cowan *et al.*, 2002; Erhardt *et al.*, 2000; Erhardt *et al.*, 1999; Lawrence and Jackson, 2001; Zamyatnin *et al.*, 2004). No existen evidencias directas que identifiquen el mecanismo por el cual las TGB de *Hordeivirus* alcanzan los PDs. En este sentido, diferentes experimentos han puesto de manifiesto que el transporte intracelular no depende de la ruta secretora ER-Golgi ni del citoesqueleto (Schepetilnikov *et al.*, 2008); parece ser que depende de



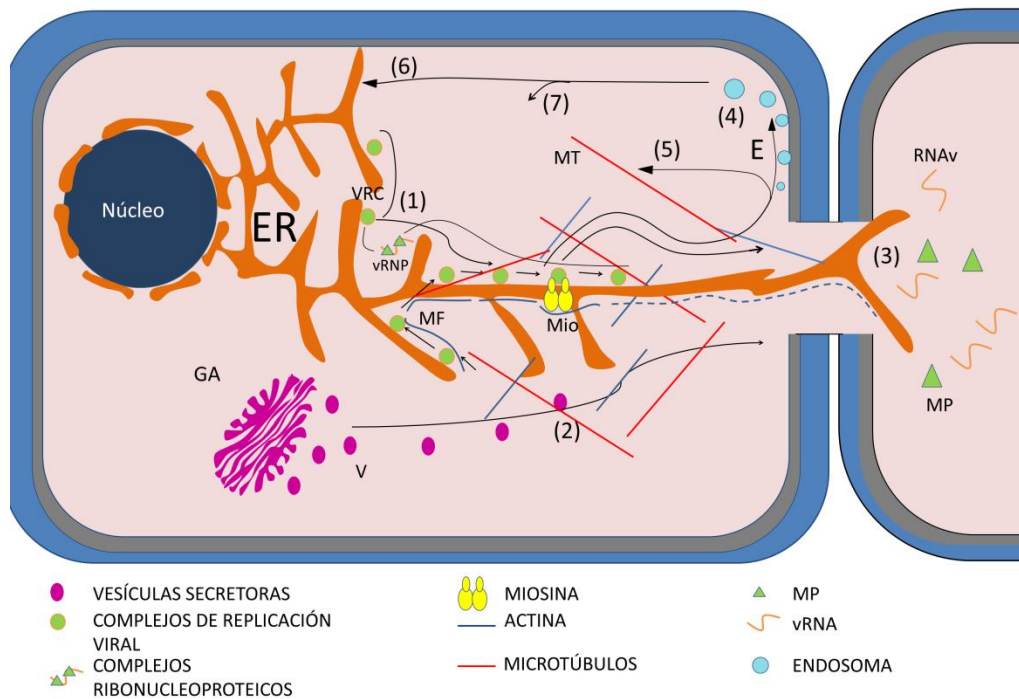
un mecanismo no-convencional probablemente basado en la difusión a través de la membrana lipídica (Schepetilnikov *et al.*, 2008).

Para describir el movimiento intracelular de *Potexvirus*, en cambio, se han propuesto varios mecanismos. En el primero de ellos la proteína TGB3 induciría la proliferación de estructuras vesiculares derivadas directamente del lado cortical del ER lo cual le permitiría dirigir el tráfico de la TGB2 desde los túbulos que forman la red cortical del ER a vesículas móviles que contendrían el vRNA o los complejos TGB1-vRNA-CP que se dirigen y concentran en la periferia celular. El movimiento de dichas vesículas es dependiente de la red de MFs de actina y se bloquea completamente por el tratamiento con Latrunculina B (Gorshkova *et al.*, 2003; Haupt *et al.*, 2005; Ju *et al.*, 2005; Zamyatnin *et al.*, 2002). En el modelo alternativo, TGB3 sería transportado a través de un mecanismo no convencional independiente de COP-II (Schepetilnikov *et al.*, 2005). En este caso, el transporte del vRNA hacia el PD sería en forma de virión modificado por la interacción con TGB1. Se ha descrito que dicha interacción desestabiliza las partículas virales mediante la unión de moléculas de CP al extremo 5', de forma que TGB1 se considera un activador de la traducción (Atabekov *et al.*, 2000; Karpova *et al.*, 1997). Tilsner *et al.* demostraron en 2012 que mutantes de la CP del PVX deficientes en la interacción con TGB1 son capaces de formar partículas víricas pero no de moverse. En ambos mecanismos, sin embargo, faltaría esclarecer el papel concreto que desempeñan el ER, los MFs de actina y las miosinas.

La implicación de los MFs de actina también se ha puesto de manifiesto para los virus del tipo DGB como es el caso de la MP p7A del MNSV (Genovés *et al.*, 2009). En este caso se ha demostrado además que la DGB2 correspondiente (p7B) necesita del concurso de una ruta de secreción celular activa para llegar a los PDs (Genovés *et al.*, 2011). De manera notable, este mismo requerimiento se pudo demostrar para el movimiento del virus.

Al contrario del TMV y los virus del bloque de los tres genes, los virus formadores de túbulos como *Virus del entrenudo corto infeccioso de la vid* (*Grapevine fanleaf virus*; GFLV) o CPMV no utilizan el ER para llegar a los PDs. El uso de inhibidores del citoesqueleto como la Latrunculina B (desestabilizan los MFs) y Orizalina (desestabilizan los MTs) así como inhibidores de la ruta de secreción como la Brefeldina A (BFA) han puesto de manifiesto que estas MPs formadoras de túbulos

utilizan un camino alternativo al sistema de endomembranas (Nebenfuhr *et al.*, 2002; Ritzenthaler *et al.*, 2002). El transporte de la MP del CPMV a los PDs no se ve afectada por ninguno de estos tratamientos; sin embargo, BFA inhibe la formación de túbulos sugiriendo que el transporte vesicular se requiere para la formación de túbulos o que la BFA interfiere en el direccionamiento de alguna proteína del huésped a la membrana plasmática (Huang *et al.*, 2000; Pouwels *et al.*, 2002). Análisis de mutantes de la MP del CPMV sugirieron que la MP podría primero difundir desde su lugar de síntesis hacia la membrana plasmática como dímero y posteriormente acumularse en estructuras punteadas que serán el lugar de ensamblaje de los túbulos. Para la MP del GFLV, se ha propuesto un mecanismo en el cual tanto la MP como los viriones serían transportados a los PDs mediante su asociación con vesículas secretoras guiadas por MTs y derivadas del aparato de Golgi (Laporte *et al.*, 2003). El tratamiento únicamente con Orizalina o combinado con Latrunculina B no afecta a la generación de túbulos pero provoca que se ensamblen estas estructuras también en sitios ectópicos (Laporte *et al.*, 2003). Tras el tratamiento con BFA disminuye la formación de túbulos, pero no afecta al transporte de la MP de GFLV hacia la periferia. Se sugiere que podría transportarse a través de la ruta de secreción como proteína cargo asociada a la membrana.



**Figura 1.4.2.** Diferentes mecanismos de transporte intracelular. Con el objeto de facilitar la propagación del virus, los componentes virales se trasladan desde los sitios de replicación, normalmente asociados al sistema de endomenbranas de la célula huésped, hasta los PDs. Para ello se han descrito distintos mecanismos: (1) tras la replicación viral, el virus se dirigiría a la periferia celular como VRC o vRNP a través de las membranas del ER utilizando los componentes del citoesqueleto: filamentos de actina (MF), las proteínas motoras miosinas (Mio) y los microtubulos (MT) (ej. del TMV). Los virus pertenecientes al TGB, potex- y hordeilike virus, también utilizan la red ER para desplazarse hacia los plasmodesmos; sin embargo se necesitarían más estudios para esclarecer los elementos del citoesqueleto que estarían implicados. (2) Como alternativa, los virus (ej. los virus formadores de túbulos como GFLV y CPMV) o componentes virales (ej. la MP del MNSV perteneciente al DGB) utilizarían la ruta de secreción de forma que tanto la MP como los viriones serían transportados a los PDs mediante su asociación con vesículas secretoras (V) guiadas por el citoesqueleto y derivadas del aparato de Golgi. (3) Algunos componentes virales son transferidos a la célula vecina. Otros, son reciclados a través de la ruta endocítica (4) o directamente mediante los MT (5). Los endosomas pueden regresar al ER donde las proteínas virales pueden ser reutilizadas o dirigirse a la ruta de degradación (7). Aunque en este dibujo no se contemple, también se ha correlacionado la unión de la MP con los MT con la degradación de la misma.

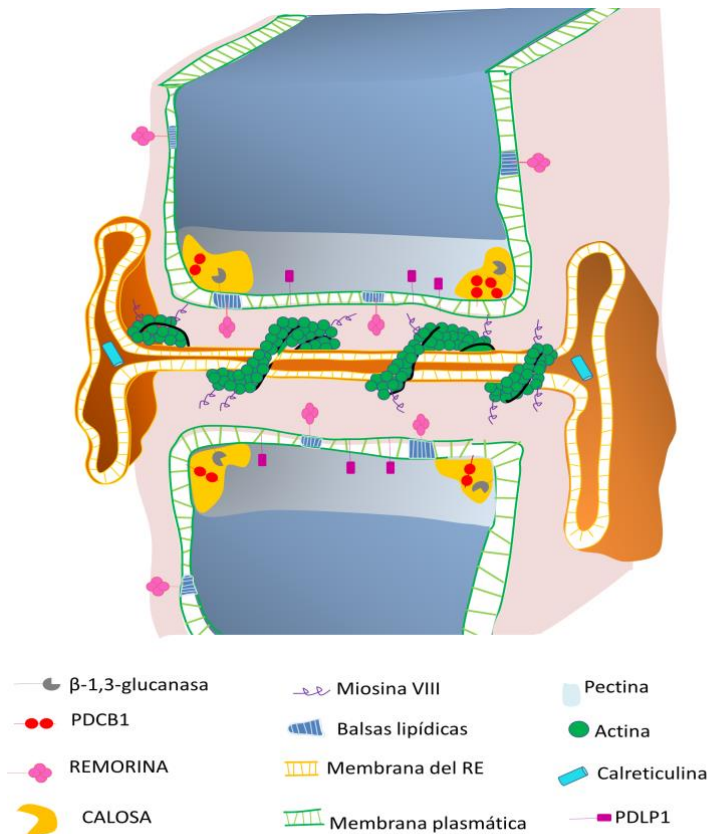
#### 4.2.2. Los plasmodesmos

Una característica de las células vegetales es la presencia de puentes citoplasmáticos, que atraviesan la pared celular, denominados PDs. Estos microcanales mantienen la continuidad de componentes celulares y permiten la circulación de

moléculas entre citoplasmas de células vecinas para el normal desarrollo de la planta. Los virus aprovechan estos canales para la propagación local y sistémica de la infección. Los PDs atraviesan las dos paredes adyacentes por perforaciones acopladas que se denominan poros cuando sólo hay pared primaria, y punteaduras, si además se ha desarrollado la pared secundaria. Normalmente están formados por dos tipos de membranas, la plasmática y la del RE. La membrana plasmática, se prolonga entre células adyacentes y define la parte externa del poro mientras que en el eje axial, el RE junto con determinados factores proteicos forma un elemento central cilíndrico y membranoso conocido como desmotúbulo. El espacio entre la membrana interna y el desmotúbulo es la lámina citoplasmática, y se encuentra interrumpida por microcanales transportadores. La pared celular que rodea el PD presenta depósitos de calosa ( $\beta$ -1,3-glucano) cerca de la apertura del poro. Los PDs primarios se forman en la placa celular durante la citoquinesis y los secundarios se forman post-citoquinesis y se pueden ensamblar a lo largo de la pared celular, permitiendo la conexión de células no relacionadas. Los PDs ya sean primarios o secundarios pueden ser simples o ramificados, dependiendo de la madurez y/o función del tejido.

Entre los componentes del PD cabe destacar (i) las conexinas, también presentes en las uniones gap de las membranas plasmáticas de las células animales; (ii) las dendrinas, que modifican el PD en respuesta a estrés; (iii) las proteínas del citoesqueleto, miosina y actina, responsables del dinamismo del plasmodesmo, esta última dispuesta en espiral alrededor del desmotúbulo donde puede regular el tamaño del SEL, (iv) la pectina metilesterasa (pectin methyl esterase, PME), proteína que se localiza en microdominios del ER próximos a los PDs cuya actividad enzimática es responsable de la desesterificación de algunas proteínas de secreción, (v) las quinasas dependientes de calcio implicadas en la regulación del transporte celular (calcium-dependent protein kinase, CDPK), (vi) la remorina que forma parte de las balsas lipídicas, (vii) la enzima  $\beta$ -1,3-glucanasa, (viii) una familia de proteínas que interaccionan con la calosa (callosa binding protein, PDCB1), ambas relacionadas con la regulación de la permeabilidad del PD, (ix) las proteínas de unión a calcio y centrinas o proteínas tipo centrinas, desempeñando el calcio un papel importante en la regulación del transporte intracelular y finalmente (X) una familia de proteínas integrales de la membrana plasmática que actúan como receptores (plasmodesmata located proteins;

PDLP1-8). Claramente, los plasmodesmos no semejan las uniones gap de las membranas de células animales, sino que son estructuras casi tan complejas y selectivas como los poros presentes en las membranas nucleares (Waigmann *et al.*, 1998; Zambryski, 1995).



**Figura 1.4.3.** Representación de la organización general de un plasmodesmo simple en la cual se puede observar la localización propuesta para las proteínas que forman parte de su estructura. Adaptado de Benitez-Alfonso *et al.*, (2010).

#### 4.2.3. Modelos de sistemas de transporte intercelular

El transporte a través de los PDs es un proceso altamente controlado. Normalmente permite el paso de moléculas pequeñas y solubles mediante transporte pasivo (Benítez-Alfonso *et al.*, 2010; Maule *et al.*, 2011; Radford and White, 2001). Sin embargo, el paso de estructuras macromoleculares, como las partículas virales o genomas virales se encuentra restringido dada la incompatibilidad de su tamaño con el SEL de los PDs. Con el objeto de facilitar la translocación a las células vecinas, los virus han desarrollado distintos mecanismos que regulan el SEL de los PDs, los cuales han

sido descritos previamente. En este proceso están implicadas tanto las MPs como factores del huésped. Dependiendo del nivel de desestructuración del PD diferenciamos dos estrategias virales para el movimiento célula a célula. En el mecanismo ejemplificado por el TMV el genoma viral se mueve en forma de vRNPs, sin requerir la presencia de la CP, que se transportan a través de un PD con el SEL dilatado pero que mantiene su estructura. En el segundo de los mecanismos, cuyo miembro tipo es el CPMV, el genoma viral se mueve en forma de partículas virales a través de estructuras tubulares inducidas por la MP, cuyas características se han detallado previamente, que atraviesan la pared celular desorganizando completamente los PDs. Existiría además un tercer mecanismo que comparte características con el TMV y el CPMV, en el cual se requeriría la presencia de la CP pero no la formación de los viriones.

#### ***Transporte viral basado en la formación de complejos ribonucleoproteicos: TMV***

Los virus que pertenecen a los géneros *Tobamo-*, *Diantho*, *Beny-*, *Tobra-*, *Tombus-*, *Carmo-* y *Hordeivirus* utilizan este mecanismo, siendo el TMV el más representativo. Las MPs que transportan el genoma viral mediante este mecanismo tienen la capacidad de localizarse en los PDs y aumentar el SEL de los mismos, sin modificar drásticamente ni irreversiblemente su estructura por lo que este proceso se encuentra estrechamente asociado con el descrito para la regulación del tráfico de NCAPs (non cell- autonomous proteins) celulares (Lee *et al.*, 2003). Aunque en presencia de la MP del TMV, el SEL aumenta considerablemente, todavía resulta insuficiente para permitir el paso tanto de partículas virales (18 nm de diámetro, longitud 300 nm) como de moléculas nativas de RNA (10 nm) (Gibbs, 1976). Mutantes del TMV que carecían de CP y mantenían la capacidad de infectar las hojas inoculadas descartaron la posibilidad que el transporte célula a célula fuese a través de partículas virales. Citovsky *et al.* demostraron en 1992 que la clave residía en la capacidad de la MP del TMV de unir de manera cooperativa y sin especificidad de secuencia moléculas de ssRNA o ssDNA, característica que comparte con la mayoría de las MPs. Estudios basados en el microscopio electrónico de transmisión permitieron comprender la estructura de estos complejos vRNP en donde la unión de la MP a la molécula de RNA

inducía un cambio en su estructura, dando lugar a un complejo RNA-MP extendido con un diámetro de entre 2 y 2.5 nm, compatible con el tamaño del SEL del PD dilatado. Estos resultados eran consistentes con que la MP del TMV, mediante su unión a RNA, transportase los complejos vRNP infecciosos formados por la MP-vRNA a través de los PDs. En conclusión, el mecanismo de translocación a la célula adyacente se basa en la propiedad que presentan las MPs de localizarse en los PDs, en su capacidad de modificar el SEL del mismo y de unirse a ácidos nucleicos. Recientemente, se ha puesto de manifiesto que el TMV y otros virus de RNA pertenecientes a distintos géneros requieren de la participación de la miosina XI-2 para el movimiento intercelular (Harries *et al.*, 2009b). Sorprendentemente, el *Virus del aclaramiento de las venas del nabo*, un virus del mismo género que el TMV, no requiere de MPs intactos para un normal funcionamiento del movimiento célula a célula lo que pone de manifiesto que los virus de RNA, en cuanto a sus requerimientos para los motores de miosina y MPs, han evolucionado de manera distinta que no correlaciona con sus relaciones filogenéticas.

A pesar de que las MPs de *Hordei-* y *Potexvirus* pertenecen al grupo del bloque de los tres genes (TGB1, TGB2 y TGB3) y que en ambos casos las tres proteínas implicadas en el movimiento se requieren para el movimiento intercelular existen diferencias en cuanto a la composición del elemento viral móvil. Como ocurre con la MP del TMV, las proteínas TGB de *Hordeivirus* son capaces *per se* de mediar el transporte local y en algunos casos el sistémico (Morozov and Solovyev, 2003), y los complejos vRNP únicamente estarían formados por TGB1 y el vRNA (Lim *et al.*, 2008). La implicación de TGB2 y TGB3 en la formación del vRNP aún se desconoce. Una vez el complejo TGB1-vRNA ha alcanzado el PD, estos se anclan a través de interacciones con el desmotúbulo que facilita el transporte del genoma viral a través del poro. Una vez liberado el vRNA a la célula adyacente TGB2 y TGB3 entrarían en una ruta de reciclado hacia los sitios de replicación (Haupt *et al.*, 2005).

Dada la limitada información genética de los virus de plantas, éstos deben reclutar proteínas del huésped para completar su ciclo de infección. Para llevar a cabo su movimiento intercelular los virus se ven obligados a interactuar con proteínas celulares de la membrana, de andamiaje o implicadas en rutas de secreción. Asimismo, se ha descrito que la MP del TMV es capaz de interactuar con una PME de la pared

celular (Chen and Citovsky, 2003), participando dicha unión en el movimiento viral dado que la acción de este enzima modula, indirectamente, la permeabilidad del PD. De la misma manera estudios recientes indican que la MP es capaz de desestructurar los MFs y relacionan esta actividad con el aumento del SEL (Su *et al.*, 2010). Estos resultados, son consistentes con trabajos previos donde demostraban que la alteración de los MFs de actina modificaba la permeabilidad del SEL en tabaco (Ding *et al.*, 1996). Se ha demostrado que esta propiedad también está relacionada con una disminución de la deposición de calosa en el PD. Recientemente se ha propuesto que la interacción en PDs de la MP del TMV con una proteína del huésped que presenta repeticiones de ankyrin (ANK) provoca una disminución de la deposición de calosa y un aumento en el movimiento intercelular del virus (Ueki and Citovsky, 2011). Un dato, también interesante, es que la MP del TMV interacciona con la calreticulina, una proteína implicada en el secuestro de  $Ca^{2+}$  y que se encuentra a veces asociada al ER y a su lumen, en el PD (Chen *et al.*, 2005). Aunque la importancia de esta interacción permanece confusa, se ha demostrado que la sobreexpresión de la calreticulina dirige la MP desde el PD a los MTs, causando una significativa ralentización de la propagación del virus. La colocalización en PDs de Arabidopsis de la MP y una proteína específica de la pared celular con actividad quinasa, PPK1, la cual es capaz de fosforilarla *in vitro*, sugiere que la fosforilación podría desempeñar un papel esencial en el transporte del complejo MP-vRNA a través del PD (Lee *et al.*, 2005). De hecho, se ha observado que a pesar de que el complejo MP-vRNA no es traducible *in vitro* ni es capaz de infectar protoplastos, es, sin embargo, infeccioso en plantas. Se ha propuesto que el paso a través de los PD permite la fosforilación de la MP, lo cual transforma el complejo MP-vRNA en traducible y replicable (Karpova *et al.*, 1997; Karpova *et al.*, 1999).

### ***Movimiento viral guiado por túbulos***

Este mecanismo se ha descrito tanto para virus con genoma de ssRNA (ej. *Como-*, *Nepo-*, *Olea-*, *Bromo-*, *Tospo-*, *Trichovirus*) como de dsDNA (ej., *Caulimovirus* y *Badnavirus*). Se describió por primera vez para el CPMV y se basa en la capacidad que tienen algunas MPs de formar unas estructuras tubulares que albergan viriones intactos y que atraviesan el plasmodesmo destruyendo el desmotúbulo. La MP es la única proteína requerida para la formación de los túbulos pero tanto ésta como la CP

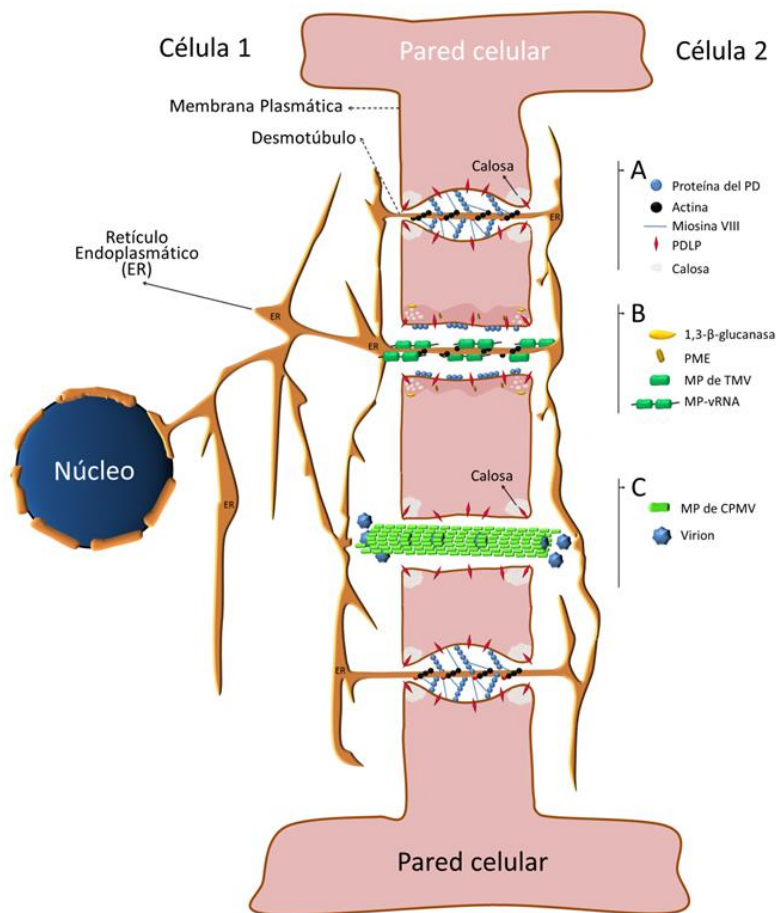


están implicadas en el movimiento del virus (Kasteel *et al.*, 1993; Wellink *et al.*, 1993). Sin embargo recientemente se ha demostrado que la MP del GFLV, clasificada como formadora de túbulos, recluta los receptores PDLP tanto para el ensamblaje de las estructuras tubulares como para el movimiento del virus (Amari *et al.*, 2010). La inactivación de la miosina XI ha puesto de manifiesto su implicación en el transporte intracelular y en el direccionamiento de los receptores PDLPs a los PDs y consecuentemente en el movimiento célula a célula del GFLV (Amari *et al.*, 2011). Durante el ensamblaje de los túbulos los viriones se introducirían específicamente en su interior, los cuales serían liberados a la célula adyacente tras la desestructuración de los mismos (Carvalho *et al.*, 2004; Pouwels *et al.*, 2003; Pouwels *et al.*, 2004). Como hemos descrito con anterioridad, se ha identificado un extremo Ct más largo en las MPs formadoras de túbulos; se especula que este dominio se introduciría dentro del lumen de los túbulos para interactuar con los viriones y facilitar el proceso de translocación viral (Thomas and Maule, 1999; Van Lent *et al.*, 1991). La delección de este dominio da lugar a la formación de túbulos vacíos (Lekkerkerker *et al.*, 1996).

Algunos miembros de la familia *Bromoviridae*, como el CMV y el AMV representan una interesante variación de ambos mecanismos, en la cual no se precisa la formación del virión, aunque sí la formación de un complejo vRNP formado por el vRNA, la MP y la CP, para su movimiento (Lee *et al.*, 2002; Sánchez-Navarro and Bol, 2001). Se trata de una variante al mecanismo guiado por túbulos, en la cual el virus se translocaría a las células vecinas en forma de un complejo vRNP que incluiría también la CP. Se ha relacionado el requerimiento de la CP con la afinidad que presenta la MP por el vRNA (Li and Palukaitis, 1996)

Esta variante también se ha observado en virus del género *Pospovirus* (Soellick *et al.*, 2000) o *Potexvirus* (Turina *et al.*, 2000) y es independiente de la capacidad de la MP viral de formar estructuras tubulares. En el caso de *Potexvirus*, a diferencia de los *Hordeivirus*, la CP desempeña un papel esencial tanto para el transporte célula a célula como a larga distancia. De hecho, únicamente se ha descrito la interacción TGB1-CP para este grupo (Samuels *et al.*, 2007). Hasta el momento existían dos modelos para explicar el transporte de *Potexvirus* a través de los PDs: uno en el que se postulaba que el PVX atravesaría el PD en forma de virión modificado (Santacruz *et al.*, 1998) con la ayuda de TGB2, mediante su interacción con el genoma viral (Hsu *et al.*, 2009) y otro en

el que la partícula vírica consistiría en un complejo RNP formado por la TGB1, la CP y el vRNA (Lough *et al.*, 2000), lo cual se asemejaría más a lo que ocurre con BMV o AMV (Karpova *et al.*, 2006; Lukashina *et al.*, 2009; Zayakina *et al.*, 2009). Sin embargo, recientemente estudios basados en la utilización de virus quimera han esclarecido el papel que desempeña la CP en este proceso y han demostrado que la formación del virión es prescindible para el movimiento célula a célula pero necesaria para el movimiento sistémico (Betti *et al.*, 2012).



**Figura I.4.4.** Representación esquemática de los principales modelos de transporte intercelular basados en las MP del virus del TMV o del CPMV. A, estructura del plasmodesmo (PD) en estado relajado, compuesto por el desmotúbulo o prolongación del retículo endoplasmático (ER), algunas de las proteínas específicas del PD, componentes del citoesqueleto y depósitos de calosa. B) Durante la infección de TMV, la enzima 1,3-β-glucanasa se libera en la pared celular degradando los depósitos de calosa del PD, permitiendo su dilatación y facilitando así el transporte de los vRNP a través del PD. C) Modificaciones generadas por la MP de virus formadores de túbulos, como el CPMV. En esta modelo, la MP se ensambla en estructuras tubulares tras interactuar con proteínas localizadas en el PD, PDLP. Los túbulos reemplazan al desmotúbulo dentro del PD y permiten el transporte de viriones entre células, los cuales, son transportados siguiendo la dirección de ensamblaje y desensamblaje del túbulo.

Experimentos realizados con virus quimera en los que el gen de la MP del AMV se reemplazó por los correspondientes genes del PNRSV, BMV, CMV, TMV o CPMV pusieron de manifiesto que todos los híbridos que se extendían con el Ct de la MP del AMV eran funcionales y que esta región es capaz de interactuar específicamente con partículas virales del AMV *in vitro* (Sánchez-Navarro *et al.*, 2006). Es de destacar que la utilización de una variante defectiva en la formación del virión no afectó el transporte célula a célula de las quimeras, demostrando claramente que las partículas virales no se requieren para el movimiento célula a célula mediado por las MPs del AMV, PNRSV, BMV, CMV, TMV o CPMV. Esta observación podría explicarse si ambos mecanismos, descritos para el movimiento local, pudieran representar dos variantes del mismo sistema de transporte viral en el que el Ct de la MP podría haberse adaptado para reconocer su “correspondiente” CP (Sánchez-Navarro *et al.*, 2006). Es muy probable que esta regla también rijan el movimiento de todos los virus que se mueven guiados por túbulos (ver revisión de Ritzenthaler and Hoffmann, 2007).

#### **4.3. Transporte sistémico de virus de plantas**

El conocimiento que se tiene respecto a los mecanismos que dirigen el movimiento sistémico es menor en comparación con los que rigen el movimiento célula a célula. En el movimiento sistémico o a larga distancia los virus de plantas traspasan varias fronteras intercelulares a través de los PDs. El proceso comienza con la entrada del virus en el tejido vascular de la planta huésped, generalmente el floema, desde las células del mesófilo (mesophyll cells, ME) infectadas (ver revisión (Nelson and van Bel, 1998; Pallás *et al.*, 2011)). Se pueden diferenciar cinco etapas distintas y secuenciales: (i) la entrada del virus en el parénquima vascular (vascular parenchyma, VP) a través de las células de la vaina (bundle sheath, BS); (ii) la translocación a las células acompañantes (companion cell, CC) y los elementos cribosos (sieve element, SE) del VP; (iii) el transporte hacia otros órganos de la planta a través de los SE; (iv) la descarga desde el complejo SE-CC al VP no infectado y (v) el transporte desde el VP a través de las BS a las ME de otros órganos sistémicos de la planta.

La forma, número y distribución de los PDs pueden ser diferentes en cada uno de los tejidos especializados que atraviesan los virus para alcanzar las partes distales de la planta. También puede variar la dificultad con la que los virus las atraviesan (Ehlers and

van Bel, 2010; Fitzgibbon *et al.*, 2010; Turgeon and Wolf, 2009). Se ha demostrado que los PDs que conectan las BS y las ME no suponen una barrera significativa para el movimiento viral (Nelson and van Bel, 1998). De hecho los virus entran a las BS del mismo modo que realizan el transporte célula a célula mientras que el paso de BS a VP ocurre a través de un mecanismo diferente, dado que se ha observado que la acumulación de la MP del TMV en los PDs que comunican ambos tejidos no aumenta la permeabilidad de los mismos (Ding *et al.*, 1992). En algunos huéspedes el paso de BS a VP constituye la primera barrera para el transporte viral y supone el bloqueo del movimiento sistémico (Goodrick *et al.*, 1991; Wintermantel *et al.*, 1997). En la mayoría de los estudios realizados en venas menores siempre hay un mayor porcentaje de células del VP infectadas con respecto a las CC, sugiriendo que incluso en plantas susceptibles la invasión de las CC constituye un paso limitante de la infección sistémica (Gosalvez-Bernal *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2004; Nelson and van Bel, 1998). Por otro lado, exceptuando los virus que se transportan por el xilema, todos los demás deben entrar desde las CC a los SE del floema a través de la ruta simplástica. Con el objeto de garantizar un transporte continuo de macromoléculas los PDs que conectan el complejo CC-SE presentan características morfológicas diferentes, con un SEL (>67 kDa) superior al que presentan otros PDs (1kDa) (Stadler *et al.*, 2005). Por tanto, una vez han alcanzado las CC, los virus potencialmente tienen acceso directo al floema (Kempers and van Bel, 1997; Kempers *et al.*, 1993).

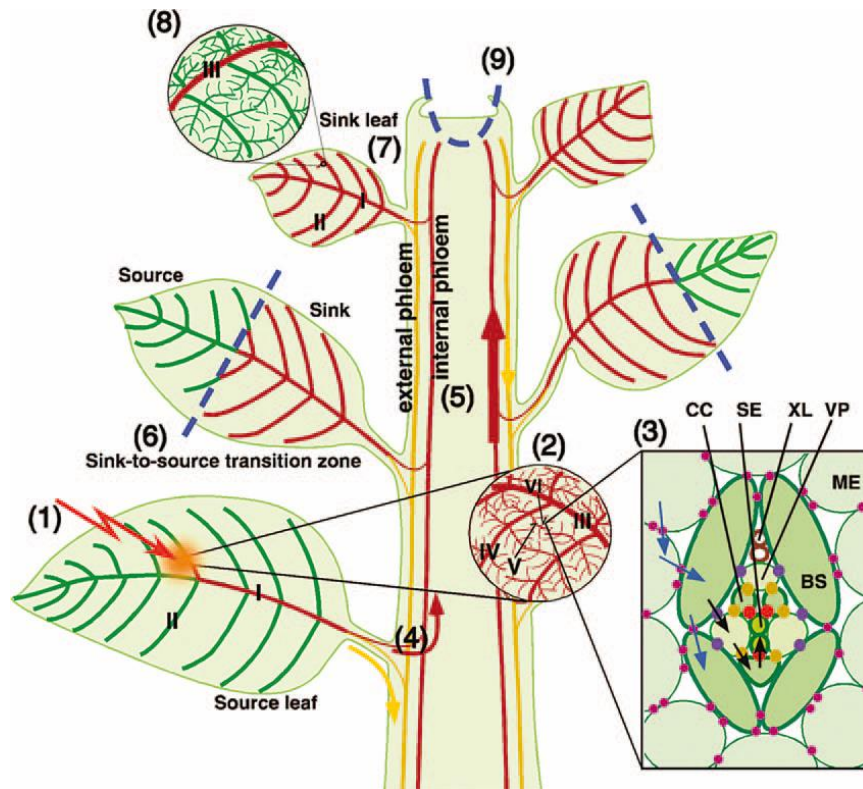
Los posibles mecanismos por los cuales el virus o la molécula de ácido nucleico entra en los SE son hasta ahora especulativos. En este proceso participan proteínas tanto de origen viral como de la planta huésped. Para algunos virus la CP es un elemento dispensable para el movimiento célula a célula; sin embargo, constituye un factor esencial para el transporte a larga distancia, como es el caso del TMV (Bransom *et al.*, 1995; Takamatsu *et al.*, 1987). En otros casos la CP es necesaria en ambos procesos. En general, se cree que la CP participa en el movimiento vascular de la mayoría de los virus mediante la formación del virión, incluyendo *Tobamo-*, *Dianto-*, *Tombus-*, *Gemini-*, *Alfamo-*, *Cucumo-*, *Bromo-*, *Luteo-*, *Potex-* y *Potyvirus* (Desvoyes and Scholthof, 2002; Dolja *et al.*, 1995; Holt and Beachy, 1991; Liu *et al.*, 1999; Lough *et al.*, 2001; Mutterer *et al.*, 1999; Rao and Grantham, 1996; Spitsin *et al.*, 1999; Taliansky and Garcia-Arenal, 1995; Vaewhongs and Lommel, 1995). Sin embargo, la eliminación

de la CP de algunos virus o la utilización de CP mutadas sin capacidad de formar virión han puesto de manifiesto que el proceso de encapsidación no condiciona el transporte viral a larga distancia y que por tanto ambos procesos no siempre están acoplados (Culver *et al.*, 1995; Pooma *et al.*, 1996; Xiong *et al.*, 1993). En los casos en el que la CP no sea necesaria para el transporte vascular, la partícula infecciosa que se transporta posiblemente se tratará de un complejo vRNP. Los *Umbravirus* constituyen un interesante ejemplo, no producen CP pero otra proteína viral asume la función de proteger el vRNA y se requiere la formación del vRNP para alcanzar las partes distales de la planta (Taliensky and Robinson, 2003). Las MPs, además de ser necesarias para el movimiento célula a célula, en algunos virus también desempeñan un papel importante en el movimiento a larga distancia (Jeffrey *et al.*, 1996; Kalinina *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2001). Del mismo modo, se ha descrito que otras proteínas virales no estructurales, como los supresores del silenciamiento del género *Tombus-*, *Poty-* y *Cucumovirus* o de la replicasa del TMV, participan en el movimiento sistémico (Roth *et al.*, 2004; Saenz *et al.*, 2002; Scholthof *et al.*, 1995; Soards *et al.*, 2002). Respecto a los factores del huésped que participan en este proceso, se ha observado la posible implicación de diferentes proteínas floemáticas que interaccionarían y facilitarían la translocación tanto de virus de RNA (Requena *et al.*, 2006) como de viroides (Gómez and Pallás, 2001; Gómez and Pallás, 2004; Gómez *et al.*, 2005; Owens *et al.*, 2001). Si estas proteínas participan de manera generalizada en la translocación de estos virus es una cuestión todavía sin resolver. Existen determinados factores celulares que actúan directamente regulando el transporte viral *per se*, facilitándolo como la PME (Chen and Citovsky, 2003), o restringiéndolo, como algunos componentes de la pared celular (Beffa and Meins, 1996; Iglesias and Meins, 2000). También pueden actuar indirectamente sobre el movimiento viral a través del silenciamiento génico post-transcripcional (Post-Transcriptional Gene Silencing; PTGS) (Moissiard and Voinnet, 2004; Voinnet, 2001). Una vez en el SE, el genoma viral, en forma de complejo o de virión, también podría interaccionar con proteínas endógenas para estabilizarlo durante su transporte a larga distancia (Gilbertson and Lucas, 1996). Así pues, una vez el virus ha entrado en el floema éste es transportado junto al flujo de fotoasimilados (Schiender, 1965) a través de un mecanismo basado en la hipótesis de Münch (Leisner and Turgeon, 1993), mediante el cual el gradiente de presión hace que

el flujo vaya desde el tejido fuente al tejido sumidero por lo que el virus se mueve a una velocidad elevada comparable a la del tránsito de estas macromoléculas. El transporte sistémico estaría influenciado, por tanto, por los mismos patrones que regulan el flujo fotosintético, por lo que, la velocidad y dirección de este transporte depende de la fuerza relativa fuente-sumidero, la proximidad de la fuente al sumidero y las interconexiones del sistema vascular (Patrick, 1991). Sin embargo, algunos virus utilizan el xilema para alcanzar las partes distales de la planta.

De forma esquemática, los virus de plantas, al igual que los fotoasimilados, se dirigen desde el tejido maduro (fuente) hacia el tejido joven (sumidero) más cercano, que está creciendo activamente y que está directamente conectado por el sistema vascular. La apertura de los PDs cambia de simples canales a complejas estructuras ramificadas durante la transición fuente-sumidero de las hojas, lo cual modifica la permeabilidad de los mismos (Oparka *et al.*, 1999). Los PDs ramificados que aparecen en las hojas fuente son los que constituyen un centro de control que determina qué tipo de moléculas pueden entrar al floema (Oparka and Turgeon, 1999), mientras que los PDs simples permitirían una rápida entrada de macromoléculas a la hoja en crecimiento (sumidero) (Oparka *et al.*, 1999; Wang and Fisher, 1994). Los factores y condiciones que modulan el desarrollo de una planta condicionan totalmente la forma en la que el virus le invade y su distribución final en la misma. Del mismo modo, las condiciones ambientales bajo las cuales las plantas crecen antes de la inoculación, en el momento de la inoculación y durante el desarrollo de la enfermedad pueden tener profundos efectos en el curso de la infección. Además, la influencia de la disposición filotáctica de las hojas respecto del sitio de entrada de los virus así como el estado fenológico de la planta en el momento de la misma se ha demostrado tanto para virus DNA (Leisner, 1992 ) como para virus RNA (Mas and Pallás, 1996).

Disponemos de escasa información sobre la descarga de solutos desde el floema a los tejidos sumideros, aunque, en general, la descarga simplástica parece ser la más común (Fisher and Oparka, 1996). Estudios realizados en plantas de *N. benthamiana* infectadas con el PVX han demostrado que la descarga del virus es simplástica y ocurre a través de las venas mayores (Roberts *et al.*, 1997).



**Figura I.4.5.** Rutas celulares del movimiento sistémico de los virus de plantas. (1,2) Se representa una infección viral iniciada en las ME de la hoja fuente, desde donde el virus se mueve célula a célula hasta alcanzar el tejido vascular en el que entra a través de las venas mayores y menores (I-V). (3) Para entrar en el floema el virus debe atravesar las ME, las BS, VP, las CC y llega a los SE. El movimiento desde ME a ME, ME a BS, y de BS a BS requiere únicamente las MPs, que se indican con flechas azules. El movimiento desde BS a VP, VP a CC y CC a SE requiere factores virales adicionales, que se indican con flechas negras. (4) Una vez en los SE el virus saldrá de la hoja inoculada usando el floema adaxial (en rojo) y abaxial (en amarillo) de las venas de la hoja, el cual conecta con el floema interno y externo del tallo, respectivamente. (5) El floema interno (flecha roja oscura) media el movimiento rápido hacia arriba del virus, el floema externo (flecha amarilla) el movimiento lento hacia abajo. (6) Las hojas pasan de ser sumidero a fuente durante su maduración, marcando una barrera para la invasión viral (línea discontinua en azul) (7,8) Para la completa infección sistémica los virus se descargan desde el floema de hojas sumidero, lo que suele ocurrir desde las venas mayores. (9) El meristemo apical se mantiene aislado no permitiendo el transporte de los virus, así como el de otras macromoléculas. (Adaptado de (Waigmann *et al.*, 2004).

#### 4.4. Las MPs como determinantes de la especificidad del huésped

En algunos casos, la incapacidad de un virus para infectar determinados huéspedes se ha relacionado con su incapacidad para moverse célula a célula (Malysenko *et al.*, 1988; Sulzinski and Zaitlin, 1982). Dado que las MPs desempeñan el principal papel en este proceso se consideran, entre otros factores virales, candidatas

a determinar la susceptibilidad en un determinado huésped. Existen un gran número de estudios encaminados a conocer la variabilidad adaptativa de los virus en huéspedes inicialmente resistentes. Sin embargo, se sabe muy poco sobre los factores virales que determinan la gama de huéspedes de un determinado virus.

En los Bromovirus, la gran variabilidad que presentan las correspondientes secuencias de sus MPs sugiere la importancia que puede tener esta proteína viral en el proceso de adaptación al huésped. Cabe destacar que mientras las plantas monocotiledóneas, incluyendo los cereales, son el principal huésped natural a nivel sistémico del BMV, las plantas dicotiledóneas lo son para la mayoría de *Bromovirus*, como el *Virus del moteado clorótico del caupí/chícharo* (*Cowpea chlorotic mottle virus*; CCMV). Con el objeto de estudiar la posible contribución de la MP en la divergencia que presentan los *Bromovirus* respecto a la gama de huéspedes se realizaron reordenamientos de los distintos segmentos que constituyen el genoma de dos especies altamente relacionadas, el BMV y el CCMV (Dasgupta and Kaesberg, 1982; Rybicki and Von Wechmar, 1981), lo cual confirmó una mayor implicación del RNA3 en este proceso, junto con el RNA 1 y 2 (Allison *et al.*, 1988); posteriormente se abordó el análisis individual de la implicación del RNA3, intercambiando entre ambas especies los genes que expresan la MP. Ambos virus quimera, BMV (MP CCMV) y CCMV (MP BMV), al igual que las especies wt, eran capaces de replicarse e invadir sistémicamente *N. benthamiana* (Mise *et al.*, 1993); sin embargo habían perdido la capacidad de infectar sus huéspedes naturales, maíz (monocotiledónea) y caupí (dicotiledónea) (Kuhn, 1964; McKinney *et al.*, 1942; Rao and Grantham, 1995). Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de adaptación de la MP para que el proceso infeccioso de *Bromovirus* en estos huéspedes tenga éxito (Allison *et al.*, 1988; Mise *et al.*, 1993). En trabajos posteriores se demostró que un único cambio en la secuencia de nucleótidos permitía a la MP del BMV adaptarse al caupí y por tanto al virus quimera CCMV (MP BMV) invadir sistémicamente al huésped natural del BMV (Fujita *et al.*, 1996).

Del mismo modo, el intercambio de diferentes fragmentos del RNA3 entre BMV wt (M1) y un aislado del BMV (M2) capaz de infectar a nivel sistémico una variedad de caupí (Tvu-612) (Valverde, 1983) demostró que la mitad 5' del RNA3, que contiene el gen de la MP, ejercía una mayor influencia sobre BMV-M2 en la infección sistémica del caupí (Tvu-612) y por tanto en la determinación de la especificidad de huésped (De



Jong and Ahlquist, 1991; De Jong and Ahlquist, 1995). Estos resultados eran consistentes con observaciones previas acerca de la implicación del RNA3 en un proceso infeccioso a nivel sistémico en el CCMV (Shang and Bujarski, 1993). La comparación entre las secuencias de nucleótidos de los genes que expresan la MP de ambos aislados reveló diferencias en cuatro posiciones distintas. El estudio independiente del efecto que producía cada uno de estos cambios en el movimiento viral puso de manifiesto que todos ellos eran necesarios para que la MP del aislado BMV (M2) se adaptase al caupí (Tvu-612). Esta adaptación va dirigida al aumento de la capacidad de movimiento local, sugiriendo que la capacidad de alcanzar las partes distales del caupí (Tvu-612) está condicionada por la tasa del transporte célula a célula (De Jong *et al.*, 1995). Posteriormente, se sugirió que la incompatibilidad de huésped podría deberse a un mecanismo de respuesta de la planta (Mise and Ahlquist, 1995).

La propiedad que presenta la MP de los *Bromovirus* como determinante de la especificidad de huésped no es una característica exclusiva de este género. En *Tobamovirus*, se ha observado que el movimiento de un virus compatible con un determinado huésped complementa el movimiento de otro virus incompatible en dicho huésped (Malysenko *et al.*, 1989). En este sentido, Fenczik *et al.* (1995) demostraron que la delección de los 11 amino ácidos C-terminales de la MP del *Virus de los anillos del odontoglossum* (*Odontoglossum ringspot virus*; ORSV) permitía que un quimera del TMV, que contenía la MP del ORSV, infectase sistémicamente plantas de tabaco mientras que perdía la capacidad de infectar orquídeas de vainilla (*Orchidaceae*), huésped natural del ORSV.

## **5.- LAS MPs COMO DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD**

El desarrollo de una enfermedad determinada en plantas está condicionado por las interacciones moleculares que se dan entre el virus y el huésped. Estas interacciones pueden afectar a la replicación viral, al movimiento a corta o a larga distancia, al desarrollo de los síntomas y al desencadenamiento del sistema defensivo de la planta (Carrington and Whitham, 1998; Lazarowitz, 1999; Pallás and Garcia, 2011). A pesar de todos los avances conseguidos respecto a las bases de la patogénesis viral, la complejidad de estas interacciones y particularmente de los mecanismos

implicados en el desarrollo de la enfermedad hace que todavía queden muchas dudas por resolver.

Se establece una **interacción compatible** entre la planta hospedadora y el virus (Hammond-Kosack and Jones, 1997) cuando las defensas constitutivas de la planta son inadecuadas o cuando la planta no detecta al patógeno o tarda en hacerlo, provocando que las respuestas de defensa inducibles sean inefectivas. Esta interacción permite que el patógeno invada, se multiplique y se distribuya por los tejidos de la planta, produciendo síntomas generalizados característicos de cada patógeno. Por el contrario, si la planta reconoce rápidamente la partícula viral, se establece una **interacción incompatible** y desfavorable para el virus. En estas condiciones, no se produce una infección generalizada dado que se activa la expresión de mecanismos de defensa que impiden que el virus se distribuya por toda la planta, lo que da lugar a un cierto nivel de resistencia que puede ser variable. Los distintos mecanismos de resistencia, entre los cuales destacamos la respuesta hipersensible, los genes de resistencia y el silenciamiento génico post-traducciona se detallaran más adelante.

Para que el proceso de infección viral tenga éxito los virus no solo han de superar los sistemas de defensa de la planta; también han de completar los distintos procesos que constituyen su propio ciclo vital dentro de la célula vegetal (Maule *et al.*, 2002), los cuales hemos detallado previamente. A pesar de que existen evidencias experimentales para cada uno de los distintos elementos que contribuyen al proceso de patogénesis viral, en este trabajo nos centraremos en el estudio del carácter patogénico de las MPs.

Dentro del ciclo infeccioso de un virus de planta, una vez se ha sintetizado la progenie viral, la invasión de los diferentes tejidos de la planta resulta esencial para que el proceso infeccioso tenga éxito. El desarrollo de la sintomatología suele correlacionarse con la distribución del virus en la planta. Durante el transporte a corta y a larga distancia las MPs desempeñan un papel fundamental, especialmente en el transporte local. La translocación del virus se produce a través de los sistemas de transporte celulares de la planta, por lo que es lógico pensar que el movimiento viral y por tanto las MPs son elementos determinantes de la patogénesis. Una de las estrategias más comunes que impiden que un virus infecte una planta consiste en bloquear su movimiento célula a célula o a larga distancia. Consecuentemente,

cualquier cambio que pueda afectar a las propiedades de las MPs o a sus funciones tendrá un efecto directo en la sintomatología. En este sentido, la mayoría de estudios se han realizado con mutantes naturales o artificiales de las MPs, o con virus pseudorecombinantes. Debido al reducido genoma que presentan los virus de plantas y a la multifuncionalidad de las proteínas virales se ha sugerido que un número limitado de cambios en la secuencia de nucleótidos de un virus podría afectar considerablemente al fenotipo causado en una infección viral. La primera variante sintomática que se correlacionó con una mutación en la MP se observó en el mutante termosensible Ls-1 del TMV, el cual tiene afectada la capacidad de infectar las partes distales de la planta a altas temperaturas (Nishiguchi *et al.*, 1978). La variante Ls-1 causa lesiones necróticas de menor tamaño que la variante silvestre en plantas de tabaco hipersensibles. El alineamiento entre la secuencia de la variante silvestre y la del mutante Ls-1, reveló que un cambio de prolina por serina en el gen de la MP era el responsable de dicho comportamiento (Ohno *et al.*, 1983). Posteriormente, plantas hipersensibles de tabaco, que expresaban constitutivamente la MP del TMV, se infectaron con un mutante del TMV deficiente en esta proteína, lo cual puso de manifiesto que la gravedad de los síntomas de la enfermedad en hojas sistémicas y la acumulación del virus en las partes distales de la planta dependían de la cantidad de MP presente en el tejido (Arce-Johnson *et al.*, 1995). Un estudio realizado con dos cepas distintas del CaMV permitió determinar que unas modificaciones en una región concreta de la MP causaban un aumento en la gravedad de los síntomas y en la acumulación del virus (Anderson *et al.*, 1991). Distintos trabajos muestran resultados similares: (i) Tsai and Dreher (1993) demostraron que un único cambio en la secuencia de nucleótidos de la MP del *Virus del mosaico amarillo del nabo* (*Turnip yellow mosaic virus*; TuYMV) mejoraba la eficiencia del movimiento viral y permitía una mayor acumulación y un aumento en la gravedad de los síntomas; (ii) Moreno *et al.* (1997) realizaron un estudio en el cual distintos niveles de expresión de la MP del *Virus de la aspermia del tomate* causaba diferencias en la gravedad de los síntomas de dos cepas distintas (iii) Rao and Grantham (1995) mediante el reordenamiento de los segmentos de un aislado del BMV asintomático y otro sintomático identificaron que el determinante genético responsable de la inducción de la sintomatología en plantas de

*N. benthamiana* era causada por un único cambio (Valina-266 por Isoleucina-266) en la secuencia de aminoácidos de la MP.

El desarrollo de una enfermedad también puede ocurrir como resultado de una interacción específica entre el virus y distintos factores del huésped. Se han descrito numerosas interacciones entre las MPs y factores del huésped; la mayoría de ellas están implicadas en el transporte a corta o a larga distancia del virus y relacionadas con la sintomatología de la enfermedad. Estos factores pueden localizarse en el núcleo (p.ej. fibrilarina, ALY, GNC5, etc.), citoplasma (p.ej. TiP1, RME-8, HFi22, ANK, etc.), ER (p.ej. Tm-2), microtúbulos (p.ej. MPB2C, DNA-J, At4/1 etc.) o en membrana plasmática (p.ej. calreticulina, PME, una familia de proteínas integrales PDLP1-8, Atp8, etc.) (Pallás and Garcia, 2011). Por ejemplo, recientemente se ha propuesto que la interacción en PDs de la MP del TMV con una proteína del huésped que presenta repeticiones de ankyrin (ANK) provoca una disminución de la deposición de calosa y un aumento en el movimiento intercelular del virus (Ueki and Citovsky, 2011). En este sentido, la MP (TGB2) del PVX interacciona con TiP-1, que a la vez interacciona con el enzima  $\beta$ -1,3-glucanasa (Fridborg *et al.*, 2003), el cual participa en la regulación del SEL del PD (Iglesias and Meins, 2000).

El conocimiento a nivel genético y molecular que disponemos de determinados huéspedes ha permitido identificar factores del huésped que a través de su interacción con las MPs de los virus contribuyen a la susceptibilidad o al desarrollo de los síntomas. En este sentido, Kleinow *et al.* (2009) identificaron tres sitios susceptibles de ser fosforilados en la MP del *Virus del mosaico del abutilón* (*Abutilion mosaic virus*; AbMV), los cuales están relacionados con el desarrollo de la sintomatología y/o con la acumulación del DNA viral. Recientemente, mediante el sistema de los dos híbridos de levadura se ha demostrado la interacción entre una chaperona de *Arabidopsis* (cpHSC70-1) y la MP del AbMV. Los resultados obtenidos mediante el silenciamiento génico de la chaperona han sugerido que esta proteína podría ser relevante para el transporte viral y la inducción de síntomas (Krenz *et al.*, 2010).

Las MPs virales también constituyen los factores determinantes de la superación de la resistencia en determinados huéspedes como es el caso de la resistencia mediada por el gen *Sw-5* de tomate frente al *Virus del bronceado del tomate* (*Tomato spotted wilt virus*; TSWV) y del que se hablará más adelante por ser objeto de estudio en un

capítulo de la presente Tesis. De forma similar se identificaron dos sustituciones en la secuencia de aminoácidos de la MP del ToMV las cuales confieren la capacidad de superar la resistencia mediada por el gen *Tm-2<sup>2</sup>* (Calder and Palukaitis, 1992; Weber *et al.*, 1993). Mediante el uso de recombinantes Meshi *et al.* (1989) demostraron que únicamente se requerían dos cambios aminoacídicos en la MP del TMV para superar de la resistencia mediada por el gen *Tm-2* en tomate.

El uso de plantas transgénicas que sobreexpresan MPs ha contribuido en gran medida a comprender el papel que desempeñan estas proteínas en la patogénesis. Diferentes experimentos han demostrado que la sobreexpresión temporal o constitutiva de las MPs provoca la aparición de la sintomatología típica de una infección viral incluyendo clorosis y una deficiencia en el desarrollo normal de la planta. La localización típica de las MPs, cuando se expresan transitoriamente o desde un transgén, suelen ser los PDs lo cual podría significar que los síntomas causados se deben al bloqueo del funcionamiento normal de estos microcanales. Uno de los efectos inmediatos de la acumulación de las MPs en PDs, es el aumento del SEL, lo cual se cree que está relacionado con la alteración en el metabolismo y distribución de los carbohidratos (Olesinski *et al.*, 1996). Sin embargo, Balachandran *et al.* (1995) proponen que la MP del TMV interviene en la distribución de los carbohidratos mediante un mecanismo independiente al proceso de aumentar el SEL de los PDs. Estas alteraciones en el metabolismo de carbohidratos han sido descritas previamente en un contexto viral (Herbers *et al.*, 2000; Love *et al.*, 2005; Tecsi *et al.*, 1994).

En general, se ha observado un aumento en los niveles de sacarosa, glucosa, fructosa y almidón de las hojas-fuente en plantas transgénicas para distintas MPs. Sin embargo, al contrario de lo esperado, dado que en estas hojas los PDs estarían dilatados, se observa una disminución en el transporte de sacarosa (Hofius *et al.*, 2001). Con el objeto de aclarar este fenómeno Rinne *et al.* demostraron en 2005 que la expresión constitutiva de la MP del TSWV (NSm) en plantas de tabaco bloqueaba el paso a través de los PDs y afectaba al desarrollo de planta. A altas temperaturas la sintomatología típica de plantas transgénicas para la MP desaparecía, restaurando el tráfico a través de los PDs. Estos resultados sugieren que la clorosis observada en plantas que expresan la NSm es el resultado de la inducción del sistema de defensa

basal de la planta, el cual trata de contrarrestar la presencia de las MPs en los PDs bloqueando el paso mediante la deposición de calosa (Rinne *et al.*, 2005).

## **6.- GENES DE RESISTENCIA**

### **6.1. Barreras frente a patógenos**

Para contrarrestar los efectos dañinos que causan los virus, las plantas han desarrollado distintas estrategias para reconocer y defenderse de estos patógenos. Nos referimos a **resistencia pasiva** cuando la planta no es susceptible a la infección de un determinado virus debido a que no es un huésped natural del patógeno. Las plantas disponen además, de mecanismos constitutivos de defensa: las barreras estructurales o físicas, entre los que destacamos la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y los químicos tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales. Por el contrario la **resistencia activa o inducida** obedece a una respuesta de la planta frente al ataque de un patógeno (Collinge *et al.*, 1994). Para que se induzca este proceso se requieren sistemas de reconocimiento específico que permitan a la planta detectar la presencia del patógeno (Hutcheson, 1998). Los mecanismos de defensa inducidos pueden ocurrir de manera específica o no-específica. Las moléculas efectoras que inducen una respuesta no-específica pueden ser componentes derivados de la pared celular, liberados por la actividad hidrolítica de los enzimas del patógeno, o efectores comunes en distintos microbios, incluyendo no- patógenos, como lipopolisacáridos, quitinas, glucanos y flagelinas (Nurnberger *et al.*, 2004; Ron and Avni, 2004; Schwessinger and Zipfel, 2008; Zipfel, 2008) conocidos como patrones moleculares asociados a microbios o a patógenos, los cuales son reconocidos por receptores transmembrana de reconocimiento de patrones. Por el contrario los mecanismos de defensa específicos se inducen por efectores expresados por los genes de avirulencia (avirulence, Avr), que el patógeno libera en el interior celular en estadios iniciales de la infección. El reconocimiento por parte del huésped implica la interacción directa o indirecta entre los productos del Avr del patógeno invasor y de una proteína de resistencia (resistance, R) de la planta. Cuando se produce esta interacción, la planta que expresa R será resistente a la infección del patógeno con los correspondientes efectores (Avr). Esta respuesta se basa en el modelo de la teoría del gen por gen descrito por Flor en el

año 1971 en el cual las proteínas R actúan como receptor y las proteínas activadoras Avr como ligando. La formación del complejo receptor-ligando inicia una cascada de transducción de señales que finalmente desencadenan la **respuesta hipersensible**. A pesar de que se han realizado grandes esfuerzos en este sentido, prácticamente no se han demostrado interacciones directas R y Avr, lo cual ha llevado a la formulación de la “hipótesis guarda” (Thomma *et al.*, 2011; van den Ackerveken *et al.*, 1992; van der Biezen *et al.*, 2002). De acuerdo con este modelo un efector del patógeno que actúa como factor de virulencia tiene una diana determinada en la planta conocida como proteína “guarda”; la interacción con dicha proteína provoca determinados cambios que inducen un patrón molecular distinto, lo cual activará el correspondiente gen de resistencia, dando lugar a la inmunidad. En algunos casos la resistencia se activa cuando la proteína R reconoce el producto del patógeno, lo cual no implica una interacción directa entre R y Avr. Uno de los ejemplos que mejor evidencian la “hipótesis guarda” es la resistencia que presenta *Arabidopsis thaliana* *pv maculicola* (RPM1) a *Pseudomonas syringae*. En este caso la proteína R (guard) se activa de forma indirecta cuando una proteína de interacción con RPM1, RIN4 (guarda), es modificada mediante su asociación de la proteína Avr del patógeno (Belkadir *et al.*, 2004).

La respuesta hipersensible, también conocida como respuesta primaria da lugar a una serie de procesos bioquímicos y fisiológicos que provocan la muerte celular programada y como consecuencia aparecen lesiones necróticas a nivel local que confinan la infección en el punto de entrada del virus e impiden la invasión sistémica por toda la planta (Hammond-Kosack and Jones, 1997; Heath, 2000). Dentro de los eventos moleculares que están asociados a la respuesta hipersensible destacamos la generación de especies reactivas de oxígeno (Lamb and Dixon, 1997), aumento de los niveles de ácido salicílico (salicylic acid, SA) (Malamy *et al.*, 1990), lignificación de la pared celular y deposición de calosa entorno a la lesión, sustancias que actúan como barrera impidiendo la penetración del patógeno, síntesis de compuestos como las fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis (pathogenesis related proteins, PR) que se concentran en el sitio de infección y en los tejidos adyacentes durante y después de la infección (Conejero and Semancik, 1977; Hammerschmidt and Dann, 1999). Tras la infección del patógeno se inducen desde el sitio inicial de la infección una serie de señales sistémicas que se relacionan con el aumento de los

niveles de SA y la síntesis de proteínas PR. Esta respuesta de defensa se conoce como **resistencia sistémica adquirida** la cual permite a la planta defenderse con mayor intensidad y velocidad frente a una segunda infección de un patógeno (Hutcheson, 1998).

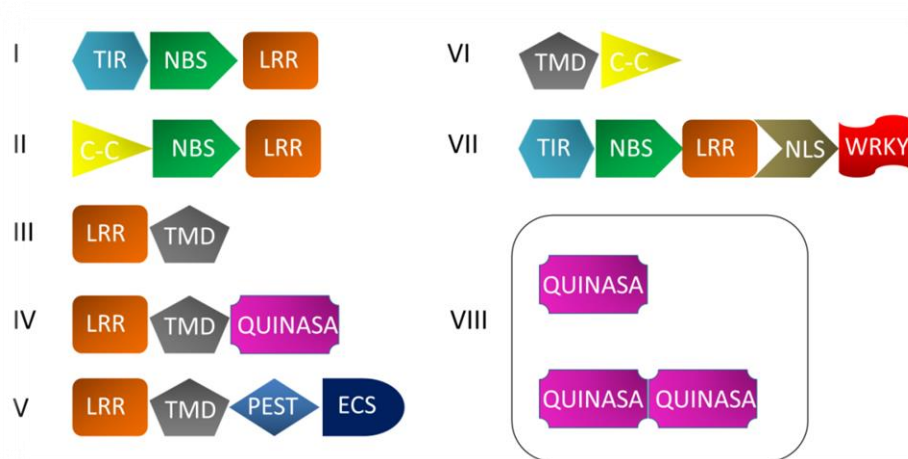
Uno de los mayores descubrimientos de los últimos años ha sido la identificación del **PTGS** como mecanismo de defensa frente a ácidos nucleicos invasores (Gómez and Pallás, 2013; Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009). En plantas se han descrito varias rutas de silenciamiento génico endógeno, aparte de las implicadas en defensa, las cuales tienen un importante papel en la regulación transcripcional (transcriptional gene silencing, TGS). El PTGS se induce por la presencia de RNAs bicatenarios de diverso origen o RNAs monocatenarios con una alta estructura secundaria (hairpins) que son procesados en moléculas de RNAs bicatenarias de entre 18 y 25 nts (small RNAs, sRNAs) por RNAsas de tipo III denominadas en plantas Dicer-Like (DCLs) (Bernstein *et al.*, 2001). Los sRNAs generados por la acción de DCL poseen dos nucleótidos protuberantes en los extremos 3' en ambas cadenas. Una RNA helicasa separa ambas cadenas de sRNAs y una de ellas es reclutada en un complejo inductor del silenciamiento (RNA-induced silencing complex, RISC), que contiene una proteína Argonata con actividad RNasa H, además de otros componentes. Una vez ensamblado, RISC es guiado por el sRNA hasta un mRNA mensajero de secuencia complementaria (diana) al que este complejo se une induciendo la inhibición de su traducción o su degradación. La respuesta de silenciamiento puede amplificarse mediante la síntesis de nuevos dsRNAs por la acción de una RNA polimerasa celular dependiente de RNA que utiliza como molde los ssRNAs generados tras el corte por el complejo RISC o sobre otros ssRNAs aberrantes. Estos dsRNAs son entonces procesados por DCL para generar los denominados sRNAs secundarios.

## **6.2. Genes de resistencia**

La identificación y clonación de distintos genes de resistencia ha permitido clasificarlos en 8 grupos según la organización de los distintos motivos de aminoácidos y de los dominios transmembrana que presentan en su secuencia. La mayoría de los genes de resistencia presentan en su secuencia repeticiones ricas en leucinas (Leucine rich repeats, LRR). La variedad observada en este dominio está relacionada con



especificidad del reconocimiento (Jones, 2001). El primero (I) de los grupos incluye genes R que expresan proteínas citosólicas que presentan una región de unión a nucleótidos (nucleotide-binding site, NBS), el dominio LRR en su extremo C-terminal y en su extremo N-terminal un dominio con alta homología con el dominio receptor TIR (toll-interleukin-1-receptor) de mamíferos. El segundo (II) de los grupos contiene genes R que consisten en proteínas citosólicas que presentan los motivos LRR y NBS y un dominio desestructurado (coiled coil, C-C) en su extremo N-terminal. El tercero (III) presenta proteínas R con un dominio extracitosólico rico en repeticiones de leucina (extracellular leucine rich repeat; eLRR), unido a un dominio transmembrana (transmembrane domain; TMD). El cuarto (IV) grupo consiste en un dominio extracelular LRR, un TMD y un dominio quinasa (kinase; KIN) serina –treonina intracelular (Song *et al.*, 1995). El quinto (V) contiene proteínas con eLRRs, junto con un dominio para la degradación de proteínas (protein degradation domain; PEST) (Pro-Glu-Ser-Thr) y un motivo de señalización de endocitosis (endocytosis cell signaling domain, ECD) que dirigiría la proteína a un receptor implicado en endocitosis. El sexto grupo (VI) está constituido por genes de resistencia que contienen un dominio TMD, fusionado a un dominio C-C, mientras que el séptimo grupo (VII) presenta dominios TIR-NBS-LRR que se extienden su extremo Ct con una señal de localización nuclear (nuclear localization signal; NLS) y un dominio WRKY. Este último dominio consiste en una región de 60 amino ácidos que se caracteriza por contener una secuencia conservada (WRKYGQK) en su extremo Nt junto con un motivo tipo dedos de zinc. Por último el octavo grupo, o grupo de los genes de resistencia enzimáticos, no contiene ni el dominio LRR ni el NBS. Dependiendo del gen puede presentar un único dominio quinasa Serina-Threonina o dos en tándem (quinasa-quinasa).



**Figura I.6.1.** Clasificación de los genes de resistencia según los dominios funcionales. LRR, repeticiones ricas en Leucina; NBS, región de unión a nucleótidos; TIR, dominio receptor; C-C, dominio desestructurado; TMD, dominio transmembrana; PEST, dominio para la degradación de proteínas; ECS, dominio señalización endocitosis; NLS, señal de localización nuclear; WRKY, secuencia de aminoácidos conservada.

Dado que la presente tesis contiene un capítulo sobre la resistencia mediada por el gen *Sw-5*, nos centraremos únicamente en las características de este y en su mecanismo de acción.

#### Resistencia mediada por el gen *Sw-5*

El locus *Sw-5* confiere los mejores niveles de resistencia en tomate frente al TSWV y a otros dos *Tospovirus*, GRV y el *Virus de la mancha clorótica del tomate* (Boiteux and Giordano, 1993). *Sw-5* procede de la especie *Solanum peruvianum* y mediante introgresión se introdujo en variedades de tomate comerciales (Aramburu and Rodriguez, 1999; Stevens *et al.*, 1991). El locus *Sw-5* contiene al menos cinco parálogos *Sw-5(a)-(e)*, de los cuales el gen dominante *Sw-5(b)* es el verdadero gen R y el responsable de conferir resistencia (Spassova *et al.*, 2001). El gen *Sw-5(b)* expresa una proteína de 1246 amino ácidos que se clasifica dentro del grupo II de genes R que expresan proteínas citoplasmáticas y se caracterizan por presentar C-C-NBS-LRR (Figura I.6.1.) (Spassova *et al.*, 2001); se ha descrito que presenta una notable similitud con el gen *Mi* de tomate que confiere resistencia a nematodos (Brommonschenkel *et al.*, 2000). La resistencia mediada por *Sw-5* sigue el modelo gen a gen descrito previamente, cuyo fenotipo se caracteriza por el desencadenamiento de la respuesta hipersensible que provoca la aparición de manchas necróticas a nivel local que

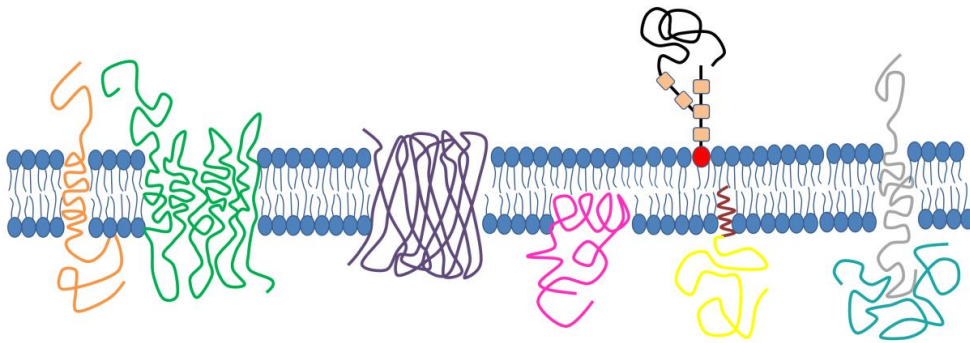
confinan la infección en el punto de entrada impidiendo la invasión sistémica de toda la planta (Flor, 1971; Staskawicz *et al.*, 1995). La mayoría de los genes R de virus de plantas se clasifican dentro del grupo NBS-LRR, dando lugar a una resistencia monogénica dominante. Sin embargo, también se han descrito en sistemas virales genes R con carácter recesivo (Jones *et al.*, 1994).

En los últimos años la resistencia mediada por *Sw-5* se ha visto comprometida por la aparición de aislados del TSWV capaces de infectar variedades resistentes, los cuales se han descrito en la República de Sur África (Thompson and van Zijl, 1995), Hawaii (Canady *et al.*, 2001; Gordillo *et al.*, 2008), Australia (Latham and Jones, 1998), España (Aramburu and Marti, 2003; Margaria *et al.*, 2004) o Italia (Roggero *et al.*, 2002; Zaccardelli *et al.*, 2008). Debido a su compleja organización genómica, todavía no disponemos de un clon infeccioso del TSWV, lo cual dificulta enormemente el estudio de los mecanismos moleculares asociados a los aislados de TSWV que superan la resistencia mediada por *Sw-5*. Sin embargo, mediante el reordenamiento de los segmentos que constituyen el genoma del TSWV se ha demostrado que el determinante genético que confiere la capacidad de superar la resistencia mediada por *Sw-5* se localiza en el segmento M, el cual expresa la MP (NSm) y los precursores de las glicoproteínas de la nucleocápside (Gn/Gc) (Hoffmann *et al.*, 2001). En el análisis comparativo de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del segmento M de una colección de aislados, que incluye variedades con y sin capacidad de superar la resistencia mediada por *Sw-5*, se ha observado que los únicos cambios comunes en los aislados que superan la resistencia se localizan en la secuencia de aminoácidos de la NSm (López *et al.*, 2011). En el capítulo 3 de la presente tesis trataremos de elucidar si dicho cambios comunes son el determinante genético responsable de superar la resistencia mediada por *Sw-5*.

## **7.- TOPOLOGÍA DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA**

Uno de los componentes principales de la membrana celular son las proteínas de membrana. Dependiendo del tipo de interacciones que se establecen entre las proteínas de membrana y la bicapa lipídica diferenciamos las proteínas integrales de membrana de las proteínas periféricas. Las proteínas integrales cruzan completamente la membrana y se encuentran embebidas en la misma, mientras que las periféricas o

asociadas, no interactúan directamente con el núcleo hidrofóbico de la membrana; se encuentran adheridas a la superficie de la membrana bien mediante una asociación indirecta a través de otras proteínas o bien a través de grupos lipídicos o hidrocarbonados unidos covalentemente a la proteína. También se consideran proteínas periféricas a aquellas incapaces de atravesar la membrana en su totalidad. Los dominios que se insertan en la membrana generalmente son ricos en residuos polares compatibles con la hidrofobicidad de la membrana. Aunque en la mayoría de los casos los segmentos que atraviesan la membrana adoptan una estructura en  $\alpha$ -hélice, también se han descrito casos en los que se estructura en forma de hojas  $\beta$ , formando una especie de barril.



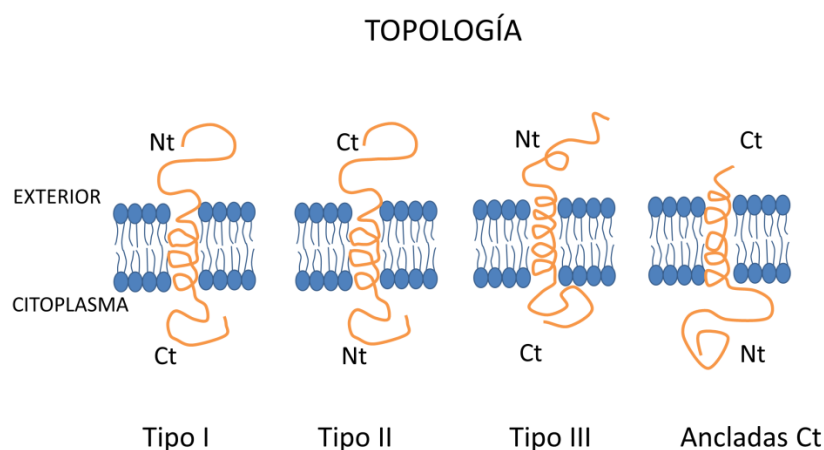
**Figura I.7.1.** Representación de los distintos tipos de proteínas de membrana. De izquierda a derecha se muestran proteínas integrales de membranas basadas en alfa hélices con único paso, multipaso o barriles beta y proteínas periféricas o asociadas a membrana a través de una región hidrofóbica, un glicolípido, un fosfolípido o una proteína transmembrana.

El mecanismo mediante el cual las proteínas se integran en la membrana puede ser co-traduccionales a través de un complejo multiproteico localizado en la membrana del RE, denominado translocón, o post-traduccionales, una vez su síntesis ha finalizado. Las proteínas integrales de membrana adoptan una orientación única, dado que la correcta topología que presenta se encuentra estrechamente relacionada con su función biológica. Sin embargo se han descrito casos en los que una misma proteína adopta dos orientaciones (Rapp *et al.*, 2006; Rapp *et al.*, 2007).

## 7.1. Clasificación

Las proteínas integrales de membrana pueden clasificarse en cuatro grupos según la topología adoptada (Goder and Spiess, 2001; von Heijne and Gavel, 1988).

Las proteínas que presentan un único fragmento transmembrana se clasifican dentro del tipo I, tanto si su extremo N-terminal está orientado hacia el lumen del RE como si lo está hacia el exterior celular. En ambos casos el extremo C-terminal está dirigido hacia el citosol. Generalmente suelen presentar una secuencia señal, región que contiene uno o varios residuos cargados seguidos de un segmento de unos 12 a 20 residuos hidrofóbicos (Walter *et al.*, 1983), que se elimina cuando se asocia al translocón. Las proteínas del tipo II y III no presentan secuencias señal; en su lugar contienen una secuencia de anclaje a la membrana. Mientras que las del tipo II tienen el extremo Nt orientado hacia el citosol, las del tipo III lo exponen en el lumen del RE. Por último, existe además otro tipo de proteínas las cuales presentan una SS en el su extremo Ct que le obligará a orientar el extremo Nt hacia el citosol. Necesariamente la inserción de estas proteínas ocurre de forma post-traduccional, ya que hasta que la síntesis de la proteína no se ha completado la secuencia señal no emerge del ribosoma. En el caso de que la proteína contenga más de una región transmembrana, su orientación generalmente estará condicionada por la inserción del primer segmento transmembrana (Blobel, 1980).



**Figura 1.7.2** Clasificación de las proteínas de membrana según su topología y teniendo en cuenta el trabajo de Goder and Spiess (2001).

## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---



El ciclo viral de un virus de plantas se inicia con su entrada a la célula vegetal y posterior liberación del genoma viral en su interior. La naturaleza del genoma determina la secuencia de pasos necesarios para su replicación. Una vez completada ésta, la progenie viral tiene que propagarse desde las primeras células infectadas al resto de la planta; moviéndose célula a célula a través de los PDs hasta alcanzar el sistema vascular lo cual le permitirá invadir las partes distales de la planta. En este proceso uno de los papeles principales lo desempeñan las MPs; aunque también es necesaria la presencia de otros actores secundarios. La Superfamilia 30k constituye uno de los grupos de MPs más importantes, cuyos virus se caracterizan por presentar una única MP con una estructura secundaria similar. Se ha descrito de forma generalizada la necesidad de estas MPs de asociarse al sistema de endomembranas de la planta tanto en los estadios iniciales del ciclo viral, dónde el virus se replica, como posteriormente como vía de transporte para la propagación viral. Comprender pues la topología que adopta la MP del miembro tipo de la familia 30K, el TMV, en el ER es fundamental para entender el papel que desempeña esta proteína en el proceso infeccioso. Se han propuesto dos mecanismos mayoritarios para el transporte intercelular de los virus, cuyas MPs constituyen esta familia: i) la MP puede formar un complejo vRNP junto con el vRNA o ii) formar parte de unas estructuras tubulares que albergan viriones en su interior. Sin embargo, se ha observado que algunas MPs formadoras de túbulos son capaces de complementar el movimiento local de virus que se mueven en forma de vRNP, pero también que estos virus son capaces de formar estructuras tubulares en protoplastos. En este sentido, se ha propuesto una interesante hipótesis en la cual los virus serían capaces de adaptarse a los distintos mecanismos de transporte propuestos, dependiendo de varios factores. Por ello analizar la capacidad de distintas MPs de complementar el movimiento sistémico de un virus no relacionado podría ayudar a entender la flexibilidad que presentan estas proteínas para adaptarse a las diferentes estrategias de movimiento viral.

En este proceso infeccioso las MPs interaccionan tanto con otras proteínas de origen viral como de la planta huésped, alterando o no la fisiología de la misma. Para evitar que el virus se propague por toda la planta, estas han desarrollado distintos mecanismos de defensa. Bloquear el movimiento local o a larga distancia del virus es



uno de las más comunes. Por consiguiente cualquier cambio que afecte al movimiento viral tendrá un efecto en la patogénesis. En este sentido, se propuso como objetivo del presente trabajo la identificación de factores virales que interaccionasen con la MP del AMV, perteneciente a la familia 30K, y estudiar el efecto que esta interacción tiene en la patogénesis viral. Cuando la planta consigue bloquear la infección, los virus pueden evolucionar hacia una forma más eficaz que permita superar dicho mecanismo de resistencia. En este contexto hemos identificado las variaciones que presenta una MP de la misma familia que permiten al TSWV superar la resistencia desarrollada en un huésped.

### **OBJETIVOS**

- **Estudio de la capacidad de integración en membrana de los hipotéticos dominios transmembrana propuestos para MP del TMV y la posterior caracterización de la topología de la MP completa en el ER mediante experimentos de expresión *in vivo*.**
- **Análisis de la capacidad de distintas MPs de la Superfamilia 30K de complementar el movimiento sistémico mediante el sistema del AMV incluyendo MPs representantes de los distintos mecanismos de transporte célula a célula.**
- **Identificación y caracterización de factores del huésped que interaccionan con la MP del AMV y estudio de su posible implicación como determinantes de susceptibilidad o avirulencia. Análisis del efecto que tiene la interacción entre la MP del AMV y las patellinas 3 y 6 en el movimiento del virus.**
- **Caracterización molecular de residuos críticos en la proteína de movimiento del TSWV responsable de superar la resistencia mediada por el gen Sw-5.**

## **CAPÍTULO 1**

---



**The *Tobacco mosaic virus* movement protein associates with but does not integrate into biological membranes**

Este capítulo ha dado lugar a la siguiente publicación:

**Peiró, A., Martínez-Gil, L., Tamborero, S., Pallás, V., Sánchez-Navarro, J. A. and Mingarro, I.** (2014) The *Tobacco mosaic virus* movement protein associates with but does not integrate into biological membranes. *J. Virol.* **88**, 3016-3026.



## INTRODUCTION

Positive-strand RNA plant viruses are dependent on the endoplasmic reticulum (ER) for translation, replication, and intercellular movement (Verchot, 2011). Plant viruses encode one or more movement proteins (MP) that enable viral propagation from the initial infected cells to the uninfected neighboring cells. For cell-to-cell transport, viruses exploit the plasmodesmata (PD), which contain ER membrane prolongations that connect plant cells. Numerous studies have expanded our insight into the cellular mechanisms permitting the intracellular and intercellular transport of plant viruses, with *Tobacco mosaic virus* (TMV) being strongly represented in the pioneering research and in a large proportion of the reported data. The proteins implicated in the TMV genome replication are produced from the viral genomic RNA (vRNA), while the movement and capsid proteins are produced from two different subgenomic RNAs. TMV MP is necessary for local spread of TMV through the PD. Studies have identified which residues/domains participate in each of the multiple functions assigned to TMV MP, e.g., RNA binding (Citovsky *et al.*, 1992), localization on PDs (Akiyama *et al.*, 1992; Crawford and Zambryski, 2001), increasing the PD size exclusion limit to facilitate viral genome translocation (Oparka *et al.*, 1997a; Waigmann *et al.*, 1994; Wolf *et al.*, 1989), and associating with ER membranes at replication sites during earlier infection stages and with microtubules and microfilaments of the cytoskeleton for transporting the ER-associated viral replication complex to PDs (Boyko *et al.*, 2007; Niehl *et al.*, 2013; Sambade *et al.*, 2008).

TMV MP is the type member of the 30K family, a group of MPs from viruses belonging to 18 different genera that each expresses a unique MP with a molecular mass of approximately 30-kDa. TMV MP associates with the ER membrane in the early stage of infection, inducing structural changes (Reichel and Beachy, 1998). Viral replication starts within proximity of the ER membrane; shortly after translation of the first viral proteins, the virus rearranges the intra-cellular membranes to form the so-called “viral factories”, a process for which the MP is fundamental (Beachy and Heinlein, 2000; Mas and Beachy, 1999). The viral factories are ER-derived membranous compartments that house concurrent virus replication and the synthesis and accumulation of viral proteins (Heinlein *et al.*, 1998). The MP also participates in

localizing the vRNA into the ER extensions that reach and cross the PD, and can temporarily control PD gating to facilitate vRNA passage into a non-infected adjacent cell (Oparka *et al.*, 1997a). Therefore, the association of the movement protein with the ER membrane is fundamental for the cell-to-cell movement of the vRNA.

Previous studies have demonstrated that TMV MP is not released from cellular membranes after urea (2.5 M) or NaCl treatment (Reichel and Beachy, 1998). Additionally, TMV MP holds a trypsin-resistant core, containing two HRs (Brill *et al.*, 2000). Based on results of CD spectroscopy of urea- and SDS-solubilized TMV MP and trypsin digestion followed by mass spectroscopy, a topological model was proposed in which TMV MP behaves as an integral ER membrane protein, with the N- and C-termini exposed to the cytoplasm, and two transmembrane (TM) regions connected by a hydrophilic loop translocated into the ER lumen (Brill *et al.*, 2000; Fujiki *et al.*, 2006). However, this topological working model cannot explain several TMV MP properties. Some RNA-binding domains (Citovsky *et al.*, 1992) or interactions with microtubules (Boyko *et al.*, 2007; Curin *et al.*, 2007), chaperones (Shimizu *et al.*, 2009), or cell wall-associated proteins (Chen *et al.*, 2000) rely on TMV MP regions that are not accessible in the current model. Further investigations of the interaction of MPs with cellular membranes are needed to obtain a more complete understanding of the role of MPs in virus infection and cell-to-cell spread.

In the present work the TMV MP topological model is examined. For this propose we used bimolecular fluorescence complementation (BiFC) studies, chemical treatments of the protein expressed *in planta* and viral cell-to-cell movement assays to demonstrate that HRs of TMV MP do not span biological membranes, either when isolated or in the full-length protein context. These results together with the previous results obtained by our collaborators (Doctoral thesis of the Dr. Luis Martinez-Gil), in which the efficiency of the TMV MP to be inserted into ER membrane was analyzed by different experimental systems that reproduce the *in vivo* situation, indicated that the TMV MP peripherally associates with ER membranes in living plant cells (Peiró *et al.*, 2014).

## PREVIOUS RESULTS FROM MARTINEZ-GIL'S THESIS

### *Isolated TMV MP hydrophobic regions do not insert into biological membranes*

The TMV MP amino acid sequence was parsed to test the performance of several commonly used algorithms for predicting membrane-spanning regions. The predicted outcome (Table 1) varied greatly according to the method used, likely due to the limited hydrophobicity of the two HRs of TMV MP.

**Table 1: Computer analysis of the TMV MP amino acid sequence**

Algorithm	HR1 (starting aa <sup>#</sup> - ending aa)	HR2 (starting aa - ending aa)	Nº of TM segments
DAS	65 - 75	155 - 165	2
$\Delta$ G Prediction	61 - 80	148 - 167	2
HMMTOP	-	148 - 166	1
MEMSAT3	-	153 - 168	1
OCTOPUS	-	-	0
SOSUI	-	-	0
TMHMM	-	-	0
TMpred	58 - 76	150 - 166	2
TopPred	61 - 81*	146 - 166	2 (1 certain)

<sup>#</sup> aa, amino acid(s)

\* putative (not certain)

To test these predictions, the membrane insertion capabilities of these HRs was assayed (Supplementary Figure 1A) using an *in vitro* experimental system based on the *Escherichia coli* inner membrane protein leader peptidase (Lep) (Hessa *et al.*, 2005), which accurately determines the integration of TM helices into ER membranes.

Lep consists of two TM segments (H1 and H2) connected by a cytoplasmic loop (P1) and a large C-terminal domain (P2). It inserts into ER-derived rough microsomal membranes (RMs) with both termini located in the lumen (Supplementary Figure 1B, left). The analyzed segment (HR-tested) is engineered into the luminal P2 domain and is flanked by two acceptor sites (G1 and G2) for *N*-linked glycosylation (Supplementary Figure 1B, center and right). Single glycosylation (i.e., membrane integration) results in a molecular mass increase of ~2.5 kDa relative to the observed molecular mass of Lep



expressed in the absence of microsomes. A molecular mass shift of ~5 kDa occurs upon double glycosylation (i.e., membrane translocation of the HR-tested). This system has the obvious advantage that the insertion assays are performed in the context of a biological membrane. The translation of the chimeric constructs harboring the predicted TMV MP hydrophobic regions resulted in double-glycosylated forms (Supplementary Figure 1C, lanes 4 and 5), consistent with the translocation of these regions into the ER lumen, as expected according to the predicted apparent free energy ( $\Delta G_{app}$ ) of insertion (Supplementary Figure 1A). Supplementary Figure 1C (lanes 1-3) shows control constructs with computer-designed previously tested translocation and integration sequences (Martinez-Gil *et al.*, 2007; Saaf *et al.*, 1998), which produced the expected double- and single-glycosylation patterns, respectively.

Previous studies have shown that, in some cases, a neighboring TM helix can promote membrane insertion of a poorly hydrophobic TM region (Bano-Polo *et al.*, 2013; Hedin *et al.*, 2010; Ojemalm *et al.*, 2012; Tamborero *et al.*, 2011). Therefore, we used the *in vitro* system to investigate the insertion of the two HRs connected by their native loop (residues 61–167) (Supplementary Figure 1D). In these constructs, translocation of the full MP region across the microsomal membrane should render in modification of both G1 and G2 sites (Supplementary Figure 1D, center). However, insertion of both HRs into the membrane should result in only G1 receiving a glycan because, as previously demonstrated (Bano-Polo *et al.*, 2013), G2 in these constructs was too close to the membrane to be efficiently glycosylated (Supplementary Figure 1D, left). If only one of the two HRs was inserted, only G1 was modified; however, in that case, the large P2 domain was not translocated across the microsomal membranes. In Supplementary Figure 1E, lanes 1 and 2 show that *in vitro* synthesis of this construct exclusively yielded double-glycosylated forms of the protein, suggesting the translocation of the TMV domain. Proteinase K (PK) treatment of translation mixtures in the presence of microsomes should degrade the membrane protein domains that protruded into the cytosol, but should not digest membrane-embedded or lumenally exposed domains. PK treatment of these split translation reaction mixtures rendered protected forms that contained H2 and P2 domains from Lep, plus the fused MP region derived from the doubly glycosylated molecules (Supplementary Figure 1E, lane 3). We also engineered an additional glycosylation site at the C-terminal

P2 domain (G3; see Supplementary Figure 1D, right) or at the loop connecting the two HRs from the TMV MP sequence (G3'). As seen in supplementary Figure 1F, both protein constructs were triple glycosylated, indicating that the full TMV MP region was translocated. Overall, these data suggest that, in the context of the Lep-derived model protein, the two HRs of TMV MP do not insert into biological membranes.

### ***TMV MP peripherally associates with membranes in vitro***

Next, the insertion of full-length TMV MP into the membrane was analyzed. The protein sequence includes two potential glycosylation sites at the N- and C-terminal domains (positions 47 and 225; supplementary Figure 1A), which can be used as topological reporters in translation assays. We found that translation in the presence of RMs yielded non-glycosylated molecules that were totally sensitive to PK treatment (Supplementary Figure 2A, lanes 4–6), regardless of the presence of microsomal membranes. Furthermore, *in vitro* translation of a version of TMV MP carrying an engineered glycosylation site (at residue 108) in the hydrophobic loop connecting the HRs, similarly rendered non-glycosylated molecules that were sensitive to PK treatment (data not shown). As a control, the translation of Lep, which carries a single glycosylation site at the P2 domain, in the presence of membranes yielded a mainly glycosylated population (Supplementary Figure 2A, lane 2) and a protected, glycosylated H2-P2 fragment upon PK treatment (Supplementary Figure 2A, lane 1). These results indicated that no domain of the TMV protein was translocated into the microsomal lumen or inserted into the microsomal membrane.

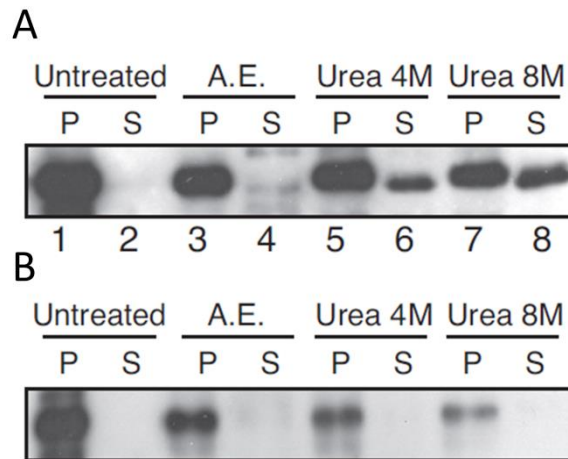
However, isolation of microsomal membranes after *in vitro* translation showed that TMV MP was mostly present in the membrane-rich fraction (86.4%) (Supplementary Figure 2B, lanes 1 and 2), suggesting a tight association with cellular membranes. To identify the type of interaction, we first washed the translation mixture with sodium carbonate (pH 11.5), a treatment that it is known to render microsomes into membranous sheets, releasing soluble luminal proteins (Peremyslov *et al.*, 2004). After the alkaline treatment, TMV MP remained mainly associated with the membrane-rich fraction (58.8%). Next we washed the membranes with 8 M urea, a treatment that should release all polypeptides from the membrane, except the integral membrane proteins (Martinez-Gil *et al.*, 2009). With this treatment, the great majority

of the protein was extracted in the supernatant fraction (87.8%, supplementary Figure 2B, lanes 5 and 6). These results suggest a tight but peripheral association of TMV MP with the microsomal membranes. The translation reaction mixtures were also treated with Triton X-114, a non-ionic detergent that forms a separate organic phase, segregating the membrane lipids and hydrophobic proteins from the aqueous phase containing non-integral membrane proteins (Bordier, 1981). After phase partitioning, the TMV MP was detected in the aqueous, but not the organic phase (Supplementary Figure 2C). As expected, Lep was recovered from the organic phase. These results supported that TMV MP was not an integral membrane protein. We also used vesicle flotation assays to examine the membrane association of TMV MP. Translation of TMV MP in the presence of RMs followed by flotation gradient centrifugation showed that the protein was exclusively recovered from the bottom fractions of the gradient (S fractions; supplementary Figure 2D, lanes 1 and 2), confirming that the TMV MP was not an integral membrane protein. Parallel control experiments using Lep demonstrated the presence of Lep in the upper membrane-associated fractions of the gradient (M fractions; supplementary Figure 2D, lanes 3 and 4).

## RESULTS

### ***TMV MP peripherally associates with membranes in vivo***

First, the membrane association of TMV MP in the natural host *Nicotiana benthamiana* was studied. The plants were infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* cultures carrying the pMOG35S-TMVMP:HA construct that transiently expressed TMV MP fused to the HA epitope. Total proteins were extracted from *N. benthamiana* agro-infiltrated leaves at three days post-infiltration. A membrane-rich fraction was generated by centrifugation at 100,000 g (Figure 1A, lanes 1 and 2), and was subjected to the above-described chemical treatments. The results showed that the TMV MP remained associated with the membranous fraction after sodium carbonate treatment (94.6%; Figure 1A, lanes 3 and 4). However, more aggressive treatments (4 M and 8 M Urea) led to the detection of some TMV MP in the soluble fraction (27.4% and 44.3%, respectively). Parallel experiments using HA-tagged Lep as an integral membrane protein control, showed Lep accumulation exclusively in the membranous fractions following these treatments (Figure 1B).

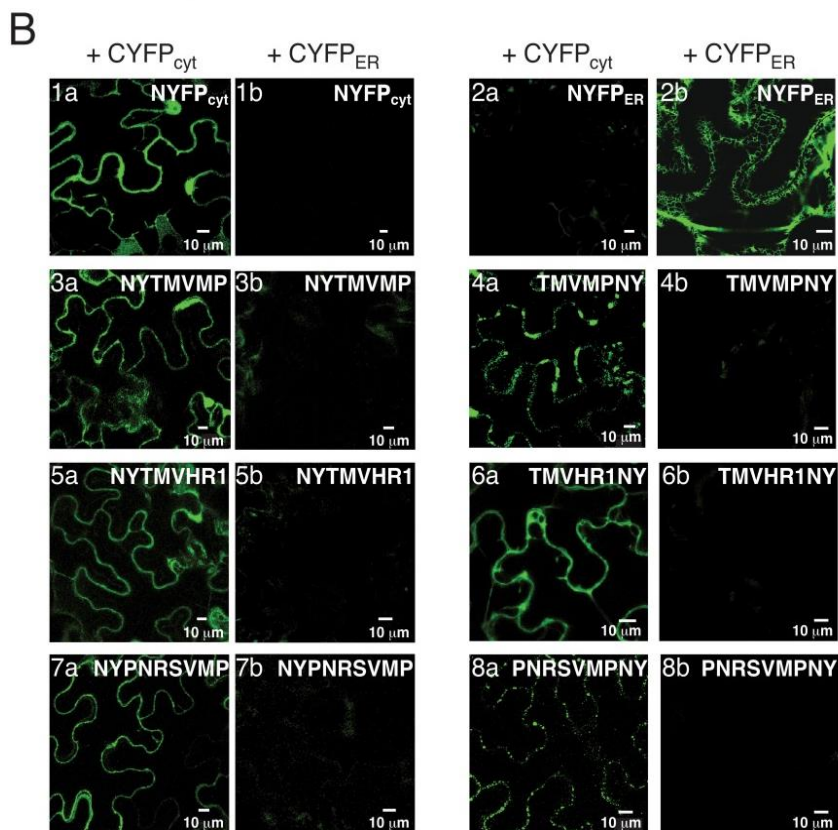
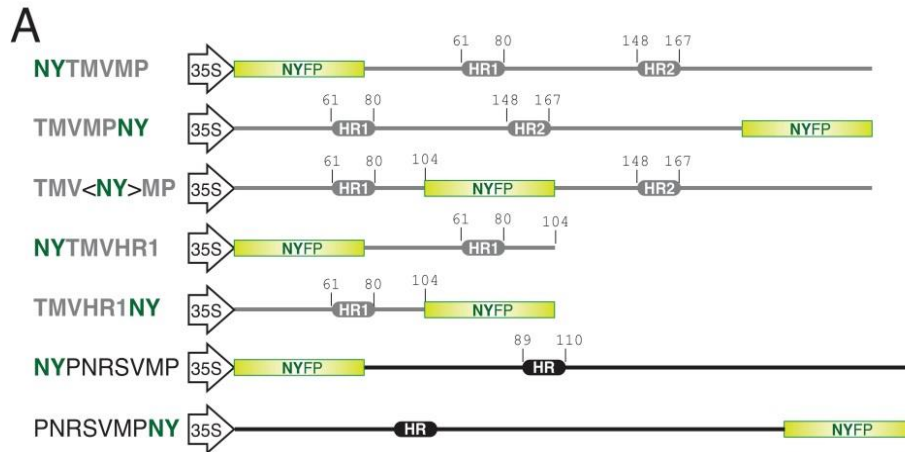


**Figure 1.** TMV MP *in vivo* association with biological membranes. **(A)** Segregation into membranous and soluble fractions of *in planta* expressed TMV MP. HA-tagged TMV MP was expressed in *N. benthamiana* plants by agro-infiltration. Comparable P and S fractions obtained from membranous fractions, untreated and after alkaline wash or urea treatments (4 M or 8 M), were analyzed by western blot analysis using an anti-HA antibody. **(B)** HA-tagged Lep was expressed in *N. benthamiana* plants by agro-infiltration and analyzed as in (A).

Together, these results with those previously exposed, suggest that TMV MP, rather than being an integral membrane protein, was a peripherally associated membrane protein, with the full-length molecule oriented towards the cytoplasm both *in vitro* and *in planta*.

#### ***ER membrane association of TMV MP in living plant cells***

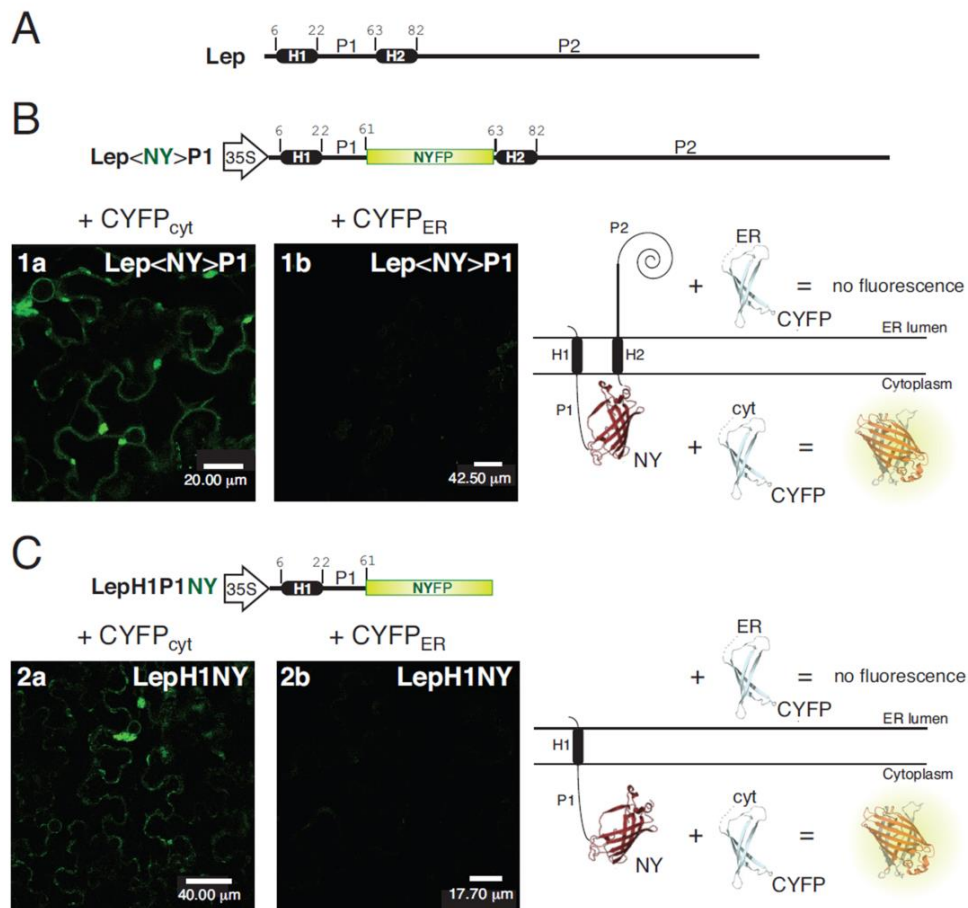
We next analyzed TMV MP membrane disposition using BiFC assays (Kerppola, 2008). This technique relies on the capacity of two non-fluorescent fragments, the N- (NYFP, 1–154 amino acids) and C-termini (CYFP, 155–239 amino acids) of the yellow fluorescent protein (YFP), to interact with each other when they are overexpressed in the same subcellular compartment (Zamyatnin *et al.*, 2006). One YFP fragment was targeted to the cytosol (NYFP<sub>cyt</sub> or CYFP<sub>cyt</sub>) or to the ER lumen (NYFP<sub>ER</sub> or CYFP<sub>ER</sub>), and it was co-infiltrated with the counterpart YFP fragment attached to the N- or C-terminus of the TMV MP or inserted into the central hydrophilic loop connecting the two HRs (Figure 2A). Reconstitution of the fluorescence-competent YFP structure indicated the *in vivo* localization of the fused/inserted YFP fragment in the appropriate compartment.



**Figure 2.** ER membrane association of TMV MP in living plant cells. **(A)** Schematic representation of expression cassettes used for BiFC. **(B)** Fluorescence observed *in planta* after transient expression of the constructs represented in (A) plus the C-terminal YFP fragment addressed to the cytosol (CYFP<sub>cyt</sub>) (A) or the lumen of the ER (CYFP<sub>ER</sub>) (B). Images reveal the topology of the N-terminus (3a, 3b, 5a, and 5b), the C-terminus (4a and 4b), and the region located between the two HRs (6a and 6b) of the TMV MP. The topology of the N- and C-terminus of the PNRSV MP is also indicated in pictures 7a–7b and 8a–8b, respectively. Positive and negative controls are indicated in pictures 1a–2b and 1b–2a, respectively. The fluorescence was monitored at 4 days post-infiltration using a confocal Leica TCS SL.

As expected, no fluorescence was detected in leaves agro-infiltrated with NYFC or CYFC, whereas fluorescent cells were readily found in leaves co-infiltrated with the NYFP and CYFP constructs targeted to the same subcellular compartment (Figure 2B, panels 1a, 1b, 2a and 2b). Next, the NYFP (NY) was fused to the N-terminus (NYTMVMP), the C-terminus (TMVMPNY), or between both HRs (TMV<NY>MP, after residue 104) of TMV MP (Figure 2A). Every chimeric protein was co-infiltrated with the corresponding expression cassette for the CYFP<sub>cyt</sub> or CYFP<sub>ER</sub> fragment in *N. benthamiana* plant leaves. With the constructs NYTMVMP and TMVMPNY, fluorescence reconstitution was exclusively observed when both chimeric proteins were co-expressed with CYFP<sub>cyt</sub> (Figure 2B, panels 3a and 4a), indicating that both N- and C-termini of the TMV MP were oriented towards the cytosol. With TMV<NY>MP, fluorescence was not observed in the ER or in the cytosol, suggesting that the fused NYFP was likely inaccessible for interaction with its partner, regardless of the partner (CYFP) location. Similar analysis with the Lep protein (Figure 3A), in which the NYFP fragment was fused at the P1 domain, revealed a clear fluorescence signal in the expected cytosol compartment (Figure 3B).

To unravel the subcellular location of the central hydrophilic loop of TMV MP, we fused the NYFP fragment to the N- or C-terminus of truncated MP versions (Figure 2A), thus reducing the putative accessibility problem of the YFP fragment in the TMV<NY>MP construct. We fused the NYFP fragment to either the N- or C-termini of the 104 N-terminal amino acid residues of the viral protein (Figure 2; NYTMVHR1 or TMVHR1NY, respectively), which included the HR1 plus 24 amino acid residues of the hydrophilic loop region that have been proposed to translocate into the ER lumen (Brill et al., 2000). Figure 2 shows that both NYTMVHR1 and TMVHR1NY chimera reconstituted the fluorescence only with the CYFP<sub>cyt</sub> (Figure 2B, panels 5a and 6a), indicating that the loop between HR1 and HR2 was oriented towards the cytosol.



**Figure 3.** ER membrane association of Lep in living plant cells. **(A)** Top: schematic representation of the Lep protein. **(B)** Top: Schematic representation of expression cassette used for BiFC. Center: Fluorescence observed *in planta* after transient expression of the construct represented on top, in which the N-terminus of YFP was inserted within the P1 domain after residue 61 in the Lep sequence, plus the C-terminal YFP fragment addressed to the cytosol (CYFP<sub>cyt</sub>) (panel 1a) or the lumen of the ER (CYFP<sub>ER</sub>) (panel 1b). Bottom: Schematic of BiFC assay. The expression of the YFP fragments in the same compartment facilitates their association allowing the formation and maturation of the fluorophore, which consequently leads to emission of fluorescence. **(C)** Top: Schematic representation of expression cassette used for BiFC, which included the 61 N-terminal residues of Lep. Center: Fluorescence observed *in planta* after transient expression of the construct represented on top. Bottom: Schematic of BiFC assay. Images reveal the topology of the P1 domain from Lep both in the full-length construct (B) and in the Lep truncated molecules (C). The fluorescence was monitored at 4 days post-infiltration using a confocal Leica TCS SL.

Additionally, the N-terminus of the TMV MP truncated molecule maintained its cytosolic orientation, as observed for the full-length protein. Parallel experiments were conducted using a truncated version of Lep that included the first TM segment (H1) and the P1 domain, which are the regions responsible for proper targeting and

orientation of the Lep protein in eukaryotic membranes (Gafvelin *et al.*, 1997). The BiFC analysis revealed that Lep-truncated molecules (LepH1P1NY) oriented their P1 domain toward the cytosol (Figure 3C), since only the cytoplasm-targeted CYFP partner restored fluorescence, similar to with the full-length Lep protein (Figure 3B).

To further validate the topology observed, we used the BiFC technology to characterize the topology of PNRSV MP, another component of the 30K family. PNRSV MP is a peripherally associated membrane protein with a single HR that cannot span the membrane (Martinez-Gil *et al.*, 2009). The NYFP fragment was fused to the N- (NYPNRSVMP) or C-termini (PNRSVMPNY) of PNRSV MP. The transient co-expression of the two PNRSV MP chimeric proteins with the differently targeted CYFP fragments resulted in fluorescence reconstitution only with the CYFP<sub>cyt</sub> (Figure 2B, panels 7a and 8a), indicating that both the N- and C-terminus of the PNRSV MP were located at the cytosol. These results agreed with the previous membrane association model proposed for PNRSV MP (Martinez-Gil *et al.*, 2009), and further supported the topology observed for the TMV MP. Altogether, these results indicated that no region of the viral TMV MP was translocated into the ER lumen, corroborating that neither HR1 nor HR2 can span the membrane in living plant cells.

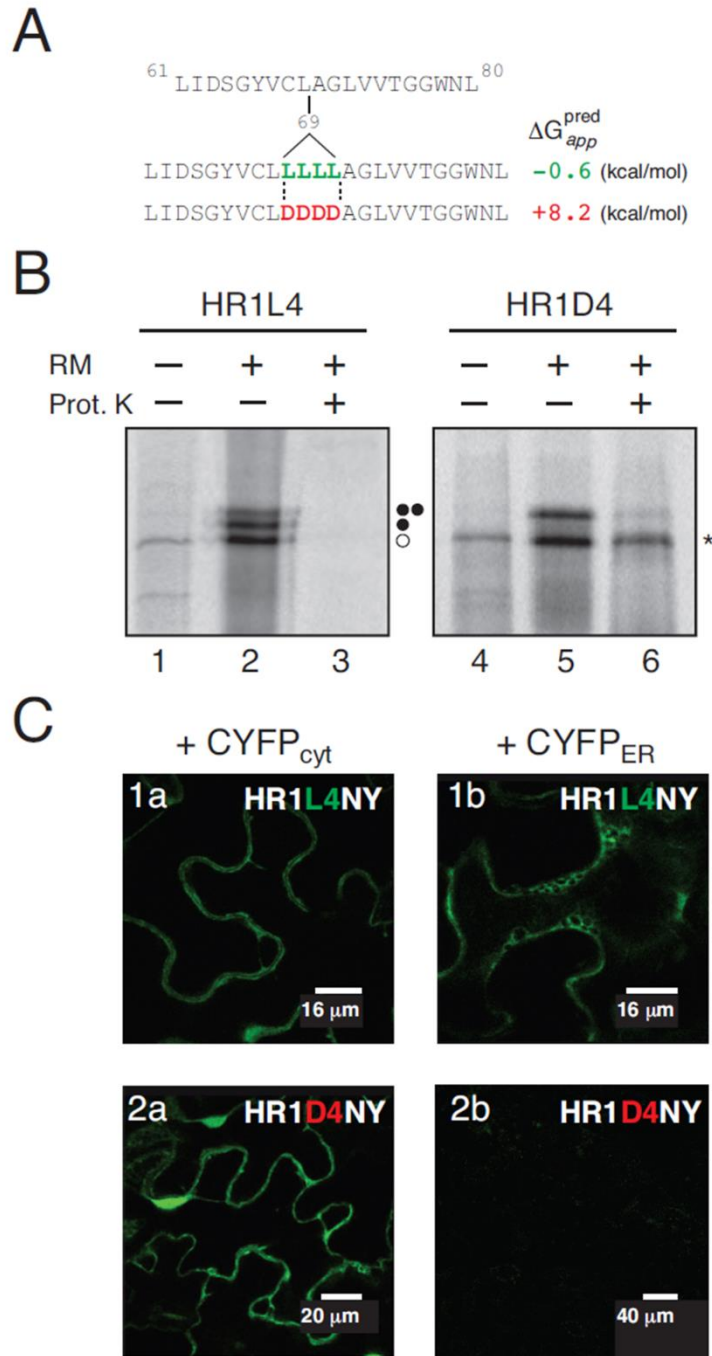
### ***The membrane disposition of TMV MP can be modulated by altering HR1 hydrophobicity***

Topological studies related to signal sequences or N-terminal TM segments have emphasized the relevance of the hydrophobicity of these domains in the overall orientation of the protein relative to the membrane (Goder and Spiess, 2003; Sauri *et al.*, 2009). The hydrophobicity of TMV MP HR1 was predicted to be low (+2.5 kcal/mol; supplementary Figure 1A), correlating with the experimental results obtained both *in vitro* and *in vivo*, and explaining the observed peripheral association. To investigate whether altering HR1 hydrophobicity would modulate the membrane disposition of TMV MP, we designed two mutants with four leucine (HR1L4) or four aspartate (HR1D4) residues inserted roughly in the middle of the HR1 region (after residue 69). Figure 4A shows the insertion frequencies on the biological hydrophobicity scale (Hessa *et al.*, 2005; Hessa *et al.*, 2007), which were predicted for these mutants using the  $\Delta G$  Prediction Server v1.0 (<http://dgpred.cbr.su.se/>). In this algorithm, the



predicted insertion frequency comes from the apparent free-energy difference ( $\Delta G_{app}$ ) from insertion into ER membranes. We first inserted these mutations in the Lep system (Figure 4A) and tested their ability to insert into microsomal membranes. Translation of the HR1L4 construct in the presence of membranes produced double- (~34%) and single- (~66%) glycosylated molecules (Figure 4B, lane 2), indicating partial insertion of the HR1L4 domain, in agreement with its predicted value. As expected, the HR1D4 mutant retained its tendency to translocate, rendering only double-glycosylated molecules when translated in the presence of ER-derived membranes (Figure 4B, lane 5). These results were further examined by PK treatment of the constructs, where a protease-protected fragment of the HR1D4 construct indicated membrane translocation (Figure 4B, lane 6).

Subsequently, to analyze the effects of these mutations in living plant cells using BiFC assays, we inserted four leucine or aspartate residues in the TMVHR1NY construct. *A. tumefaciens* cultures co-expressing HR1L4NY or HR1D4NY with CYFP<sub>cyt</sub> or CYFP<sub>ER</sub> were co-infiltrated in *N. benthamiana* plants, as described above. At two days post-infiltration, the fluorescence reconstitution was monitored. Figure 4C shows that HR1D4NY oriented the split-NYFP molecule exclusively towards the cytosol (panels 2a, 2b). In contrast, fluorescence signals were detected in the samples prepared from leaves co-expressing the HR1L4NY construct and CYFP<sub>cyt</sub> (panel 1a) or CYFP<sub>ER</sub> (panel 1b). These data indicate that the presence of the leucine stretch partially promoted TM disposition of the HR1, translocating the C-terminus into the ER, which nicely correlated with the insertion data obtained with the Lep system (Figure 4B).



**Figure 4. Effect of hydrophobicity on HR1 insertion into biological membranes. (A)** HR1-derived sequences and the free energy that they require to adopt a TM conformation as calculated using the  $\Delta G$  Prediction algorithm (Hessa et al., 2005; Hessa et al., 2007). **(B)** *In vitro* translation of the Lep-derived constructs (see supplementary Figure 1A) in the presence of microsomal membranes and proteinase K, as indicated. Nonglycosylated protein bands are indicated by a white dot, and singly or doubly glycosylated proteins are indicated by one or two black dots, respectively. The protected doubly glycosylated fragment is indicated by an asterisk. The gels are representative of at least 3 independent experiments. **(C)** BiFC analysis of the *in planta* topology of the C-terminus of the N-terminal 104 aa of the TMV MP carrying four leucine (HR1L4NY) or four aspartate (HR1D4NY) residues in the HR1 region. The expression cassette TMVHR1NY (represented in supplementary Fig 1B) was modified as indicated in (A). The resulting constructs were transiently expressed *in planta* together with the C-terminal YFP fragment addressed to the cytosol (CYFP<sub>cyt</sub>) (A) or the ER lumen (CYFP<sub>ER</sub>) (B).

## DISCUSSION

Cellular membranes are a critical component of the virus cycle, for both replication and intra- and intercellular transport (Verchot, 2011). During the virus life cycle, plant viral proteins associate with multiple membrane components, including the ER, Golgi, vacuolar, peroxisomal, chloroplast, mitochondrial, and endosomal vesicle membranes (Hwang *et al.*, 2008; Netherton *et al.*, 2007). During virus transport, the virus uses the ER or the Golgi apparatus to reach the PD, which provides continuity between adjacent cells, allowing cell-to-cell vRNA movement. Movement proteins are key components connecting vRNA to cellular membranes. Understanding the topology of MPs in the ER is vital to understand the role of the ER in PD transport and to predict interactions with host factors that mediate resistance to plant viruses.

The MP of TMV has been proposed to be an ER integral membrane protein with two TM regions (Brill *et al.*, 2000). However, this suggestion was not supported by conclusive data (Epel, 2009). In the present work, we further characterized the *in vivo* TMV MP topology, with special emphasis on the two putative TM domains (Brill *et al.*, 2000). The previous *in silico* analysis (Supplementary Figure 1A) confirmed the presence of two hydrophobic regions (HR1 and HR2) that practically corresponded to the two proposed TM domains; however, the positive values of the  $\Delta G_{app}$  predicted that they were not membrane integrated. In accordance with these predictions, the two HRs of TMV MP did not span biological membranes *in vitro* when assayed using a robust membrane protein insertion assay, either independently or in-block including both regions in the same chimeric Lep construct (Supplementary Figure 1). Similar results were observed with *in vivo* approaches using the BiFC technique. Unlike the results obtained with TMV MP, this *in vitro* Lep assay has detected that HRs predicted from other plant virus MPs span biological membranes (Martinez-Gil *et al.*, 2010; Martinez-Gil *et al.*, 2007; Vilar *et al.*, 2002). Interestingly, these membrane-spanning sequences belong to MPs from viruses in which cell-to-cell transport relies on the concerted action of two small MPs, no larger than 12 kDa, and membrane insertion of one of these two MPs is essential for virus movement (Genovés *et al.*, 2011). Additionally, the previous results indicated the HRs of TMV MP did not span the

membrane, when the full-length TMV MP was used in the glycosylation and proteinase K digestion experiments.

These *in vitro* results indicated that the TMV MP was not an integral membrane protein, but did not discard the possibility that the protein was intimately associated with membranes. Different biochemical treatments designed to distinguish between associated and integral membrane proteins revealed that the full-length TMV MP (expressed *in vitro* or *in vivo*) behaved as an associated membrane protein. Additionally, the BiFC analysis performed to determine the TMV MP topology, confirmed that the N- and C-terminal regions, and the region located between the two HRs were oriented towards the cytosol. When we substantially increased its hydrophobicity by insertion of four leucine residues, the first HR was partially integrated into the membrane. Altogether, these results support a model in which the TMV MP is peripherally associated with the ER membrane and oriented to the cytosol.

It is remarkable that most MPs belonging to the 30K family show a single hydrophobic domain by which the viral protein associates with membranes. Only TMV MP and other species belonging to *Tobamovirus* genus show two HRs. The presence of a second HR in the protein likely results in a stronger association with the ER membranes, which is consistent with the requirement of a more aggressive treatment (8M urea) to release the protein from the ER membranes when compared to the PNRSV MP association (Martínez-Gil *et al.*, 2009). In this sense, the inaccessibility of CYFP<sub>cyt</sub> to the NYFP inserted between both HRs regions using the BiFC technique is in agreement with the inaccessibility of monoclonal antibodies addressed to HR1 region (79–89 residues) and the adjacent sequence (98 to 120 residues) (Tyulkina *et al.*, 2010), as both could be explained by the tight association of this region to the membrane. Similarly, membrane fractionation experiments of a series of TMV MP deletion mutants suggested that the protein is tightly associated to membranes from infected protoplasts through the two HRs (Fujiki *et al.*, 2006). However, we cannot rule out the possibility that the tertiary structure of TMV MP could impede the availability of some regions.

The membrane topology proposed here for TMV MP should be compatible with previously described host factor interactions. Indeed, unlike the previous model, this model explains the interactions with  $\alpha$ -tubulin (144–169 aas) (Sambade *et al.*, 2008),

microtubules (Ashby *et al.*, 2006; Boyko *et al.*, 2000,)), vRNA (112–185 aas) (Citovsky *et al.*, 1990; Citovsky *et al.*, 1992), and the pectin methylesterase (130–185 aas) (Chen *et al.*, 2000), as well as the interaction between the closely related MP of the ToMV and the Tm-2 resistance gene product (Strasser and Pfitzner, 2007). Only the reported interaction with calreticulin, a protein located in the ER lumen (Chen *et al.*, 2000), seems to be incompatible with a TMV MP located at the cytosolic surface of the ER membrane. However, while calreticulin was first identified as having a luminal subcellular location at the ER (Denecke *et al.*, 1995), plant calreticulins have also been found outside the ER compartment, including on the Golgi apparatus and cell surface (Borisjuk *et al.*, 1998) or cytosol and nucleus (Jia *et al.*, 2009), permitting the hypothesis that the TMV MP–calreticulin interaction is compatible with the MP topology proposed herein.

Overall, the presently obtained results allow the proposal of a new topological model for the TMV MP, in which the MP is associated with the cytosolic surface of the ER membranes. This model is in agreement with the topology reported for other members of the 30K family (Laporte *et al.*, 2003; Martínez-Gil *et al.*, 2009). The secondary structure of the members of the 30K family revealed that all MPs share a similar core structure (Melcher, 2000), and the MPs of at least nine different genera are functionally exchangeable in the same viral system for local and systemic transport (Fajardo *et al.*, 2013; Sánchez-Navarro *et al.*, 2006; Sánchez-Navarro *et al.*, 2010), permitting the possible extension of the proposed TMV MP topology to the other members of the 30K family. This topology should drive future investigations in search for host factors involved in plant viral transport.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Computer-assisted analysis of TM helices***

TM helices for the TMV MP sequence were predicted using some of the most commonly used prediction methods available on the Internet. All user-adjustable parameters were left at their default values.

### ***DNA manipulations***

The TMV MP wild type (wt) (plasmid provided by S. Chapman, Scottish Crop Research Institute, SCRI; (Canto and Palukaitis, 2002) and the Lep (Martinez-Gil *et al.*, 2009) genes were amplified using PCR with specific sense and antisense primers, containing the appropriate restriction enzymes sequences. The HRs from TMVMP were introduced between *SpeI* and *KpnI* sites in previously modified Lep sequence from the transcription vector pGEM1 plasmid (Promega) (Hessa *et al.*, 2005; Martínez-Gil *et al.*, 2008). The QuikChange mutagenesis kit from Agilent Technologies (La Jolla, CA) was used to insert four leucine or four aspartate residues in the HR1 of TMV MP resulting the clones HR1L4 and HR1D4 regions, respectively (Figure 4).

To fuse the hemagglutinin (HA) sequence at the C-terminus of both proteins, the amplified TMV MP or Lep fragments were subcloned in the pSK+35S-MPPNRSV:HA construct (Martínez-Gil *et al.*, 2009) replacing the PNRSV MP gene. The resultant clones, pSK+35S-TMVMP:HA and pSK+35S-Lep:HA, contained the corresponding protein fused to the HA epitope under the control of 35S promoter from *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) and the inhibitor II terminator from the potato proteinase. Then, the expression cassettes 35S-TMVMP:HA and 35S-Lep:HA, were subcloned into the pMOG800 binary vector by using the restriction enzyme *XhoI*.

To fuse the N-terminal 154 amino acids of the yellow fluorescent protein sequence (NYFP) to the N- or C- terminus of the TMV MP or the Lep (Martinez-Gil *et al.*, 2009) proteins we first introduced the full-length MP or Lep genes in the pSK+35S-EGFP (Herranz *et al.*, 2005) by exchanging the EGFP gene resulting the clones pSK+35S-TMVMP and pSK+35S-Lep, respectively. The NYFP sequence was subcloned into *NcoI* or *NheI* restriction sites of the pSK+35S-TMVMP vector, resulting in the pSK+35S-NYTMVMP and pSK+35S-TMVMPNY constructs, respectively (Figure 2A). Additionally, the clone pSK+35S-TMVMP was modified, using site-directed mutagenesis, to create a restriction site *EcoR I*, which allows the insertion of the NYFP after the 104 residue of TMV MP. The resultant pSK+35S-TMV<NY>MP clone, would have the NYFP between the both HRs. Finally, the expression cassettes 35S-NYTMVMP, 35S-TMVMPNY and 35S-TMV<NY>MP were subcloned inside the pMOG800 binary vector by using the restriction enzyme *SacI*. The clones pSK+35S- NYTMVMP and pSK+35S-TMV<NY>MP

were used, as templates, to amplify the NYFP fused to the N- or C-terminus of the 104 N-terminal amino acid sequence of the TMV MP with specific primers. The amplified fragments were used to replace the EGFP gen in the plasmid pSK+35S-EGFP, using the restriction sites *NcoI* and *Eco47III*, resulting in the clone pSK+35S- NYTMVHR1 and pSK+35S-TMVHR1NY, respectively. The expression cassettes were introduced by using the *SacI* site into the pMOG800 binary vector.

The clone pSK+35S-TMVHR1NY was used as a template to insert by the QuikChange mutagenesis kit from Agilent Technologies (La Jolla, CA) 4 leucine or aspartic acid residues after residue 69 of the TMV MP (Figure 4). The corresponding expression cassettes (35S-TMVHR1L4NY and 35S-TMVHR1D4NY) were inserted into pMOG800, as described above.

In order to insert NYFP fragment between both TM domains (H1 and H2) from Lep, codon 122 of the Lep DNA sequence (included in the clone pSK+35S-Lep) was modified, using site-directed mutagenesis, to create the restriction site *BglI*. At the same time, NYFP fragment was amplified using specific primers, and it was introduced in the plasmid pSK+35S-Lep, previously digested with *BglI* and dephosphorylated, resulting the clone pSK+35S-Lep<NY>P1 (Figure 3). Finally, the expression cassette was subcloned, using *SacI*, in the pMOG800 binary vector. The clone pSK+35S-Lep<NY>P1 was used as a template, to amplify the NYFP fragment fused to the C-terminus of the 61 N-terminal amino acids from Lep. The PCR product amplified was exchange by the EGFP gen of the pSK+35S-EGFP construct, using the restriction sites *NcoI* and *Eco47III*, resulting the clone pSK+35S-TM1LepH1NY. Finally, this expression cassette was subcloned, digesting with *SacI*, in the pMOG800 binary vector. PNRSV constructs were produced similarly starting from the previously described 35S-PNRSVMP:HA-PoPit cassette (Martínez-Gil *et al.*, 2009).

The expression cassettes, which contained the N- and C- terminal fragments addressed to the endoplasmic reticulum lumen (NYFP<sub>ER</sub> and CYFP<sub>ER</sub>) corresponded to the clones pRT-YN-ER and pRT-YC-ER (provided by Dr. Jari P.T. Valkonen, University of Helsinki. Department of Applied Biology, Helsinki, Finland; (Zamyatnin *et al.*, 2006). These cassettes were subcloned into pMOG800 vector. Binary vectors expressing N- and C-terminus of the YFP addressed to the cytosol (NYFP<sub>cyt</sub> and CYFP<sub>cyt</sub>) were provided by Dr F. Aparicio (Instituto Biología Molecular y Celular de Plantas “Primo Yúfera”,

Valencia, Spain (Aparicio *et al.*, 2006). All DNA manipulations were confirmed by plasmid DNA sequencing.

### ***In Vitro protein expression***

The pGEMLepHR14L and HR14D, mutants of the HR1 of TMV MP, were transcribed and translated in the presence of reticulocyte lysate, [<sup>35</sup>S]Met, and dog pancreas rough microsomes (RM) as described previously (Martinez-Gil *et al.*, 2009). Samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the gels were visualized on a Fuji FLA3000 phosphorimager using ImageGauge software. The extent of glycosylation of a given mutant was calculated as the quotient of the glycosylated band intensity divided by the summed intensities of the glycosylated and non-glycosylated bands for each analyzed lane.

The proteinase K digestions were performed after *in vitro* translation by incubation the mixture with 400 µg/ml proteinase K on ice for 40 min. The reaction was stopped by adding 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. The membrane fraction was then collected by centrifugation and analyzed by SDS-PAGE.

### ***Expression of TMV MP and Lep proteins in planta, membrane sedimentations and western blot assay***

*Agrobacterium tumefaciens* (strain C58) cultures were transformed with both binary pMOG800 plasmids, containing the 35S-TMVMP:HA and 35S-Lep:HA expression cassettes. The cultures at OD<sub>600</sub> 0.4 were infiltrated in *N. benthamiana* plants as previously described (Herranz *et al.*, 2005). After 3 days post infiltration, the leaves were processed to obtain enriched membranous fractions as described previously (Peremyslov *et al.*, 2004). The resultant membranous enriched pellet was resuspended in buffer A (20 mM HEPES, pH 6.8/150 mM potassium acetate/250 mM mannitol/1 mM MgCl<sub>2</sub>/2.5 µL of protease inhibitor cocktail for plant cell and tissue extracts, Sigma) and divided into four aliquots for the untreated, alkaline wash or urea treatments as described previously. Membranes were collected by ultracentrifugation (100.000 x g 20 min 4°C). All the fractions were analyzed by Western-blot in 12% SDE-PAGE gels. The gel was electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes following the manufacturer's instructions (Amersham). The detection of the proteins tagged with the HA epitope was realized by using an anti-HA (Sigma) and a secondary

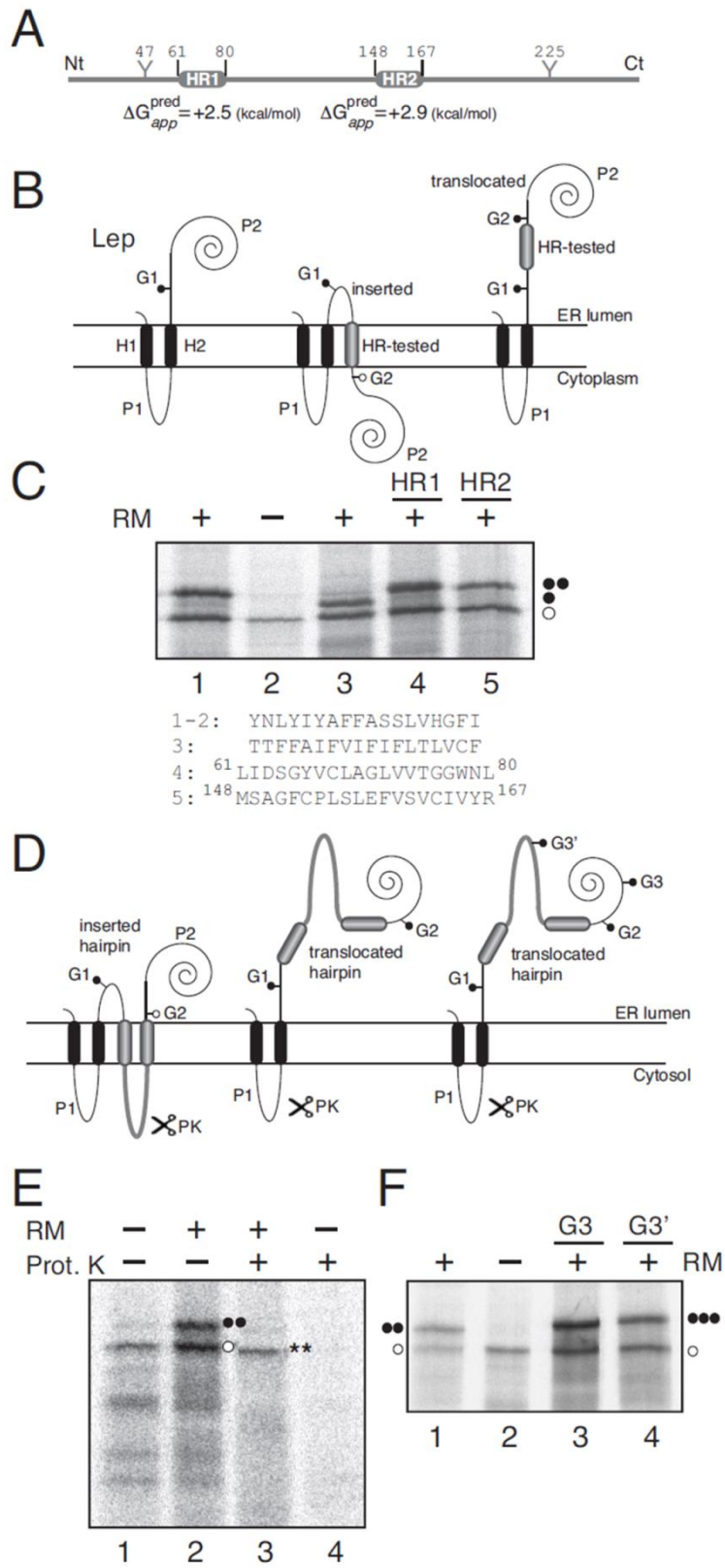


antibody conjugated with the peroxidase (Sigma). The chemiluminescence detection was made using the substrate recommended by Amersham (ECL+Plus Western Blotting Detection System).

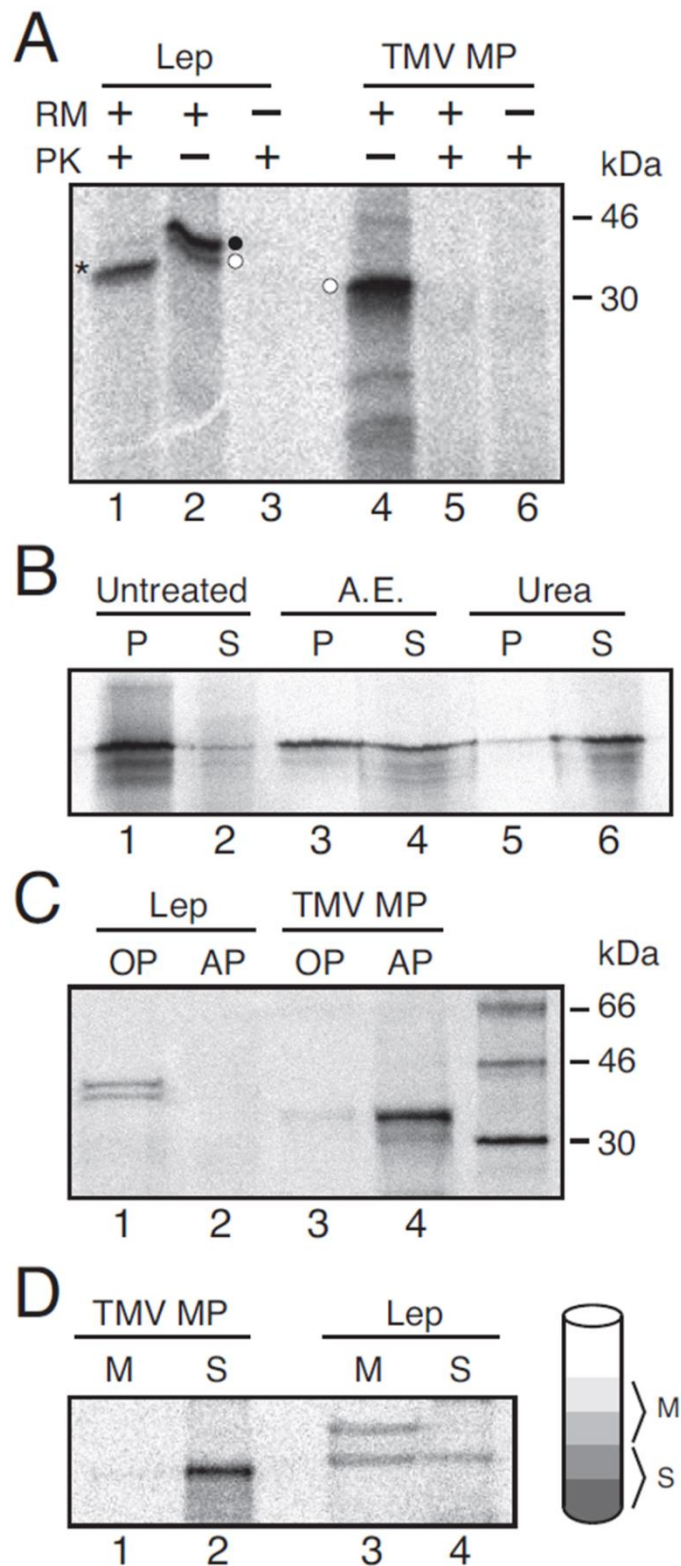
### ***Bimolecular fluorescence complementation assays***

In the BiFC assays, the different proteins (Figures 2-4) were transiently expressed with the C-terminal YFP fragment addressed to the cytosol (CYFP<sub>cyt</sub>) or the lumen of the ER (CYFP<sub>ER</sub>). For this objective, *Agrobacterium tumefaciens* (strain C58) cultures (OD<sub>600</sub> = 0,4) transformed with the corresponding binary plasmids pMOG800 were used to infiltrate *N. benthamiana* plants as it was previously described (Herranz *et al.*, 2005). The plants were kept at 24°C day-18°C night, with a 16h day- 8h night photoperiod. At 4 days post-infiltration, the fluorescence reconstitution was monitored in the confocal Leica TCS SL ( $\lambda_{exc}$  = 488 nm;  $\lambda_{em}$  = 500-550 nm).

# SUPPLEMENTARY FIGURES



**Supplementary figure 1.** TMV-isolated HRs do not span ER-derived membranes. **(A)** Schematic representation of the TMV MP, highlighting the HRs (gray boxes). Y-shaped symbols denote potential (non-naturally modified) glycosylation sites. Predicted  $\Delta G_{app}$  values are given, which were estimated using the  $\Delta G$  prediction algorithm available on the Internet (<http://dgpred.cbr.su.se/>). In this algorithm, positive values indicate translocation across the membrane (i.e., absence of stable insertion). **(B)** Schematic representation of the model leader peptidase (Lep) construct (left) and the variants used to report TMV MP HR1 and HR2 insertion into (center) or translocation across (right) the ER membrane. **(C)** *In vitro* translation of the different Lep constructs. Lep constructs containing TMV MP HR1 or HR2 were transcribed and translated in the presence of rough microsomal (RM) membranes (lanes 4 and 5, respectively). Control HRs were used to verify sequence translocation (in the presence or in the absence of RMs, lanes 1 and 2, respectively) and membrane integration (lane 3). The HR sequence in each construct is shown at the bottom. Non-glycosylated protein bands are indicated by a white dot, while singly or doubly glycosylated proteins are indicated by one or two black dots, respectively. **(D)** Schematic representations of topographical models for the in-block insertion (left) or translocation (center and right) of the two TMV MP HRs (residues 61–167) into the Lep sequence. Recognition by the translocation machinery of the two HRs as an integrating domain locates G1 and G2 at the luminal side of the ER membrane, but the short distance to the membrane prevents G2 glycosylation (left). The Lep chimera will be doubly glycosylated when this domain is translocated into the lumen of the microsomes (center). An additional glycosylation site was engineered either at the C-terminal P2 domain (G3) or at the hydrophilic loop (G3') connecting HR1 to HR2 (right). **(E)** *In vitro* translation in the presence (+) or absence (–) of RMs and PK of Lep-derivatives. The protected doubly glycosylated fragment is indicated by two asterisks. **(F)** *In vitro* translation of Lep-derived constructs harboring a third glycosylation site either at the C-terminal P2 domain (G3, lane 3) or at the loop connecting HR1 and HR2 (G3', lane 4). Control hairpin samples are included (lanes 1 and 2). Triple-glycosylated forms are indicated by three black dots. All the gels are representative of at least 3 independent experiments.



**Supplementary figure 2.** TMV MP *in vitro* association with biological membranes. **(A)** Proteinase K (PK) treatment of microsomes carrying *in vitro* translated wild-type Lep (lanes 1–3), and the full-length TMV MP (lanes 4–6). Non-glycosylated and glycosylated molecules are indicated by white and black dots, respectively. An asterisk indicates protease-protected fragments. **(B)** Segregation of [<sup>35</sup>S]Met-labeled TMV MP into membranous

and soluble fractions (untreated) and after alkaline extractions (A.E., sodium carbonate buffer wash) or urea treatments (8 M). P and S denote pellet and supernatant, respectively. **(C)** Triton X-114 partitioning of Lep (lanes 1 and 2) and TMV MP (lanes 3 and 4). OP and AP refer to organic and aqueous phases, respectively. **(D)** Flotation gradient centrifugation of TMV MP (lanes 1 and 2) and Lep (lanes 3 and 4) translated in vitro in the presence of RMs. M and S denote membrane and soluble fractions, respectively.

## **CAPÍTULO 2**

---



**Systemic transport of *Alfalfa mosaic virus* can be mediated by the movement proteins of several viruses assigned to five genera of the 30K family**

Este capítulo ha dado lugar a la siguiente publicación:

**Fajardo, T. V., Peiró, A., Pallás, V. and Sánchez-Navarro, J.** (2013) Systemic transport of *Alfalfa mosaic virus* can be mediated by the movement proteins of several viruses assigned to five genera of the 30K family. *J. Gen. Virol.* **94**, 677-81.





## INTRODUCTION

To establish a systemic infection, plant viruses must invade the adjacent cells via the cell wall connections known as plasmodesmata (PD), the so-called cell-to-cell transport (Fernandez-Calvino *et al.*, 2011a; Lucas, 2006;), and reach distal parts of the plant through the vascular tissue, a process denominated systemic transport (Carrington *et al.*, 1996; Lazarowitz and Beachy, 1999; Pallás *et al.*, 2011; Ueki and Citovsky, 2007; Waigmann *et al.*, 2004). For this purpose, the viruses express one or a few movement protein(s) (MPs) to support virus transport. MPs can determine host specificity (Waigmann *et al.*, 2007) and, in some instances, can influence viral pathogenicity (Pallás and García, 2011). Viral MPs facilitate the virus cell-to-cell transport by different mechanisms, permitting the transport of ribonucleoprotein complexes, between MP and viral RNA (e.g. *Tobacco mosaic virus*, TMV; Waigmann *et al.*, 2007), plus the coat protein (CP) (*Cucumber mosaic virus* –CMV- or *Alfalfa mosaic virus* –AMV-) or virions particles (Ritzenthaler and Hofmann, 2007). In spite of the clear differences observed among the three transport mechanisms, a large number of these MPs have been assigned to the 30K superfamily (Melcher, 2000).

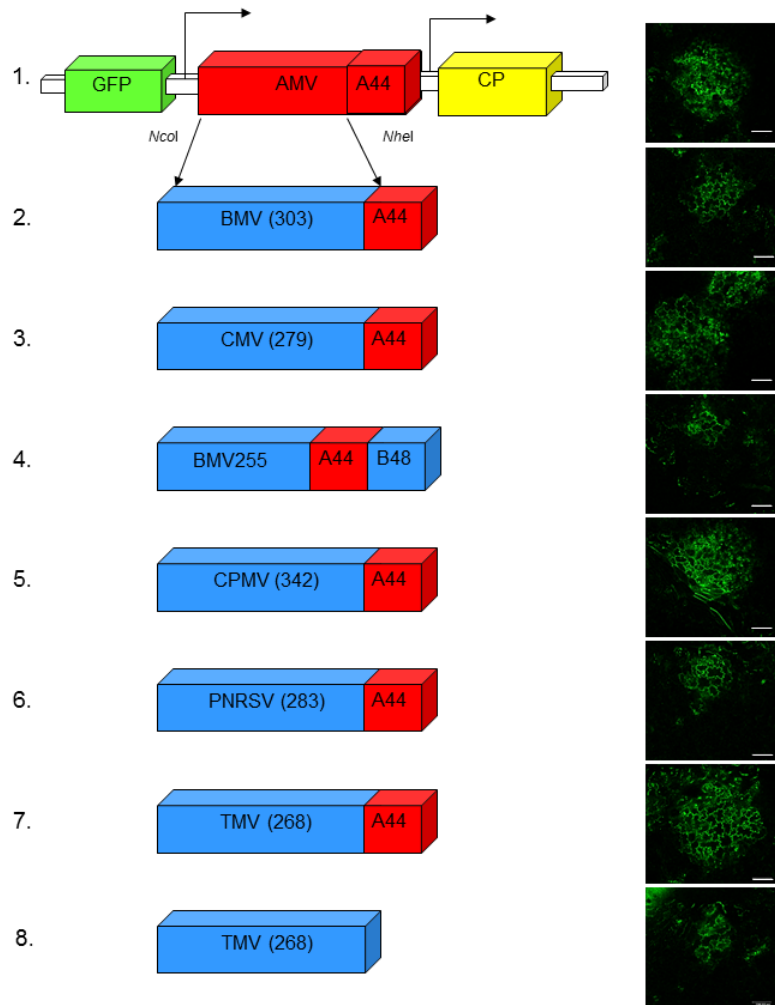
Systemic transport implies the entry into and the exit from the vascular tissue and, consequently, the infection of different cell types associated with it (see Pallás *et al.*, 2011 and Ueki and Citovsky, 2007, for recent reviews). The capacity of plant viruses to reach vascular tissue requires not only the use of the MPs but also the concurrence of other viral proteins that can be related to the suppression of plant defenses (e.g. silencing suppressors), protein translation (e.g. VPg) (Rajamaki and Valkonen, 2002), viral RNA-dependent RNA replication (Traynor *et al.*, 1991) or the presence of the CP (Bol, 2008; Ueki and Citovsky, 2007). AMV is the type member of the genus *Alfamovirus* for which virus particles are required for systemic transport (Herranz *et al.*, 2012; Sánchez-Navarro and Bol, 2001; Tenllado and Bol, 2000). We previously reported that the MP of AMV is functionally exchangeable for the cell-to-cell transport by the corresponding genes of TMV, *Brome mosaic virus* (BMV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), CMV and *Cowpea mosaic virus* (CPMV), all of them assigned to the 30K superfamily. (Sánchez-Navarro and Bol, 2001; Sánchez-Navarro *et al.*, 2006; Sánchez-Navarro *et al.*, 2010). Except for the TMV MP, the remaining heterologous

MPs require the fusion at its C terminus of the C-terminal 44 amino acids of the AMV MP (A44), responsible to interact with the cognate CP (Sánchez-Navarro *et al.*, 2006). The present work analyzes the capacity of several MPs of the 30K superfamily to support the systemic transport of chimeric AMV RNA3, including MPs representative of the different cell-to-cell transport mechanisms.

## **RESULTS**

### ***Analysis of the cell-to-cell transport of the AMV RNA3 chimera***

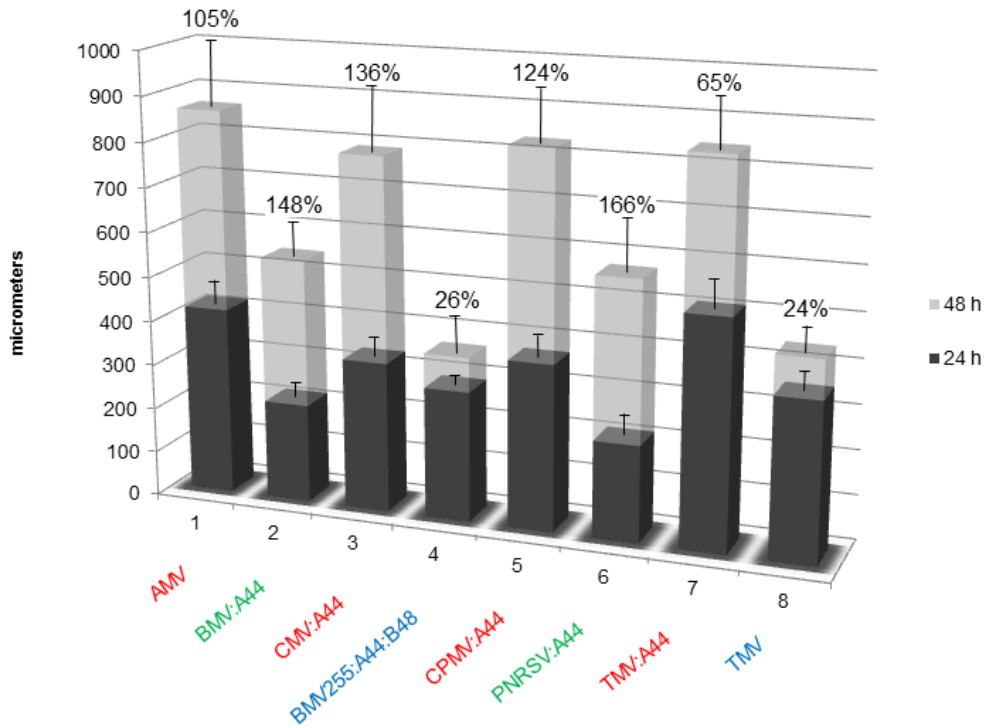
We quantified the cell-to-cell transport of the AMV RNA3 chimera modified to express the GFP and carrying the previously described heterologous MPs (Sánchez-Navarro *et al.*, 2006). An analysis of the replication rates on P12 protoplasts showed that the chimera constructs shown in Figure 1 accumulated at comparable levels (Sánchez-Navarro *et al.*, 2006). T7 transcripts from the AMV RNA 3 chimera constructs carrying the green fluorescent gene and the corresponding MP gene of PNRSV (PNRSV:A44), CMV (CMV:A44), CPMV, (CPMV:A44), BMV (BMV:A44), BMV with the A44 fused before its C-terminal 48 amino acids (BMV:A44:B48) and TMV with (TMV:A44) or without (TMV) the A44 fragment, were inoculated on transgenic tobacco plants constitutively expressing the AMV P1 and P2 protein (P12 plants; Taschner *et al.*, 1991).



**Figure 1.** Analysis of the cell-to-cell transport of the hybrid AMV RNA3 in which its movement protein (MP) gene was exchanged by the corresponding genes of different viruses. Schematic representation shows the GFP/AMV/CP and the AMV RNA 3 derivatives (1). Reading frames encoding the GFP, MP and coat protein (CP) are represented by green, red and yellow boxes, respectively. The MPs analyzed correspond to *Brome mosaic virus* (BMV)(2, 4), *Cucumber mosaic virus* (CMV)(3), *Cowpea mosaic virus* (CPMV)(5), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)(6) and *Tobacco mosaic virus* (TMV)(7, 8). The C-terminal 44 and 48 amino acids of the AMV and BMV MP are indicated as 'A44' and 'B48', respectively. The numbers in the boxes represent the total amino acids residues of the corresponding MP. The *NcoI* and *NheI* restriction sites used to exchange the MP gene are indicated. Images at the right of the scheme correspond to representative pictures of the size of infection foci observed on inoculated P12 leaves at 2 dpi.

Figure 2 shows the area average of 50 infection foci at 1 and 2 days post inoculation (dpi). The results at 2dpi grouped constructs into three clusters with a different average infection foci size: around 800  $\mu\text{m}$ (AMV, CMV:A44, CPMV:A44 and TMV:A44), 600  $\mu\text{m}$  (PNRSV:A44 and BMV:A44) and 400  $\mu\text{m}$  (BMV:A44:B48 and TMV). Interestingly, the absence of the A44 fragment (TMV construct) or its location inside the heterologous MP (BMV:A44:B48) negatively affects the cell-to-cell transport

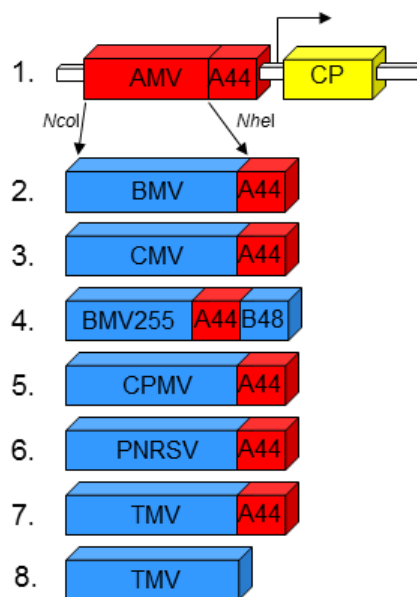
(compare TMV:A44 vs TMV in Figure 2) with an area increment at 2dpi considerably lesser than the observed for the rest of constructs (24-26% vs 65-166%).



**Figure 2.** Graphics showing the average of the area of 50 independent infection foci developed by the inoculation of transcripts originated from the constructs shown in Figure 1. Fluorescence was monitored with a confocal laser scanning microscope at 1 and 2 dpi. Bar represents 200  $\mu\text{m}$ . Red, green and blue colors correspond with the group showing an average infection foci size around 800, 600 and 400  $\mu\text{m}$ , respectively.

### ***Analysis of the systemic transport of the AMV RNA3 chimera***

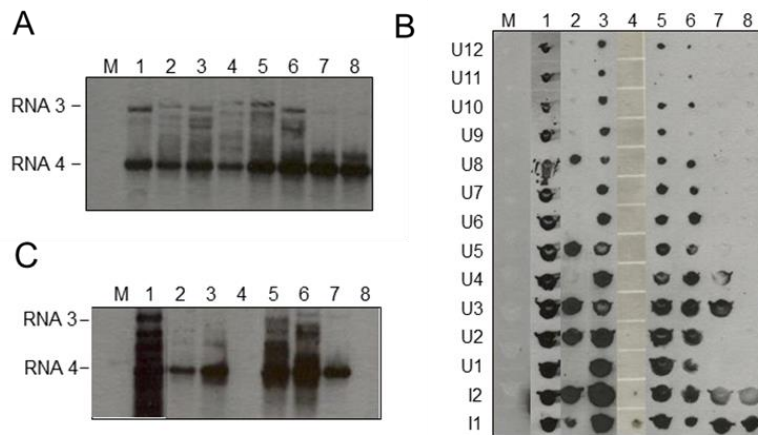
In the next step, we analyzed the capacity of the heterologous MPs to support the systemic transport of AMV RNA 3. For this purpose, we modified a wild-type AMV RNA 3 since the RNA 3 derivatives carrying the GFP reporter gene do not move systemically in P12 tobacco plants (Sánchez-Navarro *et al.*, 2001). All the heterologous MPs were introduced into AMV RNA 3 (plasmid pAL3NcoP3 in van der Vossen *et al.*, 1993) as showed Figure 3.



**Figure 3.** Schematic representation shows the AMV RNA 3 wild-type (1) and its derivatives. Reading frames encoding the MP and CP are represented by red and yellow boxes, respectively. The MP genes exchanged in the AMV RNA 3 are indicated in Figure 1.

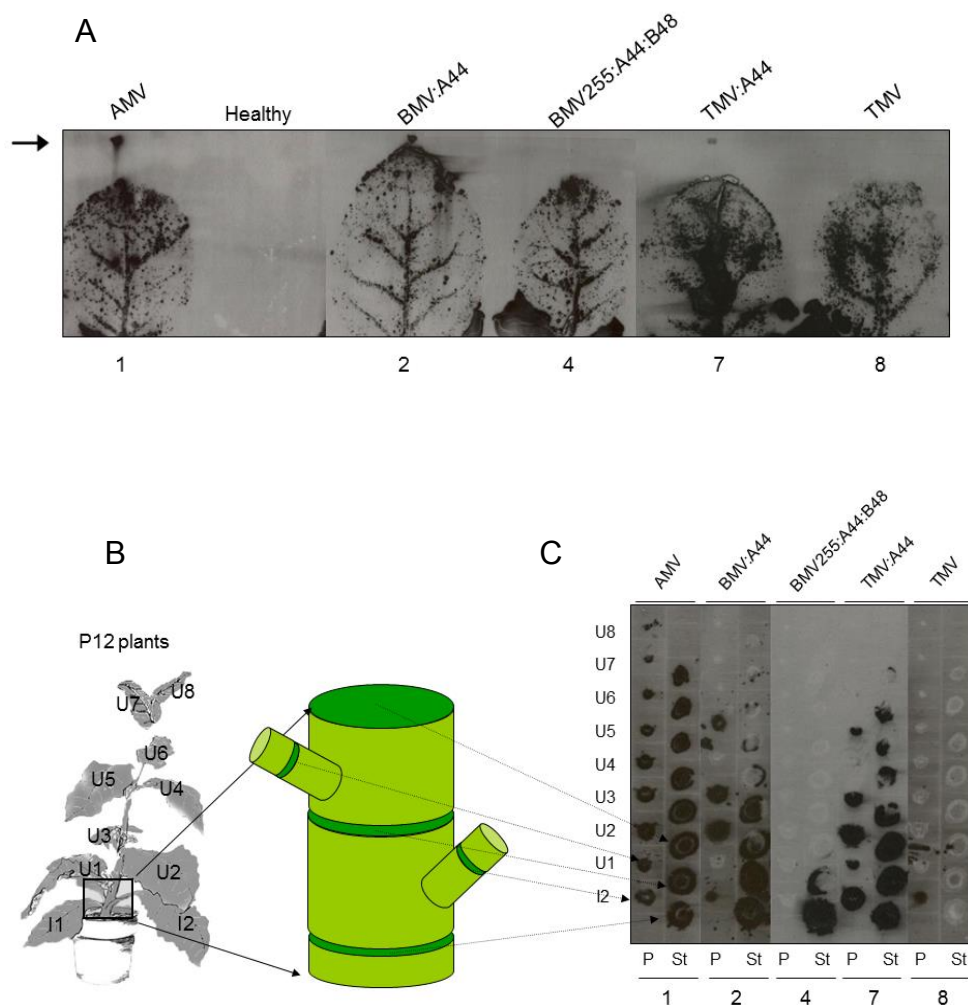
RNA accumulation levels of the different AMV RNA 3 hybrids were first analyzed in P12 protoplasts as described previously (Sánchez-Navarro *et al.*, 2010). Chimeric RNA 3 and 4 accumulated at comparable levels to AMV wild-type RNAs 3 and 4 (lanes 2-6 vs lane 1 in Figure 4A) except for the RNA 3 of the AMV constructs carrying the MP of TMV, either fused or not to the A44 fragment, which was significantly reduced (10%, lanes 7 and 8 vs lane 1 in Figure 4A). The accumulation of all the RNA 3 derivatives was then analyzed in inoculated and upper leaves of P12 plants by tissue printing of petioles, in which positive hybridization signal, representing probably the capacity of the virus to infect the tissue adjacent to the phloem sieve elements, was always correlated with the presence of the virus in the corresponding leaf, as described previously (Mas and Pallás, 1995; Sánchez-Navarro *et al.*, 2010). The tissue printing results (Figure 4B) allow us to discern three different patterns according to the detection of a positive hybridization signal in: i) all the inoculated and upper leaves (AMV, CMV:A44, CPMV:A44 and PNRSV:A44), ii) in the inoculated leaves and some upper leaves (BMV:A44 and TMV:A44) and iii) only in the inoculated leaves (BMV:A44:B48 and TMV). The accumulation of viral RNAs in the petioles of inoculated (not shown) or upper leaves showing positive hybridization signal by tissue printing was later confirmed by northern-blot analysis (Figure 4C). The results shown in Figure

4 revealed that all the analyzed MPs carrying the A44 fragment fused at its C terminus, are able to support the systemic transport of the AMV RNA3. Except for the TMV construct, all the AMV RNA 3 chimeras showing large infection foci on the inoculated leaves were able to infect all the upper leaves (CMV, CPMV and AMV). The group of AMV constructs showing medium infection foci on inoculated leaves (600  $\mu$ m; BMV:A44 and PNRSV:A44) rendered two different systemic infection patterns which were differentiated in terms of their capacity to reach all the upper leaves (PNRSV:A44; Figure 4B, lane 6) or only part of them (BMV:A44; Figure 4B, lane 2). This result clearly indicates that AMV chimeras with reduced cell-to-cell transport are still able to infect all the upper leaves.



**Figure 4.** Analysis of the replication and systemic transport of the AMV RNA 3 hybrids. **(A)** Northern blot analysis of the accumulation of the AMV RNA 3 and 4 chimeras in P12 protoplasts. **(B)** Tissue printing analysis of P12 plants inoculated with the AMV RNA 3 derivatives. Plants were analyzed at 14 dpi by printing the transversal section of the corresponding petiole from inoculated (I) and upper (U) leaves. The position of each leaf is indicated by numbers which correspond to the position of the leaves in the plant from the lower to the upper part. **(C)** Northern blot analysis of a mixture of total RNA extracted from the U2, U3 and U4 upper leaves. M, mock inoculated plant. Numbers at the top of each membrane correspond to the constructs represented in Figure 3. In all cases, the blots were hybridized with an AMV probe complementary to the 3'-untranslated region. The positions of the RNA3 and RNA4 are indicated in the left margin of the pictures A) and C).

To further characterize the AMV constructs that are affected in the systemic transport (Figure 3 constructs 2, 4, 7 and 8) we decided to perform a more precise tissue printing analysis by checking not only the petiole, but also the inoculated leaf and the stem just above and below of the corresponding petiole (Figure 5).



**Figure 5.** Tissue printing analysis of AMV RNA 3 derivatives affected in the systemic transport. P12 plants were inoculated with transcripts of AMV RNA 3 wild-type (1) or hybrids carrying the MP gene of BMV (2 and 4) and TMV (7 and 8) represented in Figure 3. **(A)** Tissue printing analysis of the inoculated leaves of P12 plants at 7 dpi. The arrow indicates the printing of the transversal section of the corresponding petiole. **(B)** Schematic representation of the localization of all the analyzed leaves and the distribution of the transversal sections of petioles (P) and stems (St). **(C)** Tissue printing analysis of the P12 plants at 14 dpi by printing transversal sections of all petioles and the stem around them. 'I' and 'U' are referred as inoculated and upper leaves, respectively.

First we observed that at 7 dpi all constructs analyzed rendered a comparable hybridization signal in the inoculated leaf (Figure 5A), meanwhile no signal at all was observed in the transversal section of the corresponding petiole for the constructs that do not move systemically (Figure 5A,4 and 8). At 14 dpi and for the AMV wild-type, we observed positive hybridization signals in all the stem sections, covering the full ring



and indicating the presence of viral RNA in all phloem tissue. However, the constructs that moved only to some of the upper leaves (BMV:A44 and TMV:A44) rendered a strong stem hybridization signal close to inoculated leaves that decreased in the upper part of the plant, where the hybridization signal was observed in only part of the cross-section (Figure 5C, St lanes 2 and 7). For the constructs that do not move systemically, we observe two different patterns on the stem sections. First, the BMV255:A44:B48 chimera shows a clear hybridization signal only in the stem sections around the inoculated leaf (Figure 5C, lane 4) and second, the TMV construct shows no hybridization signal at all in the stem (Figure 5C, lane 8).

## DISCUSSION

An interesting property of the 30K family is the observation that this group of viral MPs contains members representatives of the different virus transport mechanisms, permitting the transport of ribonucleoprotein complexes between the MP and viral RNA (e.g. TMV), plus the CP (e.g. CMV) or virions particles (e.g. CPMV). In spite of such differences, we previously reported that MPs representatives of the three mechanisms were competent to support the local transport of the AMV RNA3 chimera (Sánchez-Navarro *et al.*, 2006). The present analysis was addressed to study the capacity of the previously analyzed MPs, to support the transport of the corresponding chimeric AMV genome to the distal part of plant. The results obtained from the quantification of the local movement of the chimeric AMV constructs and the tissue printing of the p12 petiols revealed, except for TMV, a correlation between the ability of the AMV RNA 3 chimeras to show large infection foci on the inoculated leaves and their capacity to infect all the upper leaves (CMV, CPMV and AMV). This result strongly suggests that an efficient cell-to-cell transport gives an advantage to the pathogen that could avoid the plant defense mechanisms (e.g. silencing, pathogenesis-related proteins, hypersensitive response, etc). Indeed, in some well characterized plant-virus interactions, the capacity to reach upper tissue has been associated with a successful blockage of the RNA silencing-mediated plant defense barriers (Cao *et al.*, 2010; Hamilton *et al.*, 2002; Schwach *et al.*, 2005; Wintermantel *et al.*, 1997; Yelina *et al.*, 2002). However, it was not possible to apply this idea to the TMV:A44 construct since the infection foci, observed on the inoculated leaves, were similar to those observed

for other AMV chimeras able to infect all upper leaves. This result clearly reveals that despite the MP of TMV is very efficient in supporting the cell-to-cell transport of the AMV RNA 3 chimera; it is very inefficient in invading vascular tissue. The observation that the TMV construct is also competent for the cell-to-cell transport indicates that the MP transports viral RNA without any interaction with the AMV CP. In this scenario, it is tempting to speculate that probably the TMV:A44 MP mainly transports non-encapsidated viral RNA, which allows a very efficient local transport. However, it presents an inefficient systemic movement because of the presence of AMV virus particles are critical to reach the distal parts of the plant.

The different systemic infection patterns observed in the tissue printing of the petiols for BMV:A44 and PNRSV:A44, both constructs showing an average infection foci size around 600  $\mu\text{m}$ , clearly indicates that AMV chimeras with reduced cell-to-cell transport are still able to infect all the upper leaves. The differences observed between both constructs can be attributed to the greater compatibility between the PNRSV and AMV viruses (Aparicio *et al.*, 2003; Codoñer *et al.*, 2005; Sánchez-Navarro and Pallás, 1997).

The more precise tissue printing analysis shed light on the behavior of the constructs that are affected in systemic transport. BMV:A44 and TMV:A44 showed a strong stem hybridization signal close to inoculated leaves which decreased in the upper part of the plant. This result indicates that both constructs are able to reach the vascular tissue less efficiently than the AMV wild-type. A transport more inefficient through vascular system would not allow the virus to reach part of the upper leaves (e.g. U1 and U4 for P lane 2 and U4 for P lane 7) which have already undergone the sink-source transition, as it is described in other virus-host interactions (Cheng *et al.*, 2000; Mas and Pallás, 1996). For the constructs that do not move systemically different behaviors we observed. Regarding the hybridization signal obtained with the BMV255:A44:B48 construct on the border of the stem section, we can conclude that this construct is competent enough to reach vascular tissue, but it is quite likely that a delay to reaching it do not permit to establish a systemic infection. For TMV, we observed the opposite situation in which the lack of the A44 fragment compromises the accession of the virus to the phloem. In line with this, we have recently reported that virus particles and the A44 fragment are essential for the systemic transport of an

AMV chimera carrying the MP of *Cauliflower mosaic virus* (Sánchez-Navarro *et al.*, 2010).

In summary, we show that the MPs analyzed in the present work are competent enough to systemically transport the AMV chimera constructs to the distal parts of the plant when the last 44 aa of the AMV MP were fused at their C-terminus. This result allow us to suggest the idea that probably all the MPs of the 30K family are functionally exchangeable for both the local and systemic transports of AMV, irrespectively of the virus, the model used for the local transport (e.g., MP of TMV or CPMV) or the pathway used to reach the plasmodesmata (e.g., MP of TMV or *Grapevine fanleaf virus*; Sánchez-Navarro *et al.*, 2010). In addition, this work also shows that an inefficient cell-to-cell transport compromises systemic invasion, permitting to postulate the idea that a minimal cell-to-cell speed is required to reach the upper part of the plant as formerly reported for other viruses (Deom *et al.*, 1994).

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Plasmids***

The heterologous MP genes of PNRSV, CMV, TMV, BMV and CPMV were previously cloned into the modified infectious cDNA 3 clone of AMV that expresses the green fluorescent protein (Sánchez-Navarro *et al.*, 2006).

The wild-type AMV RNA 3 (plasmid pAL3NcoP3 in van der Vossen *et al.*, 1993) was modified to insert all the heterologous MPs by exchanging the *NcoI*-*PstI* fragment from chimeric constructs carrying the GFP. The resultant clones will have the heterologous MPs between the *NcoI*-*NheI* restriction sites.

### ***Inoculation of P12 protoplast and plants***

cDNA3 clone of AMV wt or modified expressing GFP and their respective mutants, expressing the different MPs, with and without GFP, were linearized with *PstI* and transcribed with T7 RNA polymerase. Protoplasts were extracted from transgenic *Nicotiana tabaccum* plants that express the polymerase proteins P1 and P2 of AMV (P12 plants; van Dun *et al.*, 1988) and  $2.5 \times 10^5$  protoplasts were inoculated by the polyethylene glycol method (Loesch-Fries *et al.*, 1985) with 6  $\mu$ l of the transcription of AMV cDNA3 wt or chimera constructs carrying the different MPs. P12 plants were

grown and inoculated with RNA transcripts from AMV cDNA3 wt clone or the modified expressing GFP and their respective mutants with and without GFP as described previously (Taschner *et al.*, 1991). GFP expression in plants was analyzed with a Leica TCS SL confocal laser scanning microscope (Leica), with excitation at 488 nm and emission at 510–560 nm.

#### ***Tissue printing and Northern blot assays***

Tissue printing analysis were performed with inoculated leaves of P12 plants and the transversal section of the corresponding petiole at 7dpi (Figure 5A), and with P12 plants at 14dpi by printing transversal sections of all petioles and the stems around them (Figure 4B and 5C). Total RNA was extracted from inoculated protoplasts at 18 h post-inoculation or from inoculated (I) and upper (U) not inoculated leaves at 7 dpi and 14 dpi, respectively as using TRI Reagent (Sigma Steinheim, Germany) described previously (Sánchez-Navarro *et al.*, 1997). In the case of the upper leaves, the RNA extraction was performed using a mixture of U2, U3 and U4 leaves. The RNAs were electrophoresed through formaldehyde-denatured gel and transferred to positively charged nylon membranes (Roche Mannheim, Germany). RNAs were fixed to the membranes with a UV cross-linker (700 × 100 µJ/cm<sup>2</sup>). Hybridization and detection was conducted as previously described (Pallás *et al.*, 1998) using a dig-riboprobe (Roche Mannheim, Germany) complementary to the AMV 3' untranslated region (UTR).



## **CAPÍTULO 3**

---



**Patellins 3 and 6, two members of the plant patellin family, interact with the movement protein of *Alfalfa mosaic virus* and interfere with viral movement**

Este capítulo ha dado lugar a la siguiente publicación:

**Peiró, A., Izquierdo-García, A. C., Sánchez-Navarro, J. A., Pallas, V., Mulet, J. M. and Aparicio, F.** (2014) Patellins 3 and 6, two members of the Plant Patellin family, interact with the movement protein of Alfalfa mosaic virus and interfere with viral movement. *Mol. Plant Pathol.* doi: 10.1111/mpp.12146.





## INTRODUCTION

To establish systemic infection, plant viruses must traffic from initially infected cells to neighbouring cells through plasmodesmata (PD) channels until they reach the vascular system (Fernandez-Calviño *et al.*, 2011b; Pallás *et al.*, 2011). Such intercellular movement is an active process that requires one or more viral-encoded movement proteins (MPs) to interact with other viral factors (genome and other proteins) and with host proteins to alter, in some instances, plant physiology (Pallás and García, 2011; Whitham and Wang, 2004). In the last few years, different approaches have permitted the identification of host proteins that interact with several MPs of the 30K superfamily (Melcher, 2000) which, in some cases, affect viral movement (reviewed in Boevink and Oparka, 2005; Lucas, 2006; Whitham and Wang, 2004). Thus, *Tomato spotted wilt virus* MP interacts with a DnaJ-like protein (Soellick *et al.*, 2000) and with At-4/1, a protein showing homology to the myosin and kinesin motor proteins, which has been proposed to be a component of the PD transport machinery (Paape *et al.*, 2006; von Bargen *et al.*, 2001). The MP of *Tobacco mosaic virus* (TMV) interacts with not only several cytoskeleton components, such as microtubule-associated protein MPB2C (Kragler *et al.*, 2003), microtubule end-binding protein 1 (EB1) (Brandner *et al.*, 2008), and actin filaments (McLean *et al.*, 1995), but also with cell wall-associated proteins, such as pectin metylesterase (PME) (Chen *et al.*, 2000) and calreticulin (Chen *et al.*, 2005). Moreover, TMV MP also interacts with a protein kinase associated with PD (Lee *et al.*, 2005), with a DnaJ-like protein (Shimizu *et al.*, 2009), a plant ankyrin repeat-containing protein (ANK) (Ueki and Citovsky, 2011) and synaptotagmin, a calcium sensor that regulates vesicle endo- and exocytosis (Lewis and Lazarowitz, 2010). Interaction with ANK and PME positively contributes to TMV intercellular movement and systemic movement, respectively. It has been found that the interaction with ANK decreases callose deposition, whereas PME regulates viral unloading from the phloem (Chen and Citovsky, 2003; Ueki and Citovsky, 2011). Synaptotagmin is also required for TMV systemic spread (Lewis and Lazarowitz, 2010). In contrast, calreticulin, MPB2C and EB1 negatively regulate the targeting of TMV MP to PD (Brandner *et al.*, 2008; Curin *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2005; Kragler *et al.*, 2003). An interaction has also been described between the MP of *Brome mosaic virus* and

NbNaCa1, a protein that is similar to the  $\alpha$ -chain of the nascent polypeptide-associated complex, which is involved in regulating the localization of the MP at PD (Kaido *et al.*, 2007). The MP of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) has been reported to interact with an Arabidopsis protein, related to mammalian proteins, described as rab acceptors (Huang *et al.*, 2001). The *Tomato mosaic virus* MP has been seen to interact with putative transcriptional coactivators (KELP and MBF1) and with protein kinases (Matshushita *et al.*, 2003; Matshushita *et al.*, 2002; Matshushita *et al.*, 2001; Yoshioka *et al.*, 2004). The overexpression of KELP interferes with viral cell-to-cell movement (Sasaki *et al.*, 2009). A yeast-based approach allowed the expression of the *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) MP, which triggers the general control (GCN) pathway through Gcn2p kinase activation (Aparicio *et al.*, 2011).

*Alfalfa mosaic virus* (AMV) is the only member of the *Alfamovirus* genus in the *Bromoviridae* family. The AMV genome consists of three single-stranded RNAs of plus-sense polarity. Replicase subunits P1 and P2 are encoded by monocistronic RNAs 1 and 2, respectively, whereas RNA 3 encodes MP and serves as a template for the synthesis of the nonreplicating subgenomic RNA4 (sgRNA4) from which the coat protein (CP) is translated. AMV MP belongs to the 30K family and is implicated in intercellular viral movement (reviewed in Bol, 2005). A mutational analysis has shown that AMV MP is able to form tubular structures in protoplasts, which correlate with cell-to-cell movement capacity (Sánchez-Navarro and Bol, 2001). However, the host factors interacting with AMV MP have not yet been identified.

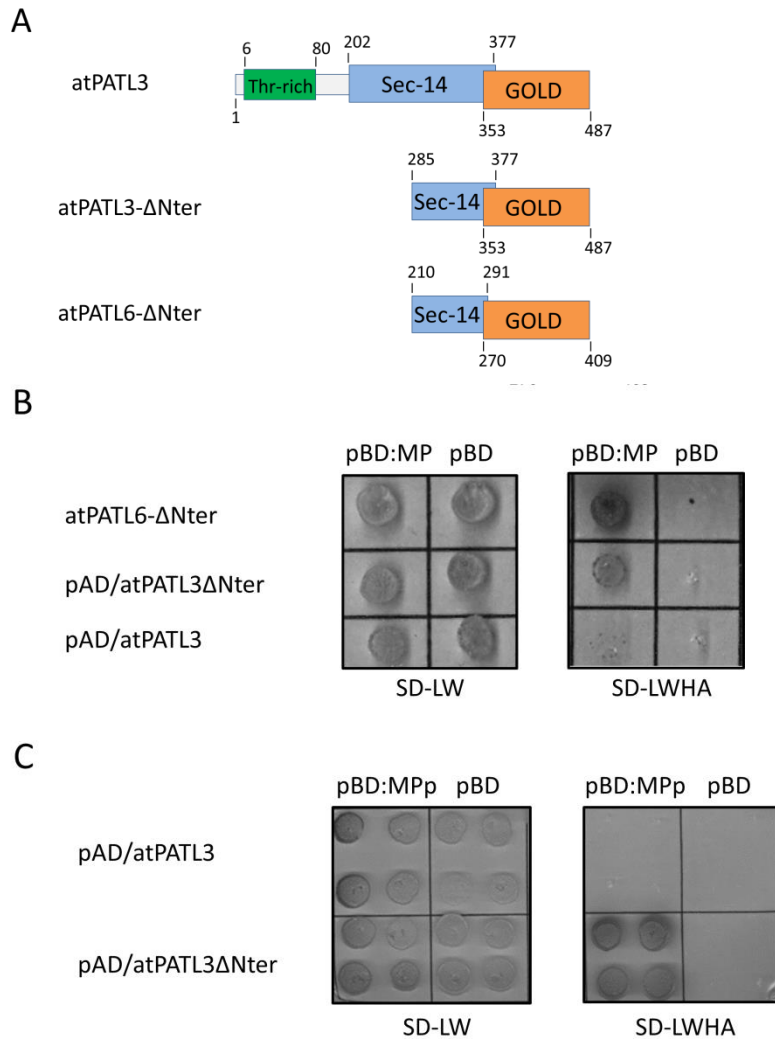
In the present work, we report the interaction between AMV MP and two members of the Arabidopsis patellin (PATLs) family: patellins 3 and 6 (atPATL3 and atPATL6). PATLs are related to Sec14 (Peterman *et al.*, 2004), which is the defining member of a family of phosphatidylinositol transfer proteins (Allen-Baume *et al.*, 2002). The proteins related to Sec14 play a role in lipid signalling and metabolism, and in membrane trafficking (Routt and Bankaitis, 2004). Biochemical fractioning and intracellular localization experiments have demonstrated that patellin1 from Arabidopsis (atPATL1) and zucchini (*Cucurbita pepo*) are peripheral membrane-associated proteins, suggesting that PATLs can be implicated in vesicle/membrane trafficking events (Peterman *et al.*, 2004; Peterman *et al.*, 2006). In fact, atPATL1 is critical in cell plate formation and maturation in the late telophase in Arabidopsis root

cells (Peterman *et al.*, 2004). Our analysis of the subcellular localization of AMV MP in the presence of either atPATL3 and atPATL6 indicated that these host proteins would diminish viral cell-to-cell movement by interfering with MP targeting to PD. Accordingly, we found that the transient overexpression of both atPATLs reduced the infection foci size, whereas viral RNA accumulation increased in the single and double Arabidopsis atPATLs knockouts.

## RESULTS

### ***AMV MP interacts with atPATL 3 and atPATL6 in yeast and in vivo***

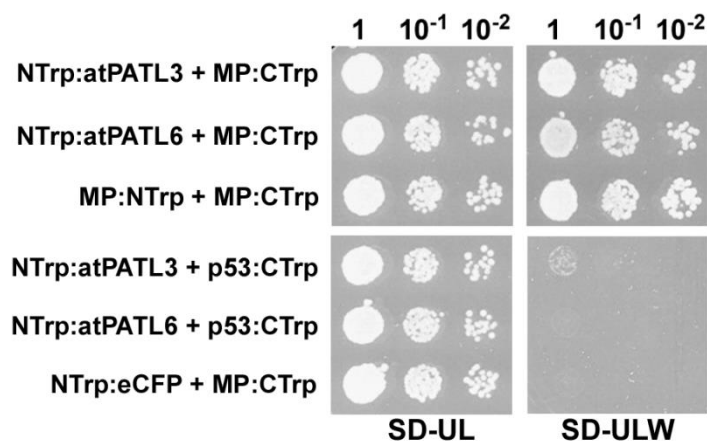
In order to shed light on the molecular mechanism driving the intercellular movement of the virus, we decided to search for host proteins that interact with AMV MP. Previous analyses have been conducted to identify the host proteins involved in AMV transport by yeast two-hybrid (Y2H) screens with full-length MP as the bait, but they yielded inconclusive results (Zuidmeer-Jongejan, 2002). We reasoned that the characteristic hydrophobic domain of the 30K family of MPs (Pallás *et al.*, 2013; Sánchez-Navarro and Pallás, 1997), which, in some viruses, has been shown to be implicated in MP membrane association (Fujiki *et al.*, 2006; Martínez-Gil *et al.*, 2009), would probably interfere with the protein-protein interactions screened by a conventional GAL 4-based Y2H system (MATCHMAKER Two-Hybrid System 3, Clontech). Therefore, we decided to use a deleted version of AMV MP, lacking the hydrophobic domain, as a bait to screen a cDNA library of mRNA from Arabidopsis leaves. From the  $3 \times 10^6$  yeast transformants, we identified diverse potential interacting partners (Peiró *et al.*, unpublished results). These included a deleted versions of atPATL3 (at1g72160) (three clones) and atPATL6 (at3g51670) (two clones), which lacked the N-terminal 285 and 210 residues, respectively (Figure 1A, atPATL3- $\Delta$ Nter and atPATL6- $\Delta$ Nter). Attempts to corroborate these interactions with full-length MP revealed that the viral protein interacts with atPATL6- $\Delta$ Nter and, more weakly with atPATL3- $\Delta$ Nter, but not with full-length atPATL3 (Figure 1B). Interestingly, the full-length MP of the related PNRSV (MPp) interacts with atPATL3- $\Delta$ Nter (Figure 1C).



**Figure 1.** Identification of MP-PATLs interactions by the conventional GAL 4- based yeast two-hybrid system. (MATCHMAKER Two-Hybrid System 3, Clontech). **(A)** Scheme showing the domain architecture of the full-length atPATL3 and C-terminal fragments of atPATL3 and 6 (atPATL3-ΔNter and atPATL6-ΔNter lacking the N-terminal 285 or 210 amino acids, respectively) which correspond to the protein fragments found as interacting partners of the AMV MP (see [www.uniprot.org/uniprot/Q56Z59](http://www.uniprot.org/uniprot/Q56Z59) and <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9SCU1>). **(B and C)** AH109 yeast strain cells were co-transformed with empty pGBKT7 plasmid (pBD) or containing the full-length AMV MP (pBD:MP) and the full-length PNRSV MP (Mpp) (pBD:Mpp) plus plasmid pGADT7 containing the full-length atPATL3 (pAD:atPATL3) or the C-terminal atPATL3 and 6 fragments showed in A (pAD:atPATL3-ΔNter and pAD: atPATL6-ΔNter). Transformants were spotted on minimal synthetic dropout (SD) medium containing (SD-LW) or lacking histidine and adenine (SD-LWHA) to confirm proper co-transformation or positive interactions, respectively. Cells were growth at 28°C for 4 days. Interaction with the empty pBD vector was used as negative control.

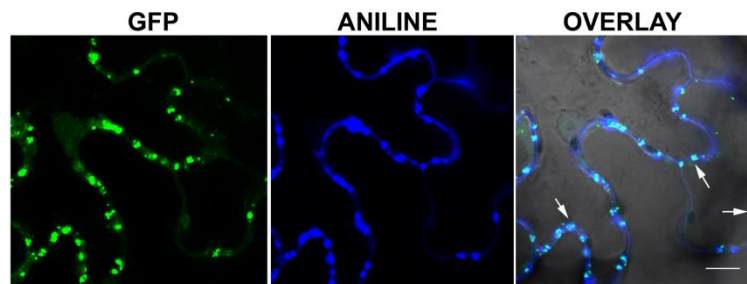
In order to confirm the interaction of AMV MP with the entire atPATLs, we decided to use an alternative split-protein sensor system, which was specially designed to detect the interactions between putative membrane-associated proteins. In this system, the two interacting partners are expressed as fusion proteins with the N- and

C-terminal fragments of ( $\beta/\alpha$ )8-barrel enzyme N-(5-phosphoribosyl)- anthranilate isomerase (Trp1p) from *Saccharomyces cerevisiae*. The interaction between both fusion proteins reconstitutes Trp1 activity and allows yeast cells to grow on medium lacking tryptophan (Tafelmeyer *et al.*, 2004). For this purpose, the N-terminal Trp1 fragment (NTrp) was fused to the N-terminus of full-length atPATL3 or atPATL6 to create NTrp:atPATL3 and NTrp:atPATL6, respectively, whereas the C-terminal Trp1 fragment (CTrp) was fused to the C-terminus of full-length AMV MP, which resulted in MP:CTrp (see Figure 2). Yeast cells were co-transformed with the corresponding plasmids, and positive transformants were selected after incubation at 28°C for 3 days on minimal synthetic medium with tryptophan (SD-UL). Positive protein interactions were detected under the same growth conditions, but using minimal synthetic medium lacking tryptophan (SD-ULW). As shown in Figure 2, yeast cells co-transformed with MP:CTrp1 and NTrp:atPATL3 or with NTrp:atPATL6 growth in the interaction selective medium (SD-ULW), whereas no growth was observed in the negative interaction controls: NTrp:atPATL3 and NTrp:atPATL6 co-transformed with p53 protein (p53:CTrp) and MP:CTrp plus NTrp:eCFP (this plasmid expressed the NTrp1 fragment fused to the N-terminus of the cyan fluorescent protein, eCFP).



**Figure 2.** Trp1 yeast two hybrid assays. Different dilutions (on top) of yeast cells co-transformed with the indicated pair of plasmids (on the left) were spotted onto synthetic minimal medium containing (SD-UL) or lacking tryptophan (SD-ULW) to confirm correct transformation or positive interactions, respectively. Self-interaction of MP (MP:NTrp + MP:CTrp) was used as positive interaction. Cells co-transformed with NTrp:atPATL3 or NTrp:atPATL6 plus p53:CTrp or MP:CTrp plus NTrp:eCFP were used as negative controls.

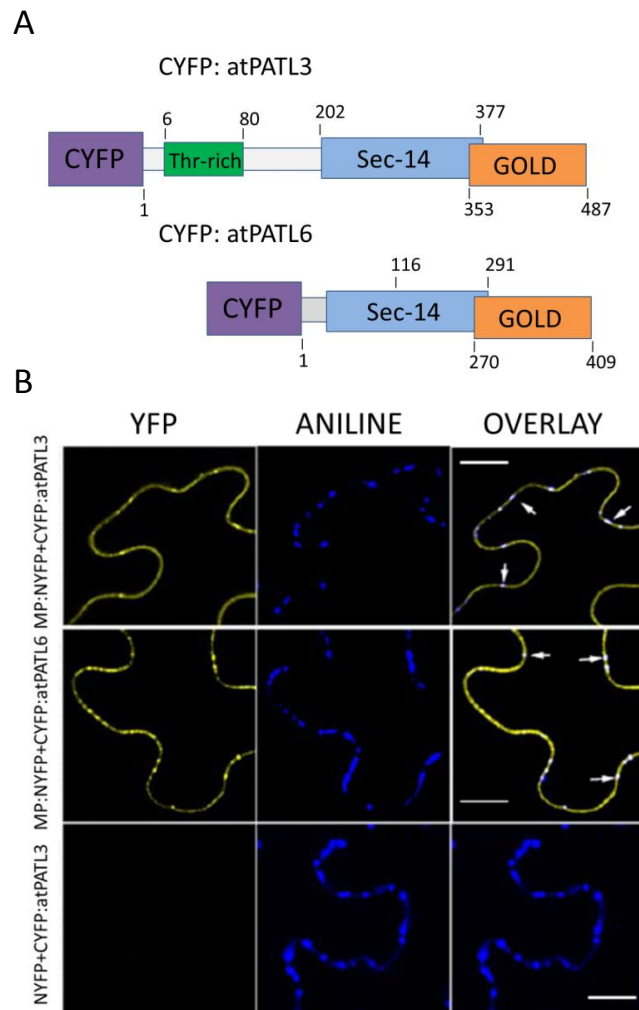
Previously, it has been shown that AMV MP accumulates at PD (van der Wel *et al.*, 1998). Indeed, the transient expression of the MP fused to the green fluorescent protein (GFP) (MP:GFP) with *Agrobacterium tumefaciens* C58 cells in *Nicotiana benthamiana* leaves displayed a punctate structure pattern on the cell wall (Herranz *et al.*, 2005; Sánchez-Navarro and Bol, 2001). To confirm that this pattern corresponds to PD, we labelled the callose-rich neck regions of PD with aniline blue in the leaves that transiently expressed MP:GFP. The confocal laser-scanning microscopy (CLSM) images depicted a clear co-localisation of MP:GFP with callose deposits, which indicates that these green fluorescent punctate structures are indeed PD with associated MP:GFP (Figure 3, overlay panel, arrows show examples of the co-localization at PD).



**Figure 3.** Localization of AMV MP at PD. CLSM images of epidermal cells expressing the MP:GFP (GFP panel) and stained with aniline blue (ANILINE panel) showing MP:GFP and callose localization, respectively. OVERLAY panel is the superposition of GFP, ANILINE and the corresponding bright field image. Arrows indicate PD labelled with both MP:GFP and aniline blue. Bar = 10  $\mu$ m.

In order to corroborate the atPATLs-MP interactions in planta, we used the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis (Aparicio *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2002). Thus, the N-terminal fragment of the yellow fluorescent protein (YFP) (NYFP) was fused to the C-terminus of AMV MP, whereas the C-terminal YFP fragment (CYFP) was fused to the N-terminus of atPATL3 and atPATL6 (see Figure 4A). *Agrobacterium* C58 mixtures of cultures, MP:NYFP plus CYFP:atPATL3 or CYFP:atPATL6, were infiltrated in *N. benthamiana* leaves. Two days later, leaves were stained with aniline blue, 10 min before monitoring reconstituted YFP fluorescence by CLSM. We found that, when AMV MP was co-expressed with both atPATL3 and atPATL6, fluorescence was detected all around the cell periphery, but also in the MP-characteristic cell-wall punctate pattern (Figure 4B, panels denoted as YFP). Moreover,

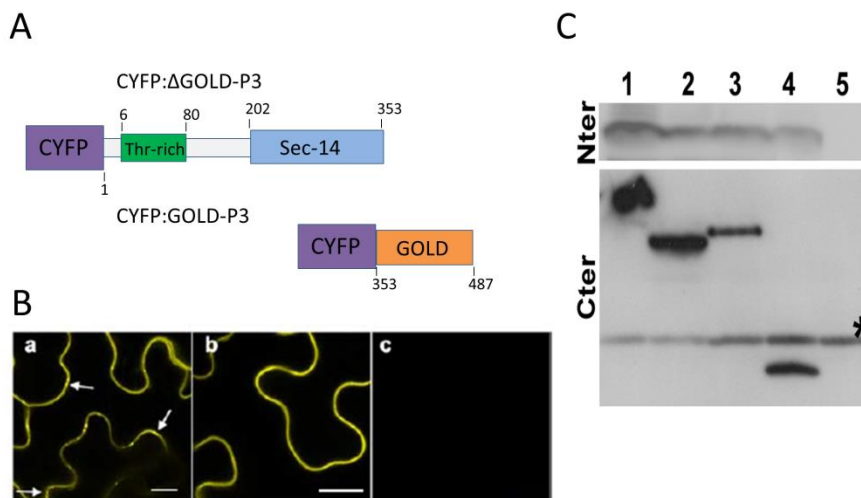
this pattern co-localized with aniline-labelled PD (Figure 4B, panels denoted as overlay). No fluorescence was detected when atPATL3 and atPATL6 were co-infiltrated with NYFP (Figure 4B lower panel and not shown, respectively). These results indicate that atPATL3 and atPATL6 interact in planta with AMV MP, and this confirms not only the interactions revealed by the Y2H system, but also that a pool of MP-atPATLs complexes accumulates at PD.



**Figure 4.** BiFC analysis of the MP-PATLs interactions. BiFC analysis to corroborate AMV MP-atPATLs interaction *in planta*. **A**, Schematic depiction of the constructs representing the full-length atPATL3 and atPATL6 fused to the C-terminal fragment of the YFP (CYFP:atPATL3 and CYFP:atPATL6) and showing the characteristic C-terminal GOLD domain. Numbers correspond to amino acid residue positions in the original sequences. **B**, CLSM images of epidermal cells co-infiltrated with MP:NYFP and CYFP:atPATL3 or CYFP:atPATL6 (indicated on the left) and stained with aniline blue solution. OVERLAY panels are the superposition of YFP and ANILINE images. Arrows indicate reconstituted fluorescence co-localizing with callose-rich PD. Leaves infiltrated with NYFP and CYFP:atPATL3 are the negative interaction controls. Arrows indicate fluorescence spots representing PD. Bar = 10  $\mu$ m.



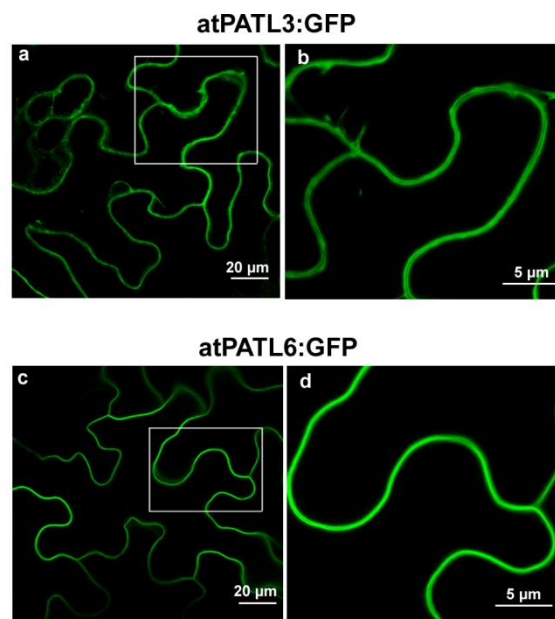
In Arabidopsis, the PATL family comprises six members characterized by a variable N-terminal domain, followed by a Sec14 lipid-binding domain and a C-terminal GOLD domain (Figure 4A) (Peterman *et al.*, 2004). As the GOLD domain is believed to be implicated in protein-protein interactions (Anantharaman and Aravind, 2002), we studied by BiFC whether the GOLD domain of atPATL3 is involved in the interaction with AMV MP. The atPATL3 GOLD domain comprises the amino acid positions 353-487 (see <http://www.uniprot.org/uniprot/Q56Z59>). Therefore, the CYFP fragment was fused to the N-terminal region of atPATL3 lacking the GOLD domain (CYFP: atPATL3- $\Delta$ GOLD) and also to the GOLD domain alone (CYFP:GOLD-P3) (see Figure 5A). Each construct was co-infiltrated together with MP:NYFP. Unexpectedly, fluorescence was reconstituted only in the cells expressing CYFP:atPATL3- $\Delta$ GOLD plus MP:NYFP (Figure 5B, panels b). This finding indicates that the GOLD domain is not required to establish an interaction between MP and atPATL3. The co-infiltration of MP:NYFP with CYFP:atPATL3 was used as a positive interaction (Figure 5B, panel a). The Western blot analysis confirmed that all the fusion proteins were correctly expressed (Fig 5C).



**Figure 5.** BiFC analysis of the implication of the GOLD domain in the interaction between AMV MP and atPATL3. BiFC interactions between AMV MP and the deleted atPATL3 versions. **(A)** Schematic depiction of a deleted version of atPATL3 lacking the GOLD domain or a construct with the GOLD domain alone fused to the C-terminal fragment of the YFP (CYFP:atPATL3- $\Delta$ GOLD and CYFP:GOLD-P3, respectively). Numbers correspond to amino acid residue positions in the original sequences. **(B)** CLSM images of epidermal leaves co-infiltrated with MP:NYFP and CYFP:atPATL3 (panel a), MP:NYFP and CYFP:atPATL3- $\Delta$ GOLD (panel b) or MP:NYFP and CYFP:GOLD-P3 (panel c) are shown. Arrows indicate fluorescence spots representing PD. Bar = 10  $\mu$ m. **(C)** Western analysis to confirm the expression of the fusion proteins analyzed in (B). Detection was carried out with specific antibodies recognizing NYFP and CYFP fusion proteins (Nter and Cter, panels, respectively). Lanes 1 to 4 correspond to leaves infiltrated with MP:NYFP plus

CYFP:atPATL3, CYFP:atPATL6, CYFP:atPATLP3-ΔGOLD or CYFP:GOLD-P3, respectively. Lane 5 is the non-infiltrated leaves. Asterisk denotes an unspecific host protein.

The observation that a pool of MP-atPATLs complexes accumulated at PD led us to wonder whether atPATL3 and atPATL6 would locate in these structures. We analysed the subcellular localization of atPATL3 and atPATL6 by the transient agro-expression of these proteins fused with the GFP at its C-terminus (atPATL3:GFP and atPATL6:GFP). The CLSM images showed that both proteins accumulated in the cellular periphery (Figure 6, panels a and c). Magnification of the wall periphery showed that neither of the two atPATLs specifically labelled PD (Figure 6, panels b and d). Hence, the relocation of atPATL3 and atPATL6 at PD observed in the BiFC assay suggests that this rearrangement is driven by MP throughout the MP-atPATL complexes formed *in vivo*.

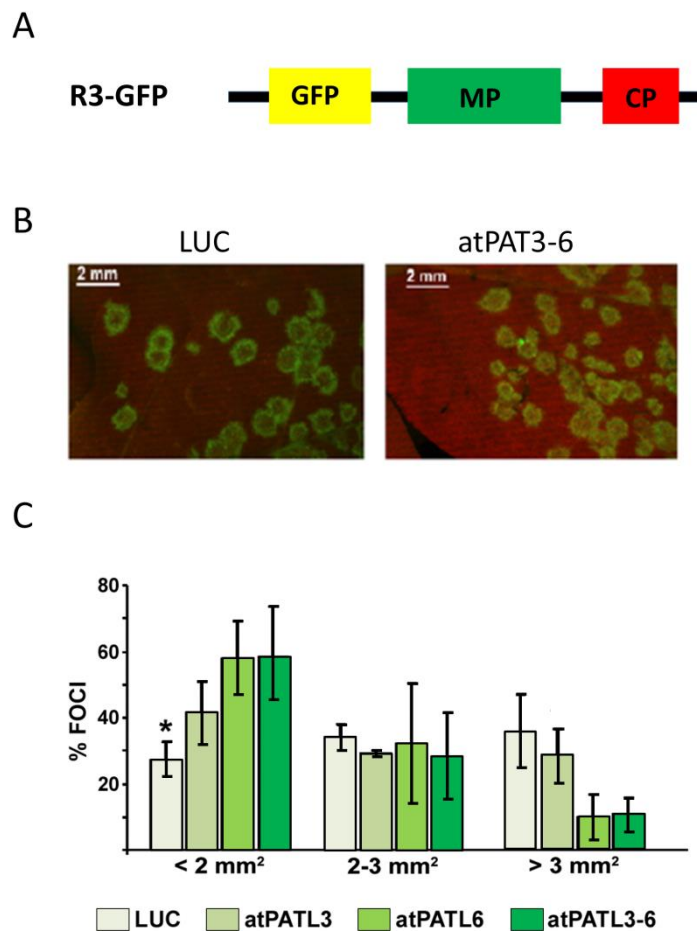


**Figure 6.** Subcellular localization of atPATL3 and atPATL6. CLSM images of epidermal cells infiltrated with *Agrobacterium* C58 expressing atPATL3 and 6 with the GFP fused at their C-terminus (atPATL3:GFP and atPATL6:GFP, respectively). Both fusion proteins present a strong signal at the cell periphery. Panels b and d show enlarged images of the boxed areas.

### ***AMV MP-atPATLs interaction interferes with viral infection***

The next step was to examine whether the MP-atPATLs interactions can affect viral infection. We first tested the effect of atPATL3 and atPATL6 overexpression. For this purpose, two leaves from three plants per construct of the transgenic *Nicotiana*

*tabacum* plants expressing P1 and P2 proteins of AMV (P12 plants, Taschner *et al.*, 1991) were inoculated with the RNA transcripts from a modified AMV RNA 3 clone, which expresses the GFP together with MP and the CP (Sanchez-Navarro *et al.*, 2001) (Figure 7A, R3-GFP). This construct permits the infection foci area to be visualised and measured (Figure 7B). At 24 h post-inoculation (hpi), leaves were infiltrated with the *Agrobacterium* C58 cultures expressing atPATL3, atPATL6, a mixture of both (atPATL3-6) or luciferase (LUC) as a negative control.



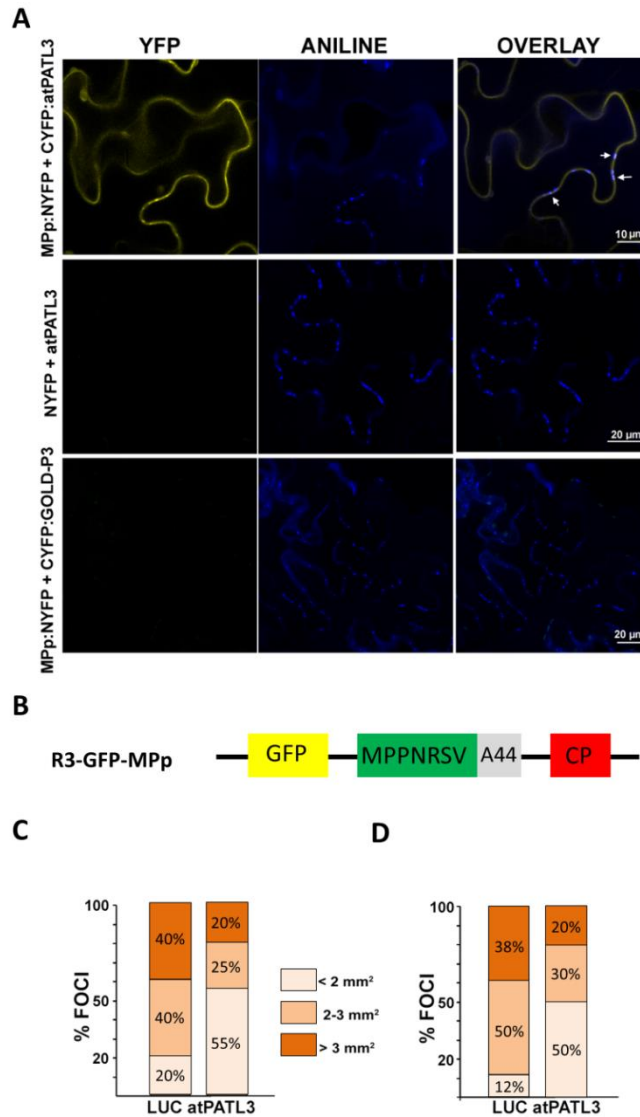
**Figure 7.** Effect of atPATLs over-expressions on the viral infection. **(A)** Schematic representation showing the modified AMV RNA 3 expressing the GFP used in this study (R3-GFP). The open reading frames corresponding to the GFP, MP and the CP are showed as boxes. **(B)** Representative images of the foci induced by R3-GFP in leaves infiltrated with *Agrobacterium* expressing LUC or a mixture of both atPATLs (atPATL3-6). **(C)** Graphic showing the percentage average of foci grouped into three different categories according to size area in leaves over-expressing LUC, atPATL3, atPATL6 or a mixture of both (atPATL3-6). Standard deviation values are shown. Significant differences are indicated by \* $P < 0.05$ .

By fluorescence microscopy, the images of 50 individual infection foci/leaves were acquired at 4 days post-inoculation (dpi) and their areas were measured using the Image J software (Wayne, Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij>). Foci were grouped into three different categories according to area size. The graph in Figure 7C shows the average of three repetitions, where the percentage of fluorescent foci with an area smaller than 2 mm<sup>2</sup> was 27.3±5.3% in the leaves infiltrated with LUC, increasing to 41.3±9.6%, 57.9±11.0% and 58.4±15.0% in the corresponding leaves infiltrated with atPATL3, atPATL6 and atPATL3-6 infiltrated leaves, respectively. In contrast, the percentage of foci with an area larger than 3 mm<sup>2</sup> was 35.7±11.2% in the LUC leaves, which decreased to 28.5±8.2%, 9.9±6.9% and 10.8±5.2% in the different atPATLs-infiltrated leaves. Overall, these results indicate that the overexpression of these atPATLs hinders cell-to-cell movement.

After taking into account that atPATL3-ΔNter also interacts with the MP of PNRSV (MPp) in Y2H (Figure 1C), we wondered whether the overexpression of atPATL3 could also have an effect on the MPp function. We first used BiFC assays to confirm that MPp interacted with the entire atPATL3 *in planta*. The reconstitution of YFP fluorescence was detected in the cells coexpressing MPp:NYFP with CYFP:atPATL3, but not in cells expressing the NYFP plus CYFP:atPATL3, or MPp:NYFP plus CYFP:GOLD-P3. (Figure 8A, panel YFP). In accordance with the previous results showing that MPp accumulates at PD (Aparicio *et al.*, 2010), we found that a pool of the MPp-atPATL3 complexes also co-localized with the aniline blue-stained PD (Figure 8A, overlay panel).

To investigate the effect on the MPp function, we used chimeric AMV RNA 3 which, in addition to the extra GFP gene, harbours the PNRSV MP fused in frame to the C-terminal 44 amino acids of AMV MP and AMV CP (Figure 8, construct R3-GFP-MPp). The 44 AMV MP residues are required for specific interactions with the AMV CP to render functional RNA 3, which replicates and moves in P12 plants (Sánchez-Navarro *et al.*, 2006). Tobacco P12 leaves inoculated with the R3-GFP-MPp transcript were infiltrated at 24 hpi with *Agrobacterium* C58 expressing atPATL3 or LUC. As before, the images of 50 individual infection foci/leaves were acquired at 4 dpi and were grouped into three different categories according to size area. The percentage of fluorescent foci with an area smaller than 2 mm<sup>2</sup> was 20% in the control LUC and 55% in the

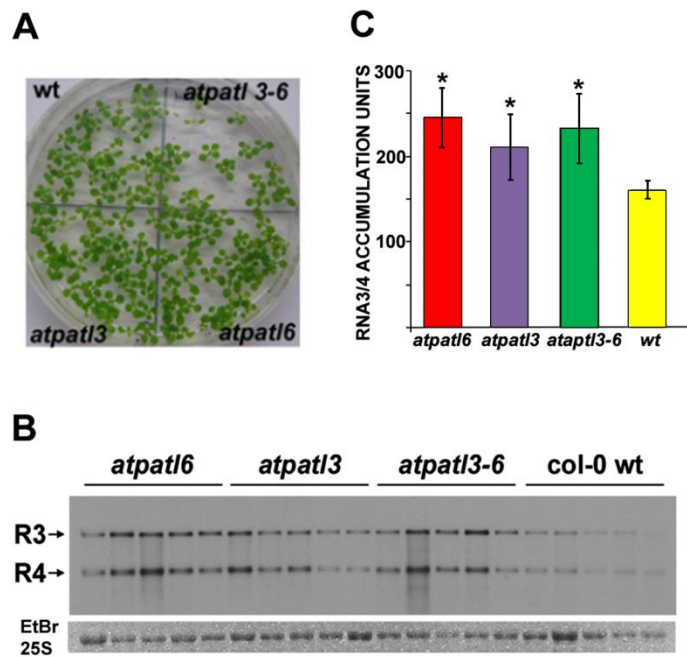
atPATL3 infiltrated leaves. However, the percentage of the foci with an area larger than 3 mm<sup>2</sup> was 40% for the LUC leaves, which decreased to 20% in atPATL3 (Figure 8C). This experiment was repeated with similar results (Figure 8D). These results demonstrate that the overexpression of atPATL3 also reduces the capability of PNRSV MP to facilitate the viral movement of the chimeric RNA 3.



**Figure 8.** Effect of atPATL3 over-expression in R3-GFP-MPp accumulation. **(A)** BiFC analysis to confirm MPP/atPATL3 interaction *in planta*. *N. benthamiana* leaves were co-infiltrated with the pairs indicated on the left and stained with aniline blue. YFP fluorescence was reconstituted only in cells co-expressing MPP:NYFP and CYFP:atPATL3. OVERLAY panels show the superposition of YFP and ANILINE image. Arrows denote aniline blue labelled PD showing fluorescence reconstitution. **(B)** Schematic representation showing the chimeric RNA 3 with the AMV MP replaced by PNRSV MP (MPP). The open reading frames corresponding to the GFP, MPP, A44 and the CP are showed as big boxes. To render a functional RNA 3 the PNRSV MP is fused in frame to the C-terminal 44 amino acids of the AMV MP (A44). **(C and D)** Graphics showing the percentage average of foci grouped into three different categories according to size area in leaves from two experiments. *N. tabacum* P12 leaves were inoculated with R3-GFP-MPp and infiltrated at 24 dpi with *Agrobacterium* expressing LUC or atPATL3. Foci area was measured at 4 dpi.

Finally, we analysed how the absence of atPATL3 and atPATL6 affected the viral accumulation of AMV. Thus, the Arabidopsis T-DNA insertion mutants for atPATL3 (*atpatl3*, SALK093994) and atPATL6 (*atpatl6*, SAIL\_284\_B11) were isolated, and the double mutant was constructed (*atpatl3-6*). A polymerase chain reaction (PCR) analysis using atPATLs and the T-DNA left border- specific primers was carried out to verify the homozygosity of the mutants. The reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis confirmed the absence of detectable atPATL3 and atPATL6 mRNAs, which corroborates that the mutations result in loss of expression (data not shown). The germination ratio of the double mutant in Murashige Skoog (MS) medium decreased slightly (Figure 9A), although growth in soil had a similar phenotype to the wild-type (wt). Both mutants and wt plants were inoculated with compatible AMV PV0196 isolate (DSMZ GmbH, Plant Virus Collection, Germany) virions. At 4 dpi, the total RNA extracted from the inoculated leaves was analysed by Northern blot to detect the accumulation of viral RNAs 3 and 4 using a digoxigenin-labelled AMV CP open reading frame (ORF) probe (Herranz *et al.*, 2012). The Northern blot in Figure 9B shows the RNA 3 and 4 accumulation levels of five independent plants from one experiment. The Northern blot signal was quantified using the Image J software.

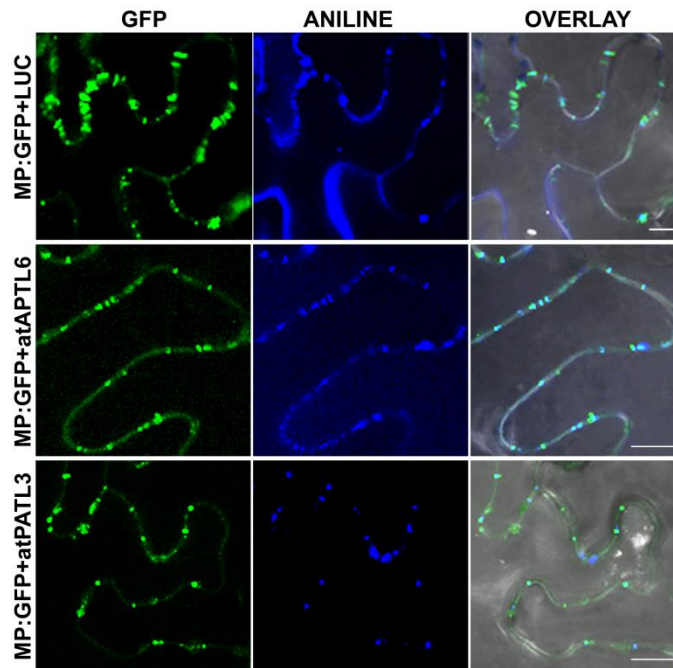
The graphic in Figure 9C illustrates that AMV RNAs accumulated at higher levels in *atpatl3*, *atpatl6* and *atpatl3-6* than in wt plants. This experiment was repeated with similar results. Overall, our results indicate that the interaction between atPATL3 or atPATL6 and MP negatively affects AMV accumulation in Arabidopsis plants.



**Figure 9.** Viral accumulation in Arabidopsis *atPATLs* knockouts. **(A)** Image of Arabidopsis wt and knockout seedlings germinated on MS medium. **(B)** Detection of AMV RNA 3 and 4 accumulation (indicated on the left) in wt and knockout lines by northern blot analysis of five infected plants. Lower panel shows the ethidium bromide (EtBr) stained gel as loading control (it is only showed the band corresponding to the 25S ribosomal RNA). **(C)** Graphic showing the average of viral RNAs accumulation measured from the northern blot in (B). Standard deviation values are shown. Significant differences are indicated by \* $P < 0.05$ .

### ***AtPATL3* and *atPATL6* interfere with the targeting of AMV MP to PD**

The reduced foci size of AMV RNA 3 observed when *atPATL3* and *atPATL6* were overexpressed could be caused by diminished cell-to-cell movement capacity as a result of impaired MP targeting to PD. In order to determine whether AMV MP subcellular localization was affected by the overexpression of these *atPATLs*, we compared the distribution pattern of MP:GFP alone or in the presence of *atPATL3* and *atPATL6*. *N. benthamiana* leaves were agro-infiltrated with MP:GFP plus LUC, MP:GFP plus *atPATL3*, or MP:GFP plus *atPATL6*, and were stained with aniline blue to label PD. Five CLMS images/leaves from three leaves were taken for each co-infiltration (Fig 10), from which the number of callose-labelled PD with associated MP:GFP was counted. The average PD/mm<sup>2</sup> was 3.487 in the leaves co-infiltrated with MP:GFP and LUC, whereas this density dropped to 2.832 and 2.692 PD/mm<sup>2</sup> in the leaves co-expressing *atPATL3* and *atPATL6*, respectively. These results suggest that *atPATL3* and *atPATL6* negatively influence the PD targeting of the AMV MP.



**Figure 10.** AMV MP subcellular localization in presence of the atPATLs. Images of epidermal cells co-infiltrated with *Agrobacterium* expressing the proteins indicated on the left and stained with aniline blue. Overlay panels correspond to the superposition of GFP, ANILINE and the corresponding bright field images. Bar = 10  $\mu$ m.

## DISCUSSION

The Arabidopsis PATL family comprises six members (designed as PATL1-6), characterized by a variable N-terminal region, followed by a Sec14-like domain and a C-terminal GOLD domain (Peterman *et al.*, 2004). Yeast protein Sec14 domain is a prototype module known to be a lipid-binding domain. Proteins with a Sec14 domain are involved in membrane trafficking, cytoskeleton dynamics, lipid metabolism and lipid-mediated regulatory functions (reviewed in Bankaitis *et al.*, 2007; Mousley *et al.*, 2007; Philips *et al.*, 2006). GOLD domains are present in several of the proteins involved in the Golgi functioning and vesicle trafficking, and are presumed to act as protein-protein interaction domains (Anantharaman and Aravind, 2002). Despite PATLs being distributed across the plant kingdom, very little is known about their *in vivo* functions. Database mining indicates that, in Arabidopsis, atPATL3 and atPATL6 are expressed in the whole plant to some degree, including roots, at the vegetative stage, in the entire rosette and internodes after plant transition to flowering, and in flowers,



siliques and seeds (Winter *et al.*, 2007). The biochemical and intracellular localization experiments carried out with PATL1 from Arabidopsis and zucchini have reported that this protein binds phosphatidylinositol and exists in a cytoplasmic pool, which can be associated with cellular membranes to play a critical role in cell plate formation and maturation during the late telophase (Peterman *et al.*, 2004; Petermen *et al.*, 2006). PATLs interact with membranes through the Sec14 domain by acting as adaptors to recruit GOLD domain-binding proteins to specific membrane sites. The cell-to-cell trafficking of viral genomes requires the interaction of MPs with host cytoskeleton components and the endomembrane system to reach PD (reviewed in Boevink and Oparka, 2005; Hofmann *et al.*, 2007; Lucas, 2006). Recent data on closely related PNRSV MP have revealed that this protein is peripherally associated with the cytosolic face of the endoplasmic reticulum membrane (Martínez-Gil *et al.*, 2009).

We have shown that atPATL3 and atPATL6 interact with AMV MP in yeast and *in planta*. Moreover, the BiFC results reproduce the typical punctate accumulation pattern in the cell periphery of the viral protein, which suggests that some MP-atPATLs complexes accumulate at PD. The observation that both atPATL3 and atPATL6 do not accumulate at PD when expressed alone suggests that this PD localization pattern probably results from the interaction with AMV MP which, during its transport towards PD, drags atPATLs molecules modifying their subcellular localisation.

Surprisingly, the BiFC analysis also demonstrated that a deleted atPATL3 version lacking the GOLD domain (atPATL3- $\Delta$ GOLD) is still able to interact with MP, whereas the GOLD domain alone is not. The GAL 4-based Y2H system showed that a truncated version of atPATL3 and atPATL6, containing the C-terminal part of Sec14 and the entire GOLD domain, is also able to interact with AMV MP (Figure 1). In general, these observations indicate that the GOLD domain is not necessary to establish the MP-atPATL3 interaction, whereas part of the Sec14 domain is required to determine this interaction. However, we cannot rule out the possibility that the construct containing the GOLD domain alone can encode a protein with inefficient folding that proves unsuitable to interact with MP. The presence of part of the Sec14 C-terminal domain may enable correct GOLD folding, thus rendering a functional domain. Another possibility is that the MP-atPATL3 interaction may require the previous interaction of

both proteins with the endomembrane system, a process in which the Sec14 domain would play a critical role.

Overexpression and absence of atPATL3 and atPATL6 induce an opposite effect on AMV infection. In general terms, our results reveal that their overexpression impairs cell-to-cell movement that reduces AMV accumulation. Moreover, we found that both atPATLs interfere with AMV MP targeting to PD. Taking all our results together, it is tempting to speculate that the interaction of atPATL3 and atPATL6 with AMV MP interferes with intercellular viral movement by negatively affecting the transport of viral complexes towards and through PD. Thus, atPATLs would operate as a defensive barrier against viral infection. This hypothesis is reinforced by the observation that atPATL3 also interacts with the MP of PNRSV, and that it negatively affects its intercellular transport capability. Impairment of viral spread has been reported as a result of the overexpression of different plant proteins which interact directly with viral MPs. In most cases, this interference has been found to be associated with changes in MP intracellular localization patterns, including impaired PD targeting (Brandner *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2005; Curin *et al.*, 2007; Fajardo *et al.*, 2013; Kaido *et al.*, 2007; Kragler *et al.*, 2003; Pallás and García, 2011 for a review; Sasaki *et al.*, 2009). Future experiments will unravel the mechanism by which PATLs interfere with AMV transport and subcellular localization, and also how specific is the interaction among the MPs from the 30K family and PATLs.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### ***Plasmid construction***

Full-length ORFs of atPATL3 and atPATL6 were amplified by RT-PCR from Arabidopsis total RNA with specific sense and antisense primers containing the restriction site *Sfi*I. Amplified fragments were exchanged by eCFP gene in the pNtrp-eCFP plasmid digested with *Sfi*I. The resultant clones, pNtrp-atPATL3 and pNtrp-atPATL6, contain the 42 N-terminal amino acids of the ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel enzyme N-(5-phosphoribosyl)-anthranilate isomerase (Trp1p) from *S.cerevisiae* fused at the N-terminus of both atPATLs. The AMV MP gene was amplified with specific primers containing the *Sfi*I sequence from a previously described clone (Sánchez-Navarro *et al.*, 2006; Sánchez-Navarro *et al.*, 2001). The PCR product was inserted in the pI-Ctrp3

plasmid, previously digested with *SfiI*. The resultant clone contains the 179 C-terminal amino acid of the Trp1p protein fused at the C-terminus of the MP.

A modified pSK plasmid (psk35S) containing the 35S promoter of CaMV followed by a multiple cloning site which included *NcoI* and *NheI* restriction sites and the potato proteinase inhibitor terminator (Popit), was used to generate GFP and BiFC fusion proteins. Full-length GFP, NYFP or CYFP fragments were PCR amplified with specific pairs of sense/antisense primers containing *PagI* (compatible with *NcoI*)-*NcoI* or *NheI*-*XbaI* (compatible with *NheI*) restriction sites. PCR products were cloned into *NcoI* linearized psk35S plasmid to obtain psk35S:NYFP-(*NcoI*-*NheI*)-Popit and psk35S:CYFP-(*NcoI*-*NheI*)-Popit, or into *NheI*-linearized psk35S plasmid to obtain psk35S:(*NcoI*-*NheI*)-GFP-Popit, psk35S:(*NcoI*-*NheI*)-NYFP-Popit and psk35S:(*NcoI*-*NheI*)-CYFP-Popit. *atPATL3*, *atPATL6*, *atPATLP3-ΔGOLD*, and *GOLD-P3* ORFs were PCR-amplified with specific primers containing *NcoI* and *NheI* restriction sites and cloned in either psk35S:CYFP-(*NcoI*-*NheI*)-Popit or psk35S:(*NcoI*-*NheI*)-GFP-Popit. The AMV MP was PCR-amplified and cloned into psk35S:(*NcoI*-*NheI*)-NYFP-Popit. Finally, the resultant expression cassettes derived from the psk35S constructs were introduced into the *XhoI*-digested pMOG800 binary vector. Plasmids px032/GFP-MP-CP, px032/GFP-MPp-CP and binary plasmids expressing the AMV MP fused to the GFP (MP:GFP) have been described previously (Sánchez-Navarro *et al.*, 2006; Sánchez-Navarro *et al.*, 2001; Herranz *et al.*, 2005).

### ***Split-protein sensor yeast two-hybrid based system***

Mixtures of pNTrp and pCTrp fusion proteins were co-transformed into yeast CRY1 cells as described previously (Gietz and Woods, 2002). Yeast CRY1 strain shows tryptophan (W), histidine (H), adenine (A), uracile (U) and leucine (L) auxotrophies. Positive transformants were selected after incubation at 28°C for 3 days on minimal synthetic medium lacking uracile and leucine (SD-UL). Positive protein interactions were detected under the same growth conditions and minimal synthetic medium but lacking tryptophan (SD-ULW).

### ***Plant inoculation***

Arabidopsis or *N. tabacum* P12 plants were maintained in pots in a growth chamber at 24°C with a photoperiod of 16 h light/8 h dark. For Arabidopsis inoculation, three leaves of 4-week-old plants were mechanically inoculated with purified virions of AMV PV0196 isolate (DSMZ GmbH, Plant Virus Collection, Germany) in 30 mM sodium phosphate buffer pH7. In the case of tobacco P12, two leaves were mechanically inoculated with 5 µg/leaf of R3-GFP or R3-GFP-MPp transcripts. For transcription purposes, plasmids px032/GFP-MP-CP and px032/GFP-MPp:A44-CP were linearized with *Pst*I and transcribed with T7 RNA polymerase (Roche) following manufacturer's recommendations.

### ***Agroinfiltration procedures***

Binary plasmids were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* C58 cells by electroporation and spread onto Luria Bertani (LB) plates containing 50 µg/mL of kanamycin and 25 µg/ml of rifampicin (LBkr). Positive colonies were grown in liquid LBkr at 28 °C for 24 h, and the bacterial cultures were resuspended in infiltration buffer [10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid (MES), pH 5,6], at an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.4 and 0.2 for BiFC and subcellular localization analysis, respectively. In all cases cultures, were infiltrated into 3-week-old *N. benthamiana* plants.

For transient overexpression experiments in tobacco P12 plants, *Agrobacterium* C58 cultures expressing LUC or atPATLs were prepared in infiltration buffer at OD<sub>600</sub> = 0.4 and infiltrated at 24 hpi. GFP fluorescence of the infection sites was visualized and photographed at 4 dpi with a LEICA MZ16F fluorescence stereomicroscope. The area of the foci was measured using the Image J software (Wayne, Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij>).

### ***Callose staining***

Leaves were infiltrated with aniline blue solution [0,005% aniline blue (Merck) in sodium phosphate buffer, 70 mM, pH 9.0] 10 min before visualization.

### ***CLSM images***

Images were taken with a Zeiss LSM 780 AxiObserver or Leica TCS SL microscope. In all cases, images correspond to single slices of 1.8  $\mu\text{m}$  thickness from epidermal cells. Excitation and emission wavelengths were 488 and 508 nm for GFP, 514 and 527 nm for YFP and 405 and 460-535 nm for aniline blue, respectively.

### ***Northern and Western blots***

Inoculated leaves were harvested at the indicated times. Total RNA was extracted from 0.1 gr of leaves using Trizol Reagent (Sigma, St Louis, MO, USA). RNAs were denatured by formaldehyde treatment and analyzed by Northern blot hybridization as described previously (Sambrook *et al.*, 1989). Viral RNAs were visualized on blots using a digoxigenin-labelled riboprobe corresponding to the AMV CP gene. Synthesis of the digoxigenin-labelled riboprobe, hybridization and digoxigenin detection procedures were carried out as previously described (Pallás *et al.*, 1998).

For Western blot analysis 50 mg of leaves were homogenized with 100  $\mu\text{l}$  of Laemmli buffer (Laemmli, 1970), boiled for 3 min and centrifuged for 3 min x 13000 rpm to pellet cellular debris; 25  $\mu\text{l}$  of extracts were resolved in 14% sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Gels were electrotransferred to poly(vinylidenedifluoride) (PDVF) membranes (Amersham) following manufacturer's recommendations. Detection of NYFP-fused proteins was carried out with anti-GFP N-terminal antibody (Sigma; product number G1544) whereas CYFP-fusion proteins were detected using anti-GFP antibody (Roche; Cat No 11814460001). Detection procedures were carried out following manufacturer's recommendations.

## **CAPÍTULO 4**

---



**The movement protein (NSm) of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the tomato *Sw-5* gene-based resistance**

Este capítulo ha dado lugar a la siguiente publicación:

**Peiró, A., Cañizares, M. C., Rubio, L., López, C., Moriones, E., Aramburu, J. and Sánchez-Navarro, J. (2014) The movement protein (NSm) of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the tomato *Sw-5* gene-based resistance. *Mol. Plant Pathol.* **15**(8), 802-13.**





## INTRODUCTION

*Tomato spotted wilt virus* (TSWV) is the type member of the plant-infecting *Tospovirus* genus in the family *Bunyaviridae* (Milne and Francki, 1984). The viral genome organization consists of three single-stranded RNAs: the large (L) negative sense RNA and the middle (M) and small (S) ambisense RNAs. Segment L (8.9kb) encodes an RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) (de Haan *et al.*, 1991); segment M (4.8kb) expresses from viral-sense (v) RNA the NS<sub>m</sub> which operates as a movement protein (MP) (Lewandowski and Adkins, 2005; Li *et al.*, 2009; Storms *et al.*, 1995), and from viral-complementary (vc) sense the precursor of surface glycoproteins G<sub>N</sub>/G<sub>C</sub> containing determinants for thrips transmission (Sin *et al.*, 2005); and segment S (2.9kb) encodes a silencing suppressor NS<sub>s</sub> (Takeda *et al.*, 2002), in the viral sense and the nucleocapsid protein (N) from viral-complementary sense, used for encapsidation of viral RNA and, according to recent studies, facilitating long-distance movement (de Haan *et al.*, 1990; Feng *et al.*, 2013).

The management of the disease caused by TSWV has been extremely difficult because of its broad host range and the resistance of the thrips vectors to insecticides (Boiteux and Giordano, 1993). The highest level of resistance to TSWV was obtained by the introgression of the dominant single resistance genes *Tsw* in pepper and *Sw-5* in tomato. These genes were derived from *Capsicum chinense* and *Solanum peruvianum*, respectively (Boiteux, 1995; Moury *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 1991). The resistance mediated by *Sw-5* follows the gene-for-gene relationship (Staskawicz *et al.*, 1995) by triggering the typical hypersensitive response around the TSWV infection foci limiting virus spread to distal parts of the plant. The avirulence (Avr) protein targeted by the resistance *Sw-5* gene is unknown, to date. Previous work has revealed that the *Sw-5* locus contains at least five paralogues (denoted *Sw-5a* to *Sw-5e*), but only the *Sw-5b* gene, was necessary and sufficient to confer resistance against TSWV (Spassova *et al.*, 2001). The *Sw-5b* gene encodes a protein of 1246 amino acids and it is classified as a member of the coiled-coil, nucleotide-binding adapter shared by APAF-1, certain R gene, and CED-4 (NB-ARC) and leucine-rich repeat group of resistance gene candidates (Meyers *et al.*, 1999).

Control strategies based on *Sw-5* gene are affected by the emergence of TSWV resistance-breaking (RB) isolates able to overcome the resistance which have been reported in South Africa (Thompson and vanZijl, 1995), Hawaii (Canady *et al.*, 2001; Gordillo *et al.*, 2008), Australia (Latham and Jones, 1998), Spain (Aramburu and Marti, 2003) and Italy (Ciuffo *et al.*, 2005; Zaccardelli *et al.*, 2008). The lack of a TSWV infectious clone has hampered the study of the molecular mechanisms associated with *Sw-5* RB isolates. Previous analysis based on a complete set of reassortants generated from infectious mixture of two isolates of TSWV showed that the M segment has a major role in overcoming the *Sw-5* resistance (Hoffmann *et al.*, 2001). Moreover, the comparative analysis of nucleotide and amino acid sequences of RNA M from RB and non-resistance-breaking (NRB) isolates, revealed that the capacity to overcome the *Sw-5* resistance is associated with the presence of a tyrosine or an asparagine at positions 118 (Y118) or 120 (N120) of the NSm protein, respectively (López *et al.*, 2011).

In the present work, we analysed the role of the NSm protein in the resistance mediated by the *Sw-5* gene by: (i) transient expression of the protein in *Sw-5* resistant plants (tomato, *Nicotiana tabacum* and *N. benthamiana*), in absence of other TSWV components; and (ii) using the heterologous viral system based on *Alfalfa mosaic virus* (AMV), which allows the functional exchangeability of viral MPs assigned to the “30 K family” (Fajardo *et al.*, 2013; Melcher, 2000; Sánchez-Navarro *et al.*, 2006). The results indicate that the NSm is the Avr factor of the *Sw-5b* gene, in which the Y118 and N120 residues are crucial to overcome the hypersensitive response.

## RESULTS

### ***Transient expression of TSWV NSm protein in Sw5-b transgenic N. benthamiana plants***

To assess the direct role of the NSm protein of TSWV in the resistance mediated by *Sw-5* gene, in absence of other viral components, we performed a transient expression of the NSm protein in resistant *Sw5-b* transgenic *N. benthamiana* and/or *N. tabacum* lines. Both transgenic lines contain the same expression cassette, allowing the constitutive expression of the *Sw5-b* protein (Spassova *et al.*, 2001; kindly provided

by Dr. M. Prins, KeyGene N.V./Amsterdam University). For this purpose, three NSm genes derived from two *Sw5*-RB (GRAU and Llo2TL3) and one *Sw5*-NRB (Gr1NL2) TSWV isolates (López *et al.*, 2011) were used in this study. Each NSm of the RB isolates is representative of one of the two amino acids proposed by López *et al.* (2011) to be associated with overcoming *Sw-5* resistance. Thus, although the NRB Gr1NL2 NSm (hereafter referred to as NRB) contains a cysteine and a threonine at positions 118 (118C) and 120 (120T), respectively, the NSm proteins of the RB Llo2TL3 (hereafter referred to as RB2) and GRAU (hereafter referred to as RB1) contain a tyrosine at position 118 (118Y) or an asparagine at position 120 (120N), respectively (Figure 1).

```

NRB MLTFFSNKGSSKSAKKDEGPLVSLAKHNGNVEVSKPWSSSDEKLALTKAMDTSKGKILLN 60
RB1 MLTFFSNKGSSKSAKKDEGPLVSLAKHNGNVEVSKPWSSSDEKLALTKAMDTSKGKILLN 60
RB2 MLTFFSNKGSSKSAKKDEGPLVSLAKHNGNVEVSKPWSSSDEKLALTKAMDTSKGKILLN 60
*****

NRB TEGTSSFGTYESDSITESEGYDLSARMIVDTNHHISNWKNLDFVGNKQNKANKVIKICPT 120
RB1 TEGTSSFGTYESDSITESEGYDLSARMIVDTNHHISNWKNLDFVGNKQNKANKVIKICPN 120
RB2 TEGTSSFGTYESDSITESEGYDLSARMIVDTNHHISNWKNLDFVGNKQNKANKVIKIYPT 120
*****

NRB WDSRKQYMMVSRIVIWCPTIPNPTGKLVVALVDPNMPSEKQVILKGQGTITDPICFVFY 180
RB1 WDSRKQYMMISRIVIWCPTIPNPTGKLVVALVDPNMPSEKQVILKGQGTITDPICFVFY 180
RB2 WDSRKQYMMISRIVIWCPTIPNPTGKLVVALVDPNMPSEKQVILKGQGTITDPICFVFY 180
*****

NRB LNWSIPKINNTPENCCQLHLMCSQEYKKGVSFGSVMYSWTKEFCDSPRADKDKSCVVIPL 240
RB1 LNWSIPKINNTPENCCQLHLMCSQEYKKGVSFGSVMYSWTKEFCDSPRADKDKSCVVIPL 240
RB2 LNWSIPKINNTPENCCQLHLMCSQEYKKGVSFGSVMYSWTKEFCDSPRADKDKSCVVIPL 240
*****

NRB NRAIRARSQAFIEACKLIIPKGNSEKQIKKQLKELSSNLSRSVEEEEEEGISDSVAQLSFD 300
RB1 NRAIRARSQAFIEACKLIIPKGNSEKQIKKQLKELSSNLSRSVEEEEEEGISDSVAQLSFD 300
RB2 NRAIRARSQAFIEACKLIIPKGNSEKQIKKQLKELSSNLSRSVEEEEEEGISDSVAQLSFD 300
*****

NRB EI 302
RB1 EI 302
RB2 EI 302
**

```

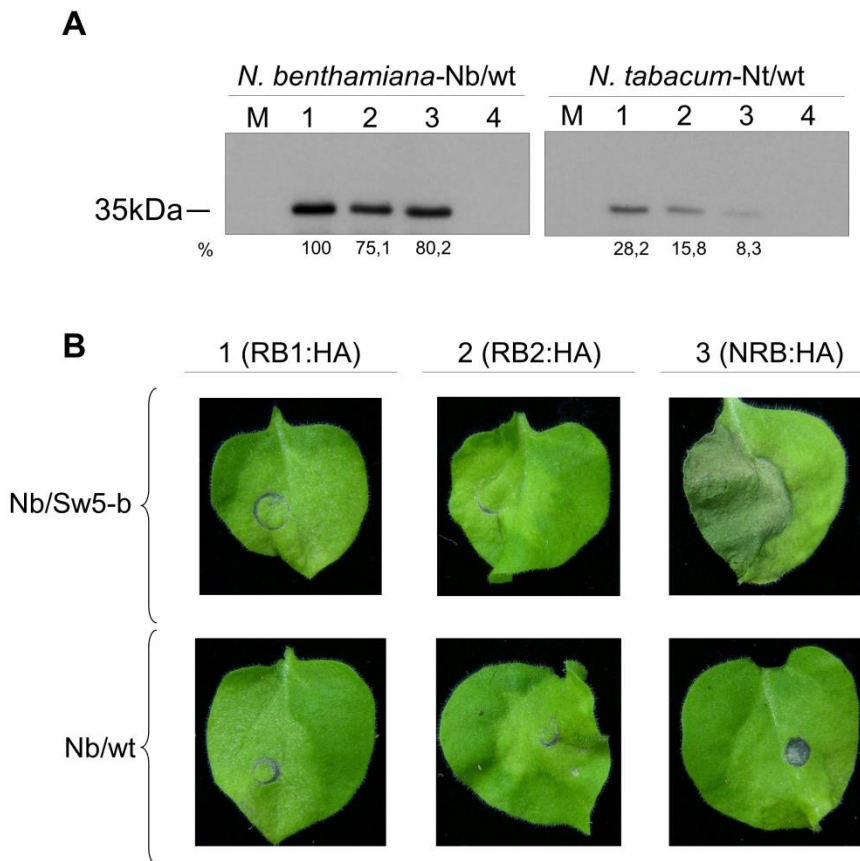
**Figure 1.** Sequence alignment of the three NSm proteins derived from the two *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) resistance-breaking (RB) isolates GRAU (RB1; GenBank FM163370) and Llo2TL3 (RB2; GenBank HM015518) and the non-resistance-breaking (NRB) isolate Gr1NL2 (Genbank HM015513). The amino acids of the RB isolates that differs from those of the NRB variant, are indicate in red.

In a preliminary study we observed that the TSWV isolates GRAU and Gr1NL2 reproduced the expected phenotypes in *Sw5-b N. bethamiana* plants (Table 1).

	<i>Nicotiana benthamiana</i>						<i>Nicotiana tabacum</i>				
	Nb/wt		Nb/Sw5-b				Nt/wt		Nt/Sw5-b		
	I	U	I	U			I	U	I	U	
TSWV RB1*	+	+	+	+	AMV/RB1 <sup>#</sup>	+	+	+	+		
AMV/RB2 <sup>#</sup>	+	+	+	+	AMV/RB2 <sup>#</sup>	+	+	+	+		
TSWV NRB*	+	+	HR	-	AMV/NRB	+	+	HR	-		
AMV wt <sup>#</sup>	+	+	+	+	AMV wt <sup>#</sup>	+	+	+	+		

**Table 1.** Symptoms observed in *Nicotiana benthamiana* (Nb) or *N. tabacum* (Nt) plants wild type (wt) or carrying the *Sw5-b* gene (Sw5-b), inoculated with *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) or chimeric *Alfalfa mosaic virus* (AMV) constructs. (\*)The plants were inoculated with infect tissue of TSWV GRAU (RB1) or Gr1NL2 (NRB) isolates. (<sup>#</sup>) The plants were inoculated with transcript of AMV wild type (wt) or the different variants carrying the NSm RB1, RB2 (TSWV Llo2TL3 isolate) or NRB genes. 'I' and 'U' indicate inoculated and upper leaves, respectively. (-) represents non infected tissue, (+) infected tissue with chlorotic symptomatology; and (HR) hypersensitive response.

In the case of the RB TSWV Llo2TL3 isolate and as a result of the lack of infectious tissue, we used an AMV hybrid containing the NSm RB2 gene (see below). This hybrid virus infected locally and systemically the *Sw5-b N. benthamiana* plants without inducing any necrotic response. Later, the NSm genes were cloned into a binary plasmid, being fused to the haemagglutinin (HA) epitope at its C-terminus, and were transiently expressed by *A. tumefaciens* in wild type *N. benthamiana* (Nb/wt) or *N. tabacum* (Nt/wt) plants. Western blot analysis revealed that the three NSm proteins accumulated in agroinfiltrated leaves when transiently expressed in either Nb/wt or Nt/wt leaf with an electrophoretic mobility of the expected 35 kDa (Figure 2A). However, the protein accumulation in *N. tabacum* plants was considerably lower (5 to 10 times) when compared to *N. benthamiana* plants.



**Figure 2.** Transient expression of the *Tomato spotted wild virus* (TSWV) NSm movement protein (MP) in wild-type *Nicotiana benthamiana* (Nb/wt) or *N. tabacum* (Nt/wt) and transgenic *N. benthamiana* plants carrying the resistance gene *Sw5-b* (Nb/Sw5-b). **(A)** Western blot analysis of the Nb/wt and Nt/wt infiltrated leaves at 3 days post-infiltration expressing RB1:HA (lane 1), RB2:HA (lane 2) and NRB:HA (lane 3). Lanes M and 4 correspond to non-agroinfiltrated leaves and leaves infiltrated with cultures carrying the empty binary plasmid, respectively. The numbers below the panel represent the relative percentages of the intensity of each band with respect to the more intense band in lane 1. **(B)** Photographs of Nb/Sw5-b (top) and Nb/wt (bottom) leaves expressing RB1:HA (1), RB2:HA (2) and NRB:HA (3) at 6 days post-agroinfiltration. HA, haemagglutinin; NRB, non-resistance-breaking; RB, resistance-breaking.

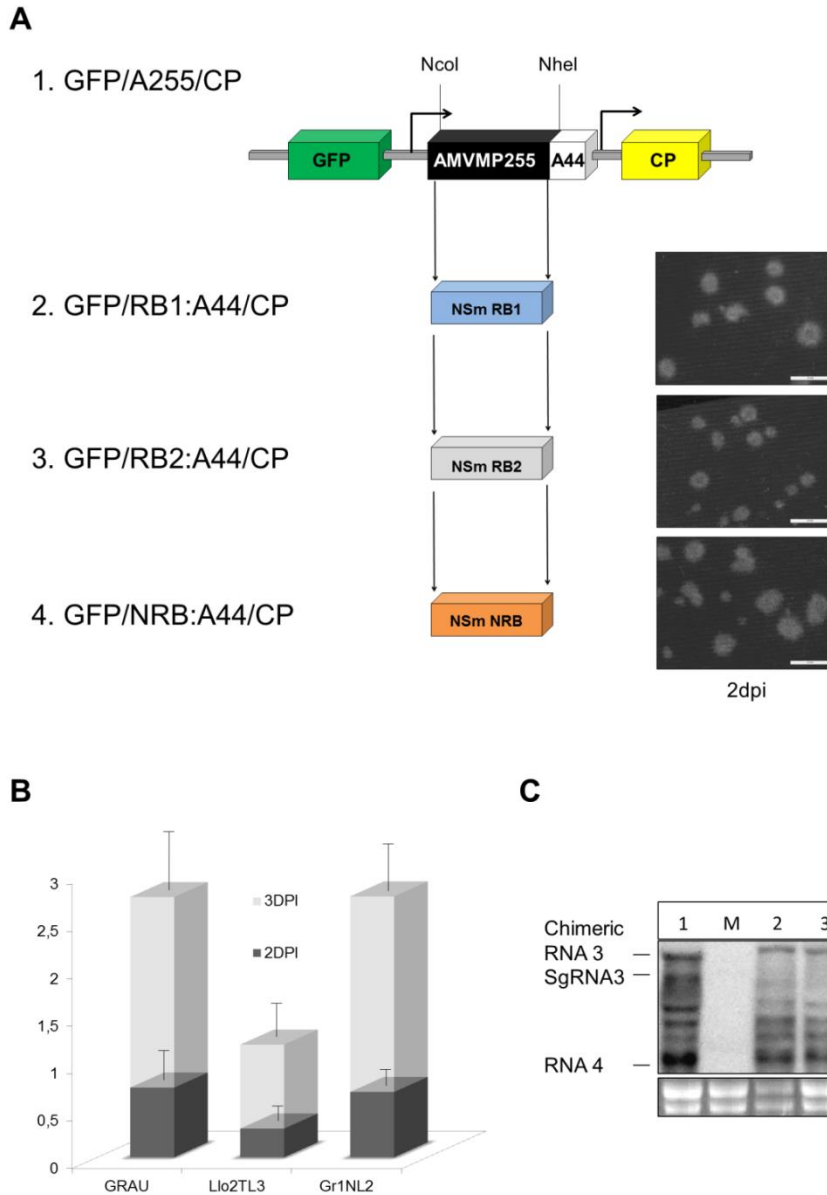
When transient expression of these three NSm proteins was assayed in susceptible and resistant tomato cultivars carrying the *Sw-5* gene, no expression at all was detected for any of the three NSm proteins or for the control construct that carries the green fluorescent protein (GFP) (data not shown). Therefore, to overcome this problem, the different constructs were transiently expressed in transgenic *N. benthamiana* or *N. tabacum* plants constitutively expressing the *Sw-5* gene (Nb/Sw5-b; Nt/Sw5-b). The clearest results were observed in *N. benthamiana* plants. As shown in Figure 2B 6 days post-agroinfiltration, only the construct that contains the NRB gene triggered the hypersensitive-like response on the Nb/Sw5-b leaf (Figure 2B, panel 3).

These results clearly identify the *NSm* gene as the only TSWV component required to trigger the hypersensitive response mediated by the *Sw-5* gene.

***Cell-to-cell and systemic movement of the chimeric AMV constructs with TSWV NSm in P12 N. tabacum plants***

We analysed the role of the *NSm* gene in the resistance mediated by the *Sw-5* gene, but in a viral context. For this purpose and because of the lack of an infectious TSWV clone, we used the heterologous AMV model system, which has been demonstrated to allow the functional exchangeability for the local (Sánchez-Navarro *et al.*, 2006) and systemic (Fajardo *et al.*, 2013) transport of MPs assigned to the 30-K family. First, we analysed the capacity of the three NSm proteins (NRB, RB1 and RB2) to support the local and systemic transport of chimeric AMV. To do this, the NSm gene was exchanged with the corresponding AMV MP gene in the AMV RNA 3 wt (pAL3NcoP3) (van der Vossen *et al.* 1993) or in a RNA 3 derivative that expresses the GFP (pGFP/A255/CP) (Sánchez-Navarro *et al.*, 2001). In the chimeric constructs, the heterologous NSm proteins were extended with the C-terminal 44 residues (A44) of the AMV MP, to allow a compatible interaction with the AMV coat protein (CP) (Sánchez-Navarro *et al.*, 2006) (Figure 3A).

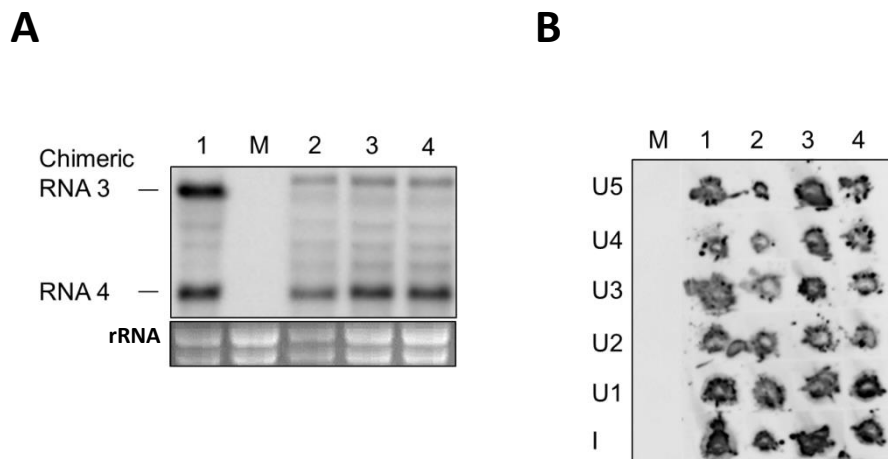
Cell-to-cell movement of the AMV RNA 3 hybrids was studied by inoculation of T7 transcripts generated from the pGFP/NRB:A44/CP, pGFP/RB1:A44/CP and pGFP/RB2:A44/CP plasmids into transgenic *N. tabacum* plants that express constitutively the P1 and P2 polymerase proteins of AMV (P12) (Figure 3A). All constructs resulted in clear fluorescent infection foci at 2 days post-inoculation (dpi) (Figure 3A), indicating that the three NSm proteins were competent to support the local transport of the hybrid AMV RNA 3. However, the analysis of the area of 50 independent foci at 2 and 3 dpi revealed that the foci derived from the pGFP/RB2:A44/CP construct were significantly smaller than those generated by pGFP/NRB:A44/CP and pGFP/RB1:A44/CP constructs (Student's t-test,  $p < 0.05$ ) (Figure 3B). Analysis of the replication of the constructs on P12 protoplast (Figure 3C) did not suggest significant RNA accumulation level differences that could account for differences observed in the cell-to-cell movement.



**Figure 3.** Analysis of the accumulation and the cell-to-cell transport of the *Alfalfa mosaic virus* (AMV) chimeric RNAs carrying the GFP and the MP of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolates. **(A)** Infection foci observed in P12 plants inoculated with RNA 3 transcripts from pGFP/A255/CP derivatives, which contain the TSWV NSm RB1 (2), RB2 (3) or NRB (3) genes. The schematic representation shows the GFP/A255/CP AMV RNA 3 (1), in which the open reading frames corresponding to the green fluorescent protein (GFP), the movement protein (MP) and the coat protein (CP) are represented by large boxes. The number shown in the MP box represents the total amino acids residues of the AMV MP (255) exchanged for the TSWV NSm, represented by single boxes below. The *NcoI* and *NheI* restriction sites used to exchange the MP genes are indicated. The arrows indicate the subgenomic promoters. The C-terminal 44 amino acids of the AMV MP are indicated as A44. Images correspond to representative photographs of the infection foci observed at 2 days post-inoculation (dpi) using a Leica stereoscopic microscope. The scale bar corresponds to 2 mm. **(B)** Histograms representing the average of the area of 50 independent infection foci at 2 and 3 dpi developed in P12 plants inoculated with transcripts derived from the AMV RNA 3 variants shown in (A). Error bars indicate the standard deviation. **(C)** Northern blot analysis of the accumulation of the chimeric AMV RNAs in P12 protoplasts inoculated with RNA transcribed from the constructs shown in (A). The positions of the chimeric RNAs 3 and 4 and additional subgenomic RNA (sgRNA) are indicated in the left margin. M refers to mock inoculated plant. NRB, non-resistance-breaking; RB, resistance-breaking.



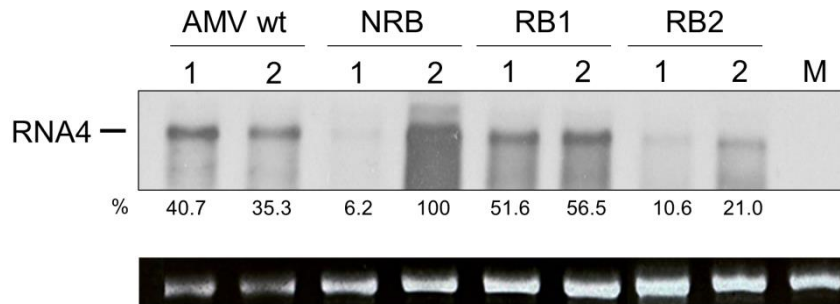
The capacity of the different TSWV MPs to support the systemic transport of the AMV RNA 3 also was analysed. For this purpose, we used the wt AMV RNA 3 constructs, as the RNA 3 derivatives carrying the GFP reporter gene do not support systemic movement in P12 tobacco plants (Sánchez-Navarro *et al.*, 2001). First, we observed that the different AMV RNA 3 hybrids accumulated comparable levels of RNAs 3 and 4 in P12 protoplast (Figure 4A). The accumulation and distribution of the chimeric RNA 3s were then analyzed in inoculated and upper non-inoculated leaves of P12 plants by tissue printing of petiole cross-sections, in which positive hybridization signal always correlated with the presence of the virus in the corresponding leaf, as described previously (Fajardo *et al.*, 2013; Mas and Pallás, 1995; Sánchez-Navarro *et al.*, 2010). The results showed that, despite the differences observed in local movement, all AMV RNA 3 constructs were able to support systemic movement, infecting all upper leaves of P12 plants (Figure 4B).



**Figure 4.** Analysis of the accumulation and the systemic transport of the *Alfalfa mosaic virus* (AMV) chimeric RNAs carrying the MP of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolates. **(A)** Northern blot analysis of the accumulation of the chimeric AMV RNAs in P12 protoplasts inoculated with RNA transcribed from plasmid pAL3NcoP3 derivatives, expressing the AMV MP (lane 1) or the NSm RB1 (lane 2; plasmid pRB1:A44/CP), RB2 (Lane 3, plasmid pRB2:A44/CP) and NRB (lane 4; plasmid pNRB:A44/CP). The positions of the chimeric RNAs 3 and 4 are indicated in the left margin. **(B)** Tissue printing analysis of P12 plants inoculated with the AMV RNA 3 derivatives used in (D). Plants were analysed at 14 dpi by printing the transverse section of the corresponding petiole from inoculated (I) and upper (U) leaves. The position of each leaf is indicated by numbers which correspond to the position of the leaves in the plant from the lower to the upper part, in which U1 corresponds to the closest leaf to that inoculated. rRNA indicates 23S RNA loading control. M refers to mock inoculated plant.

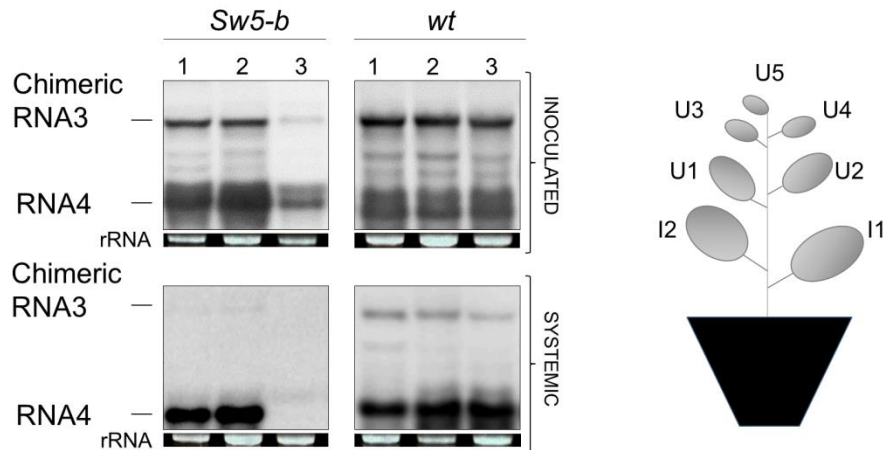
***Analysis of the capability of the different AMV derivatives to overcome the resistance conferred by Sw-5 in tomato and transgenic N. tabacum plants***

In the next step, we analyzed the capacity of the hybrid AMV to infect *Sw-5* resistant (Cultivar 'Verdi'; lanes 1 in Figure 5) or TSWV-susceptible ('Marmande'; lanes 2 in Figure 5) tomato cultivars. Therefore, the tomato plants were inoculated with wt AMV RNA 1 and RNA 2, purified CP and wt or chimeric RNA 3 constructs. Northern blot analysis of the inoculated tomato leaves in Figure 5 shows the accumulation of the RNA 4, derived from the corresponding viral RNA 3. Similar accumulation levels were observed in the resistant and susceptible tomato cultivars tested when the plants were inoculated with the AMV wt (Figure 5, AMV RNA 4 band intensities: 40.7% vs. 35.3%, respectively), indicating that the genetic differences between the two tomato cultivars do not affect significantly virus accumulation. A high accumulation level was observed in the susceptible tomato cultivar (Figure 5, lanes 2) when inoculated with the chimeric AMV RNA 3 expressing the NRB protein (100%) followed by the chimeric AMV RNA 3 expressing the RB1 (56.6%) and RB2 (21.0%) proteins. These results indicated that, in the tomato lacking the *Sw-5-b* resistance gene, the NRB NSm protein provides an advantage when compared with the RB NSm proteins or with to the wt AMV MP. In the same tomato cultivar, the low accumulation level observed with the hybrid RNA 3 expressing the RB2 protein, whose sequence differs only with regard to two or three residues to the RB1 or NRB protein, respectively, is remarkable (see Figure 1). However, in the *Sw-5* resistant tomato cultivar (Figure 5, lane 1), the presence of the NRB gene resulted in a significantly reduced (93%) accumulation (6.2% vs. 100%) whereas such a reduction was only 5% (51.6% vs. 56.6%) or 9% (10.6% vs. 21.0%) for the AMV RNA 3 variants carrying the RB1 or RB2 genes, respectively. These results confirm that the presence of the NRB NSm protein, negatively affected AMV accumulation in the *Sw-5* resistant tomato cultivar.



**Figure 5.** Northern blot analysis of the *Alfalfa mosaic virus* (AMV) chimeric RNA accumulation in the inoculated leaves of *Sw-5* resistant “Verdi” (lane 1) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)-susceptible “Marmande” (lane 2) tomato cultivars. The tomato plants were inoculated with the corresponding RNA 3 transcript expressing the AMV movement protein (MP) (AMV wt) or the NSm of the TSWV isolates Gr1NL2 (NRB), GRAU (RB1) and Llo2TL3 (RB2). Mock (M), represents total RNA extraction of healthy tissue. The position of the RNA 4 is indicated at the left margin of the photograph. rRNA indicates 23S RNA loading control. The numbers below the panel represent the relative percentages of the intensity of each band with respect to the more intense one (lane 2/NRB). NRB, non-resistance-breaking; RB, resistance breaking.

The presence of viral RNAs in upper non-inoculated leaves of the tomato cultivars was analysed at 14 and 21 dpi by tissue printing analysis. No hybridization signal was detected in any of the plants analysed, including those inoculated with the wt AMV, indicating that the AMV variant used to perform the analysis is unable to move systemically in tomato. To circumvent this limitation, we used *N. tabacum* plants, which supported local and systemic AMV accumulation (see above). We then tested the chimeric AMV constructs in both transgenic *N. tabacum* plants that express constitutively the *Sw5-b* gene (Nt/*Sw5-b*) (Spasova *et al.*, 2001) and wt *N. tabacum* plants (Nt/wt). Nt/wt and Nt/*Sw5-b* plants were inoculated as described above. The accumulation of the viral RNA on inoculated leaves was analysed by Northern blot at 7 dpi (Figure 6). All AMV RNA 3 derivatives supported comparable levels of viral RNA 3 and 4 accumulation in Nt/wt and Nt/*Sw5-b* plants, except for the construct containing the NRB gene in Nt/*Sw5-b* plants, which accumulated 65% less efficiently (Figure 6, lane 3). These results were equivalent to those obtained in resistant tomato plants (see above).



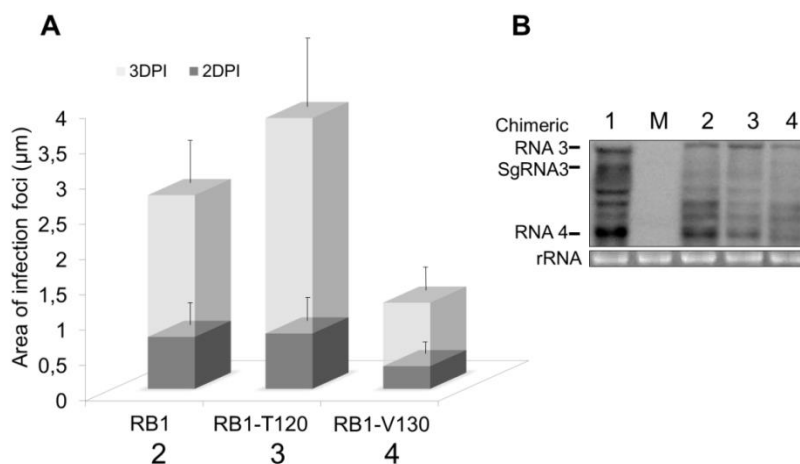
**Figure 6.** Northern blot analysis of the *Alfalfa mosaic virus* (AMV) chimeric RNAs accumulation in transgenic *Nicotiana tabacum* plants that express constitutively the *Sw5-b* gene (Nt/*Sw5-b*). *Nicotiana tabacum* wild type (Nt/*wt*) and Nt/*Sw5-b* plants were inoculated as described in Figure 5, in which the RNA 3 transcript expresses the NSm RB1 (lane 1), RB2 (lane 2) and NRB (lane 3). The analysed RNAs from inoculated leaves corresponded to a mixture of total RNA extracted from the two inoculated leaves (I1 and I2) at 7 days post-inoculation (dpi), whereas the analysed RNA from systemic leaves corresponded to a mixture of the total RNAs extracted from the upper (U) leaves U1, U2 and U3 at 14 dpi. The positions of the chimeric RNA 3 and RNA 4 are indicated in the left margin of the photographs. rRNA indicates 23S RNA loading control. NRB, non-resistance-breaking; RB, resistance-breaking.

We also analyzed the capacity of the heterologous MPs (NSm) to support the systemic transport of AMV RNA 3 by tissue printing (Sánchez-Navarro *et al.*, 2010). The analysis of all upper non-inoculated leaves of the Nt/*wt* and Nt/*Sw5-b* plants at 14 dpi revealed that all constructs rendered positive hybridization signal in both hosts, except for the NRB:A44/CP RNA 3 hybrid, which was exclusively detected in the susceptible Nt/*wt* plants (data not shown). To further confirm the accumulation of viral RNAs in the upper leaves, we performed a Northern blot analysis of total RNA extracted from a mixture of the upper leaves U1, U2 and U3 (Figure 6). The results showed that the three AMV RNA 3 chimeric variants, NRB:A44/CP, RB1:A44/CP and RB2:A44/CP, accumulated comparable levels of RNA 3 and 4 in the upper leaves of Nt/*wt* plants (Figure 6, *wt/systemic*), indicating that the three NSm proteins are competent to support the systemic transport of viral RNAs. However, only the two RNA 3 constructs, RB1:A44/CP and RB2:A44/CP, were detected in the upper leaves of the resistant Nt/*Sw5-b* plants (Figure 6, *Sw5-b/systemic*). This indicated that the NSm is the Avr

determinant responsible for overcoming the resistance mediated by the *Sw5-b* gene in the AMV viral context.

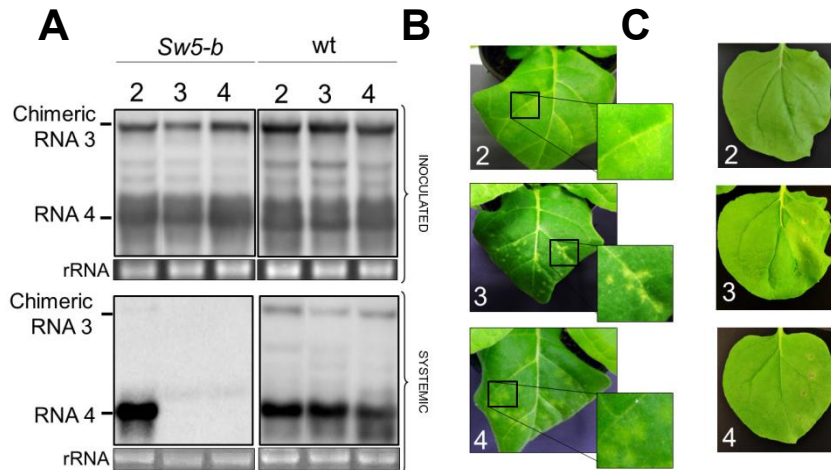
### **Mutational analysis of the RB and NRB NSm proteins**

The amino acid alignments among RB and NRB NSm proteins indicated that the capability of TSWV to overcome the resistance mediated by *Sw-5* might be exclusively a result of single changes present at residues 118 (Y) and 120 (N) of the NSm protein (López *et al.*, 2011), which are representative of the RB2 or RB1 NSm isolates analysed herein. We cannot exclude, however, that other residues might also contribute. Therefore, to analyze this aspect, we performed a mutational analysis using the RB1 and NRB NSm proteins, which differ only in two residues (RB2 and NRB differ in three residues) at position 120 (N in RB1 or T in NRB) and 130 (I in RB1 or V in NRB). By directed mutagenesis, we synthesized two variants of the RNA 3 for the heterologous AMV model system shown above, pGFP/RB1:A44/CP and pRB1:A44/CP constructs in which the asparagine at position 120 was changed to a threonine (pGFP/RB1-T120:A44/CP and pRB1-T120:A44/CP) or the isoleucine at position 130 was changed to a valine (pGFP/RB1-V130:A44/CP and pRB1-V130:A44/CP). The analysis of the cell-to-cell movement of the chimeric mutants expressing the GFP in *N. tabacum* P12 plants revealed that, at 3 dpi, the presence of a T at position 120 in the RB1 protein (RB1-T120) increased significantly the area of the foci, meanwhile, the presence of a V at position 130 (RB1-V130) resulted into the opposite effect (Student's t-test,  $p < 0.05$ ) (Figure 7A). Those differences were not caused by changes in the replication capability, as all constructs accumulated comparable levels of viral RNAs on P12 protoplasts (Figure 7B).



**Figure 7.** Analysis of the accumulation and the cell-to-cell transport of the NSm RB1 single mutants. **(A)** Histograms represent the average of the area of 50 independent infection foci at 2 and 3 days post-inoculation (dpi) observed in *Nicotiana tabacum* P12 plants inoculated with transcripts from *Alfalfa mosaic virus* (AMV) RNA 3 pGFP/A255/CP derivatives pGFP/RB1:A44/CP (lane 2), pGFP/RB1-T120:A44/CP (lane 3) and pGFP/RB1-V130:A44/CP (lane 4). The fluorescent infection foci were visualized using a Leica stereoscopic microscope. Error bars indicate the standard deviation. **(B)** Northern blot analysis of the accumulation of chimeric AMV RNAs in P12 protoplasts inoculated with RNA transcripts derived from the constructs used in (A) plus the plasmid pGFP/A255/CP (lane 1). The positions of the chimeric RNA 3 and RNA 4 are indicated in the left margin of the photograph. Mock (M), represents total RNA extraction of healthy tissue. rRNA indicates 23S RNA loading control. NRB, non-resistance-breaking; RB, resistance-breaking.

The capacity of both RB1 mutants to overcome the resistance mediated by the *Sw5-b* gene was analysed by inoculation of *N. tabacum* Nt/wt and Nt/Sw5-b plants with transcripts derived from the two pRB1-T120:A44/CP and pRB1-V130:A44/CP mutant constructs, using pRB1:A44/CP construct as control (Figure 8A). Northern blot analysis of the inoculated and upper non-inoculated leaves of Nt/wt plants revealed that the three constructs accumulated comparable levels of viral RNAs 3 and 4, indicating that neither of the two changes introduced in the RB1 gene affected the capacity of the NSm protein to support the local and/or systemic transport of viral progeny. However, when the same analysis was performed with Nt/Sw5-b plants we observed that the three constructs were competent to infect the inoculated leaves, as shown by the accumulation of the viral RNAs 3 and 4, but only the construct containing the RB1 gene was detected in the upper non-inoculated leaves. In addition, we observed differences in the symptomatology on the inoculated leaves of the resistant Nt/Sw5-b plants. Thus, whereas RB1 and RB1-V130 resulted in similar chlorotic spots, the construct carrying the RB1-T120 reproduced the typical necrotic lesions observed for the construct that expressed the NRB protein. Similar results were observed when the three NSm proteins (RB1, RB1-T120 or RB1-V130) were transiently expressed in Nb/Sw-5b plants, in which only the RB1-T120 triggered the hypersensitive-like response (Figure 8C, panel 3). All together, these results proved that mutations at position 120 are responsible for evading the hypersensitive response mediate by Sw-5, but also that, in the context of the AMV system, other changes are required to compensate the putative fitness cost associated to the incorporation of the critical residue.



**Figure 8.** Functional characterizations of NSm RB1 single mutants. **(A)** Northern blot analysis of the accumulation of the chimeric AMV RNAs in *N. tabacum* plants that express constitutively the Sw5-b gene (Nt/Sw5-b) or *N. tabacum* wild-type (Nt/wt) plants. All plants were inoculated as described in Figure 5 in which the chimeric RNA 3 corresponds to the transcripts derived from the constructs pRB1:A44/CP (lane 2), pRB1-T120:A44/CP (lane 3) and pRB1-V130:A44/CP (lane 4). Total RNA was extracted from inoculated and upper leaves as described in Figure 6. The positions of the chimeric RNA 3 and RNA 4 are indicated at the left margin of the photographs. **(B)** Symptomatology observed in Nt/Sw5-b plants inoculated with chimeric AMV derivatives used in (C) at 6 dpi. **(C)** Photographs of Nb/Sw5-b leaves expressing TSWV NSm RB1:HA (2), RB1-T120:HA (3) and RB1-V130:HA (4) at 6 days post-agroinfiltration. Mock (M) represents total RNA extraction of healthy tissue. rRNA indicates 23S RNA loading control. HA, haemagglutinin; NRB, non-resistance-breaking; RB, resistance-breaking.

### Competition assays

The presence of the TSWV RB isolates was associated mainly to Sw-5-resistant tomato crops, with scarce or null presence of these isolates in susceptible crops. This observation could suggest a fitness cost for RB TSWV isolates. The results obtained with the AMV model system and the different NSm proteins could suggest a possible fitness cost associated to RB1 and RB2 (e.g. the reduced RNA accumulation in tomato or cell-to-cell transport in *N. tabacum*). Although we cannot rule out that these effects may be caused by the heterologous AMV system or, perhaps, that other TSWV components may compensate for the putative fitness cost effects (see below), we analysed the relative fitness of chimeric AMV constructs carrying RB and NRB NSm genes to determine whether the pressure of the Sw-5 could be sufficient to select the RB NSm proteins. To do this, a competition assay between RB1, RB2 and NRB NSm chimeric constructs was conducted by co-inoculation of *N. tabacum* P12 and Sw5-b-expressing (Nt/Sw5-b) plants with an infectious mixture containing equivalent

transcripts amounts. After two serial passages at 7-day intervals using extracts of the inoculated leaves as inoculum, the prevalent isolate present in the inoculated infected tissue was determined by direct sequencing of the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplicons encompassing the full-length NSm gene. The results obtained in three independent experiments revealed that, in P12 plants, all sequenced NSm amplicons corresponded to the NRB isolate, whereas, in Nt/Sw5-b plants, all the sequences corresponded to the RB1 isolate. These results suggest a fitness cost for RB strains in absence of the *Sw-5* gene pressure, whereas, in *Sw-5* resistant genotypes, the AMV hybrid carrying the RB1 gene prevailed. In addition, it should be noted that, in the latter case, only the hybrid RNA 3 containing the RB1 gene was detected, thus suggesting a better fitness provided by this NSm under *Sw-5* pressure.

## DISCUSSION

The present analysis was addressed to experimentally confirm previous data suggesting that the NSm protein is the Avr determinant of TSWV in the resistance mediated by *Sw-5* gene (López *et al.*, 2011). The initial results obtained by transient expression of RB and NRB NSm proteins in transgenic *N. benthamiana* cultivars carrying the *Sw5-b* gene (Nb/Sw5-b) revealed a hypersensitive- like response only with the NRB NSm protein, thus indicating unequivocally that NSm is the Avr determinant for the resistance provided by *Sw-5* gene. However, we were unable to reproduce the typical necrotic reaction to TSWV infection associated to the resistance mediated by the *Sw-5* gene, indicating that other factors could be modulating such phenotypic response, e.g. a putative high protein accumulation in the infected cells or an enhanced effect caused by other cell responses associated to the viral infection. The observation that the hypersensitive- like response was clearly developed in *N. benthamiana* (Nb/Sw5-b) plants, but not in *N. tabacum* (Nt/Sw5-b) plants, a host that accumulates 5-10 times lower protein titer in transient expression, could support the concept of a minimal protein accumulation threshold required to trigger the typical hypersensitive response.

Furthermore, the differences between the NRB and the RB1 NSm proteins are exclusively located at position 120 (T or N) and 130 (V or I), but only the former has



been suggested previously by López *et al.* (2011) as being responsible for overcoming the *Sw-5* resistance, and is necessary and sufficient to trigger the necrotic response (see below). Here, we demonstrated that two (RB1) or three (RB2) residues confer the capacity to overcome the *Sw-5* resistance. Based on the gene-for-gene model of disease resistance described by Flor (1971), the few amino acids changes observed in the RB NSm proteins will maintain the pathogenic function, but not the participation in the recognition event with the host resistance factor (Fraser, 1990). In agreement with this, we demonstrated that the two RB1 and RB2 proteins are still competent for local and systemic viral transport in the AMV heterologous system. The observation that few changes are associated with the capacity of an Avr gene to overcome a host resistance is a common property for different viral proteins, such as the MP (Calder and Palukaitis, 1992; Meshi *et al.*, 1989), RNA polymerase (Meshi *et al.*, 1988; Padgett and Beachy, 1993) and CP (Dawson *et al.*, 1988; Saito *et al.*, 1987) of *Tobamoviruses*, and the NSs protein of TSWV (de Ronde *et al.*, 2013; Margaria *et al.*, 2007).

Another aspect was to determine how the critical residues required to overcome the *Sw-5* resistance affect the functionality of the NSm proteins. This aspect was studied by using the AMV model system. The absence of other TSWV components in the AMV system allowed us to correlate any effect on the viral transport with the different residues present in the NSm protein, although we cannot discount that the observed effect could be specific to the heterologous AMV system. Taking this into consideration, we observed that the three NSm proteins used in the analysis were competent to support local and systemic transport of AMV into *N. tabacum* plants. However, we observed that the cell-to-cell transport of the chimeric AMV RNA 3 expressing the RB2 protein was significantly affected, showing infection foci with a reduced area. The differences in the amino acid NSm sequences observed among RB2, RB1 and NRB proteins analysed are located at positions 118 (Y), 130 (I) and 188 (T). The Y118 and I130 are present in NSm proteins of other TSWV isolates, but T188 is exclusive of RB2 and the P321 isolates (GenBank accession number 307572726). This observation opens up the possibility that T188 may affect the transport capacity of the NSm protein. Further research is needed to confirm this hypothesis.

The AMV hybrids carrying the NSm genes were used to inoculate different plant species containing the *Sw-5* gene. Thus, we observed that the presence of the NRB NSm gene was always correlated with a significant reduction of the accumulation of viral RNAs in the inoculated leaves of tomato or *Nicotiana* species tested, carrying the resistance gene *Sw-5*. This phenotype was also correlated with the absence of systemic virus infection. This result reproduces the same phenotype observed for the TSWV wt in these resistant plants, in which the NRB isolates are able to infect the inoculated leaves, but have lost the capacity to move to the upper part of the plant. Together, the results obtained in the present work indicated that the NSm protein is the Avr determinant for the resistance mediated by the dominant gene *Sw-5*.

Here, we also analysed whether the critical Y118 or N120 residues, proposed by López *et al.* (2011) to be responsible for overcoming *Sw-5* resistance, are sufficient to trigger this phenotype. To answer this question, we performed a mutational analysis using the RB1 protein that differs only in two residues (N120 or I130) from those of the NRB protein used herein. The analysis revealed that N120 was required to avoid the hypersensitive response associated with *Sw-5*-resistant plants, but also that this residue negatively affected the cell-to-cell transport in the AMV heterologous system. The conservation of this amino acid in all members of the genus *Tospovirus*, except in the TSWV RB isolates (López *et al.*, 2011), supports the functional importance (strong negative selection) of this amino acid residue. However, I130 significantly increased the cell-to-cell transport, and is necessary for the virus to reach the distal parts of the plants. Interestingly, neither of the two single mutants was able to infect systemically the Nt/*Sw5-b* plants. These results suggested that the change T120N, present in RB1, induces a fitness cost in the local movement of the chimeric construct, which was confirmed by competition experiments. However, with the AMV experimental system used, we cannot rule out the possibility that this fitness cost could be specific of the heterologous system or perhaps be overcome through secondary mutations (Sanjuán *et al.*, 2005; Sanjuán *et al.*, 2004) located outside the NSm protein. In addition, the change V130I, present in the NSm of most of the TSWV isolates available in databases (503 out of 504 sequences), seems to be a positively selected residue for efficient cell-to-cell viral movement. Our results suggest that the RB isolates appear only in an I130 background. The fitness penalty is a prerequisite for both the resistance genes (R) and

Arv genes in the different models proposed for the co-evolution of the host-parasite in a gene-for-gene system (Bergelson *et al.*, 2001; Burdon and Thrall, 2003; Sasaki, 2000; Segarra, 2005). This assumption is also supported by the small size of virus genomes, in which any modification of the few encoded multifunctional proteins, could result in a fitness cost (Fraile and Garcia-Arenal, 2010; Sacristán and Garcia-Arenal, 2008). It was suggested that even a limited number of nucleotide changes in the virus genome may have strong pleiotropic effects. Mutations responsible for gains of virulence frequently induce fitness costs to the virus in plants which are devoid of the corresponding resistance. This has been shown in several instances (Agudelo-Romero *et al.*, 2008; Ayme *et al.*, 2006; Desbiez *et al.*, 2003; Goulden *et al.*, 1993; Jenner *et al.*, 2002; Lanfermeijer *et al.*, 2003), although it cannot be generalized because there are examples of virulent strains that are at least as fit as the avirulent ones (Chain *et al.*, 2007; Sorho *et al.*, 2005). High fitness penalties associated with increased pathogenicity have been inferred for different plant viruses from direct (Fraile *et al.*, 2011) and indirect evidence (Culver *et al.*, 1994; Hanada and Harrison, 1977; Mestre *et al.*, 2003; Murrant *et al.*, 1968). The results presented herein support a high fitness penalty associated with the RB NSm gene, at least in the AMV system. This was confirmed experimentally by competition experiments in which the chimeric NRB RNA 3 outcompeted the RB1 and RB2 constructs in the absence of the *Sw-5* resistance gene, whereas the RB1 variant was prevalent in the *Sw-5* resistant background, even outcompeting RB2. This latter result also suggests that the RB1 NSm isolate has less fitness penalty than RB2, at least in the resistant genotype, an effect that could be the consequence of a more permissive amino acid changes or a more competitive evolved NSm gene. It is remarkable that most codons of NSm were found to be under neutral or purifying selection, and a positive selection was only detected at codon 118 as a result of the adaptation to overcome the resistance conferred by the *Sw-5* gene (López *et al.*, 2011). The same observation was suggested for the substitution T120N, although the small number of isolates showing this change might have precluded its detection by the statistical methods used (López *et al.*, 2011). The results presented herein support a positive selection for N120 under the selection pressure of the resistance gene *Sw-5*. In addition, the observation of different fitness penalties between the two RB NSm forms may indicate that both genes are evolving to

compensate for the fitness loss associated with these amino acid changes (Y118 and N120). If this is the correct scenario, it can be questioned how long it will take for other mutations to appear in RB NSm able to compete (with similar or higher fitness) with the NRB NSm in a context in which absence of the resistance gene *Sw-5* occurs. Further research is needed to study this aspect and to confirm whether the results obtained with the AMV system could be applied to TSWV.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### ***Recombinant plasmids for introducing the NSm genes in the AMV RNA 3 and for its transient expression***

A modified infectious AMV cDNA 3 clone, which expresses GFP (pGFP/A255/CP) (Sánchez-Navarro and Bol, 2001), was used to exchange the N-terminal 255 amino acids of the AMV MP gene with the corresponding MP gene (NSm) of TSWV. Three TSWV isolates derived from natural infections of tomato, two *Sw-5*-RB [named GRAU (GenBank FM163370) and Llo2TL3 (GenBank HM015518)] and one *Sw5*-NRB [Gr1NL2 (Genbank HM015513)] were used as templates to amplify the MP gene (López *et al.*, 2011) employing specific primers. The MP genes are referred to as RB1 (GRAU isolate), RB2 (Llo2TL3 isolate) and NRB (Gr1NL2 isolate). The digested fragments were used to replace the *NcoI*–*NheI* fragment of pGFP/A255/CP, corresponding with the N-terminal 255 amino acids of the AMV MP, to generate the constructs pGFP/RB1:A44/CP, pGFP/RB2:A44/CP and pGFP/NRB:A44/CP, respectively.

In addition, the TSWV MP genes were introduced into an infectious cDNA 3 clone of AMV wt (pAL3NcoP3) (van der Vossen *et al.*, 1993) by exchanging the *NcoI*–*PstI* fragment between the pAL3NcoP3 plasmid and the pGFP/A255/CP derivatives, described above. The resultant chimeric plasmids were referred as pRB1:A44/CP, pRB2:A44/CP and pNRB:A44/CP.

The pGFP/RB1:A44/CP and pRB1:A44/CP plasmids were used as templates to introduce, by directed mutagenesis, the substitutions T120 (substitution N for T at position 120) and V130 (substitution I for V at position 130) of the MP, resulting in the mutant constructs pGFP/RB1-T120:A44/CP or pGFP/RB1-V130:A44/CP and pRB1-T120:A44/CP or pRB1-V130:A44/CP, respectively.

For the transient expression of the different TSWV MPs, the previously amplified MP genes were introduced in the expression cassette of the plasmid pSK+ 35S–MPPNRSV:HA-PoPit (Martínez-Gil *et al.*, 2009) by exchanging the *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) MP gene. The resulting cassettes contain the corresponding TSWV MP fused to the HA epitope at its C-terminus. Each cassette was introduced into the pMOG800 binary vector by using a unique *Xho*I restriction site.

### ***Inoculation of N. tabacum plants and tomato cultivars***

pAL3NcoP3, pGFP/A255/CP and the corresponding NSm derivatives were linearized with *Pst*I and transcribed with T7 RNA polymerase. The transcripts were inoculated onto transgenic *N. tabacum* plants that express constitutively the P1 and P2 polymerase proteins of AMV (P12), as described previously (Taschner *et al.*, 1991). The fluorescence derived from the chimeric AMV RNA 3, carrying the GFP, was monitored using a Leica stereoscopic microscope. The area of infection foci was measured at 2 and 3 dpi using Image J software (Wayne, Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij>).

*Nicotiana tabacum* wt plants (Nt/wt) or *N. tabacum* plants expressing constitutively the resistance gene *Sw5-b* (Nt/Sw5-b) (Spasova *et al.*, 2001), and the tomato cultivars, “Verdi” (heterozygous for the *Sw-5* resistance gene) and “Marmande”, (which does not carry *Sw-5*) (provided by Semillas Fitó, Barcelona, Spain) were inoculated with a mixture of capped transcripts corresponding to AMV RNAs 1, 2, the wt or chimeric RNA 3 plus few micrograms of purified AMV CP, as described previously (Neeleman and Bol, 1999).

For the competition assays, the inoculum contained a mixture of AMV RNAs 1 and 2 plus the three RNA 3 transcripts, at the same concentration, derived from the pRB1:A44/CP, pRB2:A44/CP and pNRB:A44/CP plasmids. P12 and Nt/Sw5-b plants were inoculated as described above and two serial passages at 7 dpi were performed using an extract of the inoculated leaves as inoculum.

### ***Northern blot and Tissue printing assays***

Tissue printing analyses were performed using transverse section of the corresponding petiole, as described previously (Fajardo *et al.* 2013). Total RNA was

extracted from inoculated (I) and upper (U) non- inoculated leaves at 7 and 14 dpi, as described previously (Sánchez-Navarro *et al.*, 1997). In the case of the upper leaves, the RNA extraction was performed using a mixture of U3, U4 and U5 leaves, in which U1 corresponds to that closest to the inoculated leaf. Hybridization and detection were conducted as described previously (Pallás *et al.* 1998) using a dig-riboprobe (Roche Mannheim, Germany) complementary to the AMV 3'- untranslated region (3'-UTR). The intensity of the bands was quantified using the Image J 1.48c software (<http://imagej.nih.gov/ij>).

#### ***Transient expression of the TSWV MPs in planta and Western Blot assay***

*Agrobacterium tumefaciens*, strain C58, transformed with the corresponding binary pMOG 800 plasmids, was grown overnight in a shaking incubator at 28 °C in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with the appropriate antibiotic. Cultures were collected by centrifugation and adjusted to an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.5 with 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid (MES), pH 5.6, and 150 µM acetosyringone. These suspensions were used to infiltrate the different plants, as described previously (Herranz *et al.*, 2005). The expression of the different viral MPs was analysed by Western blot assay, as described previously (Martinez-Gil *et al.*, 2009). Blots were developed using an ECL+ Plus Western Blotting Detection System (Amersham) and the LAS-3000 digital imaging system (FujiFilm). The intensity of the bands was quantified using the ImageGauge 4.0 software (FujiFilm).



## **DISCUSIÓN FINAL**

---

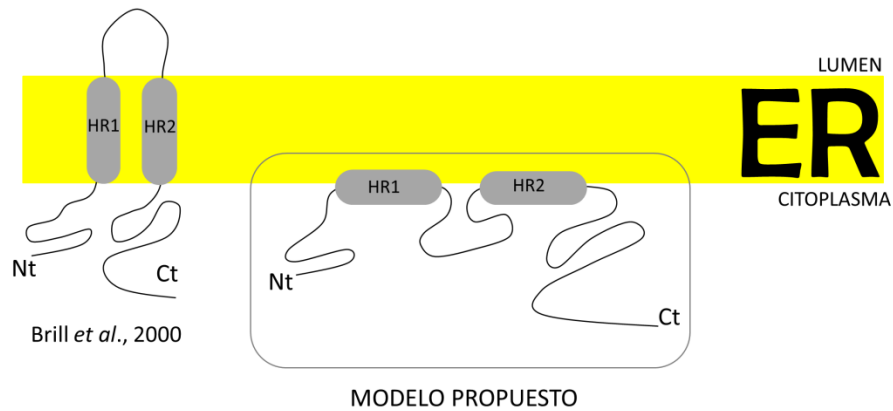




El éxito de una interacción viral en un determinado huésped es el resultado de la combinación de múltiples factores. Durante el proceso de infección, se establece una estrecha relación entre los componentes virales y los factores del huésped, que condiciona que el virus consiga replicarse y transportarse a la célula vecina o que la planta detenga la propagación viral. De este modo, se desarrolla una situación de ataque-defensa-contradefensa, en donde cualquier mínima variación en los factores que interactúan puede significar el fracaso o el éxito de una infección viral. La caracterización del papel que desempeñan las proteínas de movimiento (MP) virales en la relación virus-huésped, el estudio de su asociación con el sistema celular de endomembranas, su relación entre el transporte a corta y larga distancia y su interacción con factores celulares y/o genes de resistencia, son facetas esenciales para desentrañar las bases moleculares de la susceptibilidad viral.

La asociación de las proteínas virales a los componentes celulares tiene un papel fundamental en el ciclo vital de los virus de plantas (Hwang *et al.*, 2008; Netherton *et al.*, 2007; Sanfaçon, 2005). En particular, se ha propuesto que las MPs se asocian al sistema de endomembranas durante el transporte intra- e intercelular del genoma viral. Algunas de las propiedades que caracterizan a las MPs las podemos observar en este proceso: (i) Las MPs, a través de su unión al genoma viral, actúan como vínculo de unión entre las membranas celulares y el vRNA; (ii) utilizan el sistema de endomembranas para desplazarse por el interior celular hasta alcanzar los PDs, prolongaciones del ER y, (iii) modifican el SEL de los PDs para facilitar la translocación del vRNA a las células adyacentes. La caracterización de la asociación de las MPs al sistema de endomembranas se ha centrado principalmente en virus pertenecientes a los Grupos conocidos como DGB y TGB, los cuales se caracterizan por presentar dos y tres MPs, respectivamente (Krishnamurthy *et al.*, 2003; Lukhovitskaya *et al.*, 2005; Martínez-Gil *et al.*, 2010; Martínez-Gil *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2006; Schepetilnikov *et al.*, 2008; Verchot-Lubicz, 2005; Vilar *et al.*, 2002). Respecto a las MPs que pertenecen a la Superfamilia 30K, la MP del TMV se caracterizó como una proteína transmembrana (Brill *et al.*, 2000). Dado que la MP del TMV representa una de las MPs más estudiadas y teniendo en cuenta que se clasifica como miembro tipo de esta familia, el modelo topológico de esta proteína viral se extendió para el resto de las MPs integrantes del grupo. Sin embargo, la reciente caracterización de la MP del

PNRSV, miembro de la misma familia, como proteína fuertemente asociada, pero no integrada, a la cara citosólica de la membrana del ER (Martínez-Gil *et al.*, 2009), ha cuestionado el modelo propuesto para el TMV. Por otra parte, algunas interacciones de la MP del TMV previamente descritas no eran consistentes con el modelo insercional de Brill *et al.* (2000). Con estos antecedentes, y dadas las extraordinarias extrapolaciones que los estudios en el TMV tienen para la Virología Vegetal, en la presente tesis hemos caracterizado la topología que adopta la MP del TMV en el ER *in vivo*, centrándonos principalmente en el análisis hidrofóbico de los dos supuestos dominios TM propuestos en el modelo de Brill *et al.* (2000). Los análisis *in silico* obtenidos para los dos dominios hidrofóbicos (HRs) de la MP del TMV generaron resultados controvertidos, dado que la mayoría de los programas informáticos predecían que ambas regiones, HR1 y HR2, no eran capaces de insertarse en la membrana (Tesis Martínez-Gil, 2009). En concordancia con estas predicciones y con los análisis *in vitro* basados en la proteína modelo de *Escherichia coli*, Lep, (Tesis Martínez-Gil, 2009), los resultados obtenidos mediante la técnica de complementación bimolecular de la fluorescencia revelaron que ninguna de las HRs atravesaba las membranas biológicas ni cuando se ensayaban de forma independiente ni formando parte de la misma construcción, y que los extremos N- y C-terminales de la proteína se sitúan en la parte citosólica del ER (Capítulo 1). Además, diferentes tratamientos bioquímicos, dirigidos a discernir entre proteínas integrales y asociadas a la membrana, pusieron de manifiesto que la MP del TMV no seguía el comportamiento típico de una proteína integral de membrana ni *in vitro* ni *in vivo*. El conjunto de estos resultados nos han permitido proponer un nuevo modelo para la MP del TMV en el cual la proteína viral estaría periféricamente asociada a la membrana del RE a través de dos regiones altamente hidrofóbicas, con el extremo Nt y Ct orientados hacia el citosol.



**Figura D1.** Se representan los dos modelos propuestos para la MP del TMV: a la izquierda el modelo propuesto por Brill *et al.* (2000) en el que las dos regiones hidrofóbicas (HRs) de la MP estarían atravesando la membrana del ER con los extremos N- y C-terminales orientados hacia citosol y el modelo que se propone en este trabajo, en base a los resultados obtenidos, en el que la MP estaría periféricamente asociada a la membrana del RE a través de sus dos HRs y con los extremos N- y C-terminales orientados a la cara citoplasmática del mismo.

Este modelo, no solo es compatible con varias propiedades atribuidas a la MP del TMV que hasta ahora suscitaban cierta controversia/polémica (Chen *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005; Citovsky *et al.*, 1990; Citovsky *et al.*, 1992; Sambade *et al.*, 2008), sino que además es similar al modelo topológico propuesto para las MPs de PNRSV y GFLV (Laporte *et al.*, 2003; Martínez-Gil *et al.*, 2009), ambas integrantes de la Superfamilia 30K. Esta última observación y considerando que se ha propuesto una estructura secundaria similar para las MPs que forman parte de la Superfamilia 30K (Melcher, 2000), nos permite sugerir que el tipo de asociación a membrana caracterizada para la MP del TMV podría tratarse de una propiedad que comparten las MPs de la familia. En este sentido, un modelo topológico común de las MPs de la familia 30K estaría en concordancia con la observación de que la MP del AMV sea funcionalmente intercambiable para el transporte célula a célula por la MP de siete géneros virales distintos: *Ilar-*, *Bromo-*, *Cucumo-*, *Tobamo-*, *Caulimo-* y *Comovirus*, pertenecientes a la familia 30K (Sánchez-Navarro and Bol, 2001; Sánchez-Navarro *et al.*, 2006; Sánchez-Navarro *et al.*, 2010).

Una vez resuelta la topología de la MP del TMV, en la presente Tesis hemos querido comprender la versatilidad que presentan las MPs de la Superfamilia 30K en cuanto al movimiento viral, en especial en el transporte sistémico. Datos previos

habían puesto de manifiesto que diferentes MPs de la familia 30K, caracterizadas por transportar célula a célula complejos ribonucleoproteicos formados por la MP y el vRNA (ej. MP de TMV), más la CP (ej. MPs de AMV y CMV) o por viriones (ej. MP de CPMV), eran funcionalmente intercambiables por la MP del AMV para el transporte célula a célula (Sánchez-Navarro *et al.*, 2006). En este apartado analizamos la capacidad de la MP del TMV, BMV, PNRSV, CMV y CPMV de transportar sistémicamente el RNA3 quimérico del AMV. Los datos revelaron que todas las MPs, independientemente del modelo descrito para el transporte a corta distancia, son capaces de transportar sistémicamente los RNAs quimera del AMV cuando se les fusiona los 44 amino ácidos C-terminales de la MP de AMV, los cuales se requieren para una interacción compatible con la CP del AMV (Sánchez-Navarro *et al.*, 2006). El análisis en plantas P12 del movimiento local y sistémico de los RNA3 quimera de AMV conteniendo las diferentes MPs virales, permitió correlacionar la eficiencia del transporte célula a célula del virus con la capacidad de infectar las partes distales de la planta. Estos resultados indican la existencia de un umbral de capacidad de infección local requerido para garantizar la entrada en el tejido vascular y, en consecuencia, invadir sistémicamente la planta, como se ha descrito previamente para otros virus (Deom *et al.*, 1994). Estos resultados son consistentes con la predicción matemática recientemente propuesta según la cual la aparición de la infección sistémica en una interacción virus-planta está determinada por la velocidad del movimiento célula a célula y el número de focos primarios de infección (Rodrigo *et al.*, 2014). La pregunta que subyace en esta observación es qué procesos del huésped son los responsables de limitar el umbral observado (ej. interacción con factores celulares, sistema defensivo de la planta, transición fuente-sumidero, etc), un importante aspecto que se ha incorporado a las líneas futuras de investigación en el Grupo. En conjunto, los resultados obtenidos con el sistema del AMV y el intercambio de MPs, pone de manifiesto que, independientemente del modelo descrito para el transporte célula a célula (ej. TMV vs CMV or CPMV), de la capacidad de la MP de formar o no estructuras tubulares (e.j. CPMV vs TMV) o del sistema de transporte intracelular utilizado para alcanzar los plasmodesmos (ej. TMV vs GFLV), todas las MPs ensayadas complementan el movimiento local y sistémico del AMV, sugiriendo que los distintos modelos descritos para el transporte viral podrían tratarse de distintas variantes del mismo

modelo en donde las diferencias observadas responderían a la adaptación de las MPs a los diferentes sistemas virales.

No solo la caracterización de la asociación de las MPs al sistema de endomembranas resulta interesante en cuanto al estudio del mecanismo de translocación viral; también lo es el conocimiento de los factores celulares que participan en el proceso. En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de las interacciones que se dan entre las MPs de la Superfamilia 30K y los factores del huésped y el efecto que estas tienen en la patogénesis viral. Dichas interacciones pueden facilitar o dificultar el movimiento del virus, llegando incluso a actuar como parte del sistema de defensa del huésped (Pallás and Garcia, 2011) y, en consecuencia abriendo nuevas alternativas al desarrollo de estrategias antivirales. En este sentido hemos identificado, en levadura y en planta, dos proteínas pertenecientes a la familia patellin (PATLs) de Arabidopsis, atPATL3 y atPATL6, cuya interacción con la MP del AMV afecta directamente a la patogénesis viral. Esta familia de proteínas, PATLs, se caracterizan por presentar en su secuencia una región N-terminal variable, un dominio Sec 14-like y un dominio GOLD C-terminal (Peterman *et al.*, 2004). Las PATLs se asocian con las membranas celulares mediante el dominio Sec 14 y a su vez pueden constituir un punto de anclaje a la membrana para otras proteínas, a través de la interacción con su dominio GOLD. En el proceso infeccioso de un virus de plantas se ha descrito de forma generalizada la necesidad de las MPs de asociarse al sistema de endomembranas de la planta tanto en los estadios iniciales del ciclo viral, donde el virus se replica, como en fases posteriores, como vía de transporte para alcanzar los PDs (Hofmann *et al.*, 2007; Lucas, 2006; Sanfaçon, 2005). Mediante la técnica BiFC se ha determinado que el dominio GOLD no se requiere para que la interacción MP-atPATL3 tenga lugar *in vivo*, mientras que la presencia del dominio Sec 14 sí fue necesaria. Sin embargo, no se descarta que la no implicación del dominio GOLD en la interacción MP-atPATL3 pueda deberse a un plegamiento ineficiente de la proteína incompleta o al requerimiento de otros factores implicados en este proceso. Estudios de co-localización subcelular han puesto de manifiesto que la expresión de atPATL3 y/o atPATL6 junto con la MP del AMV modifica su patrón de localización, apareciendo, además de en las membranas biológicas, en los PDs. En estudios de sobreexpresión transitoria hemos observado que la elevada presencia de PATL3 y/o PATL6 afecta

negativamente al movimiento célula a célula del AMV, disminuyendo la presencia de la MP en PDs. Consistentes con estos resultados, hemos observado el efecto contrario en plantas knock-out infectadas con AMV, donde las PATLs no están presentes, obteniéndose un ligero aumento en la acumulación del virus. Estos resultados sugieren que la interacción MP-atPATL3 /atPATL6, dificulta la llegada de la MP a los PDs, disminuyendo la capacidad de movimiento del AMV que podría condicionar, como se ha observado en el Capítulo 2 de esta Tesis, el transporte sistémico del virus. De este modo, podríamos sugerir que las PATLs estarían actuando como una barrera defensiva no solo frente a la infección del AMV, sino también del PNRSV, ya que se ha observado un efecto similar con la MP de este virus. Sin embargo, se necesitarían más experimentos para determinar cómo de específica sería esta estrategia antiviral. La sobreexpresión de factores celulares que interactúan con las MPs, se ha asociado con una disminución en la capacidad del movimiento del virus. En algunos casos, esta deficiencia se produce como resultado de modificaciones en los patrones de localización de las MPs, llegando incluso a desaparecer de los PDs (Brandner *et al.*, 2008; Curin *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2005; Fajardo *et al.*, 2013; Kaido *et al.*, 2007; Kragler *et al.*, 2003; Pallás and Garcia, 2011; Sasaki *et al.*, 2009).

El sistema de defensa de la planta, a través de interacciones con componentes virales, puede conseguir una resistencia parcial o total pero a la vez, puede suponer/ejercer una presión que favorece la aparición de variantes resistentes, dada la capacidad de mutación que presentan los virus de plantas (Sanjuán, 2010; Sanjuán *et al.*, 2010). En este sentido, en la última parte de la presente Tesis, hemos abordado el estudio del determinante genético que confiere al *Virus de bronceado del tomate* (TSWV), la capacidad de superar la resistencia mediada por el gen Sw-5. El primer paso fue confirmar, tal y como sugerían datos previos basados en la comparación de secuencias entre aislados resistentes y no resistentes (López *et al.*, 2011), que la MP del TSWV es el determinante de avirulencia de la resistencia mediada por el gen Sw-5. Para ello, se realizaron distintos experimentos con variantes de la MP, provenientes de aislados del TSWV con (Resistance breaking, RB) y sin (Non Resistance breaking, NRB) la capacidad de superar la resistencia, en plantas susceptibles y resistentes a la infección. Los resultados confirmaron que únicamente se desencadena la respuesta hipersensible cuando la MP del aislado NRB se expresa en plantas resistentes, tanto si

se realiza mediante expresión transitoria, en ausencia de otros componentes virales, como si se hace en un contexto viral, mediante el sistema del AMV. Del mismo modo y mediante mutagénesis dirigida de una MP de un aislado tipo RB que difiere solo en dos residuos respecto a la MP de un aislado tipo NRB, comprobamos que la capacidad de evitar la respuesta hipersensible era debido únicamente a un único residuo (N en la posición 120, N120) aunque se requería de un segundo cambio (I en la posición 130, I130) para conseguir una infección sistémica. Dado el reducido genoma que presentan los virus de plantas es bastante usual que únicamente unos pocos cambios en la secuencia del gen de avirulencia se asocien con la capacidad de infectar una planta resistente pero también con la pérdida de eficiencia (Calder and Palukaitis, 1992; de Ronde *et al.*, 2013; Margaria *et al.*, 2007; Meshi *et al.*, 1988; Meshi *et al.*, 1989; Padgett and Beachy, 1993). Los análisis de movimiento intercelular y de infectividad de los mutantes generados confirmaron que el residuo N120, responsable de evitar la respuesta hipersensible, afectaba negativamente a la capacidad de movimiento célula a célula del virus, mientras que el mutante I130, presente en la mayoría de los aislados encontrados del TSWV, mejoraba significativamente el movimiento celular, contribuyendo posiblemente a superar el umbral mínimo requerido para el transporte a larga distancia, descrito en el Capítulo 2 de la presente Tesis. Sin embargo, los ensayos de competitividad pusieron de manifiesto la prevalencia del virus quimera con la MP tipo NRB frente al que expresa la MP tipo RB en ausencia del gen de resistencia, indicando la necesidad de otros cambios que mejoren la eficiencia. En el futuro realizaremos experimentos dirigidos a evolucionar la MP tipo RB y ver qué otros residuos se necesitan para poder competir con MPs del tipo NRB pudiendo, de esta manera, predecir variantes del TSWV especialmente dañinas en campo.





## **CONCLUSIONES**

---



1. Se ha propuesto un modelo topológico para la MP del TMV, miembro tipo de la Superfamilia 30K, en el cual la MP se encontraría periféricamente asociada a la cara citosólica de la membrana del retículo endoplásmático, a través de dos regiones altamente hidrofóbicas, con sus extremos N- y C-terminales orientados al citosol. Este modelo es compatible con todas las propiedades atribuidas a la MP del TMV, y clarifica interacciones con factores del huésped que el modelo anterior no podía explicar. El modelo propuesto es similar al modelo topológico previamente descrito para otras MPs de la familia 30K. Por otra parte, se ha propuesto una estructura secundaria similar para las MPs que forman parte de la Superfamilia 30K. Ambas observaciones nos permiten sugerir que el tipo de asociación a membrana caracterizada para la MP del TMV podría ser la misma en todas las MPs de la familia.

2. Mediante el sistema modelo del AMV se ha demostrado que las MPs de *Tombus-*, *Bromo-*, *Ilar-*, *Cucumo-* y *Comovirus*, representativas de cada uno de los diferentes modelos descritos para el transporte local, son capaces de transportar sistémicamente los RNAs quimera del AMV, cuando se les fusiona los 44 amino ácidos C-terminales de la MP del AMV. Este comportamiento podría responder a la existencia de un único modelo de transporte y a la capacidad de las MPs para adaptarse a los distintos sistemas virales.

3. El análisis en plantas P12 del transporte local y sistémico de los RNAs quimera del AMV que contiene las MPs del TMV, BMV, PNRSV, CMV o CPMV, permitió correlacionar la eficiencia del transporte célula a célula del virus con la capacidad de infectar las partes distales de la planta. Estos resultados indican la existencia de un umbral de capacidad de infección local requerido para garantizar la entrada en el tejido vascular y, en consecuencia, invadir sistémicamente la planta.

4. Se ha identificado dos proteínas pertenecientes a la familia patellin (PATLs) de *Arabidopsis*, atPATL3 y atPATL6, que interactúan en levadura y en planta con la MP del AMV. Mediante la técnica BiFC se ha demostrado que de las tres regiones presentes en las proteínas PATLs (región N-terminal variable, un dominio Sec 14-like y un dominio GOLD C-terminal), el dominio GOLD no se requiere para que la interacción

MP-atPATL3 tenga lugar *in vivo*, mientras que la presencia del dominio Sec 14 sí fue necesaria. La interacción entre la MP de AMV y PATLs modifica el patrón de localización de las PATLs apareciendo, además de en la periferia celular, en los PDs. Finalmente, los resultados obtenidos con experimentos de sobreexpresión o con plantas knock-out durante la infección con AMV, sugieren que la interacción MP-atPATL3 /atPATL6, dificulta la llegada de los complejos virales a los PDs, disminuyendo la capacidad de movimiento del AMV que podría condicionar el transporte sistémico del virus.

5. Se ha demostrado que la MP del *Virus del bronceado del tomate* es el factor de avirulencia en la resistencia mediada por el gen *Sw-5*, y que los residuos N120 y I130 son indispensables para evitar la respuesta hipersensible y alcanzar las partes distales de la planta, respectivamente.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Agudelo-Romero, P., de la Iglesia, F. and Elena, S.F.** (2008) The pleiotropic cost of host-specialization in *Tobacco etch Potyvirus*. *Infect. Genet. Evol.* **8**, 806-814.
- Akiyama, Y., Kamitani, S., Kusakawa, N. and Ito, K.** (1992) *In vitro* catalysis of oxidative folding of disulfide-bonded proteins by the *Escherichia coli dsbA (ppfA)* gene product. *J. Biol. Chem.* **267**, 22440-22445.
- Allen-Baume, V., Segui, B. and Cockcroft, S.** (2002) Current thoughts on the phosphatidylinositol transfer protein family. *FEBS Letters*, **531**, 74–80.
- Allison, R. F., Janda, M. and Ahlquist, P.** (1988) Infectious *in vitro* transcripts from *Cowpea chlorotic mottle virus* cDNA clones and exchange of individual RNA components with *Brome mosaic virus*. *J. Virol.* **62**, 3581-3588.
- Amari, K., Boutant, E., Hofmann, C., Schmitt-Keichinger, C., Fernandez-Calvino, L., Didier, P., Lerich, A., Mutterer J., Thomas C., Heinlein M., Mély Y., Maule A. and Ritzenthaler C.** (2010) A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog.* **6**, e1001119.
- Amari, K., Lerich, A., Schmitt-Keichinger, C., Dolja, V.V. and Ritzenthaler, C.** (2011) Tubule-guided cell-to-cell movement of a plant virus requires class XI myosin motors. *PLoS Pathog.* **7**, e1002327.
- Anantharaman, V. and Aravind, L.** (2002) The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biol.* **3**, 1-7.
- Anderson, E.J., Qui, S.G. and Schoelz, J.E.** (1991) Genetic analysis of determinants of disease severity and virus concentration in *Cauliflower mosaic virus*. *Virology*, **181**, 647-655.
- Aparicio, F., Aparicio-Sanchis, R., Gadea, J., Sánchez-Navarro, J.A., Pallás, V. and Murguía, J.R.** (2011) A plant virus movement protein regulates the Gcn2p kinase in budding yeast. *PLoS ONE*, **6**, e27409.
- Aparicio, F., Pallás, V. and Sánchez-Navarro, J.** (2010) Implication of the C terminus of the prunus necrotic ringspot virus movement protein in cell-to-cell transport and in its interaction with the coat protein. *J. Gen. Virol.* **91**, 1865-1870.
- Aparicio, F., Sánchez-Navarro, J.A. and Pallás, V.** (2006) *In vitro* and *in vivo* mapping of the *Prunus necrotic ringspot virus* coat protein C-terminal dimerization domain by bimolecular fluorescence complementation. *J. Gen. Virol.* **87**, 1745-1750.
- Aparicio, F., Vilar, M., Pérez-Payá, E. and Pallás, V.** (2003) The coat protein of *Prunus necrotic ringspot virus* specifically binds to and regulates the conformation of its genomic RNA. *Virology*, **313**, 213-223.
- Aramburu, J. and Marti, M.** (2003) The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the Sw-5 gene. *Plant Pathol.* **52**, 407-407.
- Aramburu, J. and Rodriguez, M.** (1999) Evaluation of commercial *Lycopersicon esculentum* hybrids for resistance to *Tomato spotted wilt Tospovirus* (TSWV) in Spain. *J. Hortic. Sci. Biotech.* **74**, 743-747.
- Arce-Johnson, P., Kahn, T.W., Reimann-Philipp, U., Rivera-Bustamante, R. and Beachy, R.N.** (1995) The amount of movement protein produced in transgenic plants influences the establishment, local movement, and systemic spread of infections by movement protein-deficient *Tobacco mosaic virus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 415-423.



- Ashby, J., Boutant, E., Seemanpillai, M., Groner, A., Sambade, A., Ritzenthaler, C., and Heinlein, M.** (2006) Tobacco mosaic virus movement protein functions as a structural microtubule-associated protein. *J. Virol.* **80**, 8329-8344.
- Atabekov, J.G., Rodionova, N.P., Karpova, O.V., Kozlovsky, S.V. and Poljakov, V.Y.** (2000) The movement protein-triggered *in situ* conversion of *Potato virus X* virion RNA from a nontranslatable into a translatable form. *Virology*, **271**, 259-263.
- Atkins, D., Hull, R., Wells, B., Roberts, K., Moore, P. and Beachy, R.N.** (1991) The Tobacco mosaic virus 30K movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. *J. Gen. Virol.* **72**, 209-211.
- Avisar, D., Prokhnevsky, A.I. and Dolja, V.V.** (2008) Class VIII myosins are required for plasmodesmatal localization of a *Closterovirus* Hsp70 homolog. *J. Virol.* **82**, 2836-2843.
- Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadoeuf, J., Palloix, A. and Moury, B.** (2006) Different mutations in the genome-linked protein VPg of *Potato virus Y* confer virulence on the pvr2(3) resistance in pepper. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 557-563.
- Balachandran, S., Hull, R.J., Vaadia, Y., Wolf, S. and Lucas, W.J.** (1995) Alteration in carbon partitioning induced by the movement protein of *Tobacco mosaic virus* originates in the mesophyll and is independent of change in the plasmodesmal size exclusion limit. *Plant Cell Environ.* **18**, 1301-1310.
- Bankaitis, A.V., Vincent, P., Merkulova, M., Tyeryar, K. and Liu, Y.** (2007) Phosphatidylinositol transfer proteins and functional specification of lipid signaling pools. *Adv. Enzyme Regul.* **47**, 27-40.
- Bano-Polo, M., Martínez-Gil, L., Wallner, B., Nieva, J.L., Elofsson, A. and Mingarro, I.** (2013) Charge pair interactions in transmembrane helices and turn propensity of the connecting sequence promote helical hairpin insertion. *J. Mol. Biol.* **425**, 830-840.
- Bayne, E.H., Rakitina, D.V., Morozov, S.Y. and Baulcombe, D.C.** (2005) Cell-to-cell movement of *Potato Potexvirus X* is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J.* **44**, 471-482.
- Beachy, R. N. and Heinlein, M.** (2000) Role of P30 in replication and spread of TMV. *Traffic*, **1**, 540-544.
- Beffa, R. and Meins, F.Jr.** (1996) Pathogenesis-related functions of plant beta-1,3-glucanases investigated by antisense transformation--a review. *Gene*, **179**, 97-103.
- Beijerinck, M.J.** (1898) Concerning a contagium vivum fluidum as cause of the spot disease of tobacco leaves. *Verhandelingen der Koninklijke akademie Wetenschappen te Amsterdam*, **65**, 3-21.
- Belkhadir, Y., Nimchuk, Z., Hubert, D.A., Mackey, D. and Dangl, J.L.** (2004) Arabidopsis RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by RPS2 and RPM1 downstream or independent of the NDR1 signal modulator and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *Plant Cell*, **16**, 2822-2835.
- Benítez-Alfonso, Y., Faulkner, C., Ritzenthaler, C. and Maule, A.J.** (2010) Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**, 1403-1412.

- Bergelson, J., Dwyer, G. and Emerson, J.J.** (2001) Models and data on plant-enemy coevolution. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 469-499.
- Berna, A., Gafny, R., Wolf, S., Lucas, W.J., Holt, C.A. and Beachy, R.N.** (1991) The TMV movement protein: role of the C-terminal 73 amino acids in subcellular localization and function. *Virology*, **182**, 682-689.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J.** (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
- Betti, C., Lico, C., Maffi, D., D'Angeli, S., Altamura, M.M., Benvenuto, E., Faoro, F., and Baschieri, S.** (2012) *Potato virus X* movement in *Nicotiana benthamiana*: new details revealed by chimeric coat protein variants. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 198-203.
- Blobel, G.** (1980) Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1496-1500.
- Boevink, P. and Oparka, K.J.** (2005) Virus-host interactions during movement processes. *Plant Physiol.* **138**, 1815-1821.
- Boiteux, L.S.** (1995) Allelic relationships between genes for resistance to *Tomato spotted wilt Tospovirus* in *Capsicum chinense*. *Theor. Appl. Genet.* **90**, 146-149.
- Boiteux, L.S. and Giordano, L.D.** (1993) Genetic-basis of resistance against 2 *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica*, **71**, 151-154.
- Bol, J.F.** (2005) Replication of *Alfamo*- and *Ilarviruses*: Role of the coat protein. *Ann. Rev. Phytopathol.* **43**, 39-62.
- Bol, J.F.** (2008) Role of capsid proteins. *Methods Mol. Biol.* **451**, 21-31.
- Bordier, C.** (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* **256**, 1604-1607.
- Borisjuk, N., Sitailo, L., Adler, K., Malysheva, L., Tewes, A., Borisjuk, L. and Manteuffel, R.** (1998) Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution. *Planta*, **206**, 504-514.
- Boutant, E., Fitterer, C., Ritzenthaler, C. and Heinlein, M.** (2009) Interaction of the *Tobacco mosaic virus* movement protein with microtubules during the cell cycle in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, **237**, 3-12.
- Boyko, V., Ferralli, J., Ashby, J., Schellenbaum, P. and Heinlein, M.** (2000) Function of microtubules in intercellular transport of plant virus RNA. *Nat. Cell. Biol.* **2**, 826-832.
- Boyko, V., Hu, Q., Seemanpillai, M., Ashby, J. and Heinlein, M.** (2007) Validation of microtubule-associated *Tobacco mosaic virus* RNA movement and involvement of microtubule-aligned particle trafficking. *Plant J.* **51**, 589-603.
- Bozarth, C.S., Weiland, J.J. and Dreher, T.W.** (1992) Expression of ORF-69 of *Turnip yellow mosaic virus* is necessary for viral spread in plants. *Virology*, **187**, 124-130.
- Brandner, K., Sambade, A., Boutant, E., Didier, P., Mély, Y., Ritzenthaler, C. and Heinlein, M.** (2008) *Tobacco mosaic virus* movement protein interacts with Green fluorescent protein- tagged microtubule end-binding protein 1. *Plant Physiol.* **147**, 611-623.
- Bransom, K.L., Weiland, J.J., Tsai, C.H. and Dreher, T.W.** (1995) Coding density of the *Turnip yellow mosaic virus* genome: roles of the overlapping coat protein and p206-readthrough coding regions. *Virology*, **206**, 403-412.

- Brill, L.M., Nunn, R.S., Kahn, T.W., Yeager, M. and Beachy, R.N.** (2000) Recombinant *Tobacco mosaic virus* movement protein is an RNA-binding, alpha-helical membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7112-7117.
- Brommonschenkel, S.H., Frary, A. and Tanksley, S.D.** (2000) The broad-spectrum *Tospovirus* resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 1130-1138.
- Buck, K.W.** (1999) Replication of *Tobacco mosaic virus* RNA. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* **354**, 613-627.
- Burdon, J.J. and Thrall, P.H.** (2003) The fitness costs to plants of resistance to pathogens. *Genome Biol.* **4**, 227.
- Bustamante, P.I. and Hull, R.** (1998) Plant virus gene expression strategies. *Electron. J. Biotech.* **1**, 65-82.
- Calder, V.L. and Palukaitis, P.** (1992) Nucleotide sequence analysis of the movement genes of resistance breaking strains of *Tomato mosaic virus*. *J. Gen. Virol.* **73**, 165-168.
- Canady, M.A., Stevens, M.R., Barineau, M.S. and Scott, J.W.** (2001) *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) resistance in tomato derived from *Lycopersicon chilense* Dun. LA 1938. *Euphytica*, **117**, 19-25.
- Canto, T. and Palukaitis, P.** (2002) Novel *N* gene-associated, temperature-independent resistance to the movement of *Tobacco mosaic virus* vectors neutralized by a *Cucumber mosaic virus* RNA1 transgene. *J. Virol.* **76**, 12908-12916.
- Canto, T. and Palukaitis, P.** (2005) Subcellular distribution of mutant movement proteins of *Cucumber mosaic virus* fused to green fluorescent proteins. *J. Gen. Virol.* **86**, 1223-1228.
- Canto, T., Prior, D.A.M., Hellwald, K.H., Oparka, K.J. and Palukaitis, P.** (1997) Characterization of *Cucumber mosaic virus*. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of *Cucumber mosaic virus*. *Virology*, **237**, 237-248.
- Cao, M., Ye, X., Willie, K., Lin, J., Zhang, X., Redinbaugh, M.G., Simon, A.E., Morris, T.J. and Qu, F.** (2010) The capsid protein of *Turnip crinkle virus* overcomes two separate defense barriers to facilitate systemic movement of the virus in *Arabidopsis*. *J. Virol.* **84**, 7793-7802.
- Carrington, J.C. and Whitham, S.A.** (1998) Viral invasion and host defense: strategies and counter-strategies. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 336-341.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K. and Schaad, M.C.** (1996) Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* **8**, 1669-1681.
- Carstens, E.B.** (2010) Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch. Virol.* **155**, 133-146.
- Carvalho, C.M., Pouwels, J., van Lent, J.W., Bisseling, T., Goldbach, R.W., Wellink, J.** (2004) The movement protein of *Cowpea mosaic virus* binds GTP and single-stranded nucleic acid *in vitro*. *J. Virol.* **78**, 1591-1594.
- Caspar, D.L.** (1963) Assembly and stability of the *Tobacco mosaic virus* particle. *Adv. Protein. Chem.* **18**, 37-121.
- Caspar, D.L. and Namba, K.** (1990) Switching in the self-assembly of *Tobacco mosaic virus*. *Adv. Biophys.* **26**, 157-185.

- Chain, F., Riault, G., Trottet, M. and Jacquot, E.** (2007) Evaluation of the durability of the *Barley yellow dwarf virus*-resistant Zhong ZH and TC14 wheat lines. *Eur. J. Plant Pathol.* **117**, 35-43.
- Chen, M.H. and Citovsky, V.** (2003) Systemic movement of a *Tobamovirus* requires host cell pectin methylesterase. *Plant J.* **35**, 386-392.
- Chen, M.H., Sheng, J., Hind, G., Handa, A.K. and Citovsky, V.** (2000) Interaction between the *Tobacco mosaic virus* movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J.* **19**, 913-920.
- Chen, M.H., Tian, G.W., Gafni, Y. and Citovsky, V.** (2005) Effects of calreticulin on viral cell-to-cell movement. *Plant Physiol.* **138**, 1866-1876.
- Cheng, N.H., Su, C.L., Carter, S.A. and Nelson, R.S.** (2000) Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of *Tobacco mosaic virus* in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* **23**, 349-362.
- Citovsky, V., Knorr, D., Schuster, G. and Zambryski, P.** (1990) The P30 movement protein of *Tobacco mosaic virus* is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell*, **60**, 637-647.
- Citovsky, V., Wong, M.L., Shaw, A.L., Prasad, B.V. and Zambryski, P.** (1992) Visualization and characterization of *Tobacco mosaic virus* movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell*, **4**, 397-411.
- Ciuffo, M., Finetti-Sialer, M.M., Gallitelli, D. and Turina, M.** (2005) First report in Italy of a resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomato cultivars carrying the *Sw5* resistance gene. *Plant Pathol.* **54**, 564.
- Codoñer, F.M., Cuevas, J.M., Sánchez-Navarro, J.A., Pallás, V. and Elena, S.F.** (2005) Molecular evolution of the plant virus family *Bromoviridae* based on RNA3-encoded proteins. *J. Mol. Evol.* **61**, 697-705.
- Collinge, D.B., Gregersen, P. and Thordal-Christensen, H.** (1994) The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In: Basra, A.S. (Ed.) *Mechanisms of plant growth and improved productivity: Modern approaches and perspectives*, Marcel Dekker, New York, 391-433.
- Conejero, V. and Semancik, J.S.** (1977) Exocortis viroid: alteration in the proteins of *Gynura aurantiaca* accompanying viroid infection. *Virology*, **77**, 221-232.
- Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T., Wang, A. and Laliberté, 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.
- Cowan, G.H., Lioliopoulou, F., Ziegler, A. and Torrance, L.** (2002) Subcellular localisation, protein interactions, and RNA binding of *Potato mop-top virus* triple gene block proteins. *Virology*, **298**, 106-115.
- Crawford, K. M. and Zambryski, P. C.** (2001) Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiol*, **125**, 1802-1812.
- Culver, J.N., Dawson, W.O., Plonk, K. and Stubbs, G.** (1995) Site-directed mutagenesis confirms the involvement of carboxylate groups in the disassembly of *Tobacco mosaic virus*. *Virology*, **206**, 724-730.
- Culver, J.N., Stubbs, G. and Dawson, W.O.** (1994) Structure-function relationship between *Tobacco mosaic virus* coat protein and hypersensitivity in *Nicotiana sylvestris*. *J. Mol. Biol.* **242**, 130-138.

- Curin, M., Ojangu, E.L., Trutnyeva, K., Llau, B., Truve, E. and Waigmann, E. (2007) MPB2C, a microtubule-associated plant factor, is required for microtubular accumulation of *Tobacco mosaic virus* movement protein in plants. *Plant Physiol.* **143**, 801-811.
- Dasgupta, R. and Kaesberg, P. (1982) Complete nucleotide sequences of the coat protein messenger RNAs of *Brome mosaic virus* and *Cowpea chlorotic mottle virus*. *Nucleic Acids Res*, **10**, 703-713.
- Dasgupta, R., Garcia, B.H. and Goodman, R.M. (2001) Systemic spread of an RNA insect virus in plants expressing plant viral movement protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4910-4915.
- Dawson, W.O., Bubrick, P. and Grantham, G.L. (1988) Modifications of the *Tobacco mosaic virus* coat protein gene affecting replication, movement, and symptomatology. *Phytopathology*, **78**, 783-789.
- de Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira Resende, R., van Poelwijk, F., Peters, D. and Goldbach, R. (1991) *Tomato spotted wilt virus* L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **72**, 2207-2216.
- de Haan, P., Wagemakers, L., Peters, D. and Goldbach, R. (1990) The S RNA segment of *Tomato spotted wilt virus* has an ambisense character. *J. Gen. Virol.* **71**, 1001-1007.
- De Jong, W., and Ahlquist, P. (1991) *Bromovirus* host specificity and systemic infection. *Semin. Virol.* **2**, 97-105.
- De Jong, W. and Ahlquist, P. (1995) Host-specific alterations in viral RNA accumulation and infection spread in a *Brome mosaic virus* isolate with an expanded host range. *J. Virol.* **69**, 1485-1492.
- De Jong, W., Chu, A. and Ahlquist, P. (1995) Coding changes in the 3a cell-to-cell movement gene can extend the host range of *Brome mosaic virus* systemic infection. *Virology*, **214**, 464-474.
- de Ronde, D., Butterbach, P., Lohuis, D., Hedil, M., van Lent, J.W.M. and Kormelink, R. (2013) *Tsw* gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the *Tomato spotted wilt virus*. *Mol. Plant Pathol.* **14**, 405-415.
- Denecke, J., Carlsson, L.E., Vidal, S., Høglund, A.S., Ek, B., van Zeijl, M.J., Sinjorgo, K.M. and Palva E.T. (1995) The tobacco homolog of mammalian calreticulin is present in protein complexes in vivo. *Plant Cell*, **7**, 391-406.
- Deom, C.M., He, X.Z., Beachy, R.N. and Weissinger, A.K. (1994) Influence of heterologous *Tobamovirus* movement protein and chimeric-movement protein genes on cell-to-cell and long-distance movement. *Virology*, **205**, 198-209.
- Desbiez, C., Gal-On, A., Girard, M., Wipf-Scheibel, C. and Lecoq, H. (2003) Increase in *Zucchini yellow mosaic virus* symptom severity in tolerant zucchini cultivars is related to a point mutation in P3 protein and is associated with a loss of relative fitness on susceptible plants. *Phytopathology*, **93**, 1478-1484.
- Desvoyes, B. and Scholthof, H.B. (2002) Host-dependent recombination of a *Tomato bushy stunt virus* coat protein mutant yields truncated capsid subunits that form virus-like complexes which benefit systemic spread. *Virology*, **304**, 434-442.
- Ding, B., Haudenschild, J.S., Hull, R.J., Wolf, S., Beachy, R.N. and Lucas, W.J. (1992) Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the *Tobacco mosaic virus* movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell*, **4**, 915-928.

- Ding, B., Kwon, M.O. and Warnberg, L.** (1996) Evidence that actin filaments are involved in controlling the permeability of plasmodesmata in tobacco mesophyll. *Plant J.* **10**, 157-164.
- Ding, B.A., Li, Q.B., Nguyen, L., Palukaitis, P. and Lucas, W.J.** (1995) *Cucumber mosaic virus* 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants. *Virology*, **207**, 345-353.
- Dolja, V.V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A. and Carrington, J.C.** (1995) Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of *Tobacco etch Potyvirus*. *Virology*, **206**, 1007-1016.
- Drugeon, G., Urcuqui-Inchima, S., Milner, M., Kadare, G., Valle, P.C.R., Voyatzakis, A., Haenni, A-L. and Schirawski, J.** (1999) The strategies of plant virus gene expression: models of economy. *Rev. Plant Sci.* **148**, 77-88.
- Durham, A.C., Hendry, D.A. and Von Wechmar, M.B.** (1977) Does calcium ion binding control plant virus disassembly? *Virology*, **77**, 524-533.
- Ehlers, K. and van Bel, A.J.** (2010) Dynamics of plasmodesmal connectivity in successive interfaces of the cambial zone. *Planta*, **231**, 371-385.
- Epel, B.L.** (2009) Plant viruses spread by diffusion on ER-associated movement-protein-rafts through plasmodesmata gated by viral induced host beta-1,3-glucanases. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 1074-1081.
- Erhardt, M., Morant, M., Ritzenthaler, C., Stussi-Garaud, C., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G., Bouzoubaa, S. and Gilmer, D.** (2000) P42 movement protein of *Beet necrotic yellow vein virus* is targeted by the movement proteins P13 and P15 to punctate bodies associated with plasmodesmata. *Mol. Plant- Microbe Interact.* **13**, 520-528.
- Erhardt, M., Stussi-Garaud, C., Guilley, H., Richards, K.E., Jonard, G. and Bouzoubaa, S.** (1999) The first triple gene block protein of *Peanut clump virus* localizes to the plasmodesmata during virus infection. *Virology*, **264**, 220-229.
- Fajardo, T.V., Peiró, A., Pallás, V., and Sánchez-Navarro, J.A.** (2013) Systemic transport of *Alfalfa mosaic virus* can be mediated by the movement proteins of several viruses assigned to five genera of the 30K family. *J. Gen. Virol.* **94**, 677-681.
- Fenczik, C.A., Padgett, H.S., Holt, C.A., Casper, S.J. and Beachy, R.N.** (1995) Mutational analysis of the movement protein of *Odontoglossum ringspot virus* to identify a host-range determinant. *Mol. Plant- Microbe Interact.* **8**, 666-673.
- Feng, Z., Chen, X., Bao, Y., Dong, J., Zhang, Z. and Tao, X.** (2013) Nucleocapsid of *Tomato spotted wilt Tospovirus* forms mobile particles that traffic on an actin/endoplasmic reticulum network driven by myosin XI-K. *New Phytol.* **200**, 1212-1224.
- Fernández-Calvino, L., Faulkner, C., Walshaw, J., Saalbach, G., Bayer, E., Benítez-Alfonso, Y. and Maule, A.** (2011a) *Arabidopsis* plasmodesmal proteome. *PLoS One*, **6**, e18880.
- Fernández-Calviño, L., Faulkner, C., and Maule, A.** (2011b) Plasmodesmata as active conduits for virus cell-to-cell Movement. In *Recent Advances in Plant Virology*. Edited by Carole Caranta, Miguel A. Aranda, Mark Tepfer and Juan Jose López-Moya. Caister Academic Press.

- Ferralli, J., Ashby, J., Fasler, M., Boyko, V. and Heinlein, M.** (2006) Disruption of microtubule organization and centrosome function by expression of *Tobacco mosaic virus* movement protein. *J. Virol.* **80**, 5807-5821.
- Firth, A.E. and Brierley, I.** (2012) Non-canonical translation in RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **93**, 1385-1409.
- Fisher, D.B. and Oparka, K.J.** (1996) Post-phloem transport: principles and problems. *J. Exp. Bot.* **47** Spec No, 1141-1154.
- Fitzgibbon, J., Bell, K., King, E. and Oparka, K.** (2010) Super-resolution imaging of plasmodesmata using three-dimensional structured illumination microscopy. *Plant Physiol.* **153**, 1453-1463.
- Flor, H.H.** (1971) Current Status of Gene-For-Gene Concept. *Ann. Rev. Phytopathol.* **9**, 275-296.
- Fraile, A. and Garcia-Arenal, F.** (2010) The coevolution of plants and viruses: resistance and pathogenicity. *Adv. Virus Res.* **76**, 1-32.
- Fraile, A., Pagan, I., Anastasio, G., Saez, E. and Garcia-Arenal, F.** (2011) Rapid genetic diversification and high fitness penalties associated with pathogenicity evolution in a plant virus. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 1425-1437.
- Fraser, R.S.S.** (1990) The genetics of resistance to plant-viruses. *Ann. Rev. Phytopathol.* **28**, 179-200.
- Fridborg, I., Grainger, J., Page, A., Coleman, M., Findlay, K. and Angell, S.** (2003) TIP, a novel host factor linking callose degradation with the cell-to-cell movement of *Potato virus X*. *Mol. Plant- Microbe Interact.* **16**, 132-140.
- Fujiki, M., Kawakami, S., Kim, R.W. and Beachy, R.N.** (2006) *Domains of Tobacco mosaic virus* movement protein essential for its membrane association. *J. Gen. Virol.* **87**, 2699-2770.
- Fujita, M., Mise, K., Kajiura, Y., Dohi, K. and Furusawa, I.** (1998) Nucleic acid-binding properties and subcellular localization of the 3a protein of *Brome mosaic Bromovirus*. *J. Gen. Virol.* **79**, 1273-1280.
- Fujita, Y., Mise, K., Okuno, T., Ahlquist, P. and Furusawa, I.** (1996) A single codon change in a conserved motif of a Bromovirus movement protein gene confers compatibility with a new host. *Virology*, **223**, 283-291.
- Gafvelin, G., Sakaguchi, M., Andersson, H. and von Heijne, G.** (1997) Topological rules for membrane protein assembly in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 6119-6127.
- Genovés, A., Navarro, J.A. and Pallás, V.** (2006) Functional analysis of the five *Melon necrotic spot virus* genome-encoded proteins. *J. Gen. Virol.* **87**, 2371-2380.
- Genovés, A., Navarro, J.A. and Pallás, V.** (2009) A self-interacting *Carmovirus* movement protein plays a role in binding of viral RNA during the cell-to-cell movement and shows an actin cytoskeleton dependent location in cell periphery. *Virology*, **395**, 133-142.
- Genovés, A., Navarro, J.A. and Pallás, V.** (2010) The intra- and intercellular movement of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) depends on an active secretory pathway. *Mol. Plant- Microbe Interact.* **23**, 263-272.
- Genovés, A., Pallás, V. and Navarro, J.A.** (2011) Contribution of topology determinants of a viral movement protein to its membrane association, intracellular traffic, and viral cell-to-cell movement. *J. Virol.* **85**, 7797-7809.

- Gibbs, A. J.** (1976) Viruses and plasmodesmata. *Intercellular Communication in Plants Studies on Plasmodesmata*, 149-164.
- Giesman-Cookmeyer, D., Silver, S., Vaewhongs, A.A., Lommel, S.A. and Deom, C.M.** (1995) *Tobamovirus* and *Dianthovirus* movement proteins are functionally homologous. *Virology*, **213**, 38-45.
- Gietz, R.D. and Woods, R.A.** (2002) Transformation of yeast by Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Methods Enzymol.* **350**, 87-96.
- Gilbertson, R.L. and Lucas, W.J.** (1996) How do viruses traffic on the vascular highway? *Trends Plant Sci.* **1**, 260-268.
- Goder, V. and Spiess, M.** (2001) Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS letters*, **504**, 87-93.
- Goder, V. and Spiess, M.** (2003) Molecular mechanism of signal sequence orientation in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **22**, 3645-3653.
- Gómez, G. and Pallás, V.** (2001) Identification of an in vitro ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 910-913.
- Gómez, G. and Pallás, V.** (2004) A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with *Hop stunt viroid* RNA. *J. Virol.* **78**, 10104-10110.
- Gómez, G. and Pallás, V.** (2013) Viroids: a light in the darkness of the lncRNA-directed regulatory networks in plants. *New phytol.* **198**, 10-15.
- Gómez, G., Torres, H. and Pallás, V.** (2005) Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. *Plant J.* **41**, 107-116.
- Goodrick, B.J., Kuhn, C.W. and Hussey, R.S.** (1991) Restricted systemic movement of *Cowpea chlorotic mottle virus* in soybean with nonnecrotic resistance. *Phytopathology*, **81**, 1426-1431.
- Gordillo, L.F., Stevens, M.R., Millard, M.A. and Geary, B.** (2008) Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Dis.* **92**, 694-704.
- Gorshkova, E.N., Erokhina, T.N., Stroganova, T.A., Yelina, N.E., Zamyatnin, A.A., Kalinina, N.O., Schiemann J., Solovyev A.G. and Morozov S.Y.** (2003) Immunodetection and fluorescent microscopy of transgenically expressed *Hordeivirus* TGBp3 movement protein reveals its association with endoplasmic reticulum elements in close proximity to plasmodesmata. *J. Gen. Virol.* **84**, 985-994.
- Gosalvez-Bernal, B., Genovés, A., Navarro, J.A., Pallás, V. and Sanchez-Pina, M.A.** (2008) Distribution and pathway for phloem-dependent movement of *Melon necrotic spot virus* in melon plants. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 447-461.
- Goulden, M.G., Kohm, B.A., Cruz, S.S., Kavanagh, T.A. and Baulcombe, D.C.** (1993) A feature of the coat protein of *Potato virus-x* affects both induced virus-resistance in potato and viral fitness. *Virology*, **197**, 293-302.
- Griffing, L.R.** (2010) Networking in the endoplasmic reticulum. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 747-753.
- Hacker, D.L., Petty, I.T., Wei, N. and Morris, T.J.** (1992) *Turnip crinkle virus* genes required for RNA replication and virus movement. *Virology*, **186**, 1-8.



- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D.** (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* **21**, 4671-4679.
- Hammerschmidt, R. and Dann, E.K.** (1999) The role of phytoalexins in plant protection. *Novartis Found. Symp.* **223**, 175-187.
- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.** (1997) Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 575-607.
- Hanada, K. and Harrison, B.D.** (1977) Effects of virus genotype and temperature on seed transmission of *Nepo-viruses*. *Ann. Appl. Biol.* **85**, 79-92.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S.B. and Robertson, D.** (2004) Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to *Geminivirus* DNA replication. *Mol. Plant Pathol.* **5**, 149-156.
- Harries, P.A., Palanichelvam, K., Yu, W., Schoelz, J.E. and Nelson, R.S.** (2009a) The *Cauliflower mosaic virus* protein P6 forms motile inclusions that traffic along actin microfilaments and stabilize microtubules. *Plant Physiol.* **149**, 1005-1016.
- Harries, P.A., Park, J.W., Sasaki, N., Ballard, K.D., Maule, A.J. and Nelson, R.S.** (2009b) Differing requirements for actin and myosin by plant viruses for sustained intercellular movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 17594-17599.
- Haupt, S., Cowan, G.H., Ziegler, A., Roberts, A.G., Oparka, K.J. and Torrance, L.** (2005) Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic recycling pathway. *Plant Cell*, **17**, 164-181.
- Heath, M.C.** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* **44**, 321-334.
- Hedin, L.E., Ojemalm, K., Bernsel, A., Hennerdal, A., Illergard, K., Enquist, K., Kauko, A., Cristobal, S., von Heijne, G., Lerch-Bader, M., Nilsson, I. and Elofsson, A. K.** (2010) Membrane insertion of marginally hydrophobic transmembrane helices depends on sequence context. *J. Mol. Biol.* **396**, 221-229.
- Heinlein, M., Epel, B.L., Padgett, H.S. and Beachy, R.N.** (1995) Interaction of *Tobamovirus* movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science*, **270**, 1983-1985.
- Heinlein, M., Padgett, H.S., Gens, J.S., Pickard, B.G., Casper, S.J., Epel, B.L. and Beachy, R. N.** (1998) Changing patterns of localization of the *Tobacco mosaic virus* movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell*, **10**, 1107-1120.
- Herbers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, H.P., Hajirezaei, M. and Sonnewald, U.** (2000) Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of *Potato virus Y* with tobacco. *Mol. Plant Pathol.* **1**, 51-59.
- Herranz, M.C. and Pallás, V.** (2004) RNA-binding properties and mapping of the RNA-binding domain from the movement protein of *Prunus necrotic ringspot virus*. *J. Gen. Virol.* **85**, 761-768.
- Herranz, M.C., Pallás, V. and Aparicio, F.** (2012) Multifunctional roles for the N-terminal basic motif of *Alfalfa mosaic virus* coat protein: nucleolar/cytoplasmic shuttling, modulation of RNA-binding activity and virion formation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **25**, 1093-1103.
- Herranz, M.C., Sánchez-Navarro, J.A., Sauri, A., Mingarro, I. and Pallás, V.** (2005) Mutational analysis of the RNA-binding domain of the *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) movement protein reveals its requirement for cell-to-cell movement. *Virology*, **339**, 31-41.

- Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S.H. and von Heijne, G. (2005) Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature*, **433**, 377-381.
- Hessa, T., Meindl-Beinker, N.M., Bernsel, A., Kim, H., Sato, Y., Lerch-Bader, M., Nilsson, I., White, S.H. and von Heijne, G. (2007) Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon. *Nature*, **450**, 1026-1030.
- Hoffmann, K., Qiu, W.P. and Moyer, J.W. (2001) Overcoming host- and pathogen-mediated resistance in tomato and tobacco maps to the M RNA of *Tomato spotted wilt virus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 242-249.
- Hofius, D., Herbers, K., Melzer, M., Omid, A., Tacke, E., Wolf, S., and Sonnewald, U. (2001) Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the *Potato leafroll virus* movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant J.* **28**, 529-543.
- Hofmann, C., Niehl, A., Sambade, A., Steinmetz, A. and Heinlein, M. (2009) Inhibition of *Tobacco mosaic virus* movement by expression of an actin-binding protein. *Plant Physiol.* **149**, 1810-1823.
- Hofmann, C., Sambade, A. and Heinlein, M. (2007) PD and intercellular transport of viral RNA. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 142-145.
- Holt, C.A. and Beachy, R.N. (1991) *In vivo* complementation of infectious transcripts from mutant *Tobacco mosaic virus* cDNAs in transgenic plants. *Virology*, **181**, 109-117.
- Howard, A.R., Heppler, M.L., Ju, H.J., Krishnamurthy, K., Payton, M. E. and Verchot-Lubicz, J. (2004) *Potato virus X* TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves. *Virology*, **328**, 185-197.
- Hsu, H.T., Chou, Y.L., Tseng, Y.H., Lin, Y.H., Lin, T.M., Lin, N.S., Hsu, Y.H. and Chang, B.Y. (2008) Topological properties of the triple gene block protein 2 of *Bamboo mosaic virus*. *Virology*, **379**, 1-9.
- Hsu, H.T., Tseng, Y.H., Chou, Y.L., Su, S.H., Hsu, Y.H. and Chang, B.Y. (2009) Characterization of the RNA-binding properties of the triple-gene-block protein 2 of *Bamboo mosaic virus*. *Virol. J.* **6**, 50.
- Hu, C.D., Chinenov, Y. and Kerppola, T.K. (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell*, **9**, 789-798.
- Huang, M., Jongejan, L., Zheng, H., Zhang, L. and Bol, J.F. (2001) Intracellular localization and movement phenotypes of *Alfalfa mosaic virus* movement protein mutants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 1063-1074.
- Huang, Z., Han, Y. and Howell, S.H. (2000) Formation of surface tubules and fluorescent foci in *Arabidopsis thaliana* protoplasts expressing a fusion between the green fluorescent protein and the *Cauliflower mosaic virus* movement protein. *Virology*, **271**, 58-64.
- Hutcheson, S.W. (1998) Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 59-90.
- Hwang, Y.T., McCartney, A.W., Gidda, S.K. and Mullen, R.T. (2008) Localization of the *Carnation italian ringspot virus* replication protein p36 to the mitochondrial

- outer membrane is mediated by an internal targeting signal and the TOM complex. *BMC Cell Biol.* **9**, 54.
- Iglesias, V.A. and Meins, F.Jr.** (2000) Movement of plant viruses is delayed in a beta-1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *Plant J.* **21**, 157-166.
- Inoue, T., Moore, P. and Tsai, B.** (2011) How viruses and toxins disassemble to enter host cells. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 287-305.
- Ishikawa, M., and and Okada, Y.** (2004) Replication of *Tobamovirus* RNA. *Proc. Jpn. Acad.* **80**, 215-224.
- Isogai, M. and Yoshikawa, N.** (2005) Mapping the RNA-binding domain on the *Apple chlorotic leaf spot virus* movement protein. *J. Gen. Virol.* **86**, 225-229.
- Itaya, A., Woo, Y.M., Masuta, C., Bao, Y., Nelson, R.S. and Ding, B.** (1998) Developmental regulation of intercellular protein trafficking through plasmodesmata in tobacco leaf epidermis. *Plant Physiol.* **118**, 373-385.
- Iwanowski, D.** (1892) Concerning the mosaic disease of the tobacco plant. *St. Petersburg Acad. Imp. Sci. Bul.* **35**, 67-70.
- Jeffrey, J.L., Poorna, W. and Petty, I.T.** (1996) Genetic requirements for local and systemic movement of *Tomato golden mosaic virus* in infected plants. *Virology*, **223**, 208-218.
- Jenner, C.E., Wang, X., Ponz, F. and Walsh, J.A.** (2002) A fitness cost for *Turnip mosaic virus* to overcome host resistance. *Virus Res.* **86**, 1-6.
- Jia, X.Y., He, L.H., Jing, R.L. and Li, R.Z.** (2009) Calreticulin: conserved protein and diverse functions in plants. *Physiol. Plant*, **136**, 127-138.
- Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J. and Jones, J.D.** (1994) Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*, **266**, 789-793.
- Jones, J.D.** (2001) Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 281-287.
- Ju, H.J., Samuels, T.D., Wang, Y.S., Blancaflor, E., Payton, M., Mitra, R., Krishnamurthy, K., Nelson, R.S. and Verchot-Lubicz, J.** (2005) The *Potato virus X* TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum-derived vesicles during virus infection. *Plant Physiol.* **138**, 1877-1895.
- Kaido, M., Inoue, Y., Takeda, Y., Takeda, A., Mori, M., Tamai, A., Meshi, T., Okuno, T. and Mise, K.** (2007) Downregulation of the *NbNACa1* gene encoding a movement-protein-interacting protein reduces cell-to-cell movement of *Brome mosaic virus* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**, 671-681.
- Kalinina, N.O., Rakitina, D.A., Yelina, N.E., Zamyatnin, A.A.Jr., Stroganova, T.A., Klinov, D.V., Prokhorov, V.V., Ustinova, S.V., Chernov, B.K., Schiemann, J., Solovyev, A.G. and Morozov, S.Y.** (2001) RNA-binding properties of the 63 kDa protein encoded by the triple gene block of *Poa semilatent Hordeivirus*. *J. Gen. Virol.* **82**, 2569-2578.
- Kalinina, N.O., Rakitina, D.V., Solovyev, A.G., Schiemann, J. and Morozov, S.Y.** (2002) RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the triple gene block. *Virology*, **296**, 321-329.

- Karasev, A.V., Kashina, A.S., Gelfand, V.I. and Dolja, V.V.** (1992) HSP70-related 65 kDa protein of *Beet yellows Closterovirus* is a microtubule-binding protein. *FEBS letters*, **304**, 12-14.
- Karpova, O.V., Ivanov, K.I., Rodionova, N.P., Dorokhov Yu, L. and Atabekov, J.G.** (1997) Nontranslatability and dissimilar behavior in plants and protoplasts of viral RNA and movement protein complexes formed *in vitro*. *Virology*, **230**, 11-21.
- Karpova, O.V., Rodionova, N.P., Ivanov, K.I., Kozlovsky, S.V., Dorokhov, Y.L. and Atabekov, J.G.** (1999) Phosphorylation of *Tobacco mosaic virus* movement protein abolishes its translation repressing ability. *Virology*, **261**, 20-24.
- Karpova, O.V., Zayakina, O.V., Arkhipenko, M.V., Sheval, E.V., Kiselyova, O.I., Poljakov, V.Y., Yaminsky, I.V., Rodionova, N.P. and Atabekov, J.G.** (2006) *Potato virus X* RNA-mediated assembly of single-tailed ternary 'coat protein-RNA-movement protein' complexes. *J.Gen.Virol.* **87**, 2731-2740.
- Kasteel, D., Wellink, J., Verver, J., Van Lent, J., Goldbach, R. and van Kammen, A.** (1993) The involvement of *Cowpea mosaic virus* M RNA-encoded proteins in tubule formation. *J. Gen. Virol.* **74**, 1721-1724.
- Kasteel, D.T., van der Wel, N.N., Jansen, K.A., Goldbach, R.W. and van Lent, J.W.** (1997) Tubule-forming capacity of the movement proteins of *Alfalfa mosaic virus* and *Brome mosaic virus*. *J. Gen. Virol.* **78**, 2089-2093.
- Kawakami, S., Watanabe, Y. and Beachy, R.N.** (2004) *Tobacco mosaic virus* infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6291-6296.
- Kempers, R. and van Bel, A.J.E.** (1997) Symplasmic connections between sieve element and companion cell in the ítem phoem of *Vicia faba* have a molecular exclusion limit of at least 10 kDa. *Planta*, **201**, 195-201.
- Kempers, R., Prior, D.A.M., van Bel, A.J.E. and Oparka, K.J.** (1993) Plasmodesmata between sieve elements and companion cell of extrafascicular phoem of *Cucurbita maxima* permit passage of 3 KDA fluorescent proves. *Plant J.* **4**, 567-575.
- Kerppola, T.K.** (2008) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 465-487.
- Kleinow, T., Nischang, M., Beck, A., Kratzer, U., Tanwir, F., Preiss, W., Kepp, G. and Jeske, H.** (2009) Three C-terminal phosphorylation sites in the *Abutilon mosaic virus* movement protein affect symptom development and viral DNA accumulation. *Virology*, **390**, 89-101.
- Koonin, E.V., Mushegian, A.R. Ryabov, E.V. and Dolja, V.V.** (1991) Diverse groups of plant RNA and DNA viruses share related movement proteins that may possess chaperone-like activity. *J. Gen. Virol.* **72**, 2895-2903.
- Kormelink, R., Garcia, M.L., Goodin, M., Sasaya, T. and Haenni, A.L.** (2011) Negative-strand RNA viruses: the plant-infecting counterparts. *Virus Res.* **162**, 184-202.
- Kragler, F., Curin, M., Trutnyeva, K., Gansch A. and Waigmann, E.** (2003) MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of *Tobacco mosaic virus* movement protein. *Plant Physiol.* **132**, 1870-1883.

- Krenz, B., Windeisen, V., Wege, C., Jeske, H. and Kleinow, T.** (2010) A plastid-targeted heat shock cognate 70kDa protein interacts with the *Abutilon mosaic virus* movement protein. *Virology*, **401**, 6-17.
- Krishnamurthy, K., Heppler, M., Mitra, R., Blancaflor, E., Payton, M., Nelson, R.S., and Verchot-Lubicz, J.** (2003) The *Potato virus X* TGBp3 protein associates with the ER network for virus cell-to-cell movement. *Virology*, **309**, 135-151.
- Kuhn, C.W.** (1964) Purification, serology and properties of a new cowpea virus. *Phytopathology*, **54**, 853-857.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laliberté, J.F. and Sanfaçon, H.** (2010) Cellular remodeling during plant virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**, 69-91.
- Lamb, C. and Dixon, R.A.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 251-275.
- Lanfermeijer, F.C., Dijkhuis, J., Sturre, M.J.G., de Haan, P. and Hille, J.** (2003) Cloning and characterization of the durable *Tomato mosaic virus* resistance gene *Tm-2(2)* from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Mol. Biol.* **52**, 1037-1049.
- Laporte, C., Vetter, G., Loudes, A.M., Robinson, D.G., Hillmer, S., Stussi-Garaud, C., and Ritzenthaler, C.** (2003) Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of *Grapevine fanleaf virus* movement protein in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell*, **15**, 2058-2075.
- Latham, L.J. and Jones, R.A.C.** (1998) Selection of resistance breaking strains of *Tomato spotted wilt* *Tospovirus*. *Ann. Appl. Biol.* **133**, 385-402.
- Lawrence, D.M. and Jackson, A.O.** (2001) Interactions of the TGB1 protein during cell-to-cell movement of *Barley stripe mosaic virus*. *J. Virol.* **75**, 8712-8723.
- Lazarowitz, S.G.** (1999) Probing plant cell structure and function with viral movement proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 332-338.
- Lazarowitz, S.G. and Beachy, R.N.** (1999) Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell*, **11**, 535-548.
- Leathers, V., Tanguay, R., Kobayashi, M. and Gallie, D.R.** (1993) A phylogenetically conserved sequence within viral 3' untranslated RNA pseudoknots regulates translation. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5331-5347.
- Lee, J.Y., Taoka, K., Yoo, B.C., Ben-Nissan, G., Kim, D.J. and Lucas, W.J.** (2005) Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and Arabidopsis recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *Plant Cell*, **17**, 2817-2831.
- Lee, J.Y., Yoo, B.C., Rojas, M.R., Gómez-Ospina, N., Staehelin, L.A. and Lucas, W.J.** (2003) Selective trafficking of non-cell-autonomous proteins mediated by NtNCAPP1. *Science*, **299**, 392-396.
- Lee, L., Palukaitis, P. and Gray, S.M.** (2002) Host-dependent requirement for the *Potato leafroll virus* 17-kDa protein in virus movement. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**, 1086-1094.
- Leisner, S.M. and Turgeon, R.** (1993) Movement of virus and photoassimilate in the phloem: a comparative analysis. *BioEssays*, **15**, 741-748.
- Leisner, S.M., Turgeon, R. y Howell, S.H.** (1992) Long-distance movement of *Cauliflower mosaic virus* in infected Turnip plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**, 41-47.

- Lekkerkerker, A., Wellink, J., Yuan, P., vanLent, J., Goldbach, R. and vanKammen, A. V.** (1996) Distinct functional domains in the *Cowpea mosaic virus* movement protein. *J. Virol.* **70**, 5658-5661.
- Lewandowski, D.J. and Adkins, S.** (2005) The tubule-forming NSm protein from *Tomato spotted wilt virus* complements cell-to-cell and long-distance movement of *Tobacco mosaic virus* hybrids. *Virology*, **342**, 26-37.
- Lewis, J.D. and Lazarowitz, S.G.** (2010) Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2491–2496.
- Li, Q. and Palukaitis, P.** (1996) Comparison of the nucleic acid- and NTP-binding properties of the movement protein of *Cucumber mosaic Cucumovirus* and *Tobacco mosaic Tobamovirus*. *Virology*, **216**, 71-79.
- Li, W., Lewandowski, D.J., Hilf, M.E. and Adkins, S.** (2009) Identification of domains of the *Tomato spotted wilt virus* NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology*, **390**, 110-121.
- Li, W.Z., Qu, F. and Morris, T.J.** (1998) Cell-to-cell movement of *Turnip crinkle virus* is controlled by two small open reading frames that function in trans. *Virology*, **244**, 405-416.
- Lim, H.S., Bragg, J.N., Ganesan, U., Lawrence, D.M., Yu, J., Isogai, M., Hammond, J. and Jackson, A.O.** (2008) Triple gene block protein interactions involved in movement of *Barley stripe mosaic virus*. *J. Virol.* **82**, 4991-5006.
- Lin, M.K., Chang, B.Y., Liao, J.T., Lin, N.S. and Hsu, Y.H.** (2004) Arg-16 and Arg-21 in the N-terminal region of the triple-gene-block protein 1 of *Bamboo mosaic virus* are essential for virus movement. *J. Gen. Virol.* **85**, 251-259.
- Liou, D.Y., Hsu, Y.H., Wung, C.H., Wang, W.H., Lin, N.S. and Chang, B.Y.** (2000) Functional analyses and identification of two arginine residues essential to the ATP-utilizing activity of the triple gene block protein 1 of *Bamboo mosaic Potexvirus*. *Virology*, **277**, 336-344.
- Liu, H., Lucy, A.P., Davies, J.W. and Boulton, M.I.** (2001) A single amino acid change in the coat protein of *Maize streak virus* abolishes systemic infection, but not interaction with viral DNA or movement protein. *Mol. Plant Pathol.* **2**, 223-228.
- Liu, J.Z., Blancaflor, E.B. and 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.
- Liu, L., Pinner, M.S., Davies, J.W. and Stanley, J.** (1999) Adaptation of the *Geminivirus Bean yellow dwarf virus* to dicotyledonous hosts involves both virion-sense and complementary-sense genes. *J. Gen. Virol.* **80**, 501-506.
- Loesch-Fries, L.S., Halk, E.L., Nelson, S.E., Krahn, K.J.,** (1985) Human leukocyte interferon does not inhibit *Alfalfa mosaic virus* in protoplasts or tobacco tissue. *Virology*, **143**, 626 – 629.
- López, C., Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Nuez, F. and Rubio, L.** (2011) Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *J. Gen. Virol.* **92**, 210-215.
- Lough, T.J., Emerson, S.J., Lucas, W.J. and Forster, R.L.S.** (2001) Trans-complementation of long-distance movement of *White clover mosaic virus* triple

- gene block (TGB) mutants: Phloem-associated movement of TGBp1. *Virology*, **288**, 18-28.
- Lough, T.J., Netzler, N.E., Emerson, S.J., Sutherland, P., Carr, F., Beck, D.L., Lucas, W.J. and Forster, R.L.** (2000) Cell-to-cell movement of *Potexviruses*: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 962-974.
- Lough, T.J., Shash, K., Xoconostle-Cazares, B., Hofstra, K.R., Beck, D.L., Balmori, E., Forster, R.I. and Lucas, W.J.** (1998) Molecular dissection of the mechanism by which *Potexvirus* triple gene block proteins mediate cell-to-cell transport of infectious RNA. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 801-814.
- Love, A.J., Yun, B.W., Laval, V., Loake, G.J. and Milner, J.J.** (2005) *Cauliflower mosaic virus*, a compatible pathogen of Arabidopsis, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. *Plant Physiol.* **139**, 935-948.
- Luby-Phelps, K.** (2000) Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int. Rev. Cytol.* **192**, 189-221.
- Lucas, W.J.** (2006) Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*, **344**, 169-184.
- Lukashina, E., Badun, G., Fedorova, N., Ksenofontov, A., Nemykh, M., Serebryakova, M., Mukhamedzhanova, A., Karpova, O., Rodionova, N., Baratova, L. and Dobrov, E.** (2009) Tritium planigraphy study of structural alterations in the coat protein of *Potato virus X* induced by binding of its triple gene block 1 protein to virions. *FEBS J.* **276**, 7006-7015.
- Lukhovitskaya, N.I., Yelina, N.E., Zamyatnin, A.A.Jr., Schepetilnikov, M.V., Solovyev, A.G., Sandgren, M., Morozov, S.Y., Valkonen, J.P. and Savenkov, E.I.** (2005) Expression, localization and effects on virulence of the cysteine-rich 8 kDa protein of *Potato mop-top virus*. *J. Gen. Virol.* **86**, 2879-2889.
- Maia, I.G., Seron, K., Haenni, A.L. and Bernardi, F.** (1996) Gene expression from viral RNA genomes. *Plant Mol. Biol.* **32**, 367-391.
- Makarov, V.V., Rybakova, E.N., Efimov, A.V., Dobrov, E.N., Serebryakova, M.V., Solovyev, A.G., Yaminsky, I.V., Taliansky M.E., Morozov S.Y., Kalinina N.O.** (2009) Domain organization of the N-terminal portion of *Hordeivirus* movement protein TGBp1. *J. Gen. Virol.* **90**, 3022-3032.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F. and Raskin, I.** (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, **250**, 1002-1004.
- Malysenko, S.I., Kondakova, A., Talianski, M.E. and Atabekov, J.G.** (1989) Plant virus transport function: complementation by helper virus is non-specific. *J. Gen. Virol.* **70**, 2751-2758.
- Malysenko, S.I., Lapchic, L.G., Kondakova, A., Kuznetzova, L.L., Taliansky, M.E. and Atabekov, J.G.** (1988) *Red clover mottle Comovirus* B-RNA spreads between cells in *Tobamovirus*-infected tissues. *J. Gen. Virol.* **69**, 407-412.
- Marcos, J.F., Vilar, M., Pérez-Paya, E. and Pallás, V.** (1999) *In vivo* detection, RNA-binding properties and characterization of the RNA-binding domain of the p7 putative movement protein from *Carnation mottle Carmovirus* (CarMV). *Virology*, **255**, 354-365.

- Margaria, P., Ciuffo, M. and Turina, M.** (2004) Resistance breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* (*Tospovirus*; *Bunyaviridae*) on resistant pepper cultivars in Almeria, Spain. *Plant Pathol.* **53**, 795-795.
- Margaria, P., Ciuffo, M., Pacifico, D. and Turina, M.** (2007) Evidence that the nonstructural protein of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the interaction with resistant pepper carrying the TSW gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**, 547-558.
- Martínez Gil, L.** (2009) Tesis doctoral. Estudio estructural y funcional de proteínas de movimiento viral de virus de plantas. Universitat de València.
- Martínez-Gil, L., Johnson, A.E. and Mingarro, I.** (2010) Membrane insertion and biogenesis of the *Turnip crinkle virus* p9 movement protein. *J. Virol.* **84**, 5520-5527.
- Martínez-Gil, L., Pérez-Gil, J. and Mingarro, I.** (2008) The surfactant peptide KL4 sequence is inserted with a transmembrane orientation into the endoplasmic reticulum membrane. *Biophys. J.* **95**, L36-38.
- Martínez-Gil, L., Sánchez-Navarro, J.A., Cruz, A., Pallás, V., Pérez-Gil, J. and Mingarro, I.** (2009) Plant virus cell-to-cell movement is not dependent on the transmembrane disposition of its movement protein. *J. Virol.* **83**, 5535-5543.
- Martínez-Gil, L., Sauri, A., Vilar, M., Pallás, V. and Mingarro, I.** (2007) Membrane insertion and topology of the p7B movement protein of *Melon Necrotic Spot Virus* (MNSV). *Virology*, **367**, 348-357.
- Mas, P. and Beachy, R.N.** (1999) Replication of *Tobacco mosaic virus* on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *J. Cell Biol.* **147**, 945-958.
- Mas, P. and Pallás, V.** (1995) Non-isotopic tissue-printing hybridization: a new technique to study long-distance plant virus movement. *J. Virol. Methods*, **52**, 317-326.
- Mas, P. and Pallás, V.** (1996) Long-distance movement of *Cherry leaf roll virus* in infected tobacco plants. *J. Gen. Virol.* **77**, 531-540.
- Matsushita, Y., Deguchi, M., Youda, M., Nishiguchi, M. and Nyunoya, H.** (2001) The *Tomato mosaic Tobamovirus* movement protein interacts with a putative transcriptional coactivator KELP. *Mol. Cells*, **12**, 57-66.
- Matsushita, Y., Miyakawa, O., Deguchi, M., Nishiguchi, M. and Nyunoya, H.** (2002) Cloning of a tobacco cDNA coding for a putative transcriptional coactivator MBF1 that interacts with the *Tomato mosaic virus* movement protein. *J. Exp. Botany*, **53**, 1531-1532.
- Matsushita, Y., Ohshima, M., Yoshioka, K., Nishiguchi, M. and Nyunoya, H.** (2003) The catalytic subunit of protein kinase CK2 phosphorylates in vitro the movement protein of *Tomato mosaic virus*. *J. Gen. Virol.* **84**, 497-505.
- Maule, A., Leh, V. and Lederer, C.** (2002) The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 279-284.
- Maule, A.J., Benitez-Alfonso, Y., Faulkner, C.** (2011) Plasmodesmata - membrane tunnels with attitude. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 683-690.
- Mayer, A.** (1886) Concerning the mosaic disease of tobacco. *Die Landwirtschaftliche Versuchsstationen*, **32**, 451-467.
- McKinney, H.H., Fellows, H. and Johnston, C.O.** (1942) Mosaic of *Bromus inermis*. *Phytopathology*, **32**, 331.



- McLean, B.G., Zupan, J. and Zambryski, P.C.** (1995) *Tobacco mosaic virus* movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell*, **7**, 2101-2114.
- Melcher, U.** (1990) Similarities between putative transport proteins of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **71**, 1009-1018.
- Melcher, U.** (2000) The 30K superfamily of viral movement proteins. *J. Gen. Virol.* **81**, 257-266.
- Meshi, T., Motoyoshi, F., Adachi, A., Watanabe, Y., Takamatsu, N. and Okada, Y.** (1988) 2 concomitant base substitutions in the putative replicase genes of *Tobacco mosaic-virus* confer the ability to overcome the effects of a tomato resistance gene, *tm-1*. *Embo J.* **7**, 1575-1581.
- Meshi, T., Motoyoshi, F., Maeda, T., Yoshiwoka, S., Watanabe, H. and Okada, Y.** (1989) Mutations in the *Tobacco mosaic virus* 30-kD protein gene overcome *Tm-2* resistance in tomato. *Plant Cell*, **1**, 515-522.
- Mestre, P., Brigneti, G., Durrant, M.C. and Baulcombe, D. C.** (2003) *Potato virus Y* Nla protease activity is not sufficient for elicitation of Ry-mediated disease resistance in potato. *Plant J.* **36**, 755-761.
- Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B.W. and Young, N.D.** (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.* **20**, 317-332.
- Miller, W.A. and Koev, G.** (2000) Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology*, **273**, 1-8.
- Milne, R.G. and Francki, R.I.** (1984) Should *Tomato spotted wilt virus* be considered as a possible member of the family *Bunyaviridae*? *Intervirology*, **22**, 72-76.
- Mise, K. and Ahlquist, P.** (1995) Host-specificity restriction by *Bromovirus* cell-to-cell movement protein occurs after initial cell-to-cell spread of infection in nonhost plants. *Virology*, **206**, 276-286.
- Mise, K., Allison, R.F., Janda, M. and Ahlquist, P.** (1993) *Bromovirus* movement protein genes play a crucial role in host specificity. *J. Virol.* **67**, 2815-2823.
- Moissiard, G. and Voinnet, O.** (2004) Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol. Plant Pathol.* **5**, 71-82.
- Moore, P.J., Fenczik, C.A., Deom, C.M. and Beachy, R.N.** (1992) Developmental-changes in plasmodesmata in transgenic tobacco expressing the movement protein of *Tobacco mosaic-virus*. *Protoplasma*, **170**, 115-127.
- Moreno, I.M., Bernal, J.J., Garcia de Blas, B., Rodriguez-Cerezo, E. and Garcia-Arenal, F.** (1997) The expression level of the 3a movement protein determines differences in severity of symptoms between two strains of *Tomato aspermy Cucumovirus*. *Mol. Plant- Microbe Interact.* **10**, 171-179.
- Moreno, I.M., Thompson, J.R. and Garcia-Arenal, F.** (2004) Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by *Cucumber green mottle mosaic virus*. *J. Gen. Virol.* **85**, 749-759.
- Morozov, S.Y. and Solovyev, A.G.** (2003) Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *J. Gen. Virol.* **84**, 1351-1366.
- Morozov, S.Y., Fedorkin, O.N., Juttner, G., Schiemann, J., Baulcombe, D.C. and Atabekov, J.G.** (1997) Complementation of a *Potato virus X* mutant mediated by

- bombardment of plant tissues with cloned viral movement protein genes. *J. Gen. Virol.* **78**, 2077-2083.
- Moury, B., Selassie, K.G., Marchoux, G., Daubeze, A.M. and Palloix, A.** (1998) High temperature effects on hypersensitive resistance to *Tomato spotted wilt Tospovirus* (TSWV) in pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Eur. J. Plant Pathol.* **104**, 489-498.
- Mousley, C.J., Tyeryar, K.R., Vincent-Pope, P. and Bankaitis, V.A.** (2007) The Sec14-superfamily and the regulatory interface between phospholipid metabolism and membrane trafficking. *Biochim. Biophys. Acta*, **1771**, 727-736.
- Mundry, K.W., Watkins, P.A., Ashfield, T., Plaskitt, K.A., Eisele-Walter, S. and Wilson, T.M.** (1991) Complete uncoating of the 5' leader sequence of *Tobacco mosaic virus* RNA occurs rapidly and is required to initiate cotranslational virus disassembly in vitro. *J. Gen. Virol.* **72**, 769-777.
- Murant, A.F., Taylor, C.E. and Chambers, J.** (1968) Properties relationships and transmission of a strain of *Raspberry ringspot virus* infecting raspberry cultivars immune to common Scottish strain. *Ann. Appl. Biol.* **61**, 175-186.
- Mutterer, J.D., Stussi-Garaud, C., Michler, P., Richards, K.E., Jonard, G. and Ziegler-Graff, V.** (1999) Role of the *Beet western yellows virus* readthrough protein in virus movement in *Nicotiana clevelandii*. *J. Gen. Virol.* **80**, 2771-2778.
- Nagy, P.D. and Pogany, J.** (2006) Yeast as a model host to dissect functions of viral and host factors in *Tombusvirus* replication. *Virology*, **344**, 211-220.
- Navarro, J.A., Genovés, A., Climent, J., Sauri, A., Martínez-Gil, L., Mingarro, I., and Pallás, V.** (2006) RNA-binding properties and membrane insertion of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) double gene block movement proteins. *Virology*, **356**, 57-67.
- Nebenfuhr, A., Ritzenthaler, C. and Robinson, D.G.** (2002) Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol.* **130**, 1102-1108.
- Neeleman, L. and Bol, J.F.** (1999) Cis-acting functions of *Alfalfa mosaic virus* proteins involved in replication and encapsidation of viral RNA. *Virology*, **254**, 324-333.
- Nelson, R.S. and van Bel, A.J.E.** (1998) The mystery of virus trafficking into, through and out of the vascular tissue. *Prog. Bot.* **59**, 476-533.
- Netherton, C., Moffat, K., Brooks, E. and Wileman, T.** (2007) A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. *Adv. Virus Res.* **70**, 101-182.
- Niehl, A., Pena, E.J., Amari, K. and Heinlein, M.** (2013) Microtubules in viral replication and transport. *Plant J.* **75**, 290-308.
- Nishiguchi, M., Motoyoshi, F. and Oshima, N.** (1978) Behaviour of a temperature sensitive strain of *Tobacco mosaic virus* in tomato leaves and protoplasts. *J. Gen. Virol.* **39**, 53-61.
- Nurkiyanova, K.M., Ryabov, E.V., Kalinina, N.O., Fan, Y., Andreev, I., Fitzgerald, A.G., Palukaitis, P. and Taliansky, M.** (2001) *Umbravirus*-encoded movement protein induces tubule formation on the surface of protoplasts and binds RNA incompletely and non-cooperatively. *J. Gen. Virol.* **82**, 2579-2588.
- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L.** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**, 249-266.

- Ohno, T., Takamatsu, N., Meshi, T., Okada, Y., Nishiguchi, M. and Kiho, Y.** (1983) Single amino acid substitution in 30K protein of TMV defective in virus transport function. *Virology*, **131**, 255-258.
- Ojemalm, K., Halling, K.K., Nilsson, I. and von Heijne, G.** (2012) Orientational preferences of neighboring helices can drive ER insertion of a marginally hydrophobic transmembrane helix. *Mol. Cell*, **45**, 529-540.
- Olesinski, A.A., Almon, E., Navot, N., Perl, A., Galun, E., Lucas, W. J. and Wolf, S.** (1996) Tissue-specific expression of the *Tobacco mosaic virus* movement protein in transgenic potato plants alters plasmodesmal function and carbohydrate partitioning. *Plant Physiol.* **111**, 541-550.
- Oparka, K.J. and Turgeon, R.** (1999) Sieve elements and companion cells-traffic control centers of the phloem. *Plant Cell*, **11**, 739-750.
- Oparka, K.J., Prior, D.A., Santa Cruz, S., Padgett, H.S. and Beachy, R.N.** (1997a) Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of *Tobacco mosaic virus* (TMV). *Plant J.* **12**, 781-789.
- Oparka, K.J., Roberts, A.G., Boevink, P., Santa Cruz, S., Roberts, I., Pradel, K.S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N. and Epel, B.** (1999) Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell*, **97**, 743-754.
- Oparka, K.J., Roberts, A.G., SantaCruz, S., Boevink, P., Prior, D.A.M. and Smallcombe, A.** (1997b) Using GFP to study virus invasion and spread in plant tissues. *Nature*, **388**, 401-402.
- Owens, R.A., Blackburn, M. and Ding, B.** (2001) Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Mol. Plant- Microbe Interact.* **14**, 905-909.
- Paape, M., Solovyev, A.G., Erokhina, T.N., Minina, E.A., Schepetilnikov, M.V., Lesemann, D.E., Schiemann, J., Morozov, S.Y., and Kellmann, J.W.** (2006) At-4/1, an interactor of the *Tomato spotted wilt virus* movement protein, belongs to a new family of plant proteins capable of directed intra- and intercellular trafficking. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 874-883.
- Padgett, H.S. and Beachy, R.N.** (1993) Analysis of a *Tobacco mosaic virus* strain capable of overcoming *N* gene-mediated resistance. *Plant Cell*, **5**, 577-586.
- Padgett, H.S., Epel, B.L., Kahn, T.W., Heinlein, M., Watanabe, Y. and Beachy, R.N.** (1996) Distribution of *Tobamovirus* movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. *Plant J.* **10**, 1079-1088.
- Pallás, V.** (2007). En el límite de la vida. Un siglo de virus. Ed. La Voz de Galicia S.A. 124pp. ISBN: 978-84-9757-238-5. Reeditado por la Universidad Politécnica de Valencia (2008), 154 pp; ISBN 978-84-8363-350-2
- Pallás, V. and Garcia, J.A.** (2011) How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J. Gen. Virol.* **92**, 2691-2705.
- Pallás, V., Aparicio, F., Herranz, M.C., Sánchez-Navarro, J.A. and Scott, S.W.** (2013) The molecular biology of *Ilarviruses*. *Adv. Virus Res.* **87**, 130-181.
- Pallás, V., Genovés, A., Sanchez-Pina, M.A., and Navarro, J.A.** (2011) Systemic movement of viruses via the plant phloem. In: *Recent Advances in Plant Virology*, Edited by Carole Caranta, Miguel A. Aranda, Mark Tepfer and Juan Jose López-Moya. Caister Academic Press.

- Pallás, V., Mas, P., and Sánchez-Navarro, J.A.** (1998) Detection of plant RNA viruses by nonisotopic dot-blot hybridization. *Methods Mol. Biol.* **81**, 461-468.
- Patrick, J.M.** (1991) Control of phloem transport to and short-distance transfer in sink regions: an overview. In: *Recent advances in phloem transport and assimilate compartmentation*. Edited by Bonnemain. J.L., Delrot, S.
- Peiró, A., Martínez-Gil, L., Tamborero, S., Pallás, V., Sánchez-Navarro, J.A. and Mingarro, I.** (2014) The *Tobacco mosaic virus* movement protein associates with but does not integrate into biological membranes. *J. Virol.* **88**, 3016-3026.
- Perbal, M.C., Thomas, C.L. and Maule, A.J.** (1993) *Cauliflower mosaic virus* gene I product (P1) forms tubular structures which extend from the surface of infected protoplasts. *Virology*, **195**, 281-285.
- Peremyslov, V.V., Pan, Y.W. and Dolja, V.V.** (2004) Movement protein of a *Closterovirus* is a type III integral transmembrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **78**, 3704-3709.
- Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I. and Hellen, C.U.** (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7029-7036.
- Peterman, T.K., Ohol, Y.M., McReynolds, L.J. and Luna, E.J.** (2004) Patellin1, a novel Sec14-Like protein, localizes to the cell plate and binds phosphoinositides. *Plant. Physiol.* **136**, 3080-3094.
- Peterman, T.K., Sequeira, A.S., Samia, J.A. and Lunde, E.E.** (2006) Molecular cloning and characterization of patellin1, a novel sec14-related protein, from zucchini (*Cucurbita pepo*). *J. Plant Phys.* **163**, 1150-1158.
- Phillips, S.E., Vincent, P., Rizzieri, K.E., Bankaitis, V.A. and Gaucher, E.A.** (2006) The diverse biological functions of phosphatidylinositol transfer proteins in eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 21-49.
- Pooma, W., Gillette, W.K., Jeffrey, J.L. and Petty, I.T.** (1996) Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite *Geminivirus* systemic movement. *Virology*, **218**, 264-268.
- Pouwels, J., Kornet, N., van Bers, N., Guighelaar, T., van Lent, J., Bisseling, T. and Wellink, J.** (2003) Identification of distinct steps during tubule formation by the movement protein of *Cowpea mosaic virus*. *J. Gen. Virol.* **84**, 3485-3494.
- Pouwels, J., Van Der Krogt, G.N., Van Lent, J., Bisseling, T. and Wellink, J.** (2002) The cytoskeleton and the secretory pathway are not involved in targeting the *Cowpea mosaic virus* movement protein to the cell periphery. *Virology*, **297**, 48-56.
- Pouwels, J., van der Velden, T., Willemse, J., Borst, J.W., van Lent, J., Bisseling, T. and Wellink, J.** (2004) Studies on the origin and structure of tubules made by the movement protein of *Cowpea mosaic virus*. *J. Gen. Virol.* **85**, 3787-3796.
- Radford, J.E. and White, R.G.** (2001) Effects of tissue-preparation-induced callose synthesis on estimates of plasmodesma size exclusion limits. *Protoplasma*, **216**, 47-55.
- Rajamaki, M.L. and Valkonen, J.P.** (2002) Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a *Potyvirus* in inoculated potato leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**, 138-149.

- Rao, A.L. and Grantham, G.L.** (1995) A spontaneous mutation in the movement protein gene of *Brome mosaic virus* modulates symptom phenotype in *Nicotiana benthamiana*. *J. Virol.* **69**, 2689-2691.
- Rao, A.L. and Grantham, G.L.** (1996) Molecular studies on *Bromovirus* capsid protein. II. Functional analysis of the amino-terminal arginine-rich motif and its role in encapsidation, movement, and pathology. *Virology*, **226**, 294-305.
- Rapp, M., Granseth, E., Seppala, S. and von Heijne, G.** (2006) Identification and evolution of dual-topology membrane proteins. *Nature Struct. Biol.* **13**, 112-116.
- Rapp, M., Seppala, S., Granseth, E. and von Heijne, G.** (2007) Emulating membrane protein evolution by rational design. *Science*, **315**, 1282-1284.
- Reichel, C. and Beachy, R.N.** (1998) *Tobacco mosaic virus* infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11169-11174.
- Requena, A., Simon-Buela, L., Salcedo, G. and Garcia-Arenal, F.** (2006) Potential involvement of a cucumber homolog of phloem protein 1 in the long-distance movement of *Cucumber mosaic virus* particles. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 734-746.
- Rinne, P.L., van den Boogaard, R., Mensink, M.G., Kopperud, C., Kormelink, R., Goldbach, R. and van der Schoot, C.** (2005) Tobacco plants respond to the constitutive expression of the *Tospovirus* movement protein NS(M) with a heat-reversible sealing of plasmodesmata that impairs development. *Plant J.* **43**, 688-707.
- Ritzenthaler, C., and Hofmann, C.** 2007. Tubule-guided movement of plant viruses. In: *viral transport in plants*. Edited by E. Waigmann and M. Heinlein. Springer, Berlin/Heidelberg. pp. 63-84.
- Ritzenthaler, C., Nebenfuhr, A., Movafeghi, A., Stussi-Garaud, C., Behnia, L., Pimpl, P., Staehelin, L.A. and Robinson, D.G.** (2002) Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco *Bright Yellow 2* cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell*, **14**, 237-261.
- Roberts, A.G., Cruz, S.S., Roberts, I.M., Prior, D., Turgeon, R. and Oparka, K.J.** (1997) Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. *Plant Cell*, **9**, 1381-1396.
- Roberts, I.M., Boevink, P., Roberts, A.G., Sauer, N., Reichel, C. and Oparka, K.J.** (2001) Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink-source transition in tobacco leaves. *Protoplasma*, **218**, 31-44.
- Rodrigo, G., Zwart, M.P., Elena, S.F.** (2014) Onset of virus systemic infection in plants is determined by speed of cell-to-cell movement and number of primary infection foci. *J. R. Soc. Interface* **11**: 20140555. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0555>
- Roggero, P., Masenga, V. and Tavella, L.** (2002) Field isolates of *Tomato spotted wilt virus* overcoming resistance in pepper and their spread to other hosts in Italy. *Plant Dis.* **86**, 950-954.
- Ron, M. and Avni, A.** (2004) The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell*, **16**, 1604-1615.
- Roth, B.M., Pruss, G.J. and Vance, V.B.** (2004) Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res.* **102**, 97-108.

- Routt, S.M. and Bankaitis, V.A.** (2004) Biological functions of phosphatidylinositol transfer proteins. *Biochem. Cell Biol.* **82**, 254–62.
- Ruiz-Ferrer, V. and Voinnet, O.** (2009) Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 485-510.
- Rybicki, E.P. and Von Wechmar, M.B.** (1981) The serology of the *Bromoviruses*. I. Serological interrelationships of the *Bromoviruses*. *Virology*, **109**, 391-402.
- Saaf, A., Wallin, E. and von Heijne, G.** (1998) Stop-transfer function of pseudo-random amino acid segments during translocation across prokaryotic and eukaryotic membranes. *Eur. J. Biochem.* **251**, 821-829.
- Sacristán, S. and Garcia-Arenal, F.** (2008) The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 369-384.
- Saenz, P., Salvador, B., Simon-Mateo, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. and Garcia, J.A.** (2002) Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of *Potyvirus*s. *J. Virol.* **76**, 1922-1931.
- Saito, T., Meshi, T., Takamatsu, N. and Okada, Y.** (1987) Coat protein gene sequence of *Tobacco mosaic-virus* encodes a host response determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6074-6077.
- Sambade, A. and Heinlein, M.** (2009) Approaching the cellular mechanism that supports the intercellular spread of *Tobacco mosaic virus*. *Plant. Signal Behav.* **4**, 35-38.
- Sambade, A., Brandner, K., Hofmann, C., Seemanpillai, M., Mutterer, J. and Heinlein, M.** (2008) Transport of TMV movement protein particles associated with the targeting of RNA to plasmodesmata. *Traffic*, **9**, 2073-2088.
- Sambrook J, Fritschi E.F. and Maniatis T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samuels, T.D., Ju, H.J., Ye, C.M., Motes, C.M., Blancaflor, E.B. and Verchot-Lubicz, J.** (2007) Subcellular targeting and interactions among the *Potato virus X* TGB proteins. *Virology*, **367**, 375-389.
- Sanchez-Navarro, J.A. and Bol, J.F.** (2001) Role of the *Alfalfa mosaic virus* movement protein and coat protein in virus transport. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 1051-1062.
- Sánchez-Navarro, J.A. and Pallás, V.** (1997) Evolutionary relationships in the *Ilarviruses*: Nucleotide sequence of *Prunus necrotic ringspot virus* RNA 3. *Arch. Virol.* **142**, 749-763.
- Sánchez-Navarro, J.A., Carmen Herranz, M. and Pallás, V.** (2006) Cell-to-cell movement of *Alfalfa mosaic virus* can be mediated by the movement proteins of *Ilar*-, *Bromo*-, *Cucumo*-, *Tobamo*- and *Comovirus*s and does not require virion formation. *Virology*, **346**, 66-73.
- Sánchez-Navarro, J., Fajardo, T., Zicca, S., Pallás, V. and Stabolone, L.** (2010) *Caulimoviridae* tubule-guided transport is dictated by movement protein properties. *J. Virol.* **84**, 4109-4112.
- Sánchez-Navarro, J.A., Miglino, R., Ragozzino, A. and Bol, J.F.** (2001) Engineering of *Alfalfa mosaic virus* RNA 3 into an expression vector. *Arch. Virol.* **146**, 923-939.
- Sánchez-Navarro, J.A., Reusken, C.B.E.M., Bol, J.F. and Pallás, V.** (1997) Replication of *Alfalfa mosaic virus* RNA 3 with movement and coat protein genes replaced by corresponding genes of *Prunus necrotic ringspot Ilarvirus*. *J. Gen. Virol.* **78**, 3171-3176.

- Sanfaçon, H.** (2005) Replication of positive-strand RNA viruses in plants: contact points between plant and virus components. *Can. J. Bot.* **83**, 1529-1549.
- Sanjuán, R.** (2010) Mutational fitness effects in RNA and single-stranded DNA viruses: common patterns revealed by site-directed mutagenesis studies. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences 365, 1975-1982.
- Sanjuán, R., Cuevas, J.M., Moya, A. and Elena, S.F.** (2005) Epistasis and the adaptability of an RNA virus. *Genetics*, **170**, 1001-1008.
- Sanjuán, R., Moya, A. and Elena, S.F.** (2004) The contribution of epistasis to the architecture of fitness in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15376-15379.
- Sanjuán, R., Nebot, M.R., Chirico, N., Mansky, L.M., Belshaw, R.** (2010) Viral Mutation Rates. *J. Virol.* **84**, 9733-9748.
- Santacruz, P., Uttl, B., Litvan, I. and Grafman, J.** (1998) Progressive supranuclear palsy: a survey of the disease course. *Neurology*, **50**, 1637-1647.
- Sasaki, A.** (2000) Host-parasite coevolution in a multilocus gene-for-gene system. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* **267**, 2183-2188.
- Sasaki, N., Ogata, T., Deguchi, M., Nagai, S., Tamai, A., Meshi, T., Kawakami, S., Watanabe, Y., Matsushita, Y. and Nyunoya, H.** (2009) Over-expression of putative transcriptional coactivator KELP interferes with *Tomato mosaic virus* cell-to-cell movement. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 161-173.
- Satoh, H., Matsuda, H., Kawamura, T., Isogai, M., Yoshikawa, N. and Takahashi, T.** (2000) Intracellular distribution, cell-to-cell trafficking and tubule-inducing activity of the 50 kDa movement protein of *Apple chlorotic leaf spot virus* fused to green fluorescent protein. *J. Gen. Virol.* **81**, 2085-2093.
- Sauri, A., Saksena, S., Salgado, J., Johnson, A.E. and Mingarro, I.** (2005) Double-spanning plant viral movement protein integration into the endoplasmic reticulum membrane is signal recognition particle-dependent, translocon-mediated, and concerted. *J. Biol. Chem.* **280**, 25907-25912.
- Sauri, A., Tamborero, S., Martínez-Gil, L., Johnson, A.E. and Mingarro, I.** (2009) Viral membrane protein topology is dictated by multiple determinants in its sequence. *J. Mol. Biol.* **387**, 113-128.
- Schepetilnikov, M.V., Manske, U., Solovyev, A.G., Zamyatnin, A.A., Jr., Schiemann, J. and Morozov, S.Y.** (2005) The hydrophobic segment of *Potato virus X* TGBp3 is a major determinant of the protein intracellular trafficking. *J. Gen. Virol.* **86**, 2379-2391.
- Schepetilnikov, M.V., Solovyev, A.G., Gorshkova, E.N., Schiemann, J., Prokhnevsky, A.I., Dolja, V.V. and Morozov, S.Y.** (2008) Intracellular targeting of a hordeiviral membrane-spanning movement protein: sequence requirements and involvement of an unconventional mechanism. *J. Virol.* **82**, 1284-1293.
- Schiender, I.R.** (1965) Introduction, translocation and distribution of viruses in plants. *Adv. Virus Res.* **11**, 163-221.
- Scholthof, H.B., Scholthof, K.B., Kikkert, M. and Jackson, A.O.** (1995) *Tomato bushy stunt virus* spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology*, **213**, 425-438.
- Schwach, F., Vaistij, F.E., Jones, L. and Baulcombe, D.C.** (2005) An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by *Potato virus X* and is required for

- the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol.* **138**, 1842-1852.
- Schwessinger, B. and Zipfel, C.** (2008) News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 389-395.
- Segarra, J.** (2005) Stable polymorphisms in a two-locus gene-for-gene system. *Phytopathology*, **95**, 728-736.
- Seksek, O., Biwersi, J. and Verkman, A.S.** (1997) Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus. *J. Cell Biol.* **138**, 131-142.
- Senshu, H., Ozeki, J., Komatsu, K., Hashimoto, M., Hatada, K., Aoyama, M., Kagiwada, S., Yamaji, Y. and Namba, S.** (2009) Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various *Potexviruses* during infection. *J. Gen. Virol.* **90**, 1014-1024.
- Shang, H. and Bujarski, J.J.** (1993) Interstrain pseudorecombinants of *Cowpea chlorotic mottle virus*: effects on systemic spread and symptom formation in soybean and cowpea. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**, 755-763.
- Shaw, J.G.** (1999) *Tobacco mosaic virus* and the study of early events in virus infections. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B.* **354**, 603-611.
- Shimizu, T., Yoshii, A., Sakurai, K., Hamada, K., Yamaji, Y., Suzuki, M., Namba, S. and Hibi, T.** (2009) Identification of a novel tobacco **DnaJ-like** protein that interacts with the movement protein of *Tobacco mosaic virus*. *Arch. Virol.* **154**, 959-967.
- Sin, S.H., McNulty, B.C., Kennedy, G.G. and Moyer, J.W.** (2005) Viral genetic determinants for thrips transmission of *Tomato spotted wilt virus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5168-5173.
- Soards, A.J., Murphy, A.M., Palukaitis, P. and Carr, J.P.** (2002) Virulence and differential local and systemic spread of *Cucumber mosaic virus* in tobacco are affected by the CMV 2b protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**, 647-653.
- Soellick, T., Uhrig, J.F., Bucher, G.L., Kellmann, J.W. and Schreier, P.H.** (2000) The movement protein NSm of *Tomato spotted wilt Tospovirus* (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2373-2378.
- Solovyev, A.G., Stroganova, T.A., Zamyatnin, A.A.Jr., Fedorkin, O.N., Schiemann, J. and Morozov, S.Y.** (2000) Subcellular sorting of small membrane-associated triple gene block proteins: TGBp3-assisted targeting of TGBp2. *Virology*, **269**, 113-127.
- Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C. and Ronald, P.** (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*, **270**, 1804-1806.
- Sorho, F., Pinel, A., Traoré, O., Bersoult, A., Ghesquière, A., Hébrard, E., Konaté, G., Séré, Y. and Fargette, D.** (2005) Durability of natural and transgenic resistances in rice to *Rice yellow mottle virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* **112**, 349-359.
- Sparkes, I.A., Frigerio, L., Tolley, N. and Hawes, C.** (2009) The plant endoplasmic reticulum: a cell-wide web. *Biochem. J.* **423**, 145-155.
- Spassova, M.I., Prins, T.W., Folkertsma, R.T., Klein-Lankhorst, R.M., Hille, J., Goldbach, R.W. and Prins, M.** (2001) The tomato gene *Sw5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Mol. Breeding*, **7**, 151-161.



- Spitsin, S., Steplewski, K., Fleysh, N., Belanger, H., Mikheeva, T., Shivprasad, S., Dawson, W., Koprowski, H. and Yusibov, V.** (1999) Expression of *Alfalfa mosaic virus* coat protein in *Tobacco mosaic virus* (TMV) deficient in the production of its native coat protein supports long-distance movement of a chimeric TMV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2549-2553.
- Stadler, R., Wright, K.M., Lauterbach, C., Amon, G., Gahrtz, M., Feuerstein, A., Oparka, K.J. and Sauer, N.** (2005) Expression of GFP-fusions in Arabidopsis companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant J.* **41**, 319-331.
- Stanley, W. M.** (1935) Isolation of a crystalline protein possessing the properties of *Tobacco-Mosaic Virus*. *Science*, **81**, 644-645.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G. and Jones, J.D.G.** (1995) Molecular-genetics of plant-disease resistance. *Science*, **268**, 661-667.
- Stavolone, L., Villani, M.E., Leclerc, D. and Hohn, T.** (2005) A coiled-coil interaction mediates *Cauliflower mosaic virus* cell-to-cell movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 6219-6224.
- Stevens, M.R., Scott, S.J. and Gergerich, R.C.** (1991) Inheritance of a gene for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica*, **59**, 9-17.
- Storms, M.M., Kormelink, R., Peters, D., van Lent, J.W. and Goldbach, R.W.** (1995) The nonstructural NSm protein of *Tomato spotted wilt virus* induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology*, **214**, 485-493.
- Strasser, M. and Pfitzner, A.J.P.** (2007) The double-resistance-breaking *Tomato mosaic virus* strain ToMV1-2 contains two independent single resistance-breaking domains. *Arch. Virol.* **152**, 903-914.
- Su, S., Liu, Z., Chen, C., Zhang, Y., Wang, X., Zhu, L., Miao, L., Wang, X.C. and Yuan, M.** (2010) *Cucumber mosaic virus* movement protein severs actin filaments to increase the plasmodesmal size exclusion limit in tobacco. *Plant Cell*, **22**, 1373-1387.
- Sulzinski, M.A. and Zaitlin, M.** (1982) *Tobacco mosaic virus* replication in resistant and susceptible plants: in some resistant species virus is confined to a small number of initially infected cells. *Virology*, **121**, 12-19.
- Sztuba-Solinska, J., Stollar, V. and Bujarski, J.J.** (2011) Subgenomic messenger RNAs: mastering regulation of (+)-strand RNA virus life cycle. *Virology*, **412**, 245-255.
- Tafelmeyer, P., Johnsson, N. and Johnsson, K.** (2004) Transforming a ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel enzyme into a split-protein sensor through directed evolution. *Chem. Biol.* **11**, 681-689.
- Takamatsu, N., Ishikawa, M., Meshi, T. and Okada, Y.** (1987) Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. *EMBO J.* **6**, 307-311.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S. and Okuno, T.** (2002) Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Lett.* **532**, 75-79.
- Taliansky, M.E. and Garcia-Arenal, F.** (1995) Role of *Cucumovirus* capsid protein in long-distance movement within the infected plant. *J. Virol.* **69**, 916-922.
- Taliansky, M.E. and Robinson, D.J.** (2003) Molecular biology of *Umbraviruses*: phantom warriors. *J. Gen. Virol.* **84**, 1951-1960.

- Tamai, A. and Meshi, T.** (2001) Cell-to-cell movement of *Potato virus X*: the role of p12 and p8 encoded by the second and third open reading frames of the triple gene block. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 1158-1167.
- Tamborero, S., Vilar, M., Martínez-Gil, L., Johnson, A.E. and Mingarro, I.** (2011) Membrane insertion and topology of the translocating chain-associating membrane protein (TRAM). *J. Mol. Biol.* **406**, 571-582.
- Taschner, P.E., Van der Kuyl, A.C., Neeleman, L. and Bol, J.F.** (1991) Replication of an incomplete *Alfalfa mosaic virus* genome in plants transformed with viral replicase genes. *Virology*, **181**, 445-450.
- Tecsi, L.I., Maule, A.J., Smith, A.M. and Leegood, R.C.** (1994) Complex, localized changes in CO<sub>2</sub> assimilation and starch content associated with the susceptible interaction between cucumber mosaic virus and a cucurbit host. *Plant J.* **5**, 837-847.
- Tenllado, F. and Bol, J.F.** (2000) Genetic dissection of the multiple functions of *Alfalfa mosaic virus* coat protein in viral RNA replication, encapsidation, and movement. *Virology*, **268**, 29-40.
- Thivierge, K., Nicaise, V., Dufresne, P.J., Cotton, S., Laliberté, J.F., Le Gall, O. and Fortin, M.G.** (2005) Plant virus RNAs. Coordinated recruitment of conserved host functions by (+) ssRNA viruses during early infection events. *Plant Physiol.* **138**, 1822-1827.
- Thomas, C.L. and Maule, A.J.** (1995) Identification of structural domains within the *Cauliflower mosaic-virus* movement protein by scanning deletion mutagenesis and epitope tagging. *Plant Cell*, **7**, 561-572.
- Thomas, C.L. and Maule, A.J.** (1999) Identification of inhibitory mutants of *Cauliflower mosaic virus* movement protein function after expression in insect cells. *J. Virol.* **73**, 7886-7890.
- Thomma, B.P., Nurnberger, T. and Joosten, M.H.** (2011) Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell*, **23**, 4-15.
- Thompson, G.J. and van Zijl, J.J.B.** (1995) Control of *Tomato spotted wilt virus* in tomatoes in South Africa. *Acta Hort.* **431**, 379-384.
- Tilsner, J., Cowan, G.H., Roberts, A.G., Chapman, S.N., Ziegler, A., Savenkov, E. and Torrance, L.** (2010) Plasmodesmal targeting and intercellular movement of *Potato mop-top Pomovirus* is mediated by a membrane anchored tyrosine-based motif on the luminal side of the endoplasmic reticulum and the C-terminal transmembrane domain in the TGB3 movement protein. *Virology*, **402**, 41-51.
- Tilsner, J., Linnik, O., Wright, K.M., Bell, K., Roberts, A.G., Lacomme, C., Cruz, S.S. and Oparka, K. J.** (2012) The TGB1 movement protein of *Potato virus X* reorganizes actin and endomembranes into the X-body, a viral replication factory. *Plant Physiol.* **158**, 1359-1370.
- Tomenius, K., Clapham, D. and Meshi, T.** (1987) Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with *Tobacco mosaic virus*. *Virology*, **160**, 363-371.
- Traynor, P., Young, B.M. and Ahlquist, P.** (1991) Deletion analysis of *Brome mosaic virus* 2a protein: effects on RNA replication and systemic spread. *J. Virol.* **65**, 2807-2815.

- Tsai, C.H. and Dreher, T.W.** (1993) Increased viral yield and symptom severity result from a single amino acid substitution in the *Turnip yellow mosaic virus* movement protein. *Mol. Plant- Microbe Interact.* **6**, 268-273.
- Turgeon, R. and Wolf, S.** (2009) Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 207-221.
- Turina, M., Desvoyes, B. and Scholthof, K.B.** (2000) A gene cluster encoded by *Panicum mosaic virus* is associated with virus movement. *Virology*, **266**, 120-128.
- Tyulkina, L.G., Karger, E.M., Sheveleva, A.A. and Atabekov, J.G.** (2010) Binding of monoclonal antibodies to the movement protein (MP) of *Tobacco mosaic virus*: influence of subcellular MP localization and phosphorylation. *J. Gen. Virol.* **91**, 1621-1628.
- Ueki, S. and Citovsky, V.** (2011) To gate, or not to gate: regulatory mechanisms for intercellular protein transport and virus movement in plants. *Mol. Plant*, **4**, 782-93.
- Ueki, S., and Citovsky, V.** (2007) Spread throughout the plant: systemic transport of viruses. In viral transport in plants, pp. 85-118. Edited by E. Waigmann and M. Heinlein. Springer, Berlin/Heidelberg.
- Vaewhongs, A.A. and Lommel, S.A.** (1995) Virion formation is required for the long-distance movement of *Red clover necrotic mosaic virus* in movement protein transgenic plants. *Virology*, **212**, 607-613.
- Valverde, R.A.** (1983) *Brome mosaic virus* isolates naturally infecting *Commelina diffusa* and *C. communis*. *Plant Dis.* **67**, 1194-1196.
- van den Ackerveken, G.F., Van Kan, J.A. and De Wit, P.J.** (1992) Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. *Plant J.* **2**, 359-366.
- van der Biezen, E.A., Freddie, C.T., Kahn, K., Parker, J.E. and Jones, J.D.** (2002) Arabidopsis RPP4 is a member of the RPP5 multigene family of TIR-NB-LRR genes and confers downy mildew resistance through multiple signalling components. *Plant J.* **29**, 439-451.
- van der Scheer, C. and Groenewegen, J.** (1971 ) Structure in cells of *Vigna unguiculata* infected with *Cowpea mosaic virus*. *Virology*, **46**, 493-497.
- van der Vossen, E.A., Neeleman, L. and Bol, J.F.** (1993) Role of the 5' leader sequence of *Alfalfa mosaic virus* RNA 3 in replication and translation of the viral RNA. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1361-1367.
- van der Wel, N.N., Goldbach, R.W. and van Lent, J.W.M.** (1998) The movement protein and coat protein of *Alfalfa mosaic virus* accumulate in structurally modified plasmodesmata. *Virology*, **244**, 322-329.
- van Dun, C.M., Overduin, B., van Vloten, D.L., Bol J.F.** (1988) Transgenic tobacco expressing *Tobacco streak virus* or mutated *Alfalfa mosaic virus* coat protein does not cross-protect against *Alfalfa mosaic virus* infection. *Virology*, **164**, pp. 383-389.
- Van Lent, J., Storms, M., van der, M.F., Wellink, J. and Goldbach, R.** (1991) Tubular structures involved in movement of *Cowpea mosaic virus* are also formed in infected cowpea protoplasts. *J. Gen. Virol.* **72**, 2615-2623.
- Verchot, J.** (2011) Wrapping membranes around plant virus infection. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 388-395.

- Verchot-Lubicz, J.** (2005) A new cell-to-cell transport model for *Potexviruses*. *Mol Plant-Microbe Interact*, **18**, 283-290.
- Verchot-Lubicz, J., Ye, C.M. and Bamunusinghe, D.** (2007) Molecular biology of *Potexviruses*: recent advances. *J. Gen. Virol.* **88**, 1643-1655.
- Vilar, M., Esteve, V., Pallás, V., Marcos, J.F. and Pérez-Paya, E.** (2001) Structural properties of *Carnation mottle virus* p7 movement protein and its RNA-binding domain. *J. Biol. Chem.* **276**, 18122-18129.
- Vilar, M., Sauri, A., Marcos, J. F., Mingarro, I. and Pérez-Paya, E.** (2005) Transient structural ordering of the RNA-binding domain of *Carnation mottle virus* p7 movement protein modulates nucleic acid binding. *Chembiochem.* **6**, 1391-1396.
- Vilar, M., Sauri, A., Monne, M., Marcos, J.F., von Heijne, G., Perez-Paya, E., and Mingarro, I.** (2002) Insertion and topology of a plant viral movement protein in the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **277**, 23447-23452.
- Vogel, F., Hofius, D. and Sonnewald, U.** (2007) Intracellular trafficking of *Potato leafroll virus* movement protein in transgenic *Arabidopsis*. *Traffic*, **8**, 1205-1214.
- Voinnet, O.** (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet*, **17**, 449-459.
- von Barga, S., Salchert, K., Paape, M., Piechulla, B. and Kellmann, J.W.** (2001) Interactions between the *Tomato spotted wilt virus* movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and DnaJ-like chaperones. *Plant. Physiol. Biochem.* **39**, 1083-1093.
- von Heijne, G. and Gavel, Y.** (1988) Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **174**, 671-678.
- Waigmann, E., Chen, M.H., Bachmaier, R., Ghoshroy, S. and Citovsky, V.** (2000) Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of *Tobacco mosaic virus* cell-to-cell movement protein. *EMBO J.* **19**, 4875-4884.
- Waigmann, E., Cohen, Y., McLean, G. and Zambryski, P.** (1998) Plasmodesmata: gateways for information transfer. *Sym. Soc. Exp. Biol.* **51**, 43-49.
- Waigmann, E., Curin, M., and Heinlein., M.** (2007) *Tobacco mosaic virus* –a model for macromolecular cell-to-cell spread in viral transport in plants, pp. 29-62. Edited by E. Waigmann and M. Heinlein. Springer, Berlin/Heidelberg.
- Waigmann, E., Lucas, W.J., Citovsky, V. and Zambryski, P.** (1994) Direct functional assay for *Tobacco mosaic virus* cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1433-1437.
- Waigmann, E., Ueki, S., Trutnyeva, K. and Citovsky, V.** (2004) The ins and outs of nondestructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. *Crit. Rev. Plant Sci.* **23**, 195-250.
- Walter, B., Gilmore, M., Muller, G. and Blobel, G.** (1983) The protein translocation machinery of the endoplasmic reticulum. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.*
- Wang, N. and Fisher, D.B.** (1994) The use of fluorescent tracers to characterize the post-phloem transport pathway in maternal tissues of developing wheat grains. *Plant Physiol.* **104**, 17-27.
- Weber, H., Schultze, S. and Pfitzner, A.J.** (1993) Two amino acid substitutions in the *Tomato mosaic virus* 30-kilodalton movement protein confer the ability to overcome the *Tm-2(2)* resistance gene in the tomato. *J. Virol.* **67**, 6432-6438.

- Wellink, J., van Lent, J.W., Verver, J., Sijen, T., Goldbach, R.W. and van Kammen, A.** (1993) The *Cowpea mosaic virus* M RNA-encoded 48-kilodalton protein is responsible for induction of tubular structures in protoplasts. *J. Virol.* **67**, 3660-3664.
- Whitham, S.A. and Wang, Y.Z.** (2004) Roles for host factors in plant viral pathogenicity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 365-371.
- Winter, D., Vinega, B., Naha, H., Ammar, R., Wilson, G.V. and Provart, N.J.** (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*, **8**, e718.
- Wintermantel, W.M., Banerjee, N., Oliver, J.C., Paolillo, D.J. and Zaitlin, M.** (1997) *Cucumber mosaic virus* is restricted from entering minor veins in transgenic tobacco exhibiting replicase-mediated resistance. *Virology*, **231**, 248-257.
- Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N. and Lucas, W.J.** (1989) Movement protein of tobacco mosaic-virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science*, **246**, 377-379.
- Wright, K.M., Cowan, G.H., Lukhovitskaya, N.I., Tilsner, J., Roberts, A.G., Savenkov, E. I., and Torrance, L. N.** (2010) The N-terminal domain of PMTV TGB1 movement protein is required for nucleolar localization, microtubule association, and long-distance movement. *Mol. Plant- Microbe Interact.* **23**, 1486-1497.
- Wright, K.M., Wood, N.T., Roberts, A.G., Chapman, S., Boevink, P., Mackenzie, K.M. and Oparka, K.J.** (2007) Targeting of TMV movement protein to plasmodesmata requires the actin/ER network: evidence from FRAP. *Traffic*, **8**, 21-31.
- Wung, C.H., Hsu, Y.H., Liou, D.Y., Huang, W.C., Lin, N.S. and Chang, B.Y.** (1999) Identification of the RNA-binding sites of the triple gene block protein 1 of *Bamboo mosaic Potexvirus*. *J. Gen. Virol.* **80**, 1119-1126.
- Xiong, Z., Kim, K.H., Giesman-Cookmeyer, D. and Lommel, S.A.** (1993) The roles of the *Red clover necrotic mosaic virus* capsid and cell-to-cell movement proteins in systemic infection. *Virology*, **192**, 27-32.
- Yelina, N.E., Savenkov, E.I., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y. and Valkonen, J.P.** (2002). Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in *Hordei-* and *Potyviruses*: complementary functions between virus families. *J. Virol.* **76**, 12981-12991.
- Yoshioka, K., Matsushita, Y., Kasahara, M., Konagaya, K. and Nyunoya, H.** (2004) Interaction of *Tomato mosaic virus* movement protein with tobacco RIO kinase. *Mol. Cells*, **17**, 223-229.
- Zaccardelli, M., Perrone, D., Del Galdo, A., Campanile, F., Parrella, G. and Giordano, I.** (2008) Tomato genotypes resistant to *Tomato spotted wilt virus* evaluated in open field crops in Southern Italy. *Acta Hort.* **789**, 147-149.
- Zambryski, P.** (1995) Plasmodesmata: plant channels for molecules on the move. *Science*, **270**, 1943-1944.
- Zamyatnin, A. A.Jr., Solovyev, A.G., Bozhkov, P.V., Valkonen, J.P., Morozov, S.Y. and Savenkov, E.I.** (2006) Assessment of the integral membrane protein topology in living cells. *Plant J.* **46**, 145-154.
- Zamyatnin, A.A., Solovyev, A.G., Sablina, A.A., Agranovsky, A.A., Katul, L., Vetten, H. J., Schiemann, J., Hinkkanen, A.E., Lehto, K. and Morozov, S.Y.** (2002) Dual-colour imaging of membrane protein targeting directed by *Poa semilatent virus*

movement protein TGBp3 in plant and mammalian cells. *J. Gen. Virol.* **83**, 651-662.

**Zamyatnin, A.A., Solovyev, A.G., Savenkov, E.I., Germundsson, A., Sandgren, M., Valkonen, J.P.T. and Morozov, S.Y.** (2004) Transient coexpression of individual genes encoded by the triple gene block of *Potato mop-top virus* reveals requirements for TGBp1 trafficking. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**, 921-930.

**Zayakina, O., Arkhipenko, M., Smirnov, A., Rodionova, N., Karpova, O. and Atabekov, J.** (2009) Restoration of *Potato virus X* coat protein capacity for assembly with RNA after His-tag removal. *Arch. Virol.* **154**, 337-341.

**Zhang, S.C., Zhang, G., Yang, L., Chisholm, J. and Sanfacon, H.** (2005) Evidence that insertion of *Tomato ringspot Nepovirus* NTB-VPg protein in endoplasmic reticulum membranes is directed by two domains: a C-terminal transmembrane helix and an N-terminal amphipathic helix. *J. Virol.* **79**, 11752-11765.

**Zipfel, C.** (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr. Opin immunol.* **20**, 10-16.

**Zuidmeer-Jongejan, L.** (2002) Interactions of plant proteins with *Alfalfa mosaic virus* movement protein. PhD Thesis. Univ. Leiden, Leiden. 137 pp.

