



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

Análisis de procesos de transcripción,
traducción y degradación del virus
del arabesco del *Pelargonium*

Presentada por:

Marta Blanco Pérez

Dirigida por:

Carmen Hernández Fort

Valencia, 2016



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Análisis de procesos de transcripción, traducción y degradación del virus del arabesco del *Pelargonium*

Memoria presentada por:

Marta Blanco Pérez

Para optar al grado de

Doctora en Biotecnología

Director: Dra. Carmen Hernández Fort

Tutor: Ismael Rodrigo Bravo

Valencia, Febrero 2016



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

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

CERTIFICA:

Que Marta Blanco Pérez ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que, con el título “Análisis de procesos de transcripción, traducción y degradación del virus del arabesco del *Pelargonium*”, presenta para optar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia a 22 de diciembre de 2015.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Carmen', with a large, stylized flourish extending to the right.

Firmado: Carmen Hernández Fort

“Lo importante en ciencia no es tanto obtener nuevos hechos
como descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos”

(William Lawrence Bragg)

A la memoria de mi padre y abuelos

ÍNDICE

ACRÓNIMOS DE VIRUS.....	1
ACRÓNIMOS.....	7
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN	25
1-Los virus de plantas y su ciclo infeccioso.....	27
2-Expresión génica de virus de plantas	37
2.1 La traducción en eucariotas: aspectos generales	37
2.2 Estrategias de expresión génica de virus de plantas.....	42
2.2.1 Regulación de la expresión génica por partición del genoma	43
2.2.2 Regulación transcripcional de la expresión génica: producción de sgRNAs.....	44
2.2.2.1 Mecanismos de síntesis de sgRNAs.....	47
2.2.2.1.1 –Iniciación interna.....	48
2.2.2.1.2 –Terminación prematura	51
a) Interacciones en <i>trans</i> bimoleculares	54
b) Interacciones en <i>cis</i> a larga distancia	56
c) Interacciones en <i>cis</i> entre regiones locales.....	59
2.2.3 Regulación de la expresión génica a nivel traduccional	64
2.2.3.1 Etapa de inicio.....	64

2.2.3.1.1	Iniciación mediada por estructuras distintas de cap y/o cola poli(A).....	64
2.2.3.1.1.1	–CITEs	67
a)	Tipo TED (<i>Translational enhancer domain</i>)	72
b)	Tipo BTE (<i>Barley yellow dwarf virus-like translation element</i>).....	74
c)	Tipo PTE (<i>Panicum mosaic virus-like translational enhancer</i>)	77
d)	Tipo ISS (<i>I-Shaped Structure</i>)	80
e)	Tipo YSS (<i>Y-Shaped Structure</i>)	83
f)	Tipo TSS (<i>T-Shaped Structure</i>).....	86
2.2.3.1.2	Escape al proceso de rastreo ribosomal (<i>leaky scanning</i>).....	91
2.2.3.1.3	Rastreo ribosomal discontinuo (<i>shunting</i>).....	92
2.2.3.1.4	Entrada interna del ribosoma.....	92
2.2.3.2	Etapa de elongación: corrimiento en la pauta de lectura del ribosoma (<i>frameshift</i>)	96
2.2.3.3	Etapa de terminación: lectura a través de codones de terminación débiles (<i>readthrough</i>).....	97
2.2.4	A nivel post-traduccional: procesamiento proteolítico..	97
3-	Silenciamiento por RNA y su papel en defensa antiviral	99
3.1	Generalidades	99
3.2	Características generales de los componentes proteicos más relevantes de la maquinaria de silenciamiento en plantas	105

3.3 Los virus como inductores y dianas del silenciamiento por RNA	109
3.4 Supresión viral del silenciamiento mediado por RNA	112
3.5 Perfiles de vsRNAs en plantas infectadas por distintos tipos de virus	114
4-El virus del arabesco del <i>Pelargonium</i>	119
4.1 Gama de huéspedes, transmisión y síntomas	119
4.2 Propiedades moleculares	121
OBJETIVOS	127
CAPÍTULO 1	131
CAPÍTULO 2	179
CAPÍTULO 3	239
DISCUSIÓN GENERAL	281
CONCLUSIONES	303
BIBLIOGRAFÍA	307
AGRADECIMIENTOS	367

ACRÓNIMOS DE VIRUS

AMV: alfalfa mosaic virus (virus del mosaico de la alfalfa)

BCMV: bean common mosaic (virus del mosaico común del frijol)

BMV: brome mosaic virus (virus del mosaico del bromo)

BNYVV: beet necrotic yellow vein virus (virus de las venas necróticas y amarillas de la remolacha)

BRV: blackcurrant reversion virus (virus de la reversión de la grosella)

BWYV: beet western yellows virus (virus del amarilleo occidental de la remolacha)

BYDV: barley yellow dwarf virus (virus del enanismo amarillo de la cebada)

CaMV: cauliflower mosaic virus (virus del mosaico de la coliflor)

CarMV: carnation mottle virus (virus del moteado del clavel)

CRSV: carnation ringspot virus (virus de las manchas en anillo del clavel)

CBLV: cucumber Bulgarian latent virus (virus latente del pepino Búlgaro)

CbMV: calibrachoa mottle virus (virus del moteado de la Calibrachoa)

CCFV: cardamine chlorotic fleck virus (virus del salpicado clorótico del cardamomo)

CIRV: carnation italian ringspot virus (virus de las manchas en anillo del clavel italiano)

CLBV: citrus leaf blotch virus (virus del manchado foliar de los cítricos)

Acrónimos de virus

CLSV: cucumber leaf spot virus (virus de las manchas de la hoja del pepino)

CMMV: cocksfoot mild mosaic virus (virus del mosaico suave de la pata de gallo)

CMV: cucumber mosaic virus (virus del mosaico del pepino)

crTMV: crucifer-infecting tobamovirus (tobamovirus que infecta crucíferas)

CTLV: citrus tatter leaf virus (virus de la hoja deformada de los cítricos)

CTV: citrus tristeza virus (virus de la tristeza de los cítricos)

CymRSV: cymbidium ringspot virus (virus de las manchas anulares de Cymbidium)

ELV: elderberry latent virus (virus latente de la baya del saúco)

FLSV: festuca leaf streak virus (virus de la hoja rayada de la Festuca)

GaMV: galinsoga mosaic virus (virus del mosaico de la Galinsoga)

GAV: grapevine vitivirus A (virus A de la vid)

GRV: groundnut rosette virus (virus de la roseta del cacahuete)

HCRSV: hibiscus chlorotic ringspot virus (virus de las manchas cloróticas en anillo del Hibisco)

HnRSV: honeysuckle ringspot virus (virus de las manchas anulares de la madreselva)

LWSV: leek White stripe virus (virus de la raya blanca del puerro)

MNeSV: maize necrotic streak virus (virus del rayado necrótico del maíz)

MNSV: melon necrotic spot virus (virus de las manchas necróticas del melón)

Acrónimos de virus

MWLMV: maize white line mosaic virus (virus del mosaico de la línea blanca del maíz)

OLV-1: olive latent virus 1 (virus 1 latente del olivo)

PCRPV: pelargonium chlorotic ring pattern virus (virus del patrón en anillos cloróticos del Pelargonium)

PeIRSV: pelargonium ringspot virus (virus de las manchas anulares del Pelargonium)

PEMV: pea enation mosaic virus (virus de las excrecencias en mosaico del guisante)

PFBV: pelargonium flower break virus (virus de la rotura del color de la flor del Pelargonium)

PLPV: pelargonium line pattern virus (virus del arabesco del Pelargonium)

PLRV: potato leafroll virus (virus del enrollamiento de la hoja de la patata)

PMMoV: pepper mild mottle virus (virus del moteado suave del pimiento)

PMTV: potato mop-top virus (virus mop-top de la patata)

PMV: panicum mosaic virus (virus del mosaico de la papaya)

PNRSV: prunus necrotic ringspot virus (virus del anillado necrótico de los prunus)

PSNV: pea stem necrosis virus (virus de la necrosis del tallo del guisante)

PVX: potato virus X (virus X de la patata)

RCNMV: red clover necrotic mosaic virus (virus del mosaico necrótico del trébol rojo)

RrLDV: rosa rugosa leaf distortion virus (virus de la deformación rugosa de las hojas del rosal)

Acrónimos de virus

RSDaV: rose spring dwarf associated virus (virus asociado al enanismo primaveral de las rosas)

RTBV: rice tungro bacilliform virus (virus baciliforme tungro del arroz)

RTSV: rice tungro spherical virus (virus esférico tungro del arroz)

SbDV: soybean dwarf virus (virus del enanismo de la soja)

SCNMV: sweet clover necrotic mosaic virus (virus del mosaico necrótico del trébol dulce)

SCV: saguaro cactus virus (virus del cactus del Saguaro)

STNV: satellite tobacco necrosis virus (virus satélite de la necrosis del tabaco)

TBSV: tomato bushy stunt virus (virus del enanismo arbustivo del tomate)

TBV: tulip breaking virus (virus del mosaico del tulipán)

TCV: turnip crinkle virus (virus del arrugamiento del nabo)

TEV: tobacco etch virus (virus del grabado del tabaco)

TBTV: tobacco bushy top virus (virus de la ramificación superior del tabaco)

TMV: tobacco mosaic virus (virus del mosaico del tabaco)

TMV-Cg: crucifer-infecting tobacco mosaic virus (virus del mosaico del tabaco que infecta crucíferas)

TMV U1: tobacco mosaic virus (virus del mosaico del tabaco U1)

TNV: tobacco necrosis virus (virus de la necrosis del tabaco)

TNV-A: tobacco necrosis virus A (cepa A del virus de la necrosis del tabaco)

Acrónimos de virus

TNV-D: tobacco necrosis virus D (cepa D del virus de la necrosis del tabaco)

TRV: tobacco rattle virus (virus del cascabeleo del tabaco)

TSWV: tomato spotted wilt virus (virus del bronceado del tomate)

ToMV: tomato mosaic virus (virus del mosaico del tomate)

TuMV: turnip mosaic virus (virus del mosaico del nabo)

TYLCV: tomato yellow leaf curl (virus del rizado amarillo del tomate)

TYMV: turnip yellow mosaic virus (virus del mosaico amarillo del nabo)

WMV: watermelon mosaic virus (virus del mosaico de la sandia)

Acrónimos de virus

ACRÓNIMOS

AGO: *Argonaute (family protein)* (Familia de proteínas Argonauta)

DRB: *Double-stranded RNA binding proteins* (Proteínas de unión a RNA de doble cadena)

BTE: *Barley yellow dwarf virus-like translation element* (Elemento traduccional tipo BTE)

cap: Estructura 7-metilguanosina

CITE: *Cap Independent Translation Enhancer* (Estimulador de la traducción independiente de cap)

CP: *Coat Protein* (Proteína de cubierta o proteína de la cápside)

C-terminal: *Carboxyl-terminal* (Carboxilo terminal)

DCL: *Dicer-like* (RNasa tipo DICER)

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

ds: *Double-stranded* (Doble cadena)

dsDNA: *Double-stranded DNA* (DNA de doble cadena)

dsRNA: *Double-stranded RNA* (RNA de doble cadena)

eEF: *Eukaryotic Translation Elongation Factor* (Factor de elongación traduccional eucariótico)

eIF: *Eukaryotic Translation Initiation Factor* (Factor de inicio traduccional eucariótico)

eRF: *Eukaryotic release factor* (Factor de terminación eucariótico)

GDP: *Guanosine-5'-diphosphate* (Guanosín difosfato)

gRNA: *Genomic RNA* (RNA genómico)

Acrónimos

GTP: *Guanosine-5'-triphosphate* (Guanosín trifosfato en 5')

HSP: *Heat shock protein* (Proteína de choque térmico)

IRES: *Internal Ribosome entry site* (Sitio interno de entrada al ribosoma)

ISS: *I-Shaped Structure* (Estructura tipo I)

miRNA: *Micro RNA* (microRNA)

MP: *Movement Protein* (Proteína de movimiento)

mRNA: *Messenger RNA* (RNA mensajero)

natsiRNA: *Natural antisense short interfering RNA* (Pequeños RNAs interferentes derivados de transcritos naturales antisentido)

nt: *Nucleotides* (Nucleótidos)

ORF: *Open reading frame* (Pauta de lectura abierta)

PABP: *Poly(A)-binding protein* (Proteína de unión a Poli-A)

Pi: *Phosphate* (Fosfato)

PT: *Premature termination* (Terminación prematura)

PTE: *Panicum mosaic virus-like translational enhancer* (Estimulador traduccional del tipo PTE)

PTGS: *Post-Transcriptional Gene Silencing* (Silenciamiento génico post transcripcional)

rasiRNA: *Repeat associated small interfering RNA* (Pequeños RNA interferentes asociados a repeticiones)

RDR: *RNA dependent-RNA polymerase* (RNA polimerasa dependiente de RNA)

RISC: *RNA-Induced silencing complex* (Complejo de silenciamiento inducido por RNA)

Acrónimos

RITS: *RNA-induced transcriptional silencing complex* (Complejo de silenciamiento transcripcional inducido por RNA)

RNA: *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

rRNA: *Ribosomal ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico ribosomal)

ss: *Single-stranded* (Simple cadena)

SGP: *Subgenomic promoter* (Promotor del subgenómico)

sgRNA: *Subgenomic RNA* (RNA subgenómico)

siRNA: *Small Interfering RNA* (RNA pequeño interferente)

ssDNA: *Single-stranded DNA* (DNA de simple cadena)

ssRNA: *Single-stranded RNA* (RNA de simple cadena)

SL: *Stem-loop* (Horquilla)

tasiRNA: *Trans-acting small interfering RNA* (pequeño RNA interferente que actúa en trans)

TED: *Translational Enhancer Domain* (Dominio de estimulación traduccional)

TGS: *Transcriptional Gene Silencing* (Silenciamiento génico transcripcional)

TLS: *tRNA-like structure* (Estructura parecida a tRNA)

TSS: *T-Shaped structure* (Estructura en forma de T)

tRNAs: *Transfer RNAs* (RNAs de transferencia)

UTR: *Untranslational Region* (Región no traducible)

VRC: *Viral replication complex* (Complejos de replicación viral)

VPg: *Viral protein genome-linked* (Proteína viral unida al genoma)

Acrónimos

VSR: *Viral suppressor of RNA silencing* (Supresor viral del silenciamiento de RNA)

vsRNAs: *Virus derived small RNAs* (Pequeños RNAs derivados de virus)

wt: Wild type (Silvestre)

YSS: *Y-Shaped Structure* (Estructura en forma de Y)

RESUMEN

El virus del arabesco del *Pelargonium* (PLPV) es uno de los agentes virales más frecuentes en geranio (*Pelargonium* spp.). Se trata de un virus icosaédrico de 30 nm de diámetro, con un genoma monopartito de RNA de simple cadena (ss) y de polaridad positiva (+) que carece de estructura cap en su extremo 5' y de cola poli(A) en su extremo 3'. Su RNA genómico (gRNA) está constituido por 3883 nt y contiene 5 pautas de lectura abiertas (ORFs) flanqueadas por una región no traducible (UTR) de sólo 6 nt en 5' y una 3' UTR de 246 nt. Las ORFs codifican dos proteínas implicadas en replicación, p27 y p87 (la RNA polimerasa dependiente de RNA, RDR viral), dos proteínas implicadas en movimiento, p7 (MP1) y p9.7 (MP2), y un polipéptido, p37, que funciona como proteína de cubierta (CP) y como supresor del silenciamiento por RNA (VSR). Las dos primeras se traducen a partir del gRNA y las tres restantes lo hacen a partir de un único RNA subgenómico (sgRNA) que el virus produce en el curso de la infección. El PLPV pertenece a la familia *Tombusviridae* pero presenta características peculiares que han motivado la propuesta de su inclusión en un nuevo género, denominado provisionalmente *Pelarspovirus*, en el que se agruparían otros cuatro pequeños virus isométricos. Los virus de este nuevo género compartirían particularidades específicas relacionadas con sus mecanismos de expresión

génica como son: a) la generación de un solo sgRNA estructural- y funcionalmente tricistrónico, b) la presencia de un codón de iniciación no canónico (CUG o GUG) en el gen de la MP2, c) la ausencia de codones AUG en cualquier marco de lectura entre los codones de inicio AUG de los genes MP1 y CP, y d) la agrupación filogenética en un clado separado de otros miembros de la familia *Tombusviridae*.

En esta tesis se ha pretendido, por una parte, profundizar en el estudio de las estrategias de regulación de la expresión génica del PLPV y, por otra, recabar información sobre los procesos de degradación a los que se encuentra sometido su genoma, particularmente sobre aquellos relacionados con el mecanismo de silenciamiento por RNA.

El control de la expresión génica del PLPV parece tener lugar tanto a nivel transcripcional, con la producción de un sgRNA, como post-transcripcional, con la utilización de distintos mecanismos de traducción no convencionales. Trabajos previos habían puesto de manifiesto que la traducción de tres genes a partir del sgRNA tenía lugar por procesos de escape al rastro ribosomal finamente regulados. Sin embargo, no se conocía cómo se sintetizaba dicho sgRNA. El primer objetivo abordado en este trabajo ha sido determinar el mecanismo y los elementos del RNA viral implicados en la generación del sgRNA

del PLPV. Mediante predicciones de conformación del RNA *in silico* y el diseño y bioensayo de mutantes del virus en plantas de *Nicotiana benthamiana*, se ha identificado una interacción entre segmentos alejados del gRNA de polaridad positiva, que actúa en *cis* y que media la producción de la cadena negativa del sgRNA, un tipo de molécula fácilmente detectable en tejido infectado. Estos resultados junto con la posibilidad de desacoplar la síntesis de cadenas negativas y positivas del sgRNA y con la observación de similitud de secuencia entre el extremo 5' del gRNA y del sgRNA (con una función promotora en las cadenas complementarias), sugieren que el PLPV sigue un modelo de terminación prematura para la formación de su único sgRNA.

Otra cuestión que se desconocía del esquema de expresión génica del PLPV, era cómo los RNA virales (g y sg) podían atraer a la maquinaria traduccional en ausencia de una estructura cap en 5' y de una cola poli(A) en 3'. El segundo objetivo de este trabajo ha sido identificar los elementos del genoma viral que están implicados en su traducción a través de un mecanismo independiente de cap. Análisis *in silico* previos habían sugerido la presencia de un estimulador traduccional (CITE) en la 3' UTR del virus capaz, presumiblemente, de mediar una traducción desligada de cap. Mediante trasfección de protoplastos de *N. benthamiana* con construcciones deladoras,

se ha corroborado la funcionalidad del CITE tanto en el contexto del gRNA como del sgRNA. Adicionalmente, se ha constatado que este elemento establece una interacción RNA-RNA a larga distancia con la región 5' del RNA correspondiente que es esencial para su actividad. Asimismo, se han obtenido datos que apoyan la relevancia del CITE durante el ciclo infeccioso del virus y que, además, sugieren que la doble función, reguladora y codificante, de las secuencias 5'-proximales con las que interacciona, impone fuertes restricciones a la estructura de las poblaciones virales.

Por último, para intentar recabar información sobre el papel del PLPV como inductor y diana de mecanismos de silenciamiento por RNA disparados por la planta como defensa frente al virus, se han caracterizado los pequeños RNAs virales (vsRNAs) presentes en plantas de *N. benthamiana* infectadas. Mediante secuenciación masiva, análisis computacionales e hibridación molecular, se ha podido determinar que: a) los vsRNAs del PLPV se acumulan en proporciones extraordinariamente elevadas en tejido infectado, b) los vsRNAs de 21 y 22 nt son los mayoritarios, c) los vsRNAs de polaridad positiva y negativa están en proporciones similares, y d) existe variabilidad en el nucleótido 5'-proximal de los vsRNAs. Estos resultados han permitido obtener pistas acerca de las moléculas virales que deben actuar cómo sustratos para

Resumen

la formación de los vsRNAs y, también, acerca de los componentes de la maquinaria de silenciamiento del huésped que deben participar en la respuesta del mismo frente al virus.

Resumen

SUMMARY

Pelargonium line pattern virus (PLPV) is one of the most frequent in geranium viral agents (*Pelargonium* spp.). It's a 30 nm diameter icosahedral virus, with a monopartite positive-sense single-stranded (ss) RNA genome, lacking a cap structure at the 5' end and poly(A) tail at its 3' end. Its genomic RNA (gRNA) comprises 3,883 nt and contains five open reading frames. These ORFs are flanked by an unusually short untranslatable region (UTR) at the 5' side, with just 6 nt, and by a 3' UTR of 246 nt. The ORFs encode two proteins involved in replication, p27 and p87 (the RNA-dependent RNA polymerase, RDR), two proteins involved in movement, p7 (MP1) and p9.7 (MP2), and a polypeptide, p37, that functions as coat protein (CP) and as a viral suppressor of RNA silencing (VSR). The first two ORFs are translated from the gRNA whereas the remaining three are translated from the single subgenomic RNA (sgRNA), that the virus produces in the course of infection. The PLPV belongs to the family *Tombusviridae* but presents unique characteristics that have prompted the proposal for its inclusion in a new genus, tentatively named *Pelarspovirus*, where other four small isometric viruses would be clustered. Viruses of this new genus would share specific peculiarities related to their mechanisms of gene expression such as: i) production of a sole sgRNA that is structural- and functionally tricistronic, ii)

presence of a non-AUG start codon (CUG or GUG) initiating the MP2 ORF, iii) absence of AUG codons in any frame between the AUG initiation codons of MP1 and CP genes, and iv) sequence-based phylogenetic clustering of all encoded proteins in separate clades from those of other family members.

In this doctoral thesis we have tried, on the one hand, to further study the regulation of PLPV gene expression and, on the other hand, to obtain information on degradation processes to which its genome is subjected, particularly on those related to the mechanism of RNA silencing.

The control of gene expression in PLPV seems to take place both at the transcriptional level, with the production of a sgRNA, and at post-transcriptional level, with the use of different non-canonical mechanisms of translation. Previous work revealed that the translation of three genes from the sgRNA is accomplished through leaky-scanning processes that are tightly regulated processes. However, it was not known how this sgRNA is synthesized. The first objective in this work was to determine the mechanism and the viral RNA elements involved in the generation of the sgRNA of PLPV. Throughout RNA secondary structure predictions and the design and bioassay of mutants of the virus in *Nicotiana benthamiana* plants, an RNA-RNA interaction involving distant segments of

the gRNA of plus polarity has been identified. Such long-range interaction seems to act in *cis* and specifically mediates the production of the negative strand of the sgRNA, a type of molecule easily detectable in infected tissue. These results together with the possibility of uncoupling the synthesis of negative and positive strands of the sgRNA and with the observation of sequence similarity between the 5' ends of the gRNA and the sgRNA (with promoter function in their complementary strands), suggest that PLPV follows a model of premature termination for the formation of its unique sgRNA.

Another question related with gene expression strategies of PLPV that was unknown was how the viral RNAs (g and sg) were able to attract to the translational machinery in the absence of a cap structure and a poly(A) tail at the 5' and 3' ends, respectively. The second objective of this work was to identify the elements of the viral genome that are involved in its translation through a cap-independent mechanism. Previous *in silico* analysis had suggested the presence of a cap-independent translational enhancer (CITE) at the 3' UTR of the virus, presumably capable of mediating cap-independent translation. Transfection of protoplasts of *N. benthamiana* with PLPV-based reporter constructs has allowed us to corroborate the functionality of the CITE in the context of both the gRNA and the sgRNA. Additionally, it has been shown that this

element establishes a long-distance RNA-RNA interaction with the 5'-region of the corresponding RNA which is essential for its activity. Also, data that support the relevance of the CITE during the infectious cycle of the virus have been gathered that, moreover, suggest that regulatory and coding function of the CITE-interacting 5'-proximal sequences imposes strong restrictions on the structure of viral populations.

Finally, in order to obtain information on the role of PLPV as inducer and target of RNA silencing that the plant triggers as a defense against the virus, we have characterized the viral small RNAs (vsRNAs) present in PLPV-infected *N. benthamiana* plants. High-throughput sequencing, computational analysis and molecular hybridization assays have shown that: i) vsRNAs of the PLPV accumulate in extraordinarily high proportions in infected tissue, ii) 21 and 22 nt vsRNAs are the most frequent ones, iii) the vsRNAs of positive and negative polarities are in similar proportions, and, iv) there is variability in the vsRNAs 5'-proximal nucleotide. These results have provided clues on the viral molecules that must act as substrates for the formation of the vsRNAs and, also, about the components of the silencing machinery of the host that are likely involved in the response against the virus.

RESUM

El virus de l'arabesc del *Pelargonium* (PLPV) és un dels agents virals més freqüents en gerani (*Pelargonium* spp.). Es tracta d'un virus icosaèdric de 30 nm de diàmetre, amb un genoma monopartit de RNA de simple cadena (ss) i de polaritat positiva (+) que manca d'estructura cap en el seu extrem 5', i de cua poli(A) en el seu extrem 3'. El seu RNA genòmic (gRNA) està constituït per 3883 nt i conté cinc pautes obertes de lectura (ORFs) flanquejats per una regió no traduïble (UTR) de només 6 nt en 5' i una 3' UTR de 246 nt. Les ORFs codifiquen dues proteïnes implicades en replicació, p27 i p87 (la RNA polimerasa dependent de RNA, RDR viral), dues proteïnes implicades en moviment, p7 (MP1) i p9.7 (MP2), i un polipèptid, p37, que funciona com a proteïna de coberta (CP) i com supressor de silenciament per RNA (VSR). Les dues primeres es tradueixen a partir del gRNA i les tres restants ho fan a partir d'un únic RNA subgenòmic (sgRNA) que el virus produeix en el curs de la infecció. El PLPV pertany a la família *Tombusviridae*, però presenta característiques peculiars que han motivat la proposta de la seua inclusió en un nou gènere, denominat provisionalment *Pelarspovirus*, en el qual s'agruparien quatre xicotets virus isomètrics més. Els virus d'aquest nou gènere compartirien particularitats específiques relacionades amb els seus mecanismes d'expressió gènica com són: a) la generació

d'un sol sgRNA estructural i funcionalment tricistrònic, b) la presència d'un codó d'iniciació no canònic (CUG o GUG) en el gen de la MP2, c) l'absència de codons AUG en qualsevol pauta de lectura entre els codons d'inici AUG dels gens MP1 i CP, i d) l'agrupació filogenètica en un clade separat d'altres membres de la família *Tombusviridae*.

En aquesta tesi s'ha pretès, d'una banda, aprofundir en l'estudi de les estratègies de regulació de l'expressió gènica del PLPV i, per una altra, recopilar informació sobre els processos de degradació als quals es troba sotmès el seu genoma, particularment sobre aquells relacionats amb el mecanisme de silenciament per RNA.

El control de l'expressió gènica del PLPV sembla tenir lloc tant a nivell transcripcional, amb la producció d'un sgRNA, com post-transcripcional, amb la utilització de diferents mecanismes de traducció no convencionals. Treballs previs havien posat de manifest que la traducció de tres gens a partir del sgRNA tenia lloc per processos d'escapament al rastreig ribosomal finament regulats. No obstant açò, no es coneixia com se sintetitzava dit sgRNA. El primer objectiu abordat en aquest treball ha sigut determinar el mecanisme i els elements del RNA viral implicats en la generació del sgRNA del PLPV. Mitjançant prediccions de conformació del RNA *in silico* i el disseny i bioassaig de mutants

del virus en plantes de *Nicotiana benthamiana*, s'ha identificat una interacció entre segments allunyats del gRNA de polaritat positiva, que actua en *cis* i que intervé en la producció de la cadena negativa del sgRNA, un tipus de molècula fàcilment detectable en teixit infectat. Aquests resultats juntament amb la possibilitat de desacoblar la síntesi de cadenes negatives i positives del sgRNA i amb l'observació de similitud de seqüència entre l'extrem 5' del gRNA i del sgRNA (amb una funció promotora en les cadenes complementàries), suggereixen que el PLPV segueix un model de terminació prematura per a la formació del seu únic sgRNA.

Una altra qüestió que es desconeixia de l'esquema d'expressió gènica del PLPV, era com els RNA virals (g i sg) eren capaços d'atraure a la maquinària traduccional en absència d'una estructura cap en 5' i d'una cua poli(A) en 3'. El segon objectiu d'aquest treball ha sigut identificar els elements del genoma viral que estan implicats en la seua traducció a través d'un mecanisme independent de cap. Anàlisi *in silico* previs havien suggerit la presència d'un estimulador traduccional (CITE) en la 3' UTR del virus, capaç presumiblement, d'intervenir una traducció deslligada de cap. Mitjançant trasfecció de protoplastos de *N. benthamiana* amb construccions delatotes, s'ha corroborat la funcionalitat del CITE tant en el context del gRNA com del sgRNA.

Adicionalment, s'ha constatat que aquest element estableix una interacció RNA-RNA a llarga distància amb la regió 5' del RNA corresponent que és essencial per a la seua activitat. Així mateix, s'han obtingut dades que recolzen la rellevància del CITE durant el cicle infecció del virus i que, a més a més, suggereixen que la funció reguladora i codificant de les seqüències 5'-proximals amb les quals interacciona, imposa fortes restriccions a l'estructura de les poblacions virals.

Finalment, per intentar recopilar informació sobre el paper del PLPV com inductor i diana de mecanismes de silenciament per RNA disparats per la planta com a defensa davant del virus, s'han caracteritzat els xicotets RNAs virals (vsRNAs) presents en plantes de *N. benthamiana* infectades. Mitjançant seqüenciació massiva, anàlisis computacionals i hibridació molecular, s'ha pogut determinar que: a) els vsRNAs del PLPV s'acumulen en proporcions extraordinàriament elevades en teixit infectat, b) els vsRNAs de 21 i 22 nt són els majoritaris, c) els vsRNAs de polaritat positiva i negativa estan en proporcions similars, i d) existeix variabilitat en el nucleòtid 5'-proximal dels vsRNAs. Aquests resultats han permès obtenir pistes sobre les molècules virals que han d'actuar com substrats per a la formació dels vsRNAs i, també, sobre els components de la maquinària de silenciament de l'hoste que han de participar en la resposta del mateix enfront del virus.

Introducción

1-Los virus de plantas y su ciclo infeccioso

Los comienzos de la Virología vegetal se remontan a finales del siglo XIX, cuando el microbiólogo holandés Martinus Beijerinck y el científico ruso Dmitrii Iwanowski investigaban la causa de una misteriosa enfermedad conocida como mosaico del tabaco (Scholthof, 2001). Estos investigadores, de forma independiente, describieron un agente inusual que causaba dicha enfermedad (Zaitlin, 1998). Lo que distinguía a este agente de otros agentes causales de enfermedades era su tamaño mucho menor al de otros microorganismos. Esta entidad, posteriormente denominado virus del mosaico del tabaco (tobacco mosaic virus, TMV, *Tobamovirus*, *Virgaviridae*), fue el primer virus descrito. Desde entonces, se ha encontrado una gran cantidad de virus en plantas, animales, hongos y bacterias. El Comité Internacional de Taxonomía Viral (*International Committee of Viruses*, ICTV) ha reconocido hasta el momento cerca de 4000 especies virales distintas, de las cuales cerca de 1000 corresponden a virus de plantas. Una de las principales razones por las que se estudian los virus de plantas es por el impacto negativo que tienen las enfermedades que producen en el rendimiento y calidad de muchos cultivos de relevancia agronómica. Dependiendo de la combinación de virus y huésped y de las condiciones ambientales, la respuesta vegetal a una infección viral puede ser desde asintomática

hasta enfermedad grave y muerte de la planta. En algunos casos, en el lugar de infección se desarrollan lesiones localizadas (pequeños puntos cloróticos y/o necróticos) donde se restringe la presencia del virus. En la mayoría de los casos, los virus se dispersan a través de toda la planta causando una infección sistémica.

Los síntomas foliares típicos de las enfermedades virales incluyen patrones de mosaico, lesiones cloróticas o necróticas, amarilleamiento, estrías o franjas, decoloración y formación de bandas en las nervaduras, y enrollamiento y/o curvatura. Las flores a menudo presentan deformaciones o cambios de color. Los síntomas en frutos y otros órganos vegetales incluyen patrones de mosaico, achaparramiento, decoloración o malformación, y anillos cloróticos (Figura 1). Los tallos de las plantas pueden desarrollar quebraduras, hundimientos y tumores como consecuencia de la infección viral.

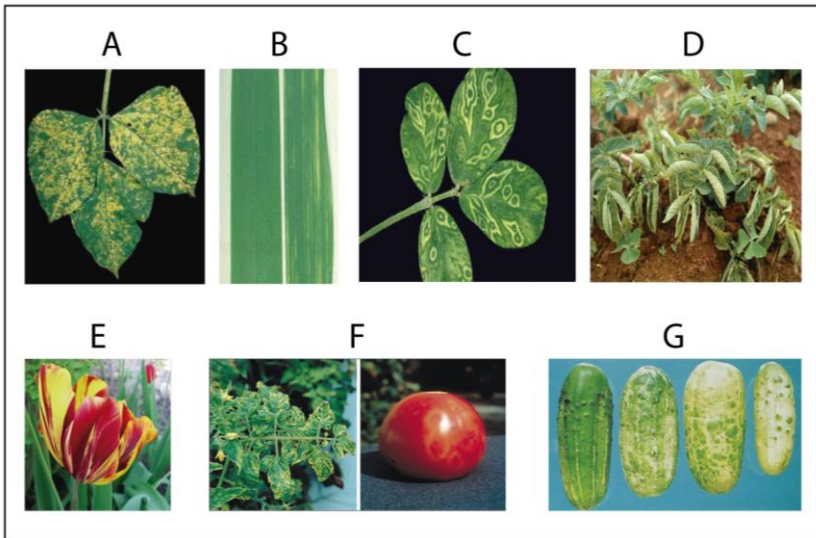


Figura 1. Sintomatología viral. Ejemplos de cómo los virus provocan síntomas en hojas, flores y frutos. **A.** Virus del mosaico común del frijol (bean common mosaic, BCMV, *Potyvirus*, *Potyviridae*) en frijol. **B.** Virus de la hoja rayada de la Festuca (festuca leaf streak virus, FLSV, *Cytorhabdovirus*, *Rhabdoviridae*) en hoja de trigo. **C.** Virus del bronceado del tomate (tomato spotted wilt virus, TSWV, *Tospovirus*, *Bunyaviridae*), en hoja de cacahuete. **D.** Virus del enrollamiento de la hoja de la patata (potato leafroll virus, PLRV, *Polerovirus*, *Luteoviridae*) en patata. **E.** Virus del mosaico del tulipán (tulip breaking virus, TBV, *Potyvirus*, *Potyviridae*) en tulipán. **F.** Virus del mosaico del tomate (tomato mosaic virus, ToMV, *Tobamovirus*, *Virgaviridae*) en tomate. **G.** Virus del mosaico del pepino (cucumber mosaic virus, CMV, *Cucumovirus*, *Bromoviridae*) en pepino.

Un virus se define como un organismo de estructura muy sencilla, compuesto de un genoma (donde reside su información genética) constituido por ácido ribonucleico

(*ribonucleic acid*, RNA), o ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*, DNA), de cadena sencilla (*single-stranded*, ss) o de doble cadena (*double-stranded*, ds), lineal o circular. Alrededor del 82% de los virus de plantas contienen un genoma RNA de simple cadena (ssRNA), el 6% contienen RNA de doble cadena (dsRNA), el 7,5% DNA de simple cadena (ssDNA) y el 4,5% DNA de doble cadena (dsDNA) (Agrios, 2005). El genoma se encuentra rodeado de una capa formada por un tipo o varios de proteína de cubierta (*coat protein*, CP) que lo protegen. Algunos ejemplos de las familias de virus de plantas económicamente más importantes y con genoma de ssRNA de polaridad positiva (+) son *Bromoviridae*, *Secoviridae*, *Tymoviridae*, *Tombusviridae*, *Virgaviridae*, *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Closteroviridae*, *Luteoviridae*, y *Potyviridae*. Pocos virus de plantas poseen genomas de ssRNA de polaridad negativa (-) como son las familias *Bunyaviridae*, *Ophioviridae* y *Rhabdoviridae*. Los virus de dsRNA se agrupan en las familias *Reoviridae*, *Partitiviridae*, *Endornaviridae*. Sólo hay una familia de virus de plantas con genoma dsDNA, la familia *Caulimoviridae* o también llamados pararetrovirus. Los virus ssDNA están representados por la familia más importante económicamente *Geminiviridae* y también por *Nanoviridae*. El pequeño tamaño del genoma de los virus de plantas limita el número de proteínas que pueden codificar. Para extender su

potencial codificante es frecuente encontrar genes solapantes en genomas virales y, asimismo, es habitual que las proteínas virales sean multifuncionales. Los virus de plantas codifican, al menos, proteínas para sustentar tres procesos básicos de su ciclo infeccioso: la replicación, el movimiento y la encapsidación. Entre las proteínas implicadas en replicación destaca, en el caso de virus con genoma de RNA, la RNA polimerasa dependiente de RNA (*RNA dependent RNA polymerase*, RDR), que cataliza la síntesis de las copias del genoma viral. En cuanto a las proteínas de movimiento (*movement protein*, MP), los virus pueden codificar una, dos e incluso tres proteínas distintas para mediar su transporte entre las células vegetales. Por último, las CPs, de un solo tipo o de más dependiendo del virus, envuelven el genoma y permiten la formación de la partícula vírica o virión (Hull, 2014).

Dado que los virus vegetales son parásitos biotróficos obligados, explotan la maquinaria macromolecular de la célula huésped para obtener la energía que necesitan y para completar las distintas etapas de su ciclo infeccioso. Este ciclo comienza con la penetración del virión en la célula. Los virus vegetales por sí solos no pueden penetrar la cutícula y la pared celular de las plantas, de modo que el virión ingresa al citoplasma de la célula de forma pasiva, a través de heridas causadas por daño mecánico o por punciones de insectos o de

otros tipos de vectores. El paso siguiente en la infección viral es la decapsidación que consiste en la eliminación parcial o total de la cubierta proteica del virión liberando su genoma en el citoplasma. A partir de aquí, los ciclos replicativos de los diferentes virus van a variar en función de la naturaleza de su material genético (Hull, 2002; Mandahar, 2006; Nayudu, 2008; Hull, 2008; Laliberti y Sanfacon, 2010).

Centrándonos en los virus de ssRNA (+), los más abundantes en plantas, su replicación tiene lugar en el citoplasma. El propio RNA genómico (*genomic RNA*, gRNA) actúa como RNA mensajero (*messenger RNA*, mRNA) para la traducción de, al menos, las proteínas implicadas en replicación, la RDR viral y, frecuentemente, una o varias proteínas auxiliares (Figura 2). En base a motivos conservados de las secuencias de las RDRs virales y a algunos rasgos genómicos, se distinguen cuatro supergrupos de virus de RNA de polaridad (+): *Picornavirus*, *Alpha*-, *Carmovirus*, y *Sobemovirus* (Koonin y Dolja, 1993). Las proteínas involucradas en replicación recién sintetizadas (que normalmente se producen en menor cantidad que el resto de productos virales; Buck, 1999), junto con el RNA viral y factores del huésped se asocian a compartimentos membranosos de la célula, donde formarán los denominados complejos de replicación viral (*viral replication complex*, VRCs) (Nagy y Pogany, 2008; den Boon y

Ahlquist, 2010). En estos complejos se generarán intermediarios de polaridad (-) complementarios al gRNA que sirven de molde para sintetizar nuevas cadenas de polaridad (+) y, en algunos casos (en los supergrupos *Alpha-*, *Carmo-*, y *Sobemovirus*), para formar RNA(s) subgenómico(s) (*subgenomic RNA*, sgRNA), que permitirán la traducción de genes situados internamente en el gRNA (ver apartado 2.2.2). La síntesis de cadenas positivas y negativas ocurre de manera asimétrica generándose mayor cantidad de las de polaridad (+), que son las que tienen capacidad infecciosa (den Boon y Ahlquist, 2010; Nagy y Pogany, 2012). Estas últimas comenzarán nuevos ciclos de traducción y/o replicación, lo que implicará una coordinación minuciosa entre ambos procesos, o serán encapsidadas para formar las partículas víricas de la progenie que estará lista para invadir nuevas células y/o organismos.

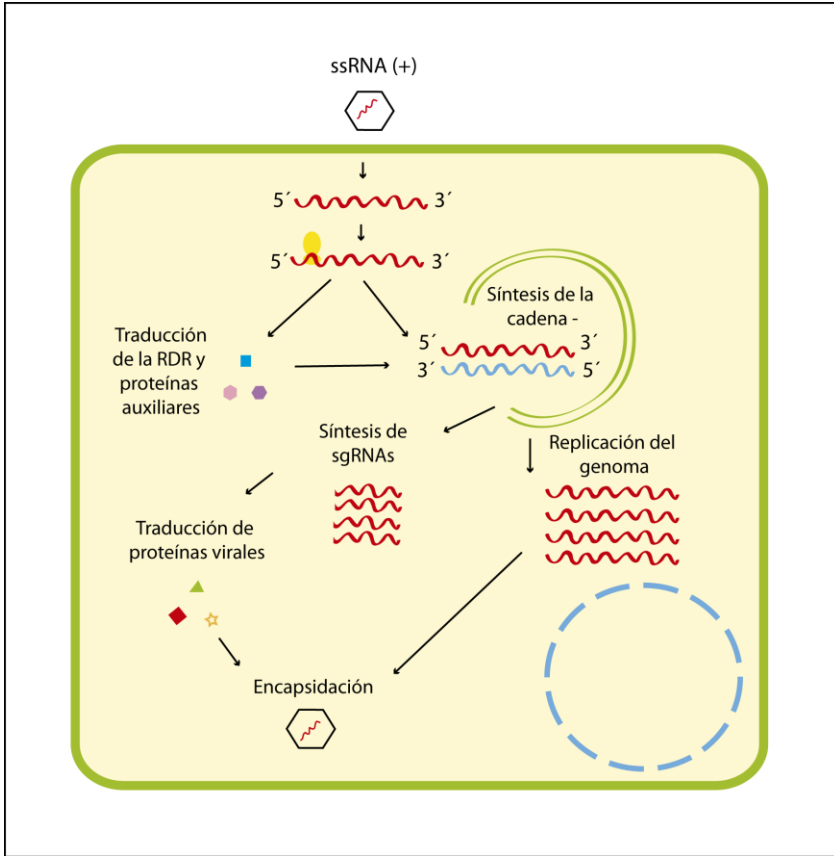


Figura 2. Representación esquemática del ciclo de replicación de los virus ssRNA (+). A partir del gRNA se traducen las replicasas virales: RDR viral y proteínas auxiliares. Estas proteínas copian el gRNA, para generar intermediarios de polaridad negativa que sirven de molde para sintetizar nuevas cadenas positivas (la progenie viral), y en algunos casos para formar sgRNAs, a partir de los cuales se traducirán otras proteínas virales (MP y CP). La(s) CP(s) reconocerán las copias del genoma viral dando lugar a nuevas partículas virales.

Para lograr una infección sistémica, el virus debe moverse célula a célula y a larga distancia. En el primer caso, las partículas virales o complejos ribonucleoproteicos con el genoma viral (esto dependerá de cada virus) son transportadas entre células vecinas a través de los plasmodesmos, un proceso en el que las MPs desempeñan un papel fundamental (Boevink y Oparka, 2005; Harries y Ding, 2011). El movimiento célula a célula es relativamente lento de modo que para que el virus se extienda por toda la planta es necesario que entre en el sistema vascular, normalmente en floema. El tiempo que transcurre desde que se inicia la infección hasta que llega a ser sistémica varía desde pocos días a pocas semanas dependiendo del tipo de virus, de la planta huésped y de las condiciones ambientales. La transmisión del virus de una planta infectada a una planta sana garantiza la supervivencia del mismo a largo plazo. La mayoría de los virus vegetales se transmiten por un vector, pudiendo ser artrópodos herbívoros, nematodos, u hongos fitófagos (Walkey, 1991). Los áfidos y las moscas blancas son los que transmiten el mayor número de especies de virus. Además, muchos virus pueden ser transmitidos vegetativamente a partir de plantas infectadas, por ejemplo por tubérculos o injertos, o por medios mecánicos como herramientas de poda. Otros pueden transmitirse de manera “vertical” a partir de semillas o polen de plantas infectadas.

Introducción

Este último tipo de transmisión es particularmente importante para la supervivencia invernal de los virus (Gergerich y Dolja, 2006).

2-Expresión génica de virus de plantas

2.1 La traducción en eucariotas: aspectos generales

La traducción es el proceso de síntesis de proteínas llevado a cabo a partir de la secuencia de nucleótidos (nt) del mRNA. En eucariotas, este proceso involucra ribosomas [compuestos de RNA ribosomal (*ribosomal RNA*, rRNA), y proteínas ribosomales], RNAs de transferencia (*transfer RNAs*, tRNAs), encargados de llevar los aminoácidos activados al ribosoma, y proteínas denominadas factores de inicio traduccional (*eukaryotic translation initiation factors*, eIFs), factores de elongación traduccional (*eukaryotic translation elongation factors*, eEFs), y factores de terminación (*eukaryotic release factors*, eRFs) (Gallie, 1996). La inmensa mayoría de los mRNAs celulares eucarióticos son monocistrónicos y contienen en su extremo 5' una estructura denominada cap, que corresponde a un nucleótido de guanina modificado (7-metilguanosina trifosfato unido mediante un enlace 5' fosfato-5' fosfato en lugar del habitual enlace 3', 5'-fosfodiéster), y en el extremo 3' presentan una cola de poli(A) (Furuchi y Shatkin, 2000). Estas modificaciones son esenciales para reclutar a los factores de inicio traduccionales y al ribosoma, y proporcionan estabilidad al mRNA (Hentze *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2010). De las tres etapas de que consta el proceso de traducción,

iniciación, elongación y terminación (Figura 3), la primera es la más limitante y la que está sujeta a mayor regulación. En eucariotas, esta etapa de iniciación se ajusta a un modelo denominado rastreo o barrido ribosomal (Gale *et al.*, 2000; Thiébeauld *et al.*, 2007).

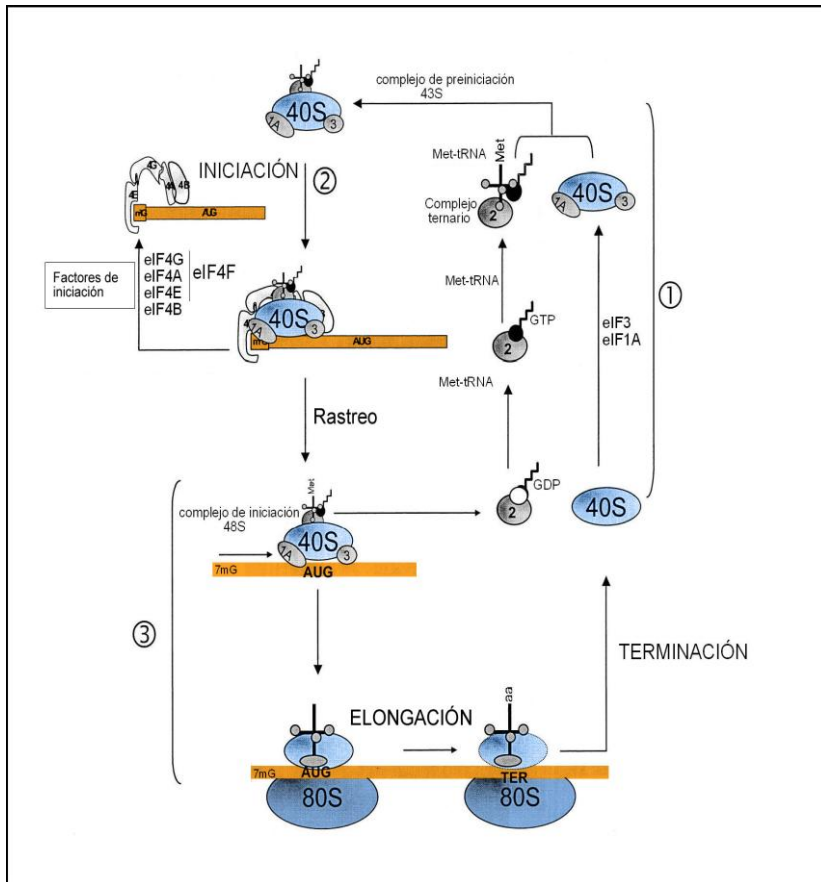


Figura 3. Esquema del proceso de traducción eucariótico dependiente de cap. Descripción detallada de los pasos en el texto principal (tomado de Gale *et al.*, 2000).

De forma resumida, el proceso empieza con el reconocimiento de la estructura cap por el complejo eIF4F a través de la subunidad pequeña eIF4E. La subunidad grande de dicho complejo, eIF4G, reconoce a su vez a la proteína de unión a poli(A) (*poly(A)-binding protein*, PABP), que está asociada a la cola poli(A), y favorece el reclutamiento del complejo de preiniciación 43S (formado, esencialmente, por los factores de iniciación eIF3, eIF1A, eIF2-GTP, el iniciador Met-tRNA y la subunidad pequeña del ribosoma 40S) a través de su interacción con eIF3. El complejo de preiniciación comienza el rastreo de la secuencia líder en dirección 5'-3' hasta encontrar un codón apropiado (normalmente el AUG situado más próximo al extremo 5'). Por medio del factor eIF5, se activa la actividad GTPasa del eIF2-GTP, liberando eIF2-GDP de la subunidad 40S que así puede unirse a la subunidad 60S para formar el ribosoma 80S y emprender la traducción (Thiébeauld *et al.*, 2007). Durante la etapa de iniciación, la interacción simultánea de la gran proteína adaptadora eIF4G a eIF4E, unida al cap, y a PABP, unida a la cola poli(A), hace que el mRNA adopte una conformación de bucle cerrado (Figura 4) (Jacobson, 1996; Sachs *et al.*, 1997; Gallie, 1998). Esta conformación se cree que aumenta la afinidad entre los eIFs, el ribosoma y el mRNA para iniciar el rastreo y, probablemente, facilitar el reciclaje de la

maquinaria traduccional para comenzar nuevas rondas de traducción sobre el mismo mRNA (Pestova *et al.*, 2001).

Aunque la mayoría de eIFs son similares en todos los eucariotas, hay diferencias entre mamíferos y plantas. Las plantas superiores poseen una isoenzima de eIF4F, llamada eIF(iso)4F, formada por las subunidades correspondientes eIF(iso)4E y eIF(iso)4G (Browning *et al.*, 1992). En levaduras, mamíferos y plantas no se conserva la secuencia aminoacídica de eIF4B (Metz *et al.*, 1999).

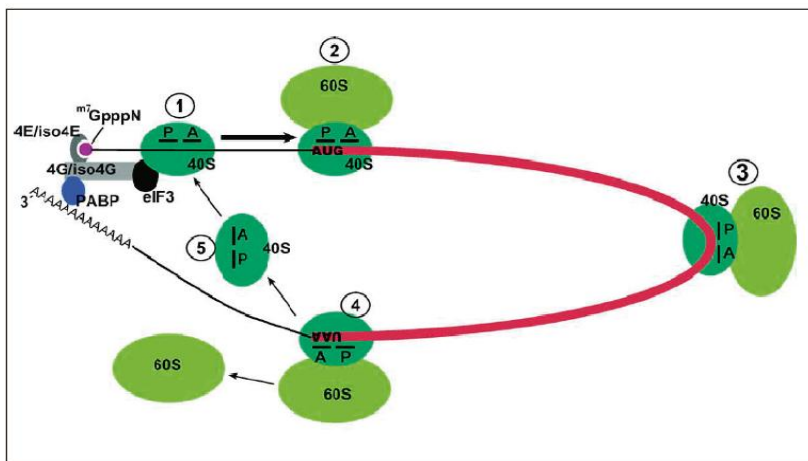


Figura 4. Modelo del bucle cerrado. 1. Ensamblaje de los factores traduccionales en el mRNA. 2. Rastreo. 3. Elongación. 4. Terminación. 5. Reciclaje de la subunidad ribosomal pequeña 40S (tomado de Dreher y Milller, 2006).

Hay una serie de factores que influyen en que el inicio traduccional se lleve a cabo de manera más o menos eficiente. Uno de ellos es el tipo de codón iniciador. El triplete convencional de inicio de traducción corresponde, como se ha indicado anteriormente, a AUG. Sin embargo, en ocasiones la traducción se inicia en codones no convencionales (o no-AUG) que difieren en un nucleótido del AUG canónico y que actúan como iniciadores débiles (Kozak, 1989; Gordon *et al.*, 1992). Otro factor importante es el contexto nucleotídico del codón de inicio. En eucariotas, el contexto óptimo se caracteriza por la presencia de una purina en la posición -3, y una guanina en la posición +4 (Gallie, 1993). En plantas más concretamente, el contexto óptimo se ajusta al consenso (A/G)aaAUGGC para dicotiledóneas, y a (A/G)ccAUGGC para monocotiledóneas (Lutcke *et al.*, 1987; Joshi *et al.*, 1997; Lukaszewicz *et al.*, 2000). Las características estructurales de la secuencia líder del mRNA son también decisivas, ya que condicionarán que el barrido del complejo de preiniciación hasta alcanzar el codón de inicio sea más o menos eficiente (Kozak, 1991, 1994; Miller *et al.*, 1995).

Tras el inicio, la síntesis de proteínas se completa con las etapas de elongación y terminación. Durante la etapa de elongación se produce la formación secuencial de enlaces peptídicos, lo que implica la unión del aminoacil-tRNA dependiente de codón, la transpeptidación y la translocación

(Thiébeauld *et al.*, 2007). Los sitios de unión del aminoacil-tRNA y del peptidil-tRNA en el ribosoma han sido designados como A y P, respectivamente. Si el ribosoma se encuentra durante la elongación con uno de los tres codones de parada (UAA, UAG o UGA), se cancela la síntesis y se produce la terminación de la traducción. Los codones de parada no poseen ningún tRNA complementario. En cambio, el factor de terminación eRF1 reconoce los tres codones de terminación y, junto con eRF3 y de manera dependiente de GTP, induce la hidrólisis del peptidil-tRNA del sitio P liberando la cadena polipeptídica del ribosoma. A continuación, el ribosoma se suelta del mRNA, y se separan sus subunidades que quedarán disponibles para comenzar un nuevo ciclo de traducción (Gale *et al.*, 2000; Welch *et al.*, 2000).

2.2 Estrategias de expresión génica de virus de plantas

Los virus dependen absolutamente de la maquinaria traduccional del huésped para producir sus proteínas. Sin embargo, debido a su pequeño tamaño, la información genética en los genomas virales está extremadamente compactada. Por ello, los RNAs de estos agentes infecciosos son a menudo policistrónicos y, además, en el caso de los correspondientes a virus de plantas, más del 80 % carecen de la estructura cap y/o de la cola poli(A) presentes en los mRNAs

celulares típicos. Esto ha condicionado que los virus hayan desarrollado todo un conjunto de estrategias que les permiten soslayar o adaptarse a algunas de las limitaciones impuestas por el aparato traduccional del huésped, como la expresión exclusiva (o preferencial) de las ORFs situadas en posición 5'-proximal en el correspondiente mensajero o la dependencia de la iniciación de la traducción de la estructura cap del extremo 5'. Estas estrategias aparecen a menudo combinadas y van a posibilitar no solo que los virus puedan traducir todos sus genes, sino que además regulen de forma precisa (temporal y cuantitativamente) su expresión génica, un aspecto esencial para el progreso de cualquier infección. A continuación, se describirán de manera general estas estrategias y con mayor detenimiento, aquellas que estén directamente relacionadas con el presente trabajo. Para facilitar esta descripción, se distinguirán cuatro niveles generales de regulación: a) por partición del genoma, b) transcripcional, c) traduccional y, d) post-traduccional.

2.2.1 Regulación de la expresión génica por partición del genoma

Los genomas de virus de plantas de ssRNA (+) pertenecientes a distintos taxones, por ejemplo los de los géneros *Bromo-*, *Bymo-*, *Como-*, *Crini-*, *Cucumo-*, *Diantho-*,

Furo-, *Hordei-*, *Ilar-*, *Idaeo-*, *Nepo-*, o *Tobravirus*, están divididos en dos (bipartito) o tres (tripartito) segmentos. Virus relacionados pertenecientes a un mismo grupo pueden diferir en el número de componentes genómicos como ocurre con los géneros *Potyvirus* (monopartitos) y *Bymovirus* (bipartitos), ambos en la familia *Potyviridae*, o de los géneros *Closterovirus* (monopartitos) y *Crinivirus* (bipartitos), ambos incluidos en la familia *Closteroviridae*. Cada segmento genómico de un genoma multipartito puede contener una o más ORFs.

La partición del genoma proporciona la ventaja de hacer a distintos genes virales más accesibles a los ribosomas para su traducción. Además, permite que la expresión génica de distintas partes del genoma pueda ser regulada de forma independiente (Hull, 2014).

2.2.2 Regulación transcripcional de la expresión génica: producción de sgRNAs

La expresión de genes situados en posición interna y 3' proximal en el genoma de virus RNA (+) es frecuentemente dirigida por sgRNAs, 3' coterminales con el gRNA, que se generan en el curso de la infección (Miller y Koev, 2000). Esta estrategia permite aproximar el codón de inicio de dichos genes al extremo 5' de un mRNA, haciéndolos accesibles a la

maquinaria traduccional del huésped. La producción de sgRNAs, que se puso de manifiesto inicialmente a partir de estudios realizados con el virus del mosaico del bromo (brome mosaic virus, BMV, *Bromovirus*, *Bromoviridae*) (Shih *et al.*, 1972), seguidos de cerca por otros realizados con el TMV (Hunter *et al.*, 1976), es empleada por la inmensa mayoría de virus de plantas de ssRNA (+). Así ocurre con aquellos pertenecientes a las familias *Bromoviridae*, *Closteroviridae* y *Tombusviridae* y a los géneros *Carlavirus*, *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Luteovirus*, *Polerovirus*, *Potexvirus*, *Sobemovirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus* y *Tymovirus*. De este modo, virus de plantas de tres supergrupos (*Alpha-*, *Carmo-*, y *Sobemovirus*) producen sgRNAs, a pesar de tener una organización genómica y otras estrategias traduccionales considerablemente diferentes. Sin embargo, componentes del supergrupo *Picornavirus*, en el que se incluyen virus de las familias *Potyviridae* y *Comoviridae* así como los *Sequivirus* de la familia *Sequiviridae*, no generan sgRNAs porque sus genes se expresan como una única poliproteína (Hull, 2014).

Como se ha mencionado en el Apartado 1 de esta Introducción, la replicación de virus con gRNA (+) transcurre exclusivamente a través de intermediarios de RNA, de polaridad positiva y negativa, que son sintetizados por la RDR codificada por el virus (Buck, 1996). La síntesis de sgRNAs

también es llevada a cabo por la RDR viral, en un proceso denominado transcripción. La generación de estos RNAs va a permitir ejercer un control cuantitativo y temporal de la producción de ciertas proteínas virales. En general, los sgRNAs empiezan a acumularse junto con, o poco después, de la detección de la replicación del genoma en las infecciones, sugiriendo que la transcripción es un proceso acoplado a la replicación (Jiwan y White, 2011). El número de sgRNAs que produce un virus puede oscilar desde uno, como se ha descrito para miembros del género *Dianthovirus* en la familia *Tombusviridae* (Basnayake *et al.*, 2006; King *et al.*, 2011) o del género *Alfamovirus* en la familia *Bromoviridae* (van der Vossen *et al.*, 1995), hasta diez o más como se ha observado en miembros del género *Closterovirus* dentro de la familia *Closteroviridae* (Hilf *et al.*, 1995; Gowda *et al.*, 2003). En general, en el caso de virus que producen más de un sgRNA, no se puede establecer una correlación entre el tamaño de los sgRNAs y la cantidad o el momento en que se generan, lo que sugiere que la regulación de la síntesis de los distintos sgRNAs se produce en respuesta a los requerimientos proteicos que existen en el curso de la infección (Koev y Miller, 2000; Peremyslov y Dolja, 2002; Gowda *et al.*, 2003; Jiwan y White, 2011). Los sgRNAs actúan normalmente como mRNAs para la expresión de proteínas que son necesarias durante los estadios

intermedios o tardíos de la infección, como son la(s) MP(s) y la(s) CP(s), entre otras.

Aunque los sgRNAs 3' coterminales con el gRNA son los más habituales, algunos virus producen sgRNAs que son 5' coterminales con el gRNA, y que, por tanto, tienen su extremo 3' coincidente con regiones internas del mismo. Así ocurre por ejemplo con el BMV (Wierzchoslawski *et al.*, 2006; Sztuba-Solińska y Bujarski, 2008), el virus de la tristeza de los cítricos (citrus tristeza virus, CTV, *Closterovirus*, *Closteroviridae*) (Che *et al.*, 2001; Gowda *et al.*, 2003), o el virus de la hoja deformada de los cítricos (citrus tatter leaf virus, CTLV, *Capillovirus*) (Tatineni *et al.*, 2009), que generan ambos tipos de sgRNAs. Estos sgRNAs 5' coterminales probablemente desempeñan también un papel en traducción, aunque la información a este respecto es relativamente escasa (Vives *et al.*, 2002; Galiakparov *et al.*, 2003).

2.2.2.1 Mecanismos de síntesis de sgRNAs

En virus de plantas se han propuesto dos mecanismos distintos para la producción de sgRNAs: iniciación interna y terminación prematura. A continuación se describirán los aspectos más destacables de ambos mecanismos.

2.2.2.1.1 –Iniciación interna

En este mecanismo, un promotor situado internamente en la cadena negativa del gRNA de longitud total se usa para iniciar la síntesis del sgRNA, un proceso que termina cuando la RDR viral alcanza el extremo 5' del molde (Figura 5) (Sztuba-Solińska *et al.*, 2011). El resultado es la producción de un sgRNA que es 3' co-terminal con el gRNA del que deriva. Este modelo transcripcional fue el primero descrito y el más ampliamente aceptado durante mucho tiempo (Miller *et al.*, 1985; Miller y Koev, 2000).

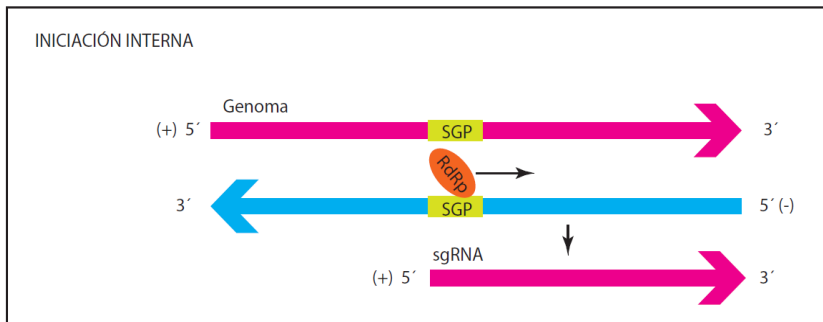


Figura 5. Representación esquemática del modelo de iniciación interna para la síntesis del sgRNA. Las cadenas del gRNA y del sgRNA de polaridad positiva se representan con flechas rosas, la cadena de polaridad negativa con una flecha azul, SGP: promotor subgenómico (basado en Sztuba-Solińska *et al.*, 2011).

Como norma general, las secuencias promotoras para la generación de los sgRNAs suelen localizarse justo antes del sitio de inicio de la transcripción (French y Ahlquist, 1988; Marsh *et al.*, 1988; van der Kuyl *et al.*, 1990; Jhonston y Rochon, 1995; van der Vossen *et al.*, 1995; Wang y Simon, 1997), aunque en algunos casos ha sido descrita la participación de secuencias alejadas físicamente (Balmori *et al.*, 1993; Miller y Koev, 2000). Normalmente, la actividad promotora de estas regiones no sólo está determinada por la secuencia primaria sino también por su estructura secundaria (Zavriev *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999; Koev *et al.*, 1999, Koev y Miller, 2000). Uno de los promotores subgenómicos mejor caracterizados es el que dirige la síntesis de un sgRNA a partir del RNA 3 del BMV. En dicho promotor se pueden distinguir varios módulos: una región potenciadora que incrementa enormemente la cantidad de sgRNA y que incluye un tramo de poli(U), una región central o núcleo que contiene una horquilla y es responsable de la unión de la RDR viral, el citidilato +1 que marca el sitio de inicio de la transcripción y un pequeño tramo de secuencia adyacente en 3' (Figura 6) (Adkins y Kao, 1998; Haasnoot *et al.*, 2002; Sivakumaran *et al.*, 2004; Wierzchoslawski *et al.*, 2004).

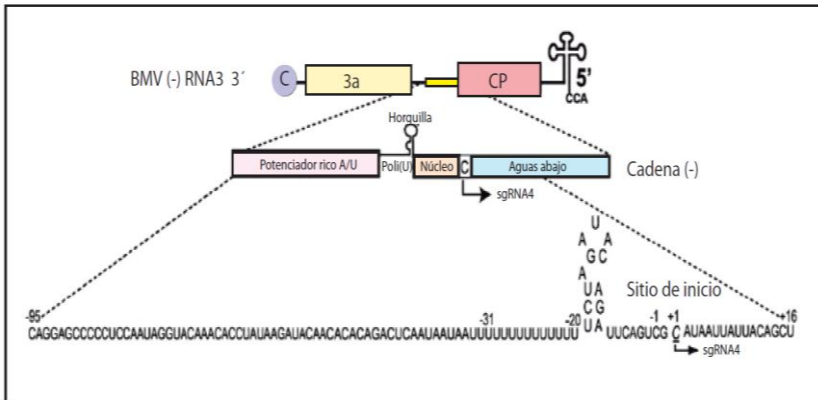


Figura 6. Esquema de la organización del promotor del subgenómico (SGP) en BMV. El dominio del SGP se muestra como una caja amarilla situada entre las ORFs 3a y CP en el RNA3 de polaridad (-) del BMV. La flecha indica el sitio de inicio y la dirección de la síntesis del sgRNA4. La expansión inferior muestra la secuencia nucleotídica del SGP (desde el nucleótido -95 hasta el nucleótido +16) (basado en Sztuba-Solińska *et al.*, 2011).

Otro promotor subgenómico bien caracterizado y que difiere considerablemente del anterior, es el que dirige la síntesis de un sgRNA para la traducción de la MP del TMV. Este promotor carece de una región potenciadora como tal, y contiene dos estructuras en forma de horquilla (SL1 y SL2, Figura 7), una de las cuales (SL1) es crítica para síntesis del sgRNA mientras que la otra (SL2) modula la eficiencia transcripcional (Grdzlishvili *et al.*, 2000; Man y Epel, 2004).

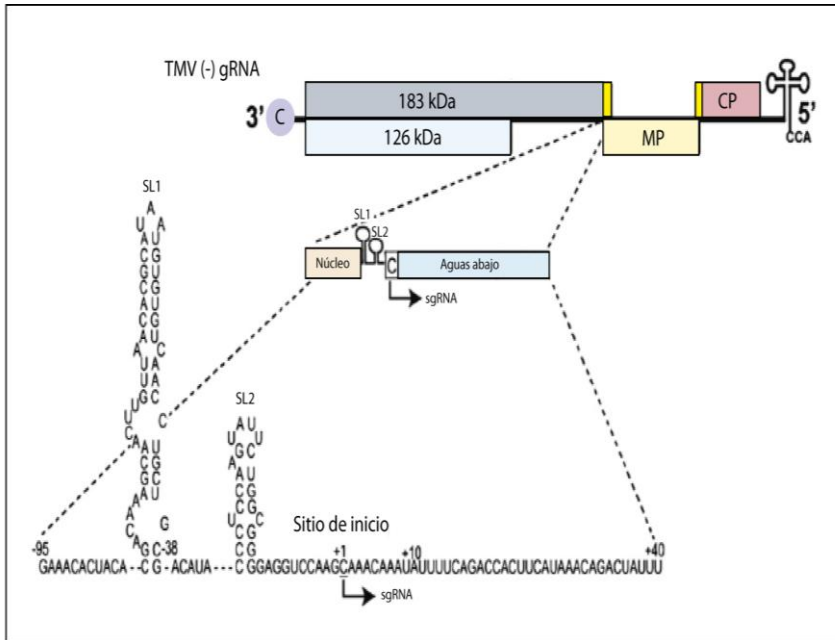


Figura 7. Organización esquemática de un promotor subgenómico (SGP) del TMV, localizado entre la ORF de la RDR viral (183 kDa) y la ORF de la MP. La flecha doblada situada en la parte inferior del gRNA (-) indica el sitio de inicio de uno de los sgRNAs. La expansión inferior muestra la secuencia nucleotídica del SGP (desde el nucleótido -95 hasta el nucleótido +40). Se indica: el núcleo del promotor, dos estructuras en horquilla, SL1 y SL2, el citidilato del inicio +1, y la secuencia aguas abajo (basado en Grdzlishvili *et al.*, 2000; Sztuba-Solińska *et al.*, 2011).

2.2.2.1.2 –Terminación prematura

La transcripción de sgRNAs, se puede ajustar también a un modelo de terminación prematura (*premature termination*, PT) (White, 2002). En este caso, la replicasa termina

Introducción

prematuramente la síntesis de cadenas (-) del genoma debido a una señal específica de parada constituida por elementos altamente estructurados de RNA. Esta señal, calificada como atenuadora, se localiza justo aguas arriba del sitio en el que se detiene la RDR viral (Figura 8). El sgRNA (-) truncado que se genera como consecuencia de esta parada, es usado como molde para la transcripción del sgRNA (+) gracias a la presencia de un promotor localizado en su extremo 3' que será reconocido por la RDR viral. El sgRNA (-) es probable que sea empleado repetidamente por dicha RDR para generar numerosas moléculas de sgRNA (+).

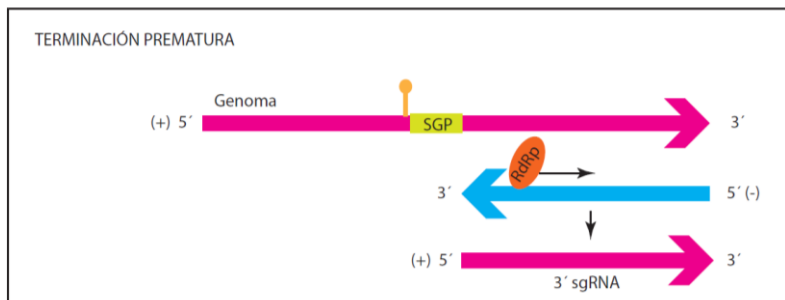


Figura 8. Representación esquemática del modelo de terminación prematura para la síntesis de un sgRNA 3' coterminales con el genoma viral. Dicho sgRNA se transcribe a partir de un molde (-) truncado que se genera cuando la RDR viral se detiene prematuramente durante la síntesis de las cadenas (-) del genoma (basado en White, 2002).

Los indicadores principales del mecanismo de terminación prematura son los siguientes (Jiwan y White, 2011):

- 1) la detección de sgRNAs (-) en tejido infectado.
- 2) la identificación en la cadena (+) del genoma viral de un motivo estructural, la denominada señal de atenuación (Wu y White, 2007), que precede al sitio de inicio del sgRNA y que hace que la RDR viral se pare prematuramente antes de alcanzar el extremo 5' del molde.
- 3) la capacidad de desacoplar la síntesis de cadenas (-) del sgRNA de sus homólogas de polaridad (+).
- 4) la similitud de secuencia entre el promotor del extremo 3' del sgRNA (-) y el del gRNA (-).

Distintos miembros de la familia *Tombusviridae* parecen utilizar este mecanismo para sintetizar sus sgRNAs, incluyendo virus del mosaico necrótico del trébol rojo (red clover necrotic mosaic virus, RCNMV, *Dianthovirus*), el virus del enanismo arbustivo del tomate (tomato bushy stunt virus, TBSV, *Tombusvirus*), el virus de las manchas de la hoja del pepino (cucumber leaf spot virus, CLSV, *Aureusvirus*), el virus del

arrugamiento del nabo (turnip crinkle virus, TCV, *Carmovirus*) y la cepa D del virus de la necrosis del tabaco (tobacco necrosis virus D, TNV-D, *Betanecrovirus*) (Jiwan *et al.*, 2011; Sztuba-Solińska *et al.*, 2011).

La señal de atenuación, protagonista principal en el mecanismo de terminación prematura, viene normalmente acompañada de una secuencia lineal rica en AU situada en 3', de modo que se cree que la replicasa se para en una región de emparejamientos de bases débiles lo que promueve su posterior disociación (Jiwan y White, 2011). A continuación se detallan algunas de las señales de atenuación propuestas en *Tombusviridae*, que corresponden a interacciones RNA-RNA que se establecen en *trans*, en el caso de un virus con genoma bipartito (RCNMV), o en *cis*, en el caso de virus con genomas monopartitos. Entre estas últimas, los segmentos implicados en formar la estructura atenuadora pueden estar situados a larga distancia en el gRNA (TBSV, CLSV), o muy próximos, formando un elemento de estructura local (TCV y TNV-D).

a) Interacciones en *trans* bimoleculares

Como se ha indicado anteriormente, el RCNMV es un virus con genoma bipartito constituido por los RNAs 1 y 2. A partir del RNA1 se sintetiza un sgrRNA que permite la traducción

Introducción

de la CP. La señal de atenuación que media la transcripción de este sgRNA está constituida por una interacción en *trans* entre el lazo terminal de una horquilla que se forma en el RNA2 y una secuencia complementaria en el RNA1 (TA y TABS, respectivamente, en Figura 9) localizada aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción del sgRNA (Sit *et al.*, 1998; Guenther *et al.*, 2004).

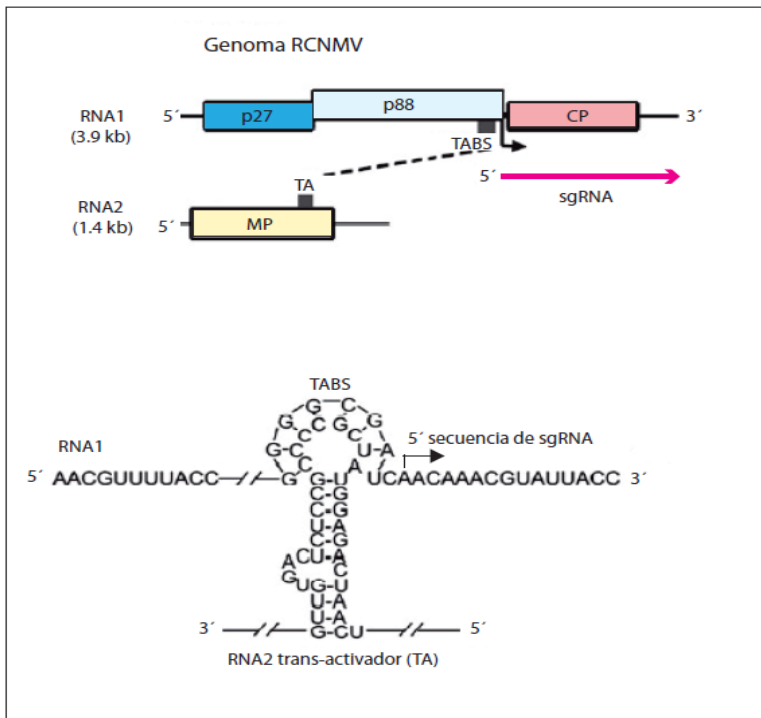


Figura 9. Representación esquemática del genoma del RCNMV. Muestra la interacción RNA-RNA en *trans* que regula la síntesis del sgRNA (basado en Sit *et al.*, 1998).

Es interesante mencionar que la ruptura de esta interacción no afecta a la replicación del gRNA (Tatsuta *et al.*, 2005); de este modo las comunicaciones intermoleculares pueden proporcionar un mecanismo interruptor o regulador entre replicación y transcripción, dos procesos que pueden interferirse mutuamente.

b) Interacciones en *cis* a larga distancia

El TBSV, un virus con genoma monopartito como se ha mencionado anteriormente, utiliza el mecanismo de PT para sintetizar sus dos sgRNAs (White y Nagy, 2004; Zhang *et al.*, 2004). En ambos casos la señal de atenuación corresponde a una interacción RNA-RNA a larga distancia intramolecular, que implica a segmentos de separados por 1000 nucleótidos o más (Choi y White, 2002; Lin y White, 2004). Estos segmentos directamente implicados se han denominado como secuencia activadora (AS) y secuencia receptora (RS), respectivamente (Figura 10). La transcripción del sgRNA2 del TBSV requiere no una, sino dos interacciones a larga distancia, una de las cuales forma la estructura de atenuación (AS2-RS2) y la otra (DE-CE) apoya a la anterior (Figura 10) (Zhang *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2001; Lin y White, 2007). Esto sugiere que la organización global del gRNA puede contribuir a la correcta formación de la estructura atenuadora. Asimismo, para este sgRNA2, se ha

observado que tanto la identidad de los nucleótidos que forman la señal atenuadora como la secuencia existente entre los dos segmentos que forman dicha señal, no son fundamentales para llevar a cabo su función (Lin y White, 2004). Lo que es crítico es la formación de la estructura secundaria en el RNA. Reforzando la idea de que la señal de atenuación representa un impedimento físico para el avance de la RDR viral, se ha visto que la que está involucrada en la transcripción del sgRNA2 del TBSV puede ser sustituida por un aptámero (pequeñas estructuras de ácidos nucleicos capaces de unirse específicamente y con alta afinidad a distintos tipos de moléculas gracias a su estructura tridimensional) de RNA. La inclusión de este aptámero en una posición adecuada del genoma del virus permitió controlar la transcripción del sgRNA2 *in vivo*, de una manera dependiente de la dosis de la molécula diana (teofilina en este caso) añadida al medio celular (Wang *et al.*, 2008). El aptámero funcionaría pues como un interruptor que permitiría la regulación exógena de la transcripción del sgRNA viral (Wang *et al.*, 2008).

Introducción

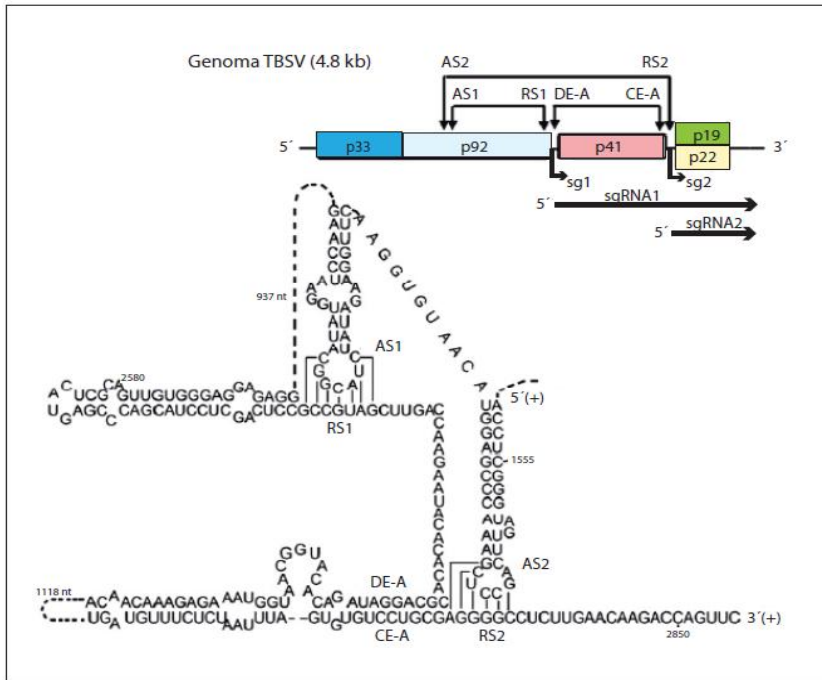


Figura 10. Representación esquemática del genoma de TBSV, donde se indican las interacciones involucradas en transcripción. En la parte superior, representación lineal de la organización del gRNA del TBSV. Las posiciones relativas de los elementos de RNA que interactúan y que están implicados en la transcripción de los sgRNAs se muestran por encima del genoma y se indican por flechas. Los sitios de inicio para la transcripción del sgRNA se etiquetan como sg1 y sg2, y los dos sgRNAs se representan por flechas negras debajo del genoma. En la parte inferior se representan las interacciones RNA-RNA a larga distancia que regulan la transcripción de los sgRNAs del TBSV (Choi *et al.*, 2001; Lin y White, 2004).

En el CLSV también es necesaria la formación de estructuras secundarias estables de RNA entre secuencias

Introducción

complementarias, situadas a corta o a larga distancia, respectivamente, para sintetizar el sgRNA1 y el sgRNA2 (Figura 11).

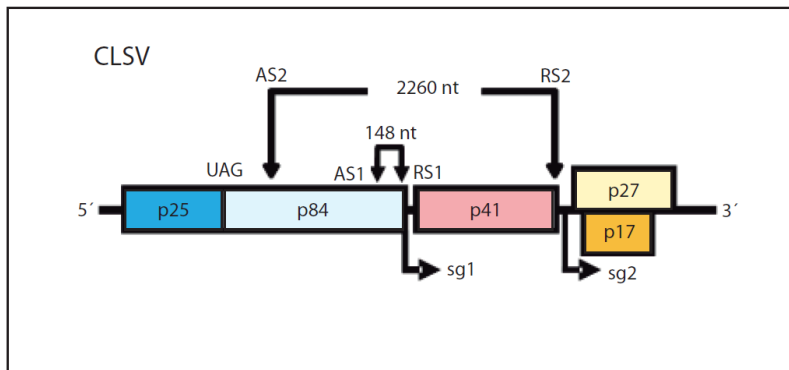


Figura 11. Diagrama esquemático del genoma de CLSV, donde se señalan las interacciones involucradas en transcripción. Se representan las posiciones de los elementos situados a corta (AS1/RS1) y a larga (AS2/RS2) distancia implicados en la formación de interacciones RNA-RNA que actúan como señales de atenuación para formar el sgRNA1 y el sgRNA2, respectivamente (basado en Jiwan y White, 2011).

c) Interacciones en *cis* entre regiones locales

La señal de atenuación que media la transcripción del sgRNA2 del TCV, que dirige la traducción de la CP viral, corresponde a una estructura en forma de horquilla que flanquea por 5' al sitio de inicio de dicho sgRNA (Figura 12) (Wu *et al.*, 2010).

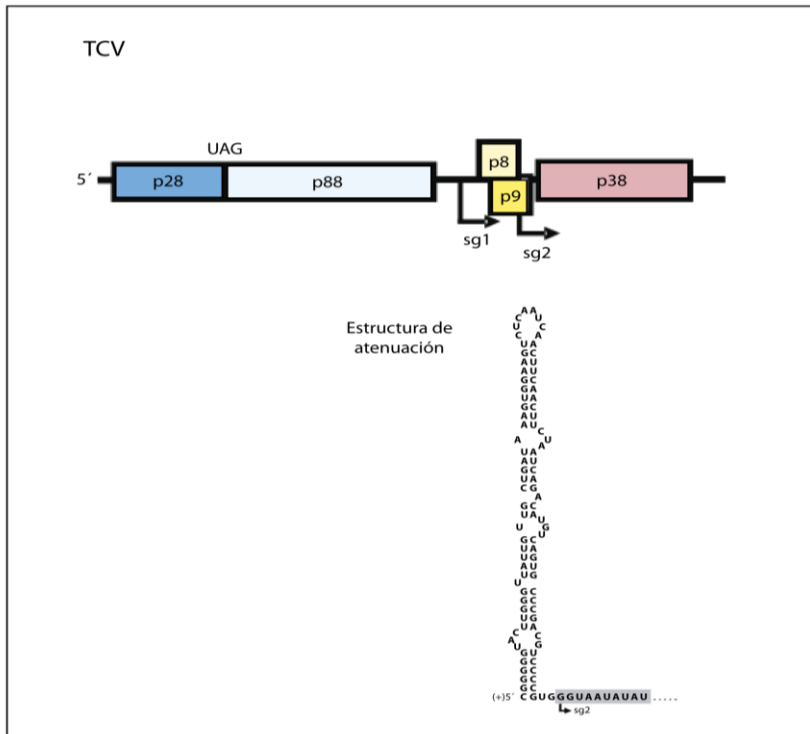


Figura 12. Diagrama esquemático del genoma de TCV, indicando la estructura de atenuación implicada en la transcripción del sgRNA2. En la parte superior, croquis de la organización del gRNA del TCV. En la parte inferior se representa la interacción a corta distancia que se requiere para sintetizar el sgRNA2 (basado en Jiwan y White, 2011).

Las señales de atenuación involucradas en la transcripción del sgRNA1 y del sgRNA2 del TNV-D también corresponden a estructuras secundarias locales adoptadas por las secuencias adyacentes, por 5', al sitio de inicio de estos sgRNAs (Figura 13) (Jiwan *et al.*, 2011). En estos tipos de interacciones locales, probablemente la estructura global de

gRNA adquiere menos importancia que en interacciones de larga distancia (Jiwan y White, 2011).

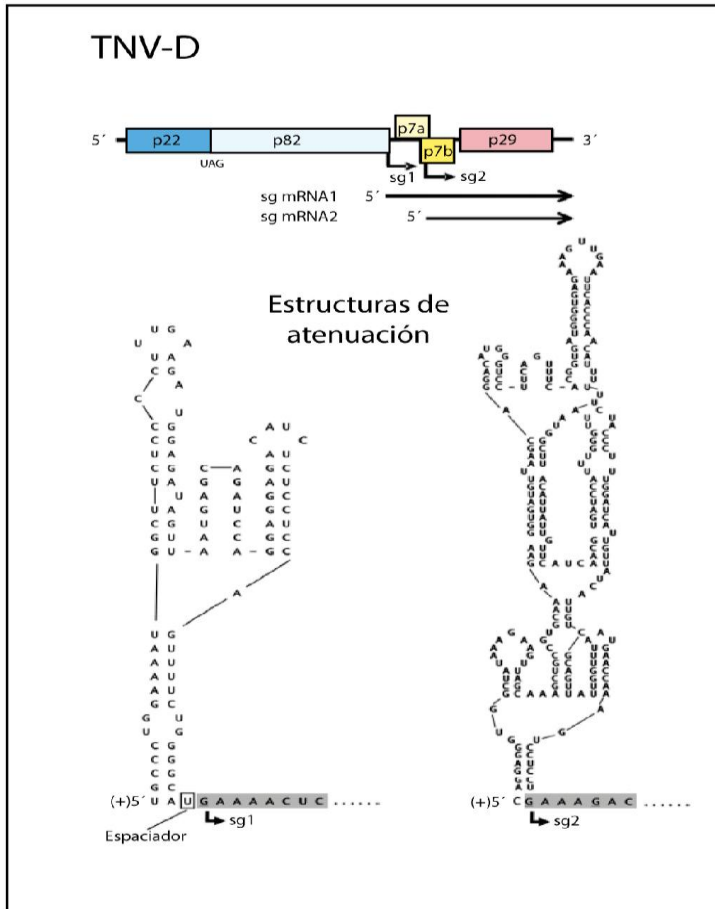


Figura 13. Representación esquemática de los elementos de RNA involucrados en la transcripción de los sgRNAs del TNV-D. Parte superior: representación lineal del genoma de TNV-D. Los sitios de inicio de los sgRNAs se indican por flechas dobladas y las flechas horizontales representan los sgRNAs. Parte inferior: estructuras de atenuación predichas,

Introducción

implicadas en la transcripción de los sgRNAs del TNV-D via un mecanismo terminación prematura (basado en Jiwan *et al.*, 2011).

Cabe señalar que se ha propuesto que la síntesis de los sgRNAs 5' coterminales identificados en el BMV (Wierzechoslowski *et al.*, 2006; Sztuba-Solińska y Bujarski, 2008), en el CTLV (Tatineni *et al.*, 2009), el CTV (Che *et al.*, 2001; Gowda *et al.*, 2003), el virus A de la vid (grapevine vitivirus A, GAV, *Vitivirus*, *Betaflexiviridae*) (Galiakparov *et al.*, 2003), y en el virus del manchado foliar de los cítricos (citrus leaf blotch virus, CLB, *Citrivirus*, *Betaflexiviridae*) (Vives *et al.*, 2002), podría ocurrir por un mecanismo de terminación prematura. En estos casos la formación del sgRNA se produciría por parada prematura de la síntesis de cadenas positivas utilizando como molde el gRNA de polaridad negativa (Figura 14). La caracterización estructural de las posibles señales de atenuación en los diferentes virus es escasa, aunque se ha propuesto que dichas señales podrían estar compuestas tanto por elementos estructurales del RNA como por factores proteicos. Esto es debido a que se da la circunstancia de que el extremo 3' de distintos sgRNAs 5' coterminales coincide, aproximadamente, con la posición del promotor sg (en el RNA de polaridad negativa) que dirige la síntesis de sgRNAs 3' coterminales (Figura 14).

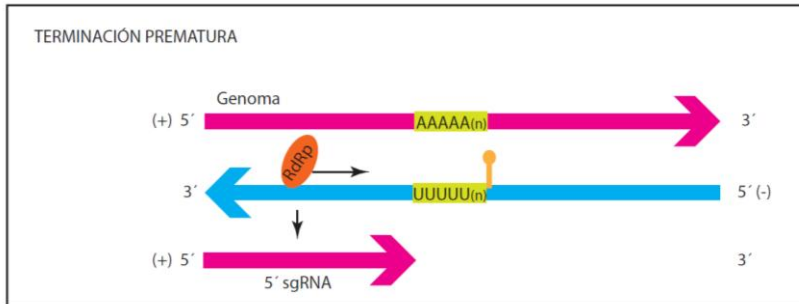


Figura 14. Representación del modelo de terminación prematura para la síntesis de un sgRNA 5' coterminales con el gRNA. La RDR viral terminaría prematuramente la síntesis de las cadenas (+) del genoma por la presencia de un elemento estructural. Secuencias ricas en U en la región de parada facilitarían la disociación del sgRNA (basado en White, 2002).

Por último, es interesante mencionar que, aparte de su papel en traducción, los sgRNAs (tanto 3' como 5' coterminales) podrían estar implicados en la regulación del proceso de replicación o desempeñar un papel relevante en procesos de recombinación viral. En el primer caso, el efecto de los sgRNAs sobre replicación puede ser positivo o negativo. En relación con un efecto positivo, se ha propuesto que ciertos sgRNAs, como aquellos que son 5'-coterminales, pueden dispensar al gRNA correspondiente de su labor como mRNA, dejando a dicho RNA libre para que se replique más eficientemente (Gowda *et al.*, 2003; Wierzchoslawski *et al.*, 2006; Tatineni *et al.*, 2009) y separando, en parte, los procesos antagónicos de replicación y traducción. En cuanto al posible

efecto negativo de los sgRNAs, se ha postulado que la acumulación de dichos RNAs puede resultar en un secuestro importante de factores traduccionales que estarán menos disponibles para la expresión de la RDR viral a partir del gRNA, repercutiendo de este modo en la replicación del virus (Sztuba-Solińska *et al.*, 2011b). Por otra parte, la presencia de sgRNAs puede proporcionar más moldes para posibles eventos de recombinación, lo que puede suponer una ventaja al facilitar la reparación de RNAs virales mutados o dañados y contribuir a la variabilidad del genoma (Cheng y Nagy, 2003; Chetverin *et al.*, 2005; Wierzchoslawski *et al.*, 2006).

2.2.3 Regulación de la expresión génica a nivel traduccional

Este tipo de regulación puede afectar a cualquiera de las tres etapas de que consta el proceso de traducción: iniciación, elongación o terminación. A continuación, se exponen los aspectos más relevantes del control en cada etapa.

2.2.3.1 Etapa de inicio

2.2.3.1.1 Iniciación mediada por estructuras distintas de cap y/o cola poli(A)

Más del 80% de virus de plantas con genoma de ssRNA (+) carecen de un cap en 5' y/o de una cola de poli(A) en 3' (van Regenmortel *et al.*, 2000). Estas estructuras son sustituidas por otros elementos capaces de reclutar a la maquinaria traduccional aunque, en ocasiones, se desconocen bastantes detalles de cómo tiene lugar dicho reclutamiento. En el caso de virus con RNA(s) que posee(n) cola poli(A) pero carecen de cap en 5' (familias *Comoviridae*, *Potyviridae* y géneros *Luteovirus* y *Sobemovirus*), normalmente, en lugar de esta última estructura, presentan una pequeña proteína viral unida covalentemente al genoma (*viral protein genome-linked*, VPg). Se ha postulado que esta proteína podría reemplazar funcionalmente a la estructura cap en una traducción convencional, ya que se han descrito interacciones de distintas VPg con eIF4E y/o eIFiso4E (Wittmann *et al.*, 1997; Leonard *et al.*, 2000; Thivierge *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2008). Sin embargo, no está claro que dichas interacciones tengan un papel en traducción, un proceso que, en base a otros resultados, parece iniciarse por mediación de un sitio de entrada interna de los ribosomas (*internal ribosome entry site*, IRES) presente en la región no traducible 5' (*untranslational region*, UTR) (Basso *et al.*, 1994; Niepel y Gallie, 1999). Estos elementos serán explicados con algo más de detalle en el apartado 2.2.3.1.4

Los genomas de otros grupos de virus ssRNA (+) presentan estructura cap en el extremo 5' pero carecen de cola poli(A) en el extremo 3' (familias *Bromoviridae*, *Tymoviridae*, y *Virgaviridae*). En estos casos, distintos datos sugieren que la 3' UTR es capaz de desempeñar funciones similares a las de la cola poli(A), reclutando factores proteicos que facilitan la interacción con el extremo 5' cap y que promueven la traducción. Algunos ejemplos los encontramos en el virus del mosaico de la alfalfa (alfalfa mosaic virus, AMV, *Alfamovirus*), el virus del mosaico amarillo del nabo (turnip yellow mosaic virus, TYMV, *Tymovirus*), el BMV o el TMV (Gallie *et al.*, 1991; Barends *et al.*, 2004, Matsuda y Dreher, 2004; Krab *et al.*, 2005). La 3' UTR de estos virus se pliega adoptando distintos tipos de conformaciones, entre las que se encuentran estructuras parecidas a tRNAs (*tRNA-like structure*, TLS) o una TLS combinada con una serie de horquillas (AMV), o fusionada a una serie de pseudonudos (BMV, TMV, TYMV) (Thiébeault *et al.*, 2007). Las proteínas que reclutan estas UTRs son muy variadas y van desde la propia CP viral (AMV), que une a su vez eIF4G lo que se ha propuesto que facilita la interacción con el 5' cap unido a eIF4E (Bol, 2005; Krab *et al.*, 2005), hasta la proteína de choque térmico HSP101 (TMV) que parece interaccionar también con factores de traducción y con la 5'

UTR del RNA viral favoreciendo la pseucircularización del mismo (Tanguay y Gallie, 1996; Gallie, 2002).

Finalmente, varios grupos de virus ssRNA (+) no tienen ni estructura cap en 5' ni cola de poli(A) en 3' y, sin embargo, se traducen eficientemente. Este es el caso de miembros de la familia *Tombusviridae* (incluyendo los del género *Umbravirus* adscrito recientemente a esta familia; Rochon *et al.*, 2012; Adams *et al.*, 2013; Rochon *et al.*, 2014) y de algunos miembros la familia *Luteoviridae*. En algunos de estos virus se ha demostrado la presencia de elementos en la región 3' terminal de su genoma, que actúan como estimuladores de la traducción de una manera independiente de cap y que se conocen como CITEs (*cap independent translational enhancers*) (Simon y Miller, 2013). A continuación se detallarán algunas de las características de estos elementos.

2.2.3.1.1.1 –CITEs

Como se ha indicado anteriormente, los CITEs se han identificado en la región 3'-proximal de RNAs virales sin estructura cap en 5' ni cola poliA en 3'. Hasta el momento, este tipo de elementos solo se ha descrito en genomas de virus de plantas. Los datos disponibles indican que los CITEs sustituyen funcionalmente a la estructura cap, reclutando factores

traduccionales esenciales para el inicio de traducción y transfiriéndolos una posición cercana al extremo 5' del RNA correspondiente, desde donde se iniciará un proceso de rastreo convencional para comenzar la síntesis proteica (Wang y Miller, 1995; Rakotondrafara *et al.*, 2006; Fabian y White, 2006). La transferencia de los factores reclutados hasta la región 5' parece estar mediada por interacciones RNA-RNA y/o RNA-proteína (Miller *et al.*, 2007; Nicholson y White, 2011, Simon y Miller, 2013). La localización 3'-proximal de los CITEs probablemente confiere distintas ventajas: a) prevenir el inicio de traducción en RNAs truncados o degradados en su extremo 3', b) garantizar la presencia de elementos traduccionales en todos los sgRNAs 3' co-terminales, y c) facilitar la regulación entre traducción y replicación. La unión y el desplazamiento de la replicasa desde el extremo 3' del genoma viral hacia 5' para sintetizar la cadena complementaria, debe interrumpir la estructura del CITE, y, por lo tanto, el gRNA, al no ser reconocido como sustrato traduccional, no se asociará con ribosomas y quedará libre para ser replicado (Barry y Miller, 2002). Hasta el momento, se han descrito al menos seis clases de CITEs que difieren en sus características estructurales y/o en sus requerimientos funcionales (Tabla 1). No existe además una correlación entre tipo de CITE y grupo viral, lo que sugiere que estos elementos han convergido evolutivamente y/o se han

adquirido por procesos de recombinación (Kneller *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2007; Simon y Miller, 2013). A continuación se exponen los aspectos más relevantes de las distintas clases de CITEs.

Estructura	Virus modelo	Otros virus
Tipo TED (<i>Translational enhancer domain</i>)	STNV	PLPV , <i>Tombusviridae</i> PCRPV , <i>Tombusviridae</i> CbMV , <i>Carmovirus</i> , <i>Tombusviridae</i>
	BYDV , <i>Luteovirus</i> , <i>Luteoviridae</i>	OLV-1 , <i>Alphanecrovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> TNV-A , <i>Alphanecrovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> TNV-D , <i>Betanecrovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> LWSV , <i>Betanecrovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> RCNMV (RNA 1) , <i>Dianthovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> SCNMV (RNA 1) , <i>Dianthovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> CRSV , <i>Dianthovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> SbDV , <i>Luteovirus</i> , <i>Luteoviridae</i> RSDaV , <i>Luteovirus</i> TBTV , <i>Umbravirus</i> , <i>Tombusviridae</i> GRV , <i>Umbravirus</i> , <i>Tombusviridae</i>
Tipo BTE (<i>Barley yellow dwarf virus-like translation element</i>)		
Tipo PTE (<i>Panicum mosaic virus-like translational enhancer</i>)	PMV , <i>Panicovirus</i> , <i>Tombusviridae</i>	SCV , <i>Carmovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> PEMV (RNA 2) , <i>Umbravirus</i> , <i>Tombusviridae</i> PFBV , <i>Carmovirus</i> ,

		<i>Tombusviridae</i> CarMV , <i>Carmovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> HnRSV , <i>Carmovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> HCRSV , <i>Carmovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> PSNV , <i>Carmovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> CMMV , <i>Panicovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> GaMV , <i>Gallantivirus</i> , <i>Tombusviridae</i>
Tipo ISS (I-Shaped Structure)	MNeSV , <i>Zeavirus</i> , <i>Tombusviridae</i>	CBLV , <i>Tombusvirus</i> , <i>Tombusviridae</i> MNSV , <i>Carmovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> MWLMV , <i>Aureusvirus</i> , <i>Tombusviridae</i>
Tipo YSS (Y-Shaped Structure)	TBSV , <i>Tombusvirus</i> , <i>Tombusviridae</i>	CIRV , <i>Tombusvirus</i> , <i>Tombusviridae</i>
Tipo TSS (T-Shaped Structure)	TCV , <i>Carmovirus</i> , <i>Tombusviridae</i>	CCFV , <i>Carmovirus</i> , <i>Tombusviridae</i> PEMV (RNA 2) , <i>Umbravirus</i> , <i>Tombusviridae</i> 3'TSS kL-TSS

Tabla 1. Tabla en donde se muestran los principales tipos de CITES con sus virus modelo, y otros virus donde han sido descritos o predichos.

Abreviaturas: STNV, Virus satélite de la necrosis del tabaco (satellite tobacco necrosis virus); PLPV, Virus del arabesco del *Pelargonium* (pelargonium line pattern virus, *Tombusviridae*); PCRPV, Virus del patrón en anillos cloróticos del *Pelargonium* (pelargonium chlorotic ring pattern virus, *Tombusviridae*); CbMV, Virus del moteado de la *Calibrachoa* (calibrachoa mottle virus, *Carmovirus*, *Tombusviridae*); BYDV, Virus del enanismo de la cebada (barley yellow dwarf virus, *Luteovirus*, *Luteoviridae*); OLV-1, Virus 1 latente del olivo (olive latent virus, *Alphanecrovirus*, *Tombusviridae*); TNV-A, Virus de la necrosis del tabaco cepa A (tobacco necrosis virus, *Alphanecrovirus*,

Introducción

Tombusviridae); TNV-D, Virus de la necrosis del tabaco cepa D (tobacco necrosis virus, *Betanecrovirus, Tombusviridae*); LWSV, Virus de la raya blanca del puerro (leek white stripe virus, *Betanecrovirus, Tombusviridae*); RCNMV, Virus del mosaico necrótico del trébol rojo (red clover necrotic mosaic virus, *Dianthovirus, Tombusviridae*); SCNMV, Virus del mosaico necrótico del trébol dulce (sweet clover necrotic mosaic virus, *Dianthovirus, Tombusviridae*); CRSV, Virus de las manchas en anillo del clavel (carnation ringspot virus, *Dianthovirus, Tombusviridae*); SbdV, Virus del enanismo de la soja (soybean dwarf virus, *Luteovirus, Luteoviridae*); RSDaV, Virus asociado al enanismo primaveral de las rosas (rose spring dwarf associated virus, *Luteovirus*); TBTv, Virus de la ramificación superior del tabaco (tobacco bushy top virus, *Umbravirus, Tombusviridae*); GRV, Virus de la roseta del cacahuete (groundnut rosette virus, *Umbravirus, Tombusviridae*); PMV, Virus del mosaico del *Panicum* (panicum mosaic virus, *Panicovirus, Tombusviridae*); SCV, Virus del cactus del Saguaro, (saguaro cactus virus, *Carmovirus, Tombusviridae*); PEMV, Virus de las excrecencias en mosaico del guisante, (pea enation mosaic virus, *Umbravirus, Tombusviridae*); PFBV, Virus de la rotura del color de la flor del *Pelargonium* (pelargonium flower break virus, *Carmovirus, Tombusviridae*); CarMV, Virus del moteado del clavel (carnation mottle virus, *Carmovirus, Tombusviridae*); HnRSV, Virus de las manchas anulares de la madreselva (honeysuckle ringspot virus, *Carmovirus, Tombusviridae*); HCRSV, Virus de las manchas cloróticas en anillo del Hibisco (hibiscus chlorotic ringspot virus, *Carmovirus, Tombusviridae*); PSNV, Virus de la necrosis del tallo del guisante (pea stem necrosis virus, *Carmovirus, Tombusviridae*); CMMV, Virus del mosaico suave de la pata de gallo (cocksfoot mild mosaic virus A, *Panicovirus, Tombusviridae*); GaMV, Virus del mosaico de la Galinsoga (galinsoga mosaic virus, *Gallantivirus, Tombusviridae*); MNeSV, Virus del rayado necrótico del maíz (maize necrotic streak virus, *Zeavirus, Tombusviridae*); CBLV, Virus latente del pepino Búlgaro (cucumber Bulgarian latent virus, *Tombusvirus, Tombusviridae*); MNSV, Virus de las manchas necróticas del melón (melon necrotic spot virus, *Carmovirus, Tombusviridae*); MWLMV, Virus del mosaico de la línea blanca del maíz (maize white line mosaic virus, *Aureusvirus, Tombusviridae*); TBSV, Virus del enanismo arbustivo del tomate (tomato bushy stunt virus, *Tombusvirus, Tombusviridae*); CIRV, Virus de las manchas en anillo del clavel italiano (carnation italian ringspot virus, *Tombusvirus, Tombusviridae*); TCV, Virus del

Introducción

arrugamiento del nabo (turnip crinkle virus, *Carmovirus*, *Tombusviridae*); CCFV, Virus del salpicado clorótico del cardamomo (cardamine chlorotic fleck virus, *Carmovirus*, *Tombusviridae*).

a) Tipo TED (*Translational enhancer domain*)

El primer CITE descubierto fue el denominado tipo TED en el virus satélite de la necrosis del tabaco (satellite tobacco necrosis virus, STNV), un RNA subviral (1.2 kb) con una única ORF que codifica su propia CP y que necesita de un virus auxiliar, el TNV, para completar su ciclo biológico. El TED corresponde a una secuencia de 120 nucleótidos cerca del extremo 5' de la 3' UTR que adopta una estructura de tipo horquilla con varias protuberancias de 6 a 8 bases (Figura 15) (Danthinne *et al.*, 1993; Timmer *et al.*, 1993; van Lipzig *et al.*, 2002). La funcionalidad de este elemento ha sido demostrada tanto *in vitro*, con extractos de germen de trigo, como *in vivo* (Timmer *et al.*, 1993; Danthinne *et al.*, 1993; Meulewaeter *et al.*, 1998). El STNV-TED es capaz de unir eIF4F e eIFiso4F *in vitro* (al primero con mayor afinidad), una unión que parece ser mediada por las subunidades respectivas eIF4E y eIFiso4E (van Lipzig *et al.*, 2002; Gazo *et al.*, 2004). La transferencia de los factores reclutados a la región 5' del RNA se postuló que podía estar mediada por interacciones RNA-RNA entre segmentos de complementariedad de secuencia entre dicha región y el TED, aunque estudios de mutagénesis no permitieron corroborar

este supuesto (Timmer *et al.*, 1993; Meulewaeter *et al.*, 1998). Asimismo, se sugirió que la conformación global del RNA viral facilitaría la transferencia de factores al aproximar las regiones 5' y 3' de la molécula o, alternativamente, que dicha transferencia estaría favorecida por interacciones proteína-proteína, aunque no se ha obtenido apoyo experimental claro para cualquiera de estos modelos (van Lipzig *et al.*, 2002; Gazo *et al.*, 2004). Aunque la funcionalidad de un CITE TED sólo ha sido confirmada en el caso del STNV, se ha predicho la presencia de un elemento de este tipo en tres miembros de la familia *Tombusviridae* (Thiébeauld *et al.*, 2007; Simon y Miller, 2013).

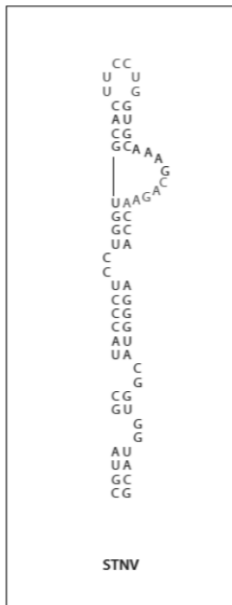


Figura 15. Estructura del CITE de tipo TED en el STNV (tomado de Simon y Miller, 2013).

b) Tipo BTE (*Barley yellow dwarf virus-like translation element*)

El CITE de tipo BTE fue identificado por primera vez en la 3' UTR del virus del enanismo amarillo de la cebada (*barley yellow dwarf virus, BYDV, Luteovirus, Luteoviridae*) (Wang y Miller, 1995; Wang *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2000, 2001). Este elemento está constituido por una secuencia de 105 nt que forman una estructura secundaria cruciforme, con cuatro hélices (SL-I, SL-II, SL-III y S-IV) conectadas a una región central de cadena sencilla (Figura 18) (Guo *et al.*, 2000). El SL-I contiene una secuencia conservada de 17 nt, GGAUCCUGGGAAACAGG (bases subrayadas apareadas), que adopta una estructura de horquilla (Figura 16) (Wang *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2010). La mutación de distintos nucleótidos de este motivo conlleva una reducción drástica de la eficiencia traduccional (Guo *et al.*, 2000; 2001). El núcleo o región central desempeña un papel importante ya que mutando alguna de sus bases se reduce enormemente la actividad del CITE, lo que sugiere la presencia de interacciones críticas no-Watson Crick (ya que se trata de una región de simple cadena) difíciles de predecir (Guo *et al.*, 2000; Kraft *et al.*, 2013). La eliminación del SL-II conlleva también una reducción considerable de actividad (Guo *et al.*, 2000). La funcionalidad de este CITE se ha constatado tanto mediante

ensayos *in vitro*, con extractos de germen de trigo, como *in vivo* (Guo *et al.*, 2000; 2001). Mediante experimentos de “pull down” con eIFs procedentes de germen de trigo, se comprobó que el BTE del BYDV se asocia con eIF4F con mayor afinidad que con eIF4E, y más específicamente con eIF4G (Treder *et al.*, 2008). La presencia de eIF4E estimula la unión de eIF4G con el BTE, aunque no es estrictamente requerida. Cúal es el dominio del BTE reconocido por eIF4G es una cuestión abierta pero se ha sugerido que podría corresponder al loop terminal del SL-I que es del tipo GNRNA (Figura 16), una propuesta que estaría apoyada por resultados de ensayos de protección a ribonucleasas (Treder *et al.*, 2008).

Un CITE del tipo BTE parece estar en todas las especies del género *Luteo* (familia *Luteoviridae*), y de los géneros *Necro*, *Diantho* y en algunas del *Umbravirus* (familia *Tombusviridae*) (Tabla 1) (Salem *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). El rasgo común en los distintos BTE es la presencia de la secuencia conservada de 17 nt, pero existen ciertas diferencias estructurales entre ellos que incluyen variaciones en el número de horquillas que rodean al núcleo central de la estructura (Figura 16), un aumento del número de bases desapareadas que forman el núcleo central o incluso cambios nucleotídicos en la secuencia conservada de 17 nt, lo que probablemente explica su eficiencia diferencial como estimuladores traduccionales

sombreadas en azul probablemente sean el sitio de unión de eIF4G (Kraft *et al.*, 2013). Las bases en verde son las que interaccionan con la 5' UTR (tomado de Simon y Miller, 2013).

c) Tipo PTE (*Panicum mosaic virus-like translational enhancer*)

El primer CITE de tipo PTE que se identificó fue el del virus del mosaico del *Panicum* (*panicum mosaic virus*, PMV, *Panicovirus*, *Tombusviridae*) (Batten *et al.*, 2006), aunque la caracterización estructural más detallada de esta clase de elemento se ha realizado con el PTE presente en el RNA2 del virus de las excrecencias en mosaico del guisante (*pea enation mosaic virus*, PEMV, *Umbravirus*, *Tombusviridae*) (Wang *et al.*, 2009; 2011). Este tipo de CITE está constituido por 116 nt y se localiza en la 3' UTR del genoma viral. Se ha propuesto que adopta una estructura en forma de Y en la que el tallo principal sería una hélice con una protuberancia rica en G (dominio G), y dos horquillas más pequeñas, separadas por una región rica en C o en pirimidinas (dominio C), se unen al tallo principal por su parte apical (Figura 17) (Wang *et al.*, 2009; 2011). Análisis *in silico* y estudios estructurales apoyan la formación de un pseudonudo entre ambos dominios G y C, haciendo que el elemento adopte una estructura relativamente compacta (Wang *et al.*, 2009; 2011). Además, estudios de mutagénesis

han mostrado que la introducción de sustituciones nucleótidas en residuos implicados en dicho pseudonudo o en otras partes del CITE tienen un efecto negativo en la eficiencia traduccional tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* (Batten *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). Mediante aproximaciones *in vitro*, se pudo concluir que este tipo de CITE une eIF4F con alta afinidad a través de la subunidad eIF4E, que es capaz de unir a esta última en ausencia de eIF4G, aunque con menor afinidad, y que el pseudonudo anteriormente mencionado probablemente desempeña un papel destacado en el proceso de reconocimiento del CITE por la proteína (Wang *et al.*, 2009; 2011).

La presencia de un CITE del tipo PTE dentro la 3' UTR (o abarcando además parte de región codificante) se ha predicho en otro miembro del género *Panicovirus*, en un *Umbravirus*, un *Gallantivirus*, y en seis miembros del género *Carmovirus*, todos dentro de la familia *Tombusviridae* (Tabla 1) (Ziegler *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Simon y Miller, 2013; Chattopadhyay *et al.*, 2014), aunque la funcionalidad del elemento predicho sólo se ha constatado experimentalmente en el virus del cactus del Saguaro (saguaro cactus virus, SCV, *Carmovirus*, *Tombusviridae*) (Chattopadhyay *et al.*, 2011). En todos los casos, a excepción del PTE del PEMV (RNA 2), se puede detectar complementariedad de secuencia entre el lazo terminal de una

de las horquillas del PTE y el lazo terminal de una horquilla de la región 5' situada dentro de la UTR o en la parte 5'-proximal (los primeros 150 nt) de la región codificante (Chattopadhyay *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011) (Figura 17). Esto sugiere que el establecimiento de una interacción RNA-RNA a larga distancia permite la transferencia del factor reclutado por el CITE a un punto próximo al inicio de traducción.

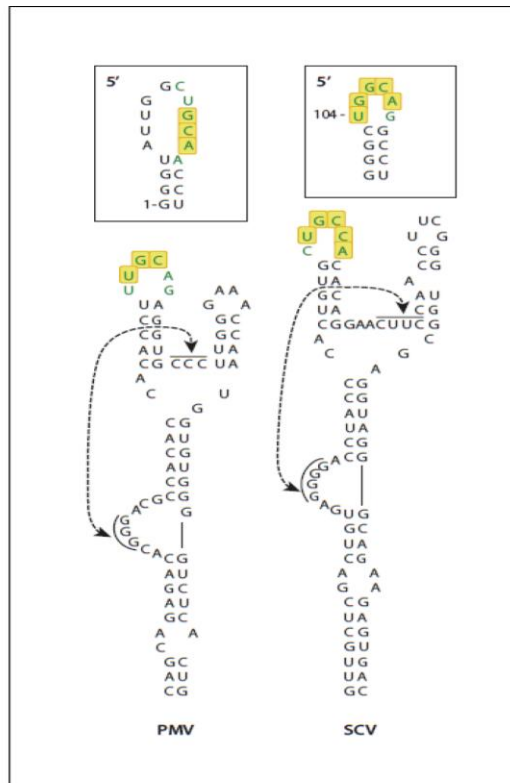


Figura 17. Estructura de dos PTEs que se encuentran en dos géneros diferentes (*Panicovirus*, PMV; *Carmovirus*, SCV). Las secuencias implicadas en la interacción a larga distancia RNA-RNA con las secuencias de 5' (en

recuadros) están en letra verde. Las cajas amarillas señalan las secuencias de la interacción conservadas en distintos tipos de CITEs de los *Carmovirus* como TED, ISS y PTE. Los pseudonudos se indican por las flechas con doble cabeza (tomado de Simon y Miller, 2013).

d) Tipo ISS (*I-Shaped Structure*)

El CITE de tipo ISS se ha identificado en el virus del rayado necrótico del maíz (maize necrotic streak virus, MNeSV, *Zeavirus*, *Tombusviridae*), el único miembro de la familia *Tombusviridae* descrito hasta el momento capaz de infectar monocotiledóneas (Scheets y Redinbaugh, 2006). El CITE de este virus es un elemento de 156 nt ubicado en la 3' UTR, y adopta una estructura de tipo horquilla extendida que presenta una similitud estructural global con el CITE de tipo TED, pero no hay semejanza ni en la secuencia, ni en los tamaños y localizaciones de las regiones de simple cadena protuberantes (Figura 18). El ISS del MNeSV presenta un núcleo central formado por una hélice de 5 pares de bases que admite pocas variaciones (Figura 18), incluso si se trata de mutaciones que preservan la estructura secundaria, lo que sugiere que posiblemente adopta conformaciones alternativas y/o que deben existir interacciones no-Watson Crick (Nicholson *et al.*, 2010; 2013). La funcionalidad de este elemento se ha comprobado tanto en ensayos de traducción *in vitro* como *in vivo* (Scheets y Redinbaugh, 2006; Nicholson *et al.*, 2010; 2013).

Aproximaciones *in vitro* con eIFs purificados de germen de trigo han puesto de manifiesto que el CITE ISS se une a eIF4F, mediante una interacción directa con su subunidad eIF4E (Nicholson *et al.*, 2010). La transferencia del factor reclutado a la región 5' está mediada, como se ha descrito en otros CITEs, por una interacción RNA-RNA a larga distancia que se establece entre el lazo apical del ISS y el lazo apical de una estructura en horquilla predicha en la 5' UTR. Es interesante, además, destacar que resultados de experimentos de "toeprinting" indicaron que el ISS puede interaccionar simultáneamente con eIF4F y con la región 5' (Nicholson *et al.*, 2010). Esta observación es consistente con la hipótesis de que el apareamiento de bases situadas a larga distancia permite depositar el factor reclutado cerca del extremo 5' del RNA viral, posibilitando el inicio de la traducción por un proceso de rastreo ribosomal.

Un CITE ISS se ha postulado que está presente en el virus latente del pepino Búlgaro (cucumber Bulgarian latent virus, CBV, *Tombusvirus*, *Tombusviridae*) (Scheets y Redinbaugh, 2006), en el virus del mosaico de la línea blanca del maíz (maize white line mosaic virus, MWLMV, *Aureusvirus*, *Tombusviridae*) (Carstens, 2010; Nicholson *et al.*, 2010) y en el virus de las manchas necróticas del melón (melon necrotic spot virus, MNSV, *Carmovirus*, *Tombusviridae*) (Truniger *et al.*, 2008). La

funcionalidad de este último se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Nieto *et al.*, 2006; Truniger *et al.*, 2008; Nieto *et al.*, 2011). Más aún, se ha demostrado que el CITE del MNSV está implicado en la rotura de la resistencia frente al virus conferida por el gen *nsv* en plantas de melón, y se ha obtenido evidencia genética de la interacción entre el CITE y eIF4E (Díaz *et al.*, 2004; Nieto *et al.*, 2006; Truniger *et al.*, 2008).

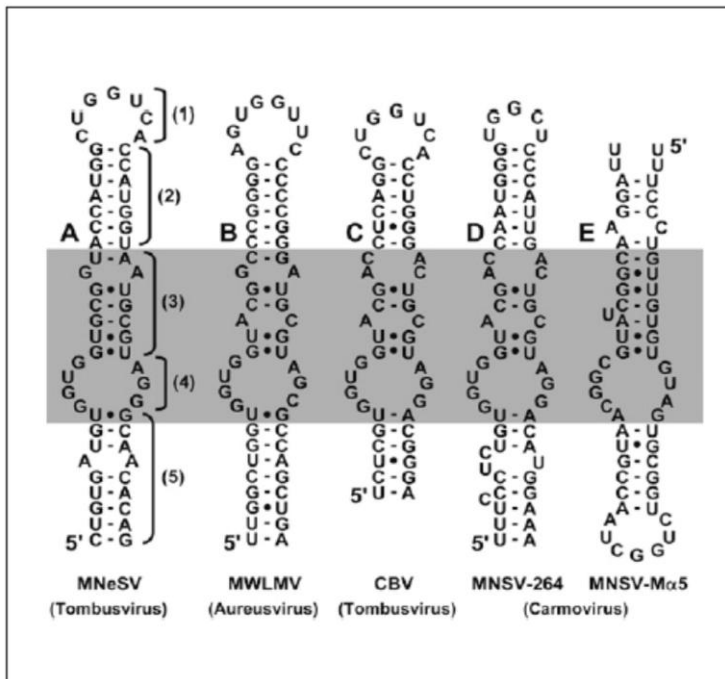


Figura 18. Comparación de la estructura secundaria predicha y de la secuencia de los 3' CITEs de tipo ISS en diferentes virus. Los numeros de los corchetes en la estructura A corresponden a las diferentes regiones (1-5) asignadas al 3' CITE de MNeSV. La banda sombreada (región 3 y 4) resalta el núcleo central sensible a mutaciones, y conservado en todos los CITEs de

este tipo. El CITE ISS del MNSV-M α 5 (incapaz de infectar plantas de melón con el gen de resistencia *nsv* a diferencia del aislado MNSV-264) se muestra con una orientación invertida para destacar las similitudes estructurales con el resto de CITEs (tomado de Nicholson *et al*, 2010).

e) Tipo YSS (*Y-Shaped Structure*)

En distintos miembros del género *Tombusvirus* se ha identificado o predicho la presencia de un CITE de tipo YSS en la 3' UTR de su genoma (Tabla 1) (Fabian y White, 2004). El YSS del TBSV, el mejor estudiado, es un elemento de 173 nt y adopta una estructura constituida por tres hélices (SL-A, SL-B, y SL-C; Figura 19), que son sustancialmente más largas que las que forman el CITE de tipo PTE (Fabian y White, 2004; White y Nagy, 2004; Fabian y White, 2006). La actividad del YSS del TBSV ha sido demostrada exclusivamente mediante ensayos *in vivo* ya que el elemento no es funcional en sistemas de traducción *in vitro* con extractos de germen de trigo. Esto se debe probablemente a que el elemento es incapaz de unir factores traduccionales de estos extractos o, alternativamente, a que no se pliega correctamente *in vitro* o adquiere una conformación incompatible con una traducción eficiente (Wu y White, 1999; Fabian y White, 2004; Nicholson y White, 2008). Un análisis mutacional exhaustivo de este CITE puso de manifiesto que los cambios nucleotídicos que mantienen la estructura de las tres hélices no afectan significativamente a su

actividad, pero sí aquellos que afectan al núcleo central que conecta las tres hélices o la eliminación de regiones de simple cadena protuberantes de la hélice principal (Fabian y White, 2006).

A diferencia del YSS del TBSV, el correspondiente al virus de las manchas en anillo del clavel italiano (carnation italian ringspot virus, CIRV, *Tombusvirus*, *Tombusviridae*) es activo en ensayos de traducción *in vitro* con extractos de germen de trigo (Nicholson y White, 2008). Mediante aproximaciones *in vitro* con eIFs purificados, se pudo concluir que el YSS recluta eIF4F y, con menor afinidad, eIFiso4F, aunque no se pudo determinar si la interacción con este complejo proteico es directa o indirecta (Nicholson *et al.*, 2013). La transferencia del factor reclutado por el YSS a la región 5' del genoma viral está mediada, muy probablemente, por una interacción RNA-RNA a larga distancia entre un lazo terminal de una de las horquillas del CITE y el lazo terminal de una horquilla de la 5' UTR, cuya relevancia para traducción ha sido comprobada experimentalmente en el caso del gRNA TBSV (Fabian y White, 2004). Interacciones similares se pueden predecir en otros *Tombusvirus* con CITE potenciales del tipo YSS, lo que sugiere que este mecanismo de transferencia debe ser general. Relacionado con esto, es interesante señalar que el YSS del CIRV puede ser reemplazado por otras clases de CITE (I-shape y

PTE) manteniendo niveles considerables de traducción (y de infectividad de los virus quimera), siempre que se preserve la interacción con la 5' UTR (Nicholson *et al.*, 2013). Esto apoya un modelo modular para este elemento traduccional que, además, podría ser objeto de intercambio por recombinación entre distintos agentes virales, una idea que también se ha sugerido para el CITE ISS del MNSV (Miras *et al.*, 2014).

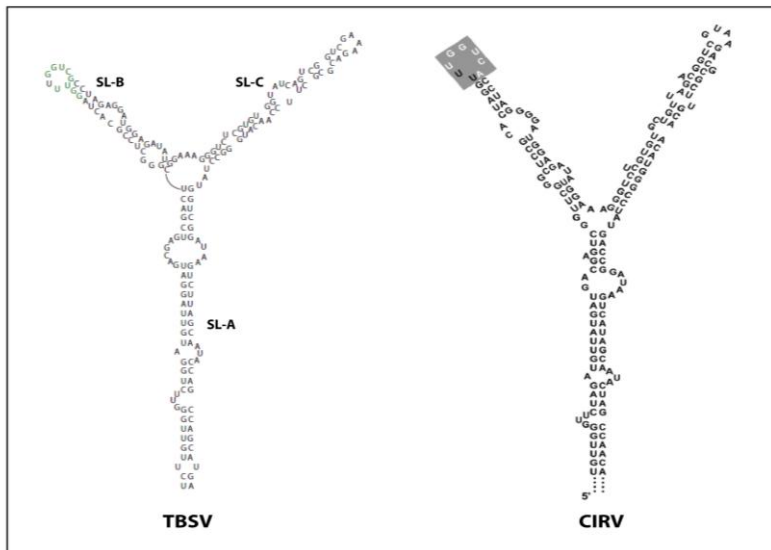


Figura 19. Estructura secundaria de CITEs de tipo YSS en el TBSV (izquierda) y CIRV (derecha). Las bases en verde en el CITE del TBSV son las que emparejan con una secuencia de la región 5' UTR. El lazo de la horquilla del CITE del CIRV implicado en la interacción con el 5' UTR se encuentra sombreado en gris, y las bases en blanco son las directamente involucradas en el apareamiento correspondiente (tomado de Nicholson *et al.*, 2013; Simon y Miller, 2013).

f) Tipo TSS (*T-Shaped Structure*)

El CITE de tipo TSS se descubrió inicialmente en el carmovirus TCV (McCormack *et al.*, 2008). Se trata de un elemento de 99 nt ubicado en la 3' UTR del RNA viral, que adopta una estructura formada por 3 hélices (H4a, H4b y H5) y que incluye dos pseudonudos (Ψ_2 y Ψ_3) (Figura 20). La conformación global de este elemento es muy similar a la de un tRNA, tal como se predijo *in silico* y como se ha corroborado posteriormente mediante aproximaciones de rayos X y NMR (McCormack *et al.*, 2008; Zuo *et al.*, 2010). Para que el TSS funcione como CITE se requieren elementos adicionales situados en la 3' UTR, incluyendo porciones de la hélice H4 situada en 5' respecto al TSS (Figura 20) y secuencias adyacentes a la misma (Stupina *et al.*, 2008). Experimentos *in vitro* han mostrado que el TSS del TCV se une tanto a ribosomas 80S como a la subunidad ribosomal 60S aislados de levaduras y *Arabidopsis*, una unión relevante para poder llevar a cabo su función (Stupina *et al.*, 2008). En presencia de la RDR viral, la conformación del TSS y, de forma más general, la de la 3' UTR (que incluye un entramado complejo de interacciones relevantes para replicación y/o traducción; Figura 20), experimenta alteraciones sustanciales que afectan especialmente al segmento que mimetiza al brazo aceptor del tRNA (H4a/ Ψ_3) y que es el sitio de unión del ribosoma. En base

a esta observación se ha propuesto que la unión de la RDR viral al promotor (Pr en Figura 20) enmascara al TSS e impide su función, de modo que la replicación del molde genómico puede tener lugar sin el impedimento que supondría la unión del ribosoma. Esto permitirá una regulación fina entre los procesos de traducción (en ausencia de la RDR viral) y replicación (en presencia de la RDR viral) (Yuan *et al.*, 2009, 2010, 2012).

No se ha detectado una interacción RNA-RNA en el TCV que aproxime los extremos 3' y 5' para circularizar el genoma y permitir la transferencia de los ribosomas reclutados por el TSS (Stupina *et al.*, 2011). El descubrimiento de un sitio de unión de la subunidad 40S en la 5' UTR del RNA viral, permitió avanzar la hipótesis de que la subunidad 40S unida a la región 5', interaccionará con la subunidad 60S unida al TSS, formando así el ribosoma 80S (Stupina *et al.*, 2011). Actualmente se desconoce si factores de traducción adicionales se unen al TSS o al complejo TSS-ribosoma. Sin embargo, cabe mencionar que los niveles de traducción de construcciones basadas en el TCV se reducían en células de *Arabidopsis* deficientes en eIF4G, lo que sugiere que este factor interviene en el proceso traduccional (Yoshii *et al.*, 1998, 2004).

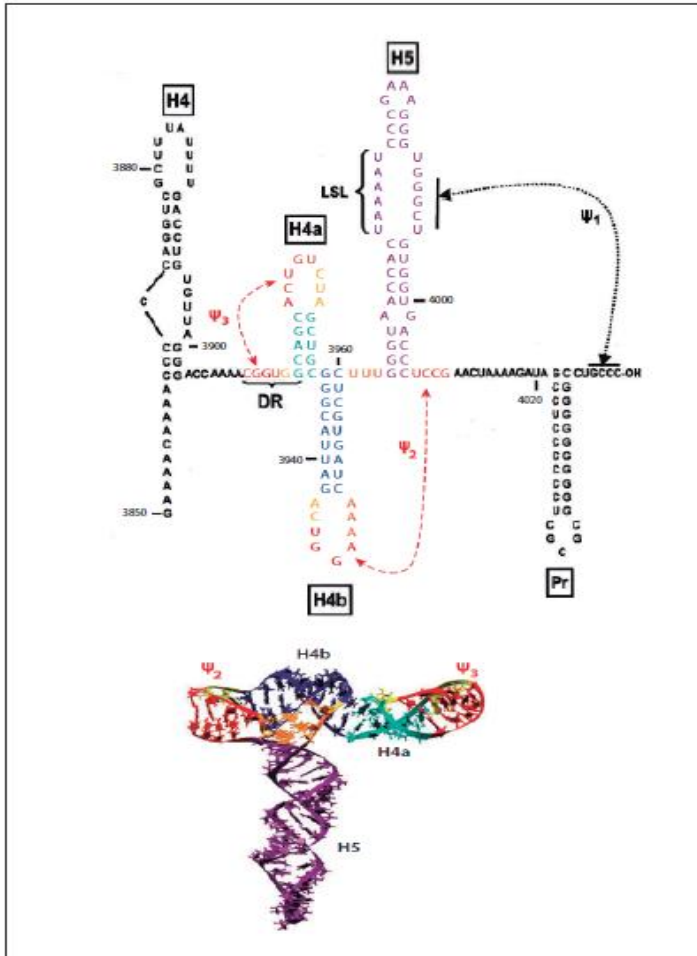


Figura 20. Representación de la 3' UTR del TCV. Parte superior, estructura secundaria de la 3' UTR del TCV. El TSS del TCV (representado en color) está compuesto de tres horquillas y dos pseudonudos. Los nombres de cada horquilla están recuadrados. No se ha detectado interacción a larga distancia para el TSS del TCV o secuencias cercanas a él (Stupina *et al.*, 2011). En la parte inferior se representa la estructura tridimensional del TSS del TCV (basado en Simon y Miller, 2013).

El virus del salpicado clorótico del cardamomo (cardamine chlorotic fleck virus, CCFV, *Carmovirus*, *Tombusviridae*) presenta un TSS similar al del TCV (Yuan *et al.*, 2010). Por su parte, resultados recientes han indicado que el PEMV (RNA 2) también contiene un elemento de este tipo en su región 3' (Gao *et al.*, 2014). De hecho, este virus parece contener hasta tres CITEs distintos en dicha región: el PTE, comentado anteriormente, que une a eIF4E, otro denominado kl-TSS que se localiza 9 nt aguas arriba del PTE y que posee secuencia y características estructurales similares a la parte superior de la mayoría de los elementos tipo PTE, a excepción del PTE del PEMV, y el TSS (Figura 21) (Gao *et al.*, 2012). El kl-TSS difiere del TSS en su estructura y en que es capaz de unir tanto al ribosoma 80S como a sus subunidades ribosomales 40S y 60S. Este CITE establece una interacción RNA-RNA a larga distancia con la región 5' del RNA viral, proporcionando la comunicación entre las dos partes de la molécula que, como se ha mencionado anteriormente, no parecía conferir el CITE PTE de este virus (Gao *et al.*, 2012). Además, la proximidad entre los dos CITEs puede facilitar el reclutamiento del ribosoma por el kl-TSS, gracias a la unión de eIF4E al PTE (Gao *et al.*, 2012). En cuanto al CITE TSS del PEMV, como el del TCV, es capaz de unir, aunque de forma débil, ribosomas 80S y la subunidad ribosomal 60S. Aunque kl-H (horquilla pequeña localizada

aguas arriba del TSS) y TSS son prescindibles para la traducción *in vitro* de una construcción delatora que contiene la 3' UTR PEMV, si se eliminan el kl-TSS y el PTE, y se colocan el kl-H y TSS próximos al codón de terminación del gen delator, se restaura la traducción a niveles cercanos a los de una construcción silvestre de referencia. Esto sugiere que PEMV requiere sus tres CITES para su correcta traducción (Gao *et al.*, 2014).

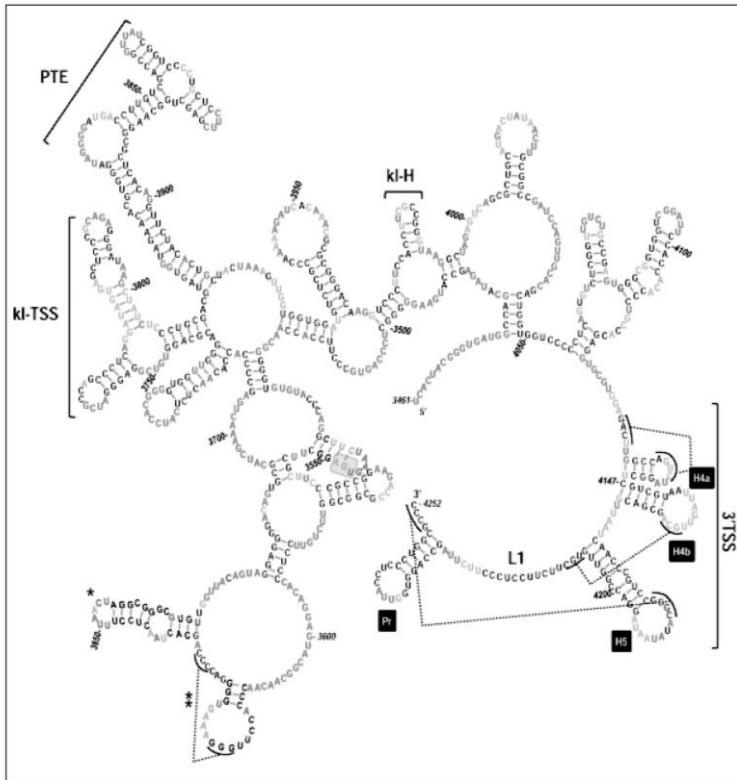


Figura 21. Estructura secundaria propuesta para la 3' UTR del PEMV.

Se indica la localización del 3'TSS, kl-TSS, y PTE. Kl-H es una horquilla que participa en la interacción a larga distancia. El asterisco indica una horquilla

cuya secuencia, estructura y posición está conservada en todos los *Umbravirus* secuenciados. El doble asterisco señala un pseudonudo predicho. El codón de terminación de la ORF 3-proximal está recuadrado en gris (tomado de Gao *et al.*, 2014).

2.2.3.1.2 Escape al proceso de rastreo ribosomal (*leaky scanning*)

Este mecanismo tiene lugar cuando una fracción de los ribosomas que comienza el rastreo lineal desde el extremo 5' sorteando el primer codón de inicio y continúa el barrido hasta alcanzar otro codón adecuado para empezar la síntesis proteica (Kozak, 1991; 2002). La falta de reconocimiento del primer codón de inicio se debe normalmente a que se trata de un codón no-AUG o de un triplete AUG en un contexto de secuencia subóptimo, aunque otros factores como la estructura secundaria, la longitud de la secuencia líder, y la distancia que separa los codones de inicio involucrados, pueden afectar a la eficiencia del proceso. Esta estrategia es utilizada por numerosos virus RNA (+) de plantas para traducir dos o, excepcionalmente, tres proteínas a partir de un único mRNA (Firth y Brierly, 2012).

2.2.3.1.3 Rastreo ribosomal discontinuo (*shunting*)

Este proceso sucede cuando los ribosomas están rastreando la región líder de un mRNA e “ignoran” ciertos segmentos dentro de la misma que contienen pequeñas ORFs, saltando en dirección 3’ para iniciar la traducción en una ORF más larga (Drugeon *et al.*, 1999). Se trata de un mecanismo infrecuente que fue descrito inicialmente en virus con genoma de DNA pertenecientes a la familia *Caulimoviridae* (Füterer *et al.*, 1993; Pooggin *et al.*, 2006). Posteriormente, se ha puesto de manifiesto que es utilizado también por un virus RNA (+) de plantas, el waikavirus esférico del tungro del arroz (rice tungro spherical virus, RTSV) (Pooggin *et al.*, 2012).

2.2.3.1.4 Entrada interna del ribosoma

La iniciación de la traducción en sitios internos de un mRNA está mediada por la presencia de una región denominada IRES, como se ha indicado previamente, que recluta directamente a factores de iniciación y ribosomas para iniciar el proceso de síntesis proteica de una forma independiente de cap. Los IRES fueron identificados por primera vez en virus animales, concretamente en picornavirus (Jang *et al.*, 1988; Pelletier y Sonenberg, 1988). Trabajos posteriores pusieron de manifiesto su presencia en otros virus

de animales (Balvay *et al.*, 2009) y en distintos virus de plantas con genoma RNA (+) incluidos dentro de las familias *Potyviridae*, *Comoviridae*, *Luteoviridae*, *Tombusviridae* y *Virgaviridae* (Dreher y Miller, 2006; Kneller *et al.*, 2006; Newburn y White, 2015). El genoma de algunos de estos virus posee una estructura cap en 5' mientras que otros tienen el extremo 5' libre o con una proteína codificada por el virus, VPg, unida covalentemente. Los IRESs en estos RNAs virales se pueden localizar en la 5' UTR o en posiciones internas de la molécula (Newburn y White, 2015).

Los IRESs descritos en los distintos virus de plantas difieren considerablemente desde un punto de vista estructural. Uno de los mejor caracterizados es el identificado en la región líder del genoma del virus del grabado del tabaco (tobacco etch virus, TEV, *Potyvirus*, *Potyviridae*) que está constituido por 143 nt con varias secuencias/estructuras relevantes para su función entre las que destaca un pseudonudo (PK1; Figura 22) (Gallie, 2001). Se ha sugerido que la complementariedad detectada entre un lazo de PK1 y el rRNA 18S podría favorecer la unión de la subunidad 40S al RNA viral, facilitando el proceso de traducción (Zeenko y Gallie, 2005).

Introducción

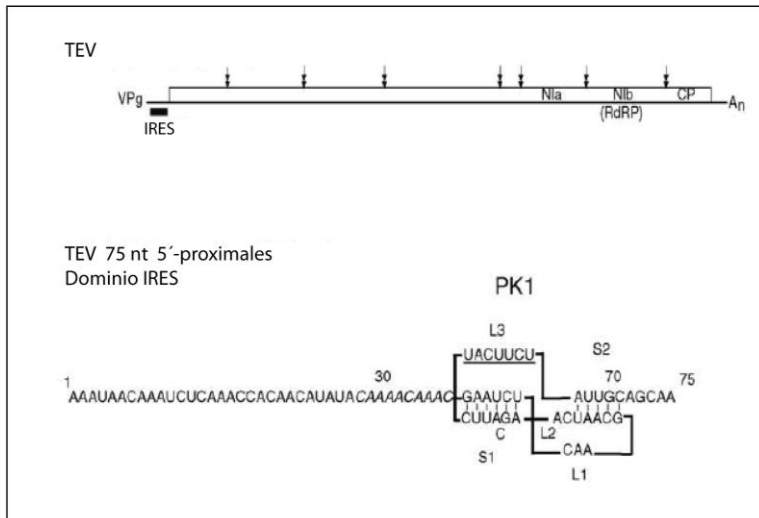


Figura 22. Diagrama esquemático del genoma del TEV, representando la estructura del dominio IRES. Parte superior: organización genómica del TEV. La barra negra indica la localización del IRES. Las flechas con doble cabeza indican los sitios de corte de la poliproteína. Parte inferior: dominio IRES de 75 nt próximo al 5' del TEV (tomado de Kneller *et al.*, 2006).

Otro IRES de virus de plantas relativamente bien estudiado es el identificado en el tobamovirus que infecta crucíferas (crucifer-infecting tobamovirus, crTMV) que dirige la traducción de la CP desde un sgrRNA y desde el grRNA (Ivanov *et al.*, 1997; Dorokhov *et al.*, 2002). Este IRES, denominado IRES_{CP,148}^{CR}, está localizado dentro del gen de la MP y solapa con la ORF de la CP (Figura 23) (Ivanov *et al.*, 1997), y adopta una estructura en forma de horquilla flanqueada por dos

Introducción

secuencias ricas en purinas, cruciales para su actividad (Ivanov *et al.*, 1997; Dorokhov *et al.*, 2002).

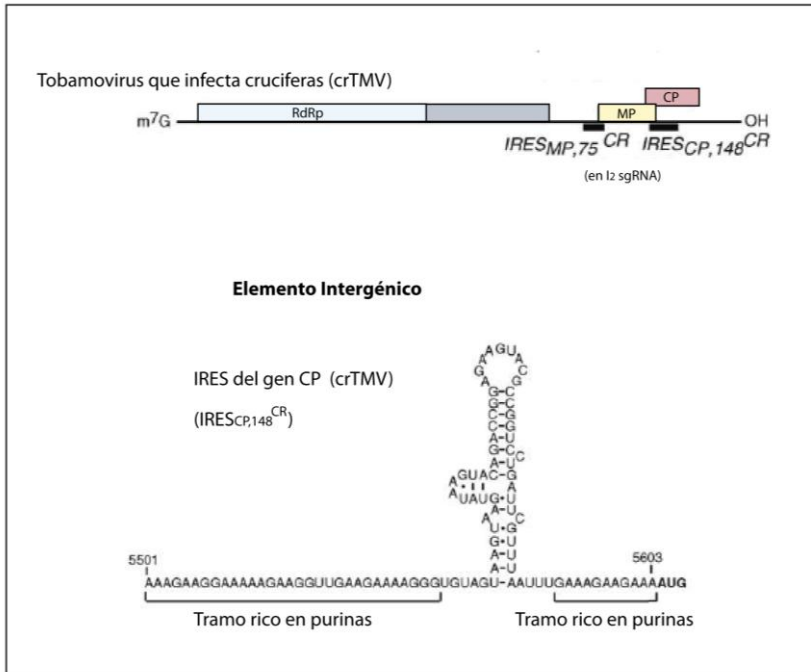


Figura 23. Diagrama esquemático del genoma del crTMV, representando la estructura del dominio IRES_{CP,148}^{CR}. Parte superior: organización genómica del crTMV. Las barras negras indican la localización de dos IRES presentes en el RNA viral. Parte inferior: estructura del IRES_{CP,148}^{CR} del crTMV (tomado de Kneller *et al.*, 2006).

2.2.3.2 Etapa de elongación: corrimiento en la pauta de lectura del ribosoma (*frameshift*)

Este proceso ocurre cuando los ribosomas que han iniciado la traducción en una pauta de lectura, se desplazan una o dos posiciones hacia 5' o 3' durante la fase de elongación y continúan el proceso. El desplazamiento del ribosoma normalmente está provocado por la presencia de determinadas señales estructurales en el mRNA que provocan su parada y posterior deslizamiento. El resultado va a ser la producción de dos proteínas a partir de dos ORFs solapantes, que son idénticas en su región N-terminal pero que difieren en su región C-terminal. Puesto que la eficiencia del proceso es baja (alrededor del 5%), la proporción de las proteínas resultantes estará muy sesgada (Miller y Giedroc, 2010; Firth y Brierly, 2012). Lo más habitual es que se produzca un corrimiento de -1 nt en la pauta de lectura, como el que regula la expresión de la RDR en distintos grupos virales, aunque también se han propuesto corrimientos de +1 nt o + 2 nt en un número limitado de casos (Firth y Brierly, 2012).

2.2.3.3 Etapa de terminación: lectura a través de codones de terminación débiles (*readthrough*)

Este mecanismo consiste en que en, determinadas rondas de traducción, los ribosomas son capaces de “ignorar” el codón de parada de un determinado gen, incorporando un aminoácido en dicha posición gracias a la presencia de un tRNA supresor (Firth y Brierley, 2012). Como en el caso del mecanismo anterior, el resultado es la síntesis de dos proteínas a partir del mismo codón de inicio, una de las cuales contiene una extensión en el extremo C-terminal con respecto a la otra. La eficiencia del proceso es baja (0,3-5%) (Bertram *et al.*, 2001) lo que permite producir dos proteínas en cantidades muy distintas. Este mecanismo es utilizado por distintos virus para producir la RDR o una versión extendida de la CP, que normalmente está involucrada en la transmisión por vectores (Thiébeauld *et al.*, 2007; Firth y Brierly, 2012).

2.2.4 A nivel post-traducciona: procesamiento proteolítico

Distintos virus de RNA (+) de plantas contienen ORFs con información genética para dos o más proteínas. La traducción de una ORF de este tipo origina una poliproteína que será escindida en productos individuales, a través de proteinasas

Introducción

codificadas por el propio virus. Esta estrategia evita la necesidad de que la secuencia codificante de cada proteína tenga un codón de inicio situado en posición 5' proximal en el mRNA. Además, permite regular la liberación de cada proteína por digestión enzimática. Este tipo de estrategia es utilizada por los virus de los géneros *Comovirus*, *Nepovirus*, y *Potyvirus* (Shanks y Lomonossoff, 1990; Wang y Sanfaçon, 2000; Merits *et al.*, 2002).

3- Silenciamiento por RNA y su papel en defensa antiviral

3.1 Generalidades

El silenciamiento génico mediado por RNA es un sistema general de regulación de la expresión génica específico de secuencia que está conservado en eucariotas. Este tipo de regulación puede producirse tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. El silenciamiento génico transcripcional (*transcriptional gene silencing* o TGS) es el resultado de la modificación del DNA o de las histonas presentes en la cromatina. Estas modificaciones crean un ambiente de heterocromatina alrededor de un cierto gen que impide el acceso de la maquinaria transcripcional (factores de transcripción, RNA polimerasas, etc), reprimiendo la expresión de dicho gen. Por su parte, el silenciamiento génico post transcripcional (*post-transcriptional gene silencing* o PTGS) es un mecanismo que implica la degradación o la represión traduccional de un mRNA, impidiendo que se sintetice la proteína correspondiente (Pantaleo, 2011; Vanyushin y Ashapkin, 2011). Tanto el TGS como el PTGS tienen en común el reconocimiento específico de secuencias de DNA o RNA, respectivamente, por pequeñas moléculas de RNA (*small RNAs*, sRNAs), y son mecanismos que desempeñan un papel esencial

en procesos fundamentales como la preservación de la integridad del genoma (Agrawal *et al.*, 2003; Buchon y Vaury, 2006), la regulación génica de procesos del desarrollo y fisiológicos (He y Hannon, 2004), la organización de la cromatina (Volpe *et al.*, 2002; Van wolfswinkel y Ketting, 2010), y la defensa frente a ácidos nucleicos invasivos, como transgenes, transposones y virus (Chicas y Macino, 2001; Matzke *et al.*, 2001; Voinnet, 2001; Baulcombe, 2004; Vaucheret, 2006).

Desde un punto de vista mecanístico, el proceso de silenciamiento se desencadena a partir de dsRNAs o de ssRNAs con una elevada estructura secundaria. Estas moléculas son reconocidas y procesadas por RNAsas de tipo III denominadas Dicer (*dicer-like*, DCLs) generando sRNAs de doble cadena con un tamaño de 20 a 25 nt (Figura 24) (Baulcombe, 2004). Posteriormente, una helicasa separa estos dúplex de RNA y una hebra (“pasajera”) es degradada mientras que la otra (“guía”) es incorporada a un complejo efector conocido como RISC (*RNA-induced silencing complex*), en el caso del PTGS, o RITS (*RNA-induced transcriptional silencing complex*), en el caso del TGS, cuyo componente activo es una proteína de la familia de las endonucleasas denominadas Argonautas (AGO) (Zamore *et al.*, 2000). El sRNA cargado guiará a RISC hasta un mRNA de secuencia complementaria induciendo su degradación o la

represión de su traducción, en el caso de PTGS. En el TGS, RITS es guiado hasta un DNA complementario que será modificado, reprimiendo la transcripción (Zvereva y Pooggin, 2012; Rogers y Chen, 2013).

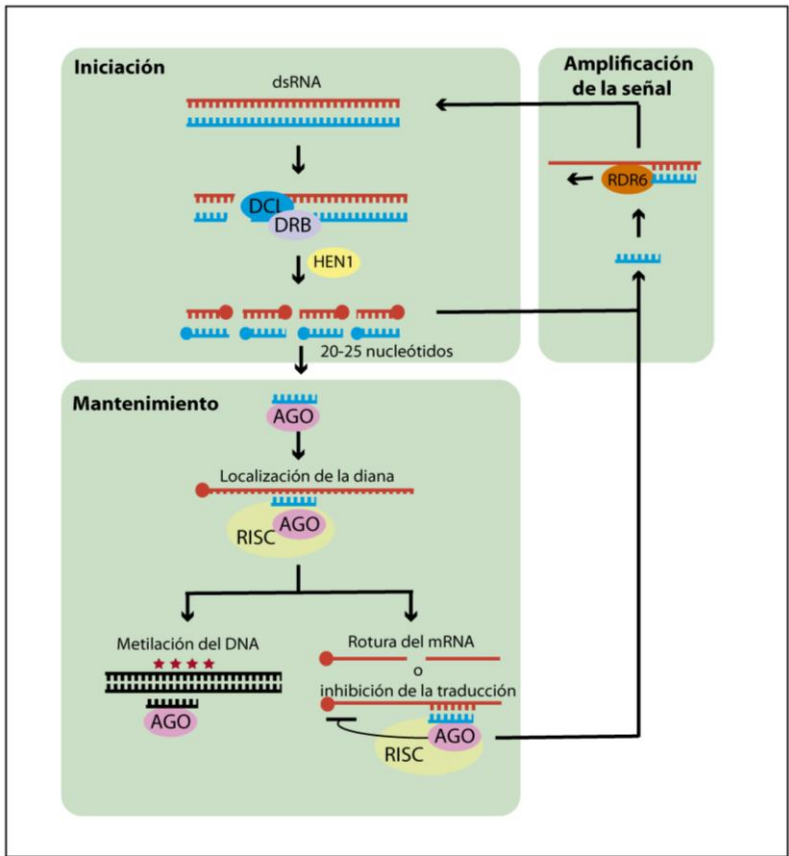


Figura 24. Esquema del proceso de silenciamiento por RNA. Durante la iniciación, una molécula de dsRNA es reconocida y procesada por DCL, asistida por su cofactor DRB que es una proteína de unión a RNA de doble cadena, para generar dsRNAs que son metilados por HEN1. Durante el mantenimiento, una hebra guía de sRNA se carga en el complejo RISC, cuyo

Introducción

componente principal es AGO, para reconocer específicamente y modificar una molécula diana (RNA en el PTGS y DNA en el TGS). La amplificación de la señal corre a cargo de una RNA polimerasa (RDR) que utiliza los sRNA primarios como cebadores para generar nuevas moléculas de dsRNA que pueden volver a procesarse.

Los dsRNAs o ssRNAs con alta estructura secundaria que desencadenan el proceso de silenciamiento pueden originarse por transcripción en el núcleo (a partir de DNA endógeno o introducido artificialmente), por la acción de una RDR celular que los sintetizan a partir de ssRNAs, o corresponder a formas genómicas o intermediarios de la replicación de un virus (Wassenegger y Krczal, 2006). En plantas, las enzimas RDR, además de poder participar en la generación de las moléculas inductoras, están involucradas en la amplificación del silenciamiento (Figura 24). En esta amplificación, una RDR emplea normalmente sRNAs como cebadores y ssRNAs primarios cortados u otros ssRNAs aberrantes como moldes, generando nuevos dsRNAs que serán procesados por DCL para generar los denominados sRNAs secundarios (Sijen *et al.*, 2007). Este proceso de amplificación favorece la diseminación del silenciamiento desencadenado en un punto particular de la planta a tejidos alejados del mismo. En esta diseminación participa una señal móvil cuya naturaleza no se conoce con

exactitud, aunque existen pruebas sólidas que involucran a los sRNAs (Chitwood y Timmermans, 2010; Melnyk *et al.*, 2011).

En plantas, como en otros organismos, las vías de silenciamiento generan fundamentalmente dos tipos de sRNAs: los microRNAs (miRNAs), y los pequeños RNAs interferentes (*small interfering RNAs*, siRNAs). La diferencia fundamental entre estas dos clases de sRNAs radica en la estructura de su RNA precursor: mientras los siRNAs resultan del procesamiento de dsRNAs o ssRNAs en horquilla con tallo perfectamente apareado, los miRNAs se generan a partir de ssRNAs que adoptan un plegamiento en horquilla con tallo parcialmente apareado. Concretamente, estos miRNAs corresponden a sRNAs endógenos de 20-24 nt que derivan de la acción de DCL1 sobre precursores producidos, en primera instancia, por transcripción de genes *MIR* a cargo de la Polimerasa II (Pol II). Una de las hebras del pequeño dúplex generado por DCL1 es degradada (miRNA*) y la otra es seleccionada como miRNA maduro e incorporada en AGO1, promoviendo el silenciamiento de genes diana a través de la rotura o de la represión traduccional del mRNA (Kidner y Martienssen, 2005; Brodersen *et al.*, 2008). Los miRNAs están implicados en procesos muy diversos en plantas tales como aquellos relacionados con la proliferación y desarrollo de hojas y flores, la formación y desarrollo de raíces laterales o la respuesta a

distintos estreses abióticos (Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006b; Meng *et al.*, 2011; Sunkar *et al.*, 2012).

En lo que respecta a los siRNAs, se han descrito varias clases: los pequeños RNAs interferentes que actúan en *trans* (*trans-acting small interfering RNA*, tasiRNAs), los siRNAs derivados de transcritos naturales antisentido (*natural antisense short interfering RNA*, natsiRNAs) y los RNA interferentes asociados a repeticiones (*repeat associated small interfering RNA*, rasiRNAs). La biogénesis de los diferentes siRNAs sigue rutas distintas en cuanto a la actividad polimerasa implicada en la generación de los precursores, la actividad DCL que los procesa y la(s) proteína(s) AGO en que son cargados (Xie *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005; Henderson *et al.*, 2006; Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006; Zvereva y Pooggin, 2012). Estos siRNAs están implicados, fundamentalmente, en la regulación de procesos de desarrollo (tasiRNAs), en adaptación o respuesta a estreses de origen diverso (natsiRNAs) y/o al mantenimiento de estados de metilación del DNA (rasiRNAs) (Yoshikawa *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005; Borsani *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2007; Kim, 2008)

3.2 Características generales de los componentes proteicos más relevantes de la maquinaria de silenciamiento en plantas

Como he mencionado más arriba las proteínas DCL son componentes clave en la biogénesis de sRNAs. Son enzimas RNasa III, de alrededor de 200 kDa, que cortan dsRNAs generando dúplex de RNA de 21 a 24 nt, con un grupo fosfato en el extremo 5' y con 2 bases no apareadas en el extremo 3' hidroxilo (Bartel, 2004). Este último extremo normalmente es metilado por una metil-transferasa (HEN1) (Yu *et al.*, 2005), un tipo de modificación que confiere protección a los sRNAs frente a la degradación y la uridilación (Li *et al.*, 2005). Las DCLs son ubicuas en los tejidos, pero se expresan de manera desigual en función de las diferentes etapas del desarrollo y en respuesta a estrés ambiental (Liu *et al.*, 2009). Están formadas por seis dominios: DExD helicasa, ATPasa/helicasa-C, Duf283 (*domain of unknown function*, dominio de función desconocida), PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille), RNasa III y dsRBD (*double stranded RNA-binding domains*, dominio de unión a dsRNA) (Finnegan *et al.*, 2003; Margis *et al.*, 2006). Los tres últimos dominios se encargan de unir y digerir dsRNA. A través de una hélice α se conectan los dominios PAZ y RNasa III entre sí, y la longitud y el tamaño de dicha hélice es lo que determinará el tamaño del sRNA que se genera (Macrae *et al.*, 2006). *Arabidopsis thaliana*

codifica cuatro DCLs: DCL1, DCL2, DCL3, y DCL4. Las enzimas DCL1 y DCL4 generan sRNAs de 21 nt, DCL2 genera sRNAs de 22 nt y DCL3 genera sRNAs de 24 nt (Blevins *et al.*, 2006). El dominio RNasa III se une directamente a la caja PIWI de las proteínas AGO. El dominio dsRBD discrimina entre distintos sustratos de RNA y la consiguiente incorporación de complejos efectores (Margis *et al.*, 2006), mientras que el dominio Duf283 parece estar relacionado con la selección de la hebra que será cargada en las proteínas AGO (Dlakic, 2006). Cabe mencionar también que para el reconocimiento de sus sustratos, las DCLs están asistidas por proteínas de unión a dsRNA (*dsRNA binding protein*, DRB). En *A. thaliana* se han identificado cinco de estas proteínas (HYL1, DRB2-5) que son capaces de interactuar de forma diferencial con las DCL (Hiraguri *et al.*, 2005; Nakazawa *et al.*, 2007; Vaucheret, 2006).

Las proteínas AGO son el componente catalítico de los complejos RISC y RITS. Presentan un tamaño de alrededor de 100 kDa contienen cuatro dominios, un dominio amino terminal variable (encargado de separar el dsRNA formado por sRNA y su mRNA diana), y tres dominios conservados: PAZ (reconoce el extremo 3' del sRNA), Mid (reconoce el extremo 5' del sRNA) y PIWI (inactiva el mRNA diana a través de la triada catalítica DEE) (Song *et al.*, 2004). En general hay múltiples genes AGO en las plantas. En *A.thaliana* se distinguen 10 AGOs

distintas (Vaucheret, 2008), que se agupan en tres clases en función de la homología de sus secuencias aminoacídicas, lo que no necesariamente se correlaciona con la función que desempeñan: AGO1/AGO5/AGO10, AGO2/AGO3/AGO7 y AGO4/AGO6/AGO8/AGO9 (Vaucheret, 2008). La presencia de la triada catalítica en el dominio PIWI no implica *per se* la actividad de corte ya que, como se ha indicado anteriormente, en ocasiones RISC induce una represión de la traducción del RNA diana en lugar de su degradación (Bartel, 2004). De las 10 proteínas AGO descritas en *A. thaliana*, se ha confirmado la capacidad de corte sólo en cinco de ellas (AGO1, AGO2, AGO4, AGO7 y AGO10) (Baumberger y Baulcombe, 2005; Qi *et al.*, 2005; Montgomery *et al.*, 2008; Carbonell *et al.*, 2012). Por último cabe indicar que el reclutamiento de los sRNAs en un complejo AGO particular está determinado en gran medida por el nucleótido del extremo 5' (Mi *et al.*, 2008; Kim, 2008). Así los sRNAs con una uridina en su extremo 5' terminal serán cargados por AGO1, los que posean una adenosina lo harán en AGO2, AGO4, AGO6 y AGO9 y los que tengan una citosina en AGO5 (Mi *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008).

Las RDRs son otros protagonistas esenciales de los mecanismos de silenciamiento que, como ya se ha comentado, pueden intervenir en la generación inicial de los dsRNAs

inductores y también en la amplificación de la señal de silenciamiento (Dalmay *et al.*, 2000; Wassenegger y Krczal, 2006). En *A. thaliana* se han identificado seis RDRs distintas: RDR1, RDR2, RDR3a (RDR3), RDR3b (RDR4), RDR3c (RDR5) y RDR6 (SDE1/SGS2). Tres de estas enzimas, RDR3a, RDR3b y RDR3c, comparten un motivo aminoacídico DFDGD en el dominio catalítico, mientras que las otras tres, RDR1, RDR2 y RDR6, presentan el motivo catalítico DLDGD canónico en C-terminal (Wassenegger y Krczal, 2006). La existencia de seis RDRs sugiere redundancia funcional y/o especialización de estas enzimas en las diferentes rutas de silenciamiento. De hecho, los efectos de las RDRs están estrechamente ligados a las funciones de DCL y AGO, y se encuentran asociaciones específicas entre los distintos tipos de enzimas en las distintas rutas de silenciamiento (Dalmay *et al.*, 2000; Mourrain *et al.*, 2000). La enzima RDR6 resulta particularmente importante para procesos de PTGS en plantas frente a transgenes o agentes virales o subvirales y sintetiza dsRNAs auxiliada por proteínas adicionales, como un estabilizador de RNA (SGS3), una exonucleasa RNasa D (WEX) y una helicasa de RNA (SDE3) (Mourrain *et al.*, 2000; Dalmay *et al.*, 2001; Glazov *et al.*, 2003).

3.3 Los virus como inductores y dianas del silenciamiento por RNA

Una de las primeras funciones descubiertas y bien estudiadas del silenciamiento por RNA es la defensa del huésped frente a patógenos virales, observada por primera vez en plantas (Lindbo *et al.*, 1993; Dougherty *et al.*, 1994; Ratcliff *et al.*, 1997). Los virus, en alguna etapa de su replicación, generan moléculas de dsRNA que pueden actuar como inductores del PTGS. Esta activación del silenciamiento les convierte en diana de este mecanismo, dando lugar a la fragmentación de su genoma y a la formación de sRNAs de origen viral (*virus derived small RNAs*, vsRNAs) (Moissiard y Voinnet, 2004; Ding y Voinnet, 2007). Como se ha descrito de forma general para el PTGS, en este caso la señal también se amplifica mediante la producción de vsRNAs secundarios (Díaz-Pendón *et al.*, 2007). Asimismo, la señal antiviral puede dispersarse por el resto de la planta, estableciendo una respuesta defensiva y una resistencia frente a la infección, previa a la llegada del patógeno (Brosnan *et al.*, 2007; Dunoyer *et al.*, 2010; Molnar *et al.*, 2010).

Los dsRNA virales que disparan el PTGS pueden tener distintos orígenes. En el caso de los virus de RNA, pueden ser generados como intermediarios de replicación y/o de

transcripción por la RDR viral o corresponder a regiones autocomplementarias del genoma viral (Ding, 2010) (Figura 25). Las RDR celulares también podrían contribuir a disparar el silenciamiento inicial mediante la generación de dsRNAs derivados del virus (Curaba y Chen, 2008).

En cuanto a los componentes proteicos de la maquinaria de silenciamiento más relevantes en defensa antiviral, estudios realizados en *A. thaliana* han indicado que DCL4, DCL2 y DCL3 actúan de manera jerárquica para producir vsRNAs de 21, 22 y 24 nt, respectivamente, a partir de los dsRNAs virales (Deleris *et al.*, 2006; Moissiard y Voinnet, 2006). DCL1 contribuye en menor medida, ya que interviene cuando otras DCLs están comprometidas o cuando se necesita un procesamiento previo que facilite el acceso de otras DCLs al dsRNA (Donaire *et al.*, 2008; García-Ruiz *et al.*, 2010; Llave, 2010).

Una vez generados, los vsRNAs se asocian con complejos efectores RISC que serán los encargados de reconocer las dianas virales y cortarlas o, alternativamente, de provocar su arresto traduccional, aunque esto aún no ha sido demostrado (Ding y Voinnet, 2007; Vaucheret, 2008). De las diez proteínas AGO identificadas en *A. thaliana*, la proteína AGO1 parece contribuir en mayor medida al desarrollo de la respuesta antiviral, pero también pueden intervenir las proteínas AGO2,

AGO5 y/o AGO7 (Morel *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2008; Harvey *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

Por último, el papel de las RDR celulares en respuesta antiviral mediada por silenciamiento es bastante importante como se ha indicado anteriormente ya que, además de poder contribuir a la inducción del silenciamiento, se encargan de amplificar la señal del silenciamiento dirigida contra el virus. Cabe destacar particularmente la contribución de RDR6 ya que si las funciones de esta enzima se encuentran afectadas en una planta, aumenta considerablemente su susceptibilidad a distintos virus (Schwach *et al.*, 2005; Voinnet, 2008). Durante las infecciones por virus RNA (+) se ha constatado la participación de RDR6 y, además, de RDR1 y RDR2 como parte de la respuesta defensiva de las plantas (Díaz-Pendón *et al.*, 2007; Donaire *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2009).

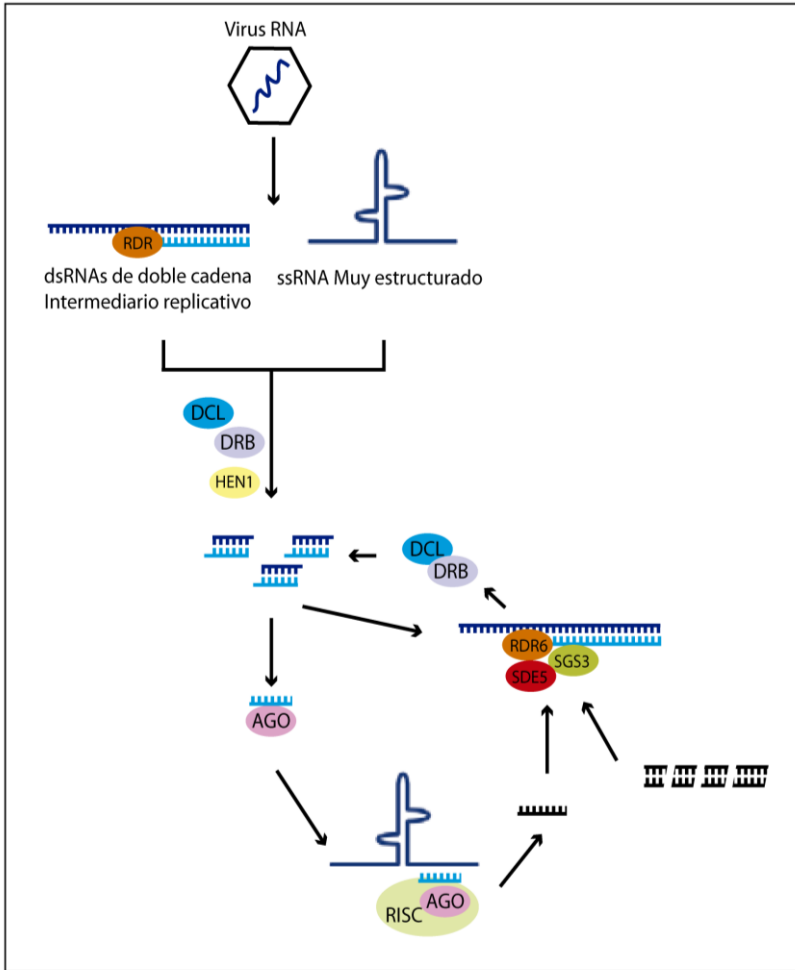


Figura 25. Modelo del silenciamiento de RNA antiviral (basado en Corsba *et al.*, 2009).

3.4 Supresión viral del silenciamiento mediado por RNA

Para contrarrestar la defensa antiviral del huésped basada en silenciamiento, los virus de plantas (y también

algunos virus animales) codifican proteínas capaces de inhibir esta respuesta que se conocen como supresores virales de silenciamiento por RNA (*viral suppressors of RNA silencing*, VSRs). Los VSRs presentan una gran variabilidad estructural y no existe correlación clara entre grupos taxonómicos y tipos de VSRs, lo que sugiere que estas proteínas han evolucionado de forma independiente para realizar la misma función. A menudo, estos VSRs son multifuncionales y tienen un papel importante en otras etapas del ciclo biológico del virus como la replicación, la encapsidación, el movimiento o la transmisión por vectores, entre otras. Además, aunque la mayoría de los virus codifican un solo VSR, también se han descrito virus que codifican más de uno, lo que probablemente facilita el proceso infeccioso (Díaz-Pendón y Ding, 2008; Wu *et al.*, 2010; Burgyán y Havelda, 2011; Pumplin y Voinnet, 2013).

Los datos disponibles sugieren que los VSRs pueden interferir con las distintas etapas de la ruta de silenciamiento y que un mismo supresor puede tener una o más dianas en dicha ruta (Incarbone y Dunoyer, 2013; Csorba *et al.*, 2015). Una de las estrategias más utilizada por los VSRs es la interacción con RNAs relevantes en silenciamiento. Los VSRs pueden unirse a sRNAs, impidiendo el ensamblaje del complejo efector RISC (Lakatos *et al.*, 2006; Mérai *et al.*, 2006) o unirse a dsRNAs más largos, compitiendo con la enzima Dicer por su sustrato e

impidiendo la formación de vsRNAs (Deleris *et al.*, 2006). Los supresores también son capaces de actuar sobre los distintos componentes proteicos de la ruta de silenciamiento como son las proteínas AGO (Zhang *et al.*, 2006a; Baumberger *et al.*, 2007; Azevedo *et al.*, 2010; Giner *et al.*, 2010), las enzimas RDR o proteínas asociadas necesarias para su función, obstaculizando la formación de dsRNAs y bloqueando la ruta de amplificación del silenciamiento (Zrachya *et al.*, 2007; Glick *et al.*, 2008; Fukunaga y Doudna, 2009).

3.5 Perfiles de vsRNAs en plantas infectadas por distintos tipos de virus

Aproximaciones iniciales de clonaje y secuenciación a pequeña escala y, posteriormente, de secuenciación masiva han permitido caracterizar de forma bastante exhaustiva las poblaciones de vsRNAs presentes en plantas infectadas con distintos tipos de virus. Este tipo de estudios ha aportado datos significativos tanto acerca de las posibles moléculas inductoras, como de los componentes de la maquinaria de silenciamiento involucrados en defensa antiviral, lo que ha revelado características generales y características particulares de distintas interacciones virus-huésped (Llave, 2010; Shimura y Pantaleo, 2011; Zhu y Guo, 2012; Ghoshal y Sanfaçon, 2015).

Uno de los aspectos considerados al analizar las poblaciones de vsRNAs es la distribución de tamaños en las mismas, ya que puede proporcionar pistas acerca de las actividades DCL implicadas en su biogénesis. En la mayoría de interacciones planta-virus estudiadas se ha encontrado que los vsRNAs de 21 nt son la clase más predominante, seguidos de cerca por los vsRNAs que tienen un tamaño de 22 nt, siendo mucho más minoritarios los vsRNAs de 24 nt o de otros tamaños (Deleris *et al.*, 2006; Fusaro *et al.*, 2006; Díaz-Pendón *et al.*, 2007; Donaire *et al.*, 2008, 2009; Margaria *et al.*, 2014). Este tipo de patrón se repite en especies vegetales diversas (incluyendo especies modelo como *A. thaliana* o *Nicotiana benthamina*, o especies de relevancia agronómica como tomate o melón, entre otras) infectadas con virus pertenecientes a grupos taxonómicos muy distintos, y sugiere que DCL4 y DCL2, tal como se ha indicado antes, son las que desempeñan un papel más relevante en defensa antiviral (Blevins *et al.*, 2006; Bouche *et al.*, 2006; Deleris *et al.*, 2006).

Por otra parte, la polaridad de los vsRNAs puede aportar información acerca de las moléculas inductoras del silenciamiento. En general, se pueden distinguir dos situaciones a este respecto: a) poblaciones de vsRNAs en las que las cadenas de polaridad (+) y (-) se encuentran en proporciones esencialmente equivalentes, y b) poblaciones de vsRNAs en las

que se observa un predominio de cadenas (+) (Mourrain *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003; Schwach *et al.*, 2005; Axtell *et al.*, 2006; Díaz-Pendón *et al.*, 2007; Donaire *et al.*, 2008, 2009; Qi *et al.*, 2009). En el primer caso, se ha sugerido que los sustratos de DCL corresponderán a moléculas de dsRNA provenientes de la acción de la RDR viral o de RDR(s) celular(es), mientras que en el segundo caso se ha propuesto que las DCLs reconocerán regiones del RNA viral de cadena (+) con un alto grado de autocomplementariedad (Szittyá *et al.*, 2002; Molnar *et al.*, 2005; Donaire *et al.*, 2009). Sin embargo, en esta última situación no se ha podido establecer una correlación clara entre vsRNAs mayoritarios y regiones especialmente estructuradas del RNA viral, por lo que se ha postulado que factores codificados por el huésped o por el virus aún desconocidos podrían contribuir al sesgo observado en la polaridad de los vsRNAs (Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Wang *et al.*, 2004; Meyers *et al.*, 2008; Donaire *et al.*, 2009).

Además de en la polaridad, en muchos casos se han observado sesgos significativos en la población de los vsRNAs referidos a la identidad del nucleótido del extremo 5'. En general, la presencia de una uridina (U) o una adenina (A) en esta posición es mucho más frecuente que la de citosina (C) o, especialmente, que la de guanina (G) (Mi *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008; Donaire *et al.*,

2009; Qi *et al.*, 2009). De este modo, la variedad de nucleótidos en posición 5'-terminal en los vsRNAs sugiere que pueden ser cargados en distintos complejos RISC y que, por tanto, diferentes proteínas AGO están potencialmente implicadas en respuesta antiviral (Kim, 2008).

Asimismo, cabe reseñar que los vsRNAs presentes en plantas infectadas por un determinado virus derivan generalmente de todas las regiones del genoma viral (Donaire *et al.*, 2009; Qu *et al.*, 2008; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2015; Herranz *et al.*, 2015). Prácticamente todas las posiciones del genoma suelen ser ocupadas por al menos un único vsRNA. Sin embargo, la abundancia relativa de vsRNAs de distintas partes del genoma suele ser heterogénea, con puntos calientes o *hotspots* en los que se observa una alta densidad de lecturas. Qué características revisten estos segmentos específicos del genoma viral que los hacen especialmente susceptibles a degradación por DCLs es una cuestión que no está clara. En algunos casos, se ha descrito que presentan un contenido en GC superior al de otras regiones del genoma viral, por lo que deben constituir un sustrato relativamente más estable de dsRNA (Ho *et al.*, 2007). También es frecuente observar mayor proporción de vsRNAs procedentes de regiones del gRNA que están involucradas en la formación de sgRNAs, lo que probablemente es consecuencia

de la mayor cantidad de sustratos presentes en plantas derivados de dichas regiones (Donaire *et al.*, 2009; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009).

Por último, es interesante mencionar que el perfil y cantidad de vsRNAs puede verse muy influenciado por la presencia de un VSR, por ejemplo, por la mayor afinidad de este por vsRNAs de una longitud determinada, por interferir con alguna DCL específica, o por bloquear la acción de alguna(s) RDR(s) (Xie *et al.*, 2004; Deleris *et al.*, 2006; Li y Ding, 2006; Díaz-Pendón *et al.*, 2007; Margaria *et al.*, 2014).

4-El virus del arabesco del Pelargonium

El virus del arabesco del *Pelargonium* (pelargonium line pattern virus, PLPV), objeto de este estudio, fue descrito por primera vez en *Pelargonium zonale*, concretamente en Gran Bretaña (Stone y Hollings, 1971; 1976). Posteriormente se ha podido constatar que se trata de uno de los patógenos virales de mayor prevalencia en geranio (*Pelargonium* spp.). Una prospección realizada en España ha puesto de manifiesto, que el PLPV presenta porcentajes de incidencia que oscilan entre el 40 y el 90 %, dependiendo del área geográfica examinada (Alonso y Borja, 2005), una situación que es probablemente extensible a otros países de nuestro entorno y a otros más alejados. De hecho, hasta el momento, el virus se ha detectado en Bélgica, Dinamarca, Francia, los Países Bajos, el Reino Unido, Serbia Montenegro, Estados Unidos, y Alemania (Stone y Hollings, 1971, 1976; Bouwen y Maat, 1992; Franck y Loebenstein, 1994; Kinard *et al.*, 1996).

4.1 Gama de huéspedes, transmisión y síntomas

La inducción de síntomas por el PLPV en geranio se encuentra altamente influenciada por las condiciones externas y varía estacionalmente (Bouwen y Maat, 1992). Las infecciones causadas por este virus en *P. peltatum*, *P. glandiformum* y *P.*

zonale, sus huéspedes más habituales, son frecuentemente asintomáticas, aunque esta última especie puede presentar ocasionalmente manchas cloróticas, y patrones de líneas en hojas (Brunt *et al.*, 1996; Alonso *et al.*, 1999) (Figura 26).



Figura 26. Manchas cloróticas y patrones de líneas en hojas de geranio inducidas por PLPV.

Aunque de forma natural el PLPV se ha encontrado sólo en especies del género *Pelargonium*, su gama de huéspedes experimentales incluye 37 especies distribuidas en 9 familias de plantas, incluyendo a *Beta vulgaris*, *Solanum lycopersicum*, *Ocimum basilicum*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Solanum tuberosum* o *Vicia faba*, entre otras. La especie utilizada como huésped para el diagnóstico de este virus suele ser *Chenopodium quinoa*, y los huéspedes más empleados para su mantenimiento y propagación son: *Nicotiana clevelandii* y *N. benthamiana* (Brunt *et al.*, 1996). El PLPV se transmite por

inoculación mecánica, por injerto y por contacto entre plantas. Hasta la fecha no se ha descrito su transmisión por medio de ningún vector biológico (Brunt *et al.*, 1996).

4.2 Propiedades moleculares

El PLPV es un virus muy resistente (punto de inactivación térmica de 85 °C) que presenta partículas icosaédricas de 30 nm de diámetro y un pequeño genoma monopartido de ssRNA (+) (Brunt *et al.*, 1996), propiedades que comparte con casi todos los miembros de la familia *Tombusviridae*, a la que se asignó provisionalmente tras una caracterización inicial (Morris y Carrington, 1988). Esta familia está integrada actualmente por más de 70 especies virales, que se encuentran distribuidas en trece géneros distintos: *Alphanecrovirus*, *Aureusvirus*, *Avenavirus*, *Betanecrovirus*, *Carmovirus*, *Dianthovirus*, *Gallantivirus*, *Macanavirus*, *Machlomovirus*, *Panicovirus*, *Tombusvirus*, *Zeavirus* y *Umbravirus* (Rochon *et al.*, 2012; 2014; Adams *et al.*, 2013). Este último género ha sido el de más reciente incorporación y las especies virales dentro del mismo se diferencian del resto de especies de la familia, entre otras cosas, por no codificar su propia CP y utilizar, en su lugar, la CP codificada por un virus auxiliar para encapsidarse (Rochon *et al.*, 2014).

La determinación de la secuencia completa y de la organización genómica del PLPV permitió confirmar la adscripción del PLPV a la familia *Tombusviridae* (Castaño y Hernández, 2005; Castaño *et al.*, 2009). El genoma de este virus está compuesto por 3883 nt y contiene cinco ORFs, flanqueadas por una 5' UTR de sólo 6 nt, y una 3' UTR de 246 nt (Castaño y Hernández, 2005, 2007; Castaño *et al.*, 2009). Como otros miembros de la familia *Tombusviridae*, los RNAs del PLPV no presentan estructura cap en el extremo 5', ni cola poli(A) en el extremo 3'. Las dos ORFs más próximas al extremo 5' codifican dos proteínas esenciales para el proceso de replicación, p27 y p87 (la RDR viral). Dos pequeñas ORFs solapantes, localizadas en la mitad del genoma, codifican proteínas implicadas en el movimiento del virus p7 (MP1) y p9.7 (MP2), mientras que la ORF más próxima al extremo 3' codifica la CP viral o p37 (Figura 27) (Castaño *et al.*, 2009). Resultados recientes han puesto de manifiesto que esta proteína no sólo está implicada en encapsidación, sino que actúa además como VSR (Pérez-Cañamás y Hernández, 2015). Mediante mutagénesis dirigida se han podido desacoplar genéticamente las funciones de supresión y de encapsidación en este producto viral, y se ha correlacionado la primera con su capacidad de unir sRNAs. Otras características que se han desvelado de la proteína son su interacción con AGOs (AGO1 y AGO4), dimerización y

localización en citoplasma, núcleo y nucleolo. Estas propiedades probablemente contribuyen a la función de p37 como VSR y/o como CP, aunque todavía no se ha determinado en qué grado lo hace cada una. Lo que sí se ha podido comprobar es que las dos funciones conocidas de p37, encapsidación y supresión del silenciamiento, son requeridas para que el virus se propague de manera sistémica de forma efectiva (Pérez-Cañamás y Hernández, 2015).

En cuanto al esquema de expresión génica del PLPV, trabajos previos han revelado aspectos interesantes sobre el mismo que sugieren una regulación tanto a nivel transcripcional como traduccional. Así pues, se ha constatado que las ORFs 1 y 2 son traducidas a partir del gRNA, la segunda mediante un proceso de lectura a través del codón de terminación débil de la ORF 1 (Castaño *et al.*, 2009). Por su parte, las ORFs 3, 4, y 5 se expresan a partir del único sgRNA que el virus produce en el curso de la infección, que tiene un tamaño de alrededor de 1.6 kb y que es 3' coterminar con el gRNA (Figura 27) (Castaño y Hernández 2005; Castaño *et al.*, 2009). La expresión de tres genes a partir del sgRNA del PLPV tiene lugar a través de procesos de *leaky-scanning*, que están favorecidos por determinados rasgos estructurales como son: la localización del AUG del gen MP1 en un contexto traduccional subóptimo, la presencia de un codón de inicio

GUG en el gen MP2 y la ausencia de tripletes AUG en cualquier pauta de lectura entre el AUG del gen MP1 y el del gen p37. Estos rasgos permiten modular la producción de proteínas a partir del sgRNA, una modulación que parece ser esencial para mantener proporciones adecuadas de las tres proteínas resultantes y, consecuentemente, para el progreso de la infección (Castaño *et al.*, 2009). Este esquema de expresión génica diferencia al PLPV de otros componentes de la familia *Tombusviridae*, particularmente de los miembros del género *Carmovirus* con los que muestra una gran similitud de organización genómica y de secuencias proteicas. Al menos otros cuatro pequeños virus isométricos relacionados y escasamente caracterizados compartirían el mismo esquema de expresión génica, ya que también producen un único sgRNA tricistrónico, su gen MP2 contiene un codón de inicio no AUG (CUG o GUG) y carecen de tripletes AUG entre los codones de inicio de los genes MP1 y CP. Dichos agentes virales son el virus de las manchas anulares del *Pelargonium* (*Pelargonium ringspot virus*, PeIRSV), el virus del patrón en anillos cloróticos del *Pelargonium* (*Pelargonium chlorotic ring pattern virus*, PCRPV), el virus latente de la baya del saúco (*Elderberry latent virus*, ELV), y el virus de la deformación rugosa de las hojas del rosal (*Rosa rugosa leaf distortion virus*, RrLDV). La adscripción de estos virus a la familia *Tombusviridae* ha sido aprobada

recientemente (Scheets *et al.*, 2014) y, en base a la propiedades comunes descritas anteriormente y a su proximidad filogenética (Kinard y Jordan, 2002; Castaño y Hernández, 2005; Stuart *et al.*, 2006; Castaño *et al.*, 2009), se ha propuesto la agrupación de todos ellos en un nuevo género dentro de dicha familia denominado provisionalmente *Pelarspovirus*, en el que el PLPV figuraría como miembro tipo (Scheets *et al.*, 2015).

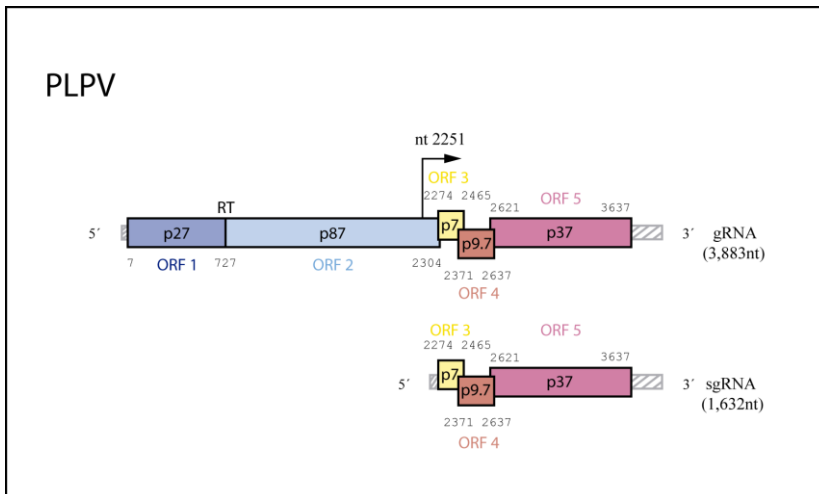


Figura 27. Representación de la organización genómica del PLPV.

Las distintas ORFs se representan con recuadros de distintos colores dependiendo de la función de las proteínas que codifican. Las ORFs 1 y 2 (en azul), codifican proteínas implicadas en replicación (p27 y p86), y se expresan a partir del gRNA. Las ORFs 3 y 4 (amarillo y naranja), codifican proteínas implicadas en movimiento, (p7 y p9.7). La ORF 5 (rosa), codifica la CP/VSR (p37). Estas tres últimas proteínas se traducen a partir del sgRNA.

Objetivos

Objetivos

Como se ha indicado en la Introducción de esta memoria, el PLPV es uno de los agentes virales con mayor prevalencia en especies del género *Pelargonium*, afectando a la calidad de estas plantas y a su comercialización. Además, este virus es capaz de infectar experimentalmente un amplio espectro de especies vegetales lo que, unido al pequeño tamaño de su genoma, facilita el análisis de distintos aspectos de su ciclo infeccioso. Las infecciones causadas por el PLPV son normalmente sistémicas, frecuentemente asintomáticas y se caracterizan, además, por un bajo título viral. La acumulación del virus en la planta debe estar condicionada por numerosos factores, incluyendo su tasa de replicación, su eficiencia traduccional y los procesos degradativos a los que se encuentra sometido. En trabajos previos se había realizado un progreso significativo en el conocimiento de estrategias de expresión génica del PLPV, que ya indicaba que dicha expresión debe estar regulada de forma muy precisa tanto a nivel transcripcional, con la producción de un único sg mRNA, como post-transcripcional, con el empleo de distintos mecanismos de traducción no canónicos. Además, se había obtenido información acerca de la proteína que el virus codifica para intentar combatir una de las principales causas de degradación de su genoma en la célula, la respuesta defensiva del huésped basada en silenciamiento por RNA. En este trabajo, se ha

Objetivos

pretendido seguir avanzando en el análisis de la regulación de la expresión génica en el PLPV y en el estudio de su papel como inductor y diana de silenciamiento. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos generales:

1. Determinar el mecanismo y los elementos estructurales implicados en la generación del sgRNA del PLPV.
2. Identificar los elementos del genoma del PLPV que están involucrados en la traducción del gRNA y del sgRNA a través de un mecanismo independiente de cap, evaluando además su relevancia en un contexto de infección.
3. Caracterizar los sRNAs derivados del PLPV que se acumulan en plantas infectadas con el fin de obtener datos acerca de los sustratos y de los componentes de la maquinaria de silenciamiento potencialmente implicados en su biogénesis.

Capítulo 1

Evidence supporting a premature termination mechanism for subgenomic RNA transcription in *Pelargonium line pattern virus*: identification of a critical long-range RNA-RNA interaction and functional variants through mutagenesis

Marta Blanco-Pérez, Carmen Hernández*

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

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

Phone: 34-96-3877869 Fax: 34-96-3877859 E-mail:
cahernan@ibmcp.upv.es

Running title: PLPV translation via a TED-like CITE

(Submitted to Journal of General Virology)

Capítulo 1

ABSTRACT

Pelargonium line pattern virus (PLPV) is a plus-strand RNA virus that has been proposed as type species of a tentative new genus, *Pelarspovirus*, in the family *Tombusviridae*. One of the singular traits of members of this prospective genus is the production of a unique subgenomic (sg) mRNA that is structurally and functionally tricistronic. Here, we have aimed to get insights into the mechanism that governs PLPV sg mRNA transcription. A long-range RNA-RNA interaction that is critical for the process has been identified through RNA folding predictions and mutational analysis of the viral genome. Such interaction seems to occur in the plus-strand, likely acts in *cis*, and specifically mediates the synthesis of sg RNA-sized minus-strand. The accumulation of this RNA species is easily detectable in plants and its generation can be uncoupled from that of the plus-strand sg mRNA. All these data together with the observation that 5' ends of PLPV g and sg mRNAs have sequence resemblances (as expected if both act as promoters in the corresponding minus-strand), support that premature termination is the mechanism underlying PLPV sg mRNA formation.

INTRODUCTION

The success of a viral infection requires precise regulation of viral gene expression. Such regulation is usually achieved through different strategies that may include transcriptional, post-transcriptional, translational and/or post-translational processes (Dreher and Miller, 2006; Drugeon et al, 1999; Maia et al., 1996). For instance, numerous plus-strand (+) RNA viruses use RNA-templated transcription to synthesize subgenomic (sg) mRNAs that are 3'-coterminial with the corresponding genomic (g) RNA. Such strategy has, at least, two advantages. On one hand, it allows expression of ORFs that are internally located in the g RNA and that would be otherwise translationally silent due to the exclusive (or highly preferential) recognition of 5'-proximal ORFs by the host translational machinery (Gale et al., 2000; Jackson et al., 2010; Kozak, 1999). On the other hand, it permits quantitative and temporal control of viral protein production as such production will greatly depend on the efficiency and timing of sg mRNA formation (Miller and Koev, 2000). The virally-encoded RNA dependent-RNA polymerase (RdRp) is responsible for both replication of the viral genome via RNA intermediates of minus (-)-polarity and transcription of sg mRNAs (Ball, 2007). Three different mechanisms have been proposed for sg mRNA

generation: i) discontinuous synthesis of (-)-strands which are then used as templates for the production of sg mRNAs that include a portion of the 5' untranslated region (UTR) of the genome (Pasternak et al., 2001; Sawicki and Sawicki, 1998; Sola et al., 2011), ii) internal initiation of RNA synthesis from promoters located on the full-length (-)-strand of the g RNA (Haasnoot et al., 2000; Miller et al., 1985; Siegel et al., 1997) and, iii) premature termination (PT) during synthesis of (-)-strand g RNA followed by the use of the resulting 3'-truncated product as a template to transcribe a complementary sg mRNA (Choi et al., 2001; Miller and Koev, 2000; Sit et al., 1998; White, 2002).

In plant viruses, internal initiation was long considered as the main mechanism for sg mRNA transcription (Miller and Koev, 2000). However, in the last years, evidence supporting a PT mechanism has been gathered for several members of the large family *Tombusviridae* (Jiwan and White, 2011), which embraces viruses with monopartite or bipartite (+)-RNA genomes of relatively short sizes (avg. 4,000 nt) (Rochon et al., 2011). Indicators of the PT mechanism would be: i) the presence of (-)-sg RNA in infected cells, ii) the possibility to uncouple (-)-sg RNA synthesis from sg mRNA production, iii) the involvement of an RNA structural motif in the (+)-g RNA, termed attenuation signal (Wu and White, 2007), that causes

the RdRp to pause before it reaches the template 3'-end, and, iv) the existence of a 3'-terminal promoter in the (-)-sg RNA that is similar in sequence to that of the (-)-g RNA (Jiwan and White, 2011). So far, the PT mechanism has been proposed to account for transcription of sg mRNAs of several viruses belonging to five out of the thirteen genera currently included in family *Tombusviridae* (Adams et al., 2013; Rochon et al., 2012; 2014). Specifically, the PT mechanism has been invoked for production of: i) sg mRNA1 and mRNA2 of tomato bushy stunt virus (TBSV, genus *Tombusvirus*) (Choi et al., 2001; Choi and White, 2002; Lin and White, 2004), ii) sg mRNA1 and mRNA2 of cucumber leaf spot virus (CLSV, genus *Aureusvirus*) (Xu and White, 2008; 2009), iii) sg mRNA2 of turnip crinkle virus (TCV, genus *Carmovirus*) (Wu et al., 2010), iv) sg mRNA1 of tobacco necrosis virus-D (TNV-D, genus *Betanecrovirus*) (Jiwan et al., 2011) and, v) the unique sg mRNA produced by the bipartite red clover necrotic mottle virus (RCNMV, genus *Dianthovirus*) (Sit et al., 1998).

Pelargonium line pattern virus (PLPV) possesses a monopartite (+)-RNA genome that is encapsidated into icosahedral particles of about 30 nm in diameter. Its g RNA is 3,883 nucleotides (nt) in length and contains five open reading frames (ORFs) (Fig. 1A). The two 5'-proximal ORFs encode two proteins involved in replication, p27 (an essential accessory

protein) and its readthrough product p87 (the viral RdRp). Two central ORFs encode a couple of small movement proteins (MPs), p7 and p9.7, and the 3'-proximal ORF encodes a product, p37, with a dual function as coat protein (CP) and as suppressor of RNA silencing (VSR) (Castaño and Hernández, 2005; Castaño et al., 2009; Pérez-Cañamás and Hernández, 2015). PLPV belongs to the family *Tombusviridae* and its gene arrangement and protein sequences closely resemble those of species of the genus *Carmovirus*. However, in contrast with carmoviruses that generate two sg mRNAs for expression of the internal and 3'-proximal ORFs, PLPV produces just one sg mRNA. Besides, the MP2 gene of PLPV presents a non-AUG initiation codon instead of the canonical AUG of MP2 gene of carmoviruses. Moreover, PLPV lacks any AUG triplet between the MP1 AUG and CP AUG initiation codons while carmoviruses have 1-8 AUGs in the equivalent region. These distinctive traits are shared by other four small isometric (+)-RNA viruses that are structurally and phylogenetically related to PLPV, which has led to the proposal of their inclusion into a new genus, tentatively named *Pelarspovirus*, within the family *Tombusviridae*, with the recommendation of PLPV as type species (Castaño and Hernández, 2005; Kinard and Jordan, 2002; Scheets et al., 2015).

Our previous work has shown that gene expression from the PLPV tricistronic sg mRNA is accomplished through leaky-scanning events that are tightly regulated and that are favoured by the weak translation context of the initiator AUG of MP1 gene, the non-canonical initiation codon (GUG) of MP2 gene and the absence of AUG triplets between the initiation codons of MP1 and CP genes (Castaño et al., 2009). However, nothing is known about the RNA elements and/or the mechanism involved in the synthesis of the sg mRNA of PLPV (or of any other proposed pelarspovirus), despite control of gene expression at transcriptional level must be also crucial for effective PLPV infection. In this study, we have sought to get insights into the structural motifs and the mechanism that govern PLPV sg mRNA transcription. The results support that the process occurs through a PT mechanism in which a long-distance RNA-RNA interaction plays a critical role. Long-range interactions with resemblances to that of PLPV can be predicted in other proposed pelarspovirus, opening the possibility that all species of the tentative genus employ PT for sg mRNA synthesis. Our results also show that the RNA-RNA interaction involved in PLPV sg mRNA generation can be replaced by others that are functionally equivalent in terms of transcription. However, mutant viruses with such alternate interactions showed reduced accumulation levels and were

unable to systemically infect plants, which may be due to the involvement of the participating RNA stretches in additional functions.

MATERIAL AND METHODS

DNA constructs

A PLPV infectious cDNA flanked by the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and the terminator sequence of the *Solanum tuberosum* proteinase inhibitor II gene (PoPit) and cloned into the binary Ti vector pMOG800 (Castaño et al., 2009), was used as template for introduction of distinct mutations with the Quick Change Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) and proper oligonucleotide pairs. The type and position of the modifications introduced in each construct are indicated in the figures depicting the mutants. All mutant constructs were verified by DNA sequencing with an ABI PRISM DNA sequencer 377 (Perkin-Elmer).

***Agrobacterium*-mediated virus inoculation**

Recombinant binary plasmids were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 CH32 by freeze/thaw shock method. Cultures of *A. tumefaciens* harbouring the different Ti plasmid constructs were infiltrated at an OD₆₆₀ of

0.5 on the abaxial side of *Nicotiana benthamiana* leaves using a 5 ml needleless syringe. The infiltrated plants were kept under greenhouse conditions (16 h days at 24 °C, 8 h nights at 20 °C) and leaf samples were taken at distinct times after infiltration. In some experiments, *N. benthamiana* plants were mechanically inoculated with PLPV transcripts derived from a T7-promoter driven construct as previously described (Castaño et al., 2007).

RNA extraction, virion purification, tissue printing and Northern blot analysis

Total RNA preparations from *N. benthamiana* leaves were obtained by phenol extraction and lithium precipitation (Verwoerd et al., 1989). Virions were purified by pelleting through a sucrose cushion (Ivars et al., 2004). For Northern blot analysis, 4 µg of total RNA were denatured by glyoxal-dimethyl sulfoxide treatment, electrophoresed in 1 % agarose gels and blotted to nylon membranes (Hybond N+, Amersham). Virion preparations were treated similarly with the exception that they were resolved in non-denaturing conditions. In some experiments, tissue printing was performed for virus detection. To this aim, stems or leaf blades were directly imprinted onto nylon membranes. After UV-crosslinking, membranes were incubated with ³²P-radioactive RNA probes for detection of (+)

or (-) PLPV RNAs. Such probes were generated by *in vitro* transcription of pBluescript KS(+)-based constructs containing the PLPV p37 gene (nt 2621 to 3637 of PLPV genome). Hybridization signals were visualized by autoradiography or with a PhosphorImager (Fujifilm FLA-5100). All experiments were repeated at least three times.

RNA secondary structure prediction

Secondary structure predictions were performed using the Mfold program version 4.6 (www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold) (Zuker, 2003).

RESULTS

Minus-strands of PLPV sg RNA are detected in virus-infected tissue.

As mentioned above, the presence of sg RNA-sized (-)-strands in infections is considered as a hallmark of the use of a PT mechanism for sg mRNA transcription. In order to investigate this point in PLPV, *N. benthamiana* plants were virus-inoculated either using *in vitro*-generated PLPV g RNA transcripts or *A. tumefaciens* cultures transformed with full-length PLPV construct (Castaño and Hernández, 2007; Castaño et al., 2009). Northern blot analysis of systemic leaves with

virus-specific probes allowed detection of (+)- and (-)-strands of both the g and the sg PLPV RNAs (Fig. 1B). In agroinoculated leaves, such RNAs were detectable as soon as 1 day post-inoculation (dpi) and, as expected, its accumulation increased in the following days (Fig. 1C).

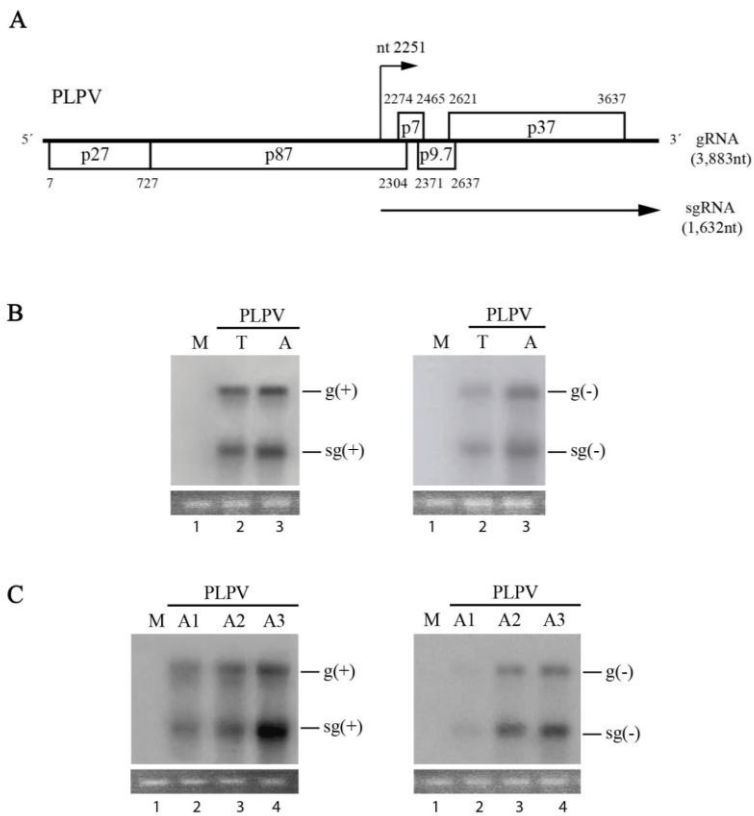


Fig. 1. Detection of (+)- and (-)-strands of PLPV g RNA and sg mRNA in infected tissue. (A) Schematic representation of the PLPV genome with

Capítulo 1

ORFs shown as boxes. The initiation site of the sgRNA (A2251) is depicted with a bent arrow and the horizontal arrow represents the PLPV sg mRNA. **(B)** Representative Northern blot analysis of RNA samples obtained from systemic leaves of *N. benthamiana* plants inoculated with PLPV either using *in vitro* generated viral genomic transcripts (T, lanes 2) or via *A. tumefaciens* (A, lanes 3). Leaves from mock inoculated plants (M, lanes 1) were used as negative controls. **(C)** Representative Northern blot analysis of RNA samples obtained from mock inoculated *N. benthamiana* leaves (M, lanes 1), or from *N. benthamiana* leaves agroinoculated with PLPV and harvested at 1, 2 and 3 dpi (A1-3, lanes 2-4). After separation of RNAs in 1 % agarose gels and transfer to nylon membranes, plus- (left autoradiograms in panels B and C) and minus- (right autoradiograms in panel B and C) PLPV strands were detected with ³²P-labeled riboprobes of minus- and plus-polarity, respectively, embracing positions 2621-3637 of the PLPV genome. Proper controls confirmed the lack of cross-hybridization among the probes (data not shown). Minus- and plus-polarity ³²P-labeled riboprobes were equalized in order to estimate genomic/subgenomic RNA and plus-/minus-strand ratios. In this Figure, an over-exposition of blots for (-)-strand detection is shown. Positions of genomic (g) and subgenomic (sg) RNAs are indicated at the right of autoradiograms. Ethidium bromide staining of rRNAs is shown below the blots as loading control. In this figure, exposition times of blots for (-)-strand detection were much longer (> 20-fold) than those for (+)-strand detection.

The ratio among g RNA and sg mRNA was approximately of 1:2 (for either polarity) in the infected tissue and the ratio among their corresponding (+)- and (-)-strands was about 1000:1 for the gRNA and 2000:1 for the sg RNA. This

observation was in agreement with the marked asymmetry that characterizes the replication process of (+)-RNA viruses, with plus-strands being produced in large excess over their minus counterparts (Buck, 1996; Ball, 2007). In addition, the results showed the clear presence of (-)-strands of PLPV sg mRNA in infected leaves which would be consistent with the transcription of this viral RNA species through a PT mechanism.

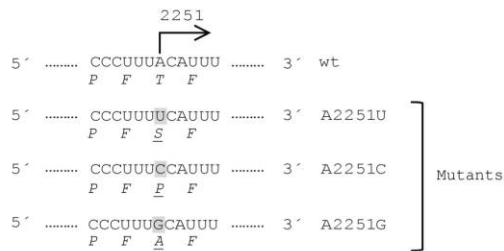
Production of minus- and plus-strands of PLPV sg RNA can be uncoupled

Besides the presence of (-)-strands of sg RNA in infected tissue, another indicator of a PT mechanism is the ability to uncouple (-)-strand sg RNA synthesis from (+)-strand sg mRNA production. In tombusvirids following a PT strategy, such uncoupling could be achieved by mutating the start site of the sg mRNA (e.g., Jiwan et al., 2011; Wu et al., 2010). To explore this issue in the case of PLPV, the sg mRNA initiating adenylate, which is located within the p87 ORF (position 2251, Fig. 1A), was replaced by an uradylate (mutant A2251U), cytidylate (mutant A2251C) or guanylate (mutant A2251G) (Fig. 2A) in the full-length PLPV construct allowing *Agrobacterium*-mediated viral inoculation. This inoculation method has been successfully

employed to delineate relevant sequences for sg mRNA production in other (+)-RNA viruses (e.g., Renovell et al., 2010). Northern blot analysis of viral RNAs at 3 dpi showed that the A-to-U substitution abolished production of (+)-sg mRNA while production of (-)-sg RNA was essentially unaffected (Fig. 2B, lanes 3). A population of small-sized viral RNAs of (+)-polarity was also detected in tissue infected with mutant A2251U. This observation likely reflected exacerbated viral RNA degradation due to the absence of the encapsidation and the RNA silencing suppression functions provided by p37, since expression of this protein was impaired by the knock-down of sg mRNA synthesis. Alternatively or complementarily, it can result from inaccurate initiation of sg mRNA synthesis owing to the substitution of the 5'-terminal nucleotide. The other two assayed mutations, A2251C and A2251G, were apparently lethal for the virus as no accumulation of either g RNA or sg mRNA was detected (Fig. 2B, lanes 4-5). This was probably due to the fact that these nucleotide changes lead to non-conservative amino acid substitutions in the viral RdRp (Thr749Pro in mutant A2251C and Thr749Ala in mutant A2251G) that likely preclude its functionality. In contrast, the A2251U mutation leads to a conservative amino acid substitution (Thr749Ser) that seems tolerated by the RdRp (Fig. 2). The results with the latter mutant underlined the relevance of the identity of the initiating

sg mRNA nucleotide for sg mRNA production and showed that the formation of (-)-sg RNA can be uncoupled from that of the sg mRNA.

A



B

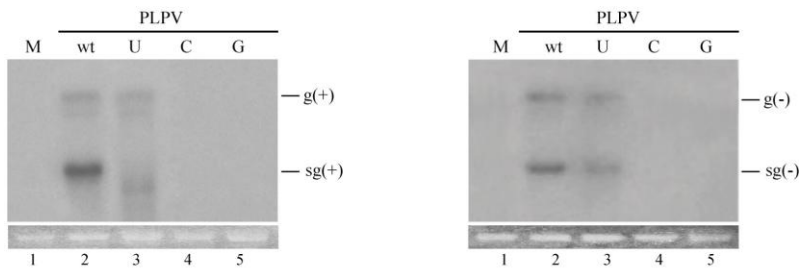


Fig. 2. Mutational analysis of the initiating nucleotide of PLPV sg mRNA: effects on transcription. (A) Schematic representation of mutants. The wt PLPV sequence surrounding the sg mRNA initiation site (A2251) is shown at the top. Nucleotide changes in mutants are shown on grey background. The encoded amino acid sequences are indicated below nucleotide sequences in italics and amino acid replacements in mutants are underlined. **(B)** Representative Northern blots showing accumulation of PLPV g RNA and sg RNA of plus- (left) and minus- (right) polarities in *N. benthamiana* leaves agroinoculated with wt and mutant PLPV constructs (lanes 2-5). Identity of each construct is shown above the lanes. Total RNA

from mock inoculated leaves was included as negative control (lanes 1). Leaves were collected at 2 dpi. Other details as in Fig. 1.

Mfold predictions reveal a potential long-distance RNA-RNA interaction close to the initiation site of PLPV sg mRNA and similar interactions in other proposed pelarspoviruses

The current model of the PT mechanism entails that an attenuation signal in the g RNA causes stoppage and dissociation of the RdRp during the (-)-strand synthesis. The available data indicate that such attenuation signal may correspond to either a local secondary structure adopted by sequences preceding the sg mRNA initiation site or to a medium- or long-range RNA-RNA interaction among two genomic elements that have been called, respectively, receptor sequence (RS) and activator sequence (AS) (Wu and White, 2007; Jiwan and White, 2011). The RS element is usually located closely upstream of the sg mRNA start site whereas the position of the AS element differs among viruses and, moreover, it can be present on the same g RNA that is used as template for transcription (intramolecular AS/RS interaction) or even on a distinct g RNA in viruses with segmented genomes (intermolecular AS/RS interaction) (Jiwan and White, 2011). In order to identify potential structural motifs within the PLPV

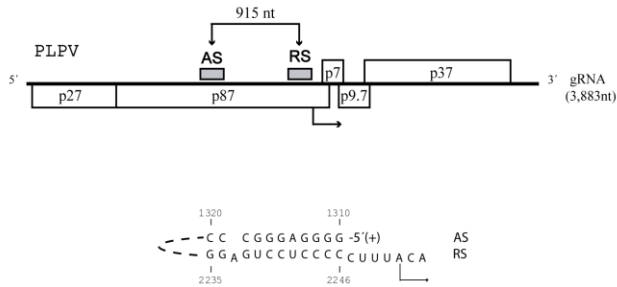
genome that could participate in regulating sg mRNA transcription, Mfold secondary structure predictions were performed (Zucker, 2003). When a segment comprising the first 3,000 nt of the PLPV genome was subjected to *in silico* analysis, a long-range base pairing interaction was identified between a 12-nt long sequence (putative RS, positions 2235-2246), separated by just 4 nt from the downstream sg mRNA initiation site, and a 11-nt complementary sequence (putative AS, positions 1310-1320), located ~ 900 nt upstream (Fig. 3A). The predicted base pairing interaction had 1 nt-bulge, was rich in GC base pairs (bp) (9 out of 11 bp) and contained an AU base pair and a non-canonical GU base pair (Fig. 3A).

Long-distance interactions, resembling that found in the optimal RNA secondary structure of PLPV, were also predicted in optimal or near-optimal RNA secondary structures of other proposed pelarspovirus, pelargonium chlorotic ring pattern virus (PCRPV), pelargonium ring spot virus (PeIRSV), elderberry latent virus (ELV) and rosa rugosa leaf distortion virus (RrLDV) (Fig. 3B). The putative AS and RS elements in the distinct viruses mapped to comparable genomic positions and showed some common features as a preponderance of G and C residues, respectively, in the corresponding AS and RS and, consequently, a high proportion of GC pairs in the potential attenuation signal (8 out of 13 bp in PCRPV, 5 out of 8 bp in PeIRSV, 9 out of 14 bp

in ELV and 6 out 10 bp in RrLDV). Nevertheless, several differences were also apparent: i) the length of the AS/RS interaction was variable and ranged from 8 (PeIRSV) to 14 (ELV) base pairs, ii) whereas the PLPV and PCRPV AS/RS interactions presented 1 nt-bulge (involving an A residue in both cases) and the ELV AS/RS interaction harboured two single-nt bulges (involving a G and an A residue, respectively) and 1-nt mismatch, no bulged nt nor mismatches were predicted in the PeIRSV nor RrLDV interactions and, iii) besides nt sequence variations, differences in the stability of the AS/RS interaction were also anticipated with those of PLPV and PeIRSV corresponding, respectively, to the most and the least stable ones according to minimal free energy estimations (data not shown). The length of the spacer sequence separating the 3'-end of the putative RS element and the initiation nucleotide of sg mRNA could also vary among the distinct viruses (Fig. 3), though this is merely speculative as such initiation site has not been mapped in pelarspoviruses other than PLPV.

Capítulo 1

A



B

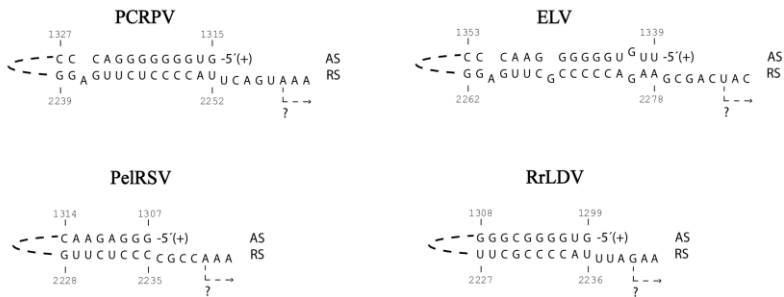


Fig. 3. Putative long-range AS/RS interactions in PLPV and other proposed pelarspoviruses. The Mfold program (Zucker et al., 2003) was used to compute minimal free energy RNA secondary structures in the 5'-proximal 3,000 nt of each viral genome. **(A)** At the top, the relative positions of putative AS and RS interacting elements are depicted on a schematic representation of the PLPV genome. The bent arrow indicates the position of the initiation site of sg mRNA. At the bottom, relevant segment of the predicted PLPV secondary structure showing details of the potential AS/RS base pairing. **(B)** Potential base pairings among putative AS and RS elements in other proposed pelarspoviruses: pelargonium chlorotic ring pattern virus (PCRPV), pelargonium ring spot virus (PeIRSV), elderberry latent virus (ELV) and rosa rugosa leaf distortion virus (RrLDV). The bent arrow in each case indicates conjectural position (depicted with a question mark) of the sg

mRNA initiation site as such initiation site has not been experimentally determined.

Assessing the relevance of the predicted long-range interaction for PLPV sg RNA transcription

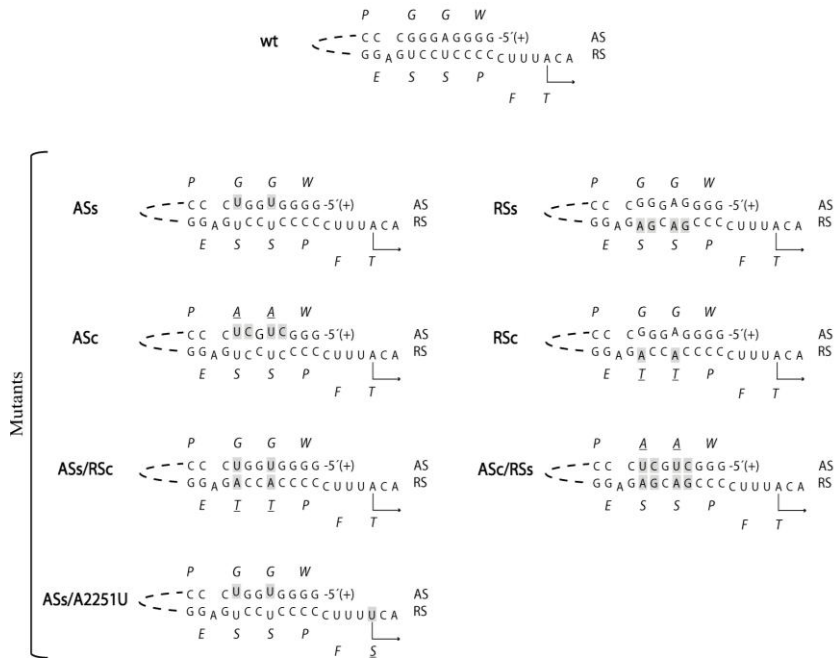
To assess whether the long-range base pairing predicted in PLPV genome was biologically (and, in particular, transcriptionally) relevant, a set of mutants with disruptive and restorative changes in the putative AS/RS interaction was generated. The coding nature of the elements (both within p87 gene, Fig. 3A) involved in this potential interaction conditioned the design of mutations. Nucleotide substitutions that were either silent or conservative regarding p87 amino acid sequence were engineered, thus trying to minimize potential impact on p87 functionality. The engineered constructs included: i) two AS mutants, ASs and ASc, with silent and conservative nucleotide replacements, respectively, ii) two RS mutants, RSc and RSs, with conservative and silent nucleotide changes, respectively, and iii) two AS/RS mutants combining the ASs/RSc and ASc/RSs mutations, respectively. Detailed representation of these mutants is shown in Fig. 4A. The nucleotide substitutions in AS and RS mutants were expected to destabilize the AS/RS interaction whereas such interaction would be regenerated in AS/RS compensatory mutants.

Bioassay of AS mutants showed that both, ASs and ASc, were able to replicate (mutant ASc accumulated at significantly lower levels, likely due to the two amino acid replacements in p87 caused by the engineered nucleotide substitutions; Fig 4A) though, instead of a wt-sized sg mRNA, a smear of low-sized RNA molecules was detected. As commented above for mutant A2251U, such RNA smearing likely results from enhanced viral degradation due to the absence of p37. Mutants RSc and RSs behaved similarly supporting that both elements, AS and RS, play a crucial role in sg mRNA production. That role is most likely related with the synthesis of the (-)-sg RNA as such RNA species was apparently absent in tissue infected by any AS or RS mutant and, only a series of low molecular weight molecules of (-)-polarity was observed. The (+) and (-)-RNA smearing in these mutants could result from enhanced viral degradation due to the absence of p37, as commented above for mutant A2251U, and/or inaccurate premature termination caused by abnormal RNA folding leading to production of (-)- sg RNAs with variable 3'-ends and imprecise initiation of the corresponding (+)-sgRNAs on such deviant (-)-sg RNAs. Outstandingly, mutants ASs/RSc and ASc/RSs, with compensatory nucleotide substitutions that allowed the establishment of AS/RS interactions similar to that predicted in the wt gRNA, were able to produce the sg mRNA. The accumulation level of mutant

ASc/RSs was significantly lower than that of the wt virus or of mutant ASs/RSc, likely because of the amino acid replacements in p87 in the former that are common to those present in mutant ASc (Fig. 4). In any case, recovery of sg mRNA generation in ASs/RSc and ASc/RSs mutants was accompanied by restoration of (-)-sg RNA synthesis, supporting a mechanistic link among both types of sg molecules. In addition, introduction of ASs nucleotide replacements on the A2251U mutant hindered production of the sg (-)-strand (compare lanes 9 in Fig. 4B with lanes 3 of Fig. 2B) which was consistent with the notion that formation of the AS/RS interaction is a prerequisite for (-)-sg RNA generation. Collectively, the results supported that the AS/RS interaction occurs *in vivo* and that such interaction is critical for sg mRNA synthesis. Moreover, detection of (-)-sg RNA correlated with establishment of the AS/RS interaction as expected if such interaction was acting as an attenuation signal during (-)-strand synthesis.

Capítulo 1

A



B

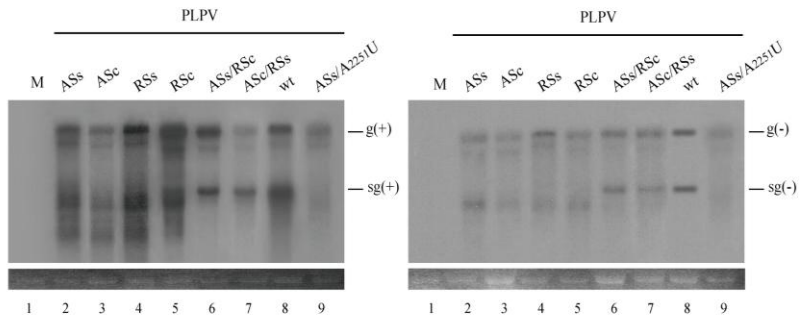


Fig. 4. Mutational analysis of the AS/RS interaction. (A) Schematic representation of relevant segments of mutants with nucleotide substitutions (on grey background) in AS and/or RS elements. The corresponding amino acid sequences are indicated in italics above (AS) or below (RS) nucleotide sequences with mutations underlined. **(B)**

Capítulo 1

Representative Northern blots showing accumulation of PLPV g RNA and sg RNA of plus- (left) and minus- (right) polarities in *N. benthamiana* leaves agroinoculated with wt and mutant PLPV constructs (lanes 2-9). Identity of each construct is shown above the corresponding lanes. Total RNA from mock inoculated leaves (M) has been included as negative control (lanes 1). Leaves were collected 2 dpi. Other details as in Fig. 1.

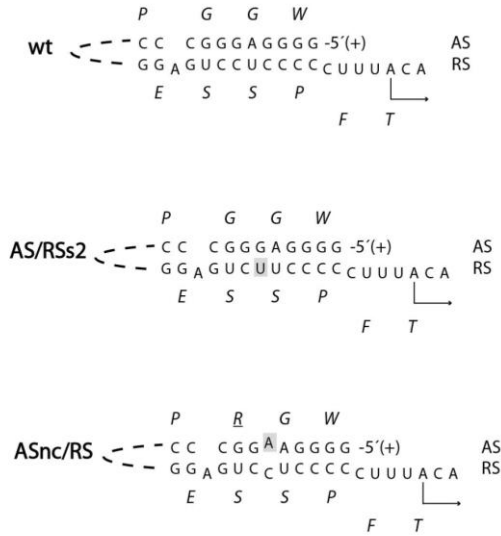
Though according to Mfold predictions the PLPV AS/RS interaction was able to be formed intramolecularly, the potential to be established *in trans* was also evaluated. To this aim, *N. benthamiana* leaves were inoculated with a mix of the ASs mutant and the RSc mutant or with the ASc mutant plus the RSs mutant. We reasoned that either the wt AS/RS or the alternate ASs/RSc interactions could be established between ASs and RSc mutant molecules and that, similarly, the wt AS/RS or the alternate ASc/RSs could be constituted between ASc and RSs mutant molecules. Such intermolecular interaction could promote formation of the (-)-sg RNA and subsequent synthesis of the sg mRNA. Northern blot analyses of leaves co-inoculated with the mentioned constructs did revealed the presence of neither (-) or (+)-strands of the sg RNA (data not shown), further supporting that the proposed attenuation signal is a *cis*-acting element.

On the other hand, the AS/RS interaction was revealed in secondary structure predictions of the (+)-strand but not of the

(-)-strand of viral g RNA, in agreement with its presumed role in hampering the advance of the RdRp during (-)-strand synthesis. The presence of a GU wobble base pair in the wt AS/RS interaction (Fig. 3A) is consistent with its functioning in the (+)-strand, as these residues would form a disruptive CA mismatch in the (-)-strand. To obtain additional evidence on the viral polarity of the viral RNA in which the AS/RS interaction is operative, two new mutants, AS/RSs2 and ASnc/RS (Fig. 5A) were generated by changing a GC base pair to either GU (which is predicted to preferentially destabilize the minus-strand structure) or to a AC (which is predicted to preferentially destabilize the plus-strand structure). Bioassay of the two new mutants showed that both (-)-sg RNA and sg mRNA were present in tissue infected by mutant AS/RSs2 (GC base pair replaced by GU base pair) (Fig. 5B). Viral RNAs were hardly detectable in leaves inoculated with mutant ASnc/RS suggesting that the amino acid replacement in p87 provoked by the nucleotide change engineered in this mutant (Gly437Arg) was largely detrimental for PLPV infectivity. This mutation effect precluded from obtaining more information from the strand-preferential destabilization approach but the results with construct AS/RSs2 together with the presence of a non-canonical GU base pair in the wt AS/RS interaction provided

good support to the idea of a (+)-strand, rather than a (-)-strand, activity for the proposed attenuation signal.

A



B

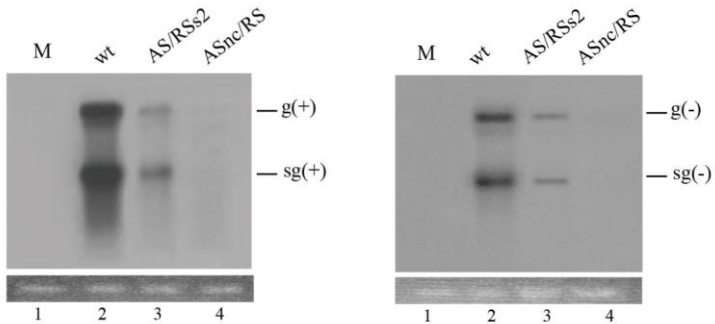


Fig. 5. Mutational analysis of the proposed AS/RS interaction for strand-specific destabilization. (A) The wt AS/RS interaction is depicted at the top with mutant derivatives shown below. Nucleotide substitutions are

on a grey background. The corresponding amino acid sequences are indicated above (AS) or below (RS) nucleotide sequences with mutations underlined. **(B)** Northern blot analysis showing accumulation of g and sg PLPV RNAs of plus- (left) and minus- (right) polarities in *N. benthamiana* leaves agroinoculated with wt and mutant PLPV constructs (lanes 2-4). Total RNA from mock inoculated leaves (M) was included as negative control (lanes 1). Leaves were collected at 2 dpi. Other details as in Fig. 1.

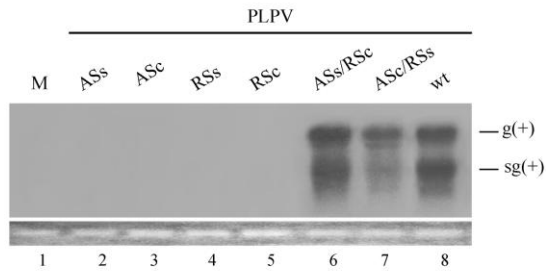
Preservation of a transcriptionally functional AS/RS interaction is required for PLPV viability

The results with the AS/RS mutants indicated that PLPV sg RNA production can be directed by alternative long-range interactions with an strength similar to that of the wt one (note that ASs/RSc and ASc/RSs mutants both contain 9 GC pairs and 2 AU base pairs which closely resemble the base pair composition of the wt interaction; Fig. 4A). We wondered whether the PLPV variants with these alternate interactions were fully competent in plants. To answer this question, mutants ASs/RSc and ASc/RS (and the wt construct used as positive control of infection) were agroinoculated in *N. benthamiana* plants and local and systemic leaves were taken at 10 and 30 dpi, respectively. AS and RS mutants were also bioassayed in parallel to test whether impairment of sg mRNA production was, as expected, lethal for virus viability. At 7 dpi, Northern blot analyses revealed that, effectively, the

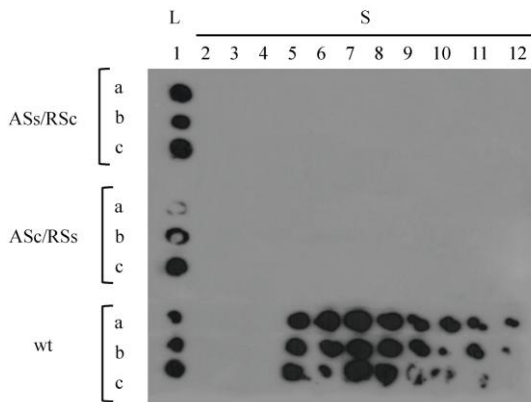
accumulation of the latter mutants was negligible whereas infection by mutants AS/RS was clearly detectable. Mutant ASs/RSc accumulated at ~ 0.5 -fold with regard the wt virus whereas ASc/RSs accumulation was decreased by ~ 0.25 -fold. The amino acid replacements in the RdRp of these mutants are most likely responsible of such reductions in virus titers. Intriguingly, these AS/RS mutants did not become systemic in plants despite they were efficient in virion formation (Fig. 6B and 6C). The reasons of this observation were uncertain and could be related with the decreased accumulation of the mutants in inoculated leaves and/or with the involvement of the mutagenized sequence motifs in other aspects of the infectious cycle.

Capítulo 1

A



B



C

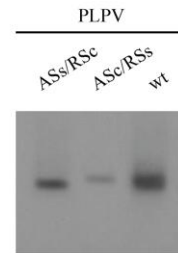


Fig. 6. Viability of PLPV mutants carrying alterations in the AS and/or RS elements. (A) Northern blot analysis of *N. benthamiana* leaves agroinoculated with wt and mutant viruses (see Fig. 4A for detailed representation of mutants) (lanes 2 to 8) and collected at 7 dpi. Total RNA from mock inoculated leaves (M) has been included as negative control (lanes 1). **(B)** Tissue printing hybridization of *N. benthamiana* plants agroinoculated with PLPV either wt or mutants ASs/RSc or ASc/RScs. Imprints of local (L) and systemic (S) leaf blades from three independent plants (a to c) were done at 30 dpi. **(C)** Northern blot analysis of viral particles purified from *N. benthamiana* local leaves infected with wt PLPV or mutants ASs/RSc

or ASc/RSs and collected at 7 dpi. Loading of virion preparations were normalized considering virus RNA accumulation in the infected tissue. In all panels, a probe for detection of viral RNAs of (+)-polarity was used.

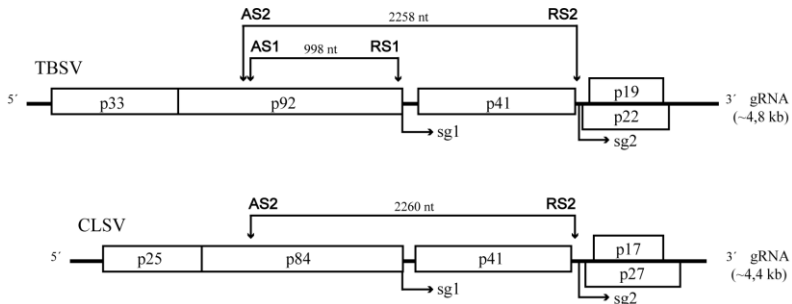
DISCUSSION

In this work, evidence supporting that PLPV uses a PT mechanism to generate its unique sg mRNA has been obtained. Firstly, the clear presence of (-)-sg RNA in infected tissue has been proved. Secondly, the possibility to uncouple synthesis of (-)-sg RNA from that of the sg mRNA has been illustrated through mutation of the sg mRNA initiation nucleotide. This capacity to produce (-)-strand templates independently of their (+)-strand sg mRNA counterparts indicated that the former could serve as intermediates in transcription, as required in a PT mechanism. Thirdly, we have identified two segments in the PLPV genome, AS and RS, that are separated by ~ 900 nt and that are essential for (-)-sg RNA generation. Such segments seem to act in the (+)-strand and regulate transcription by establishing an intramolecular, long-distance RNA-RNA interaction that, most likely, functions as an attenuation signal causing premature termination of (-)-strand synthesis. Attenuation signals corresponding to *cis*-acting, long-range interactions have been proposed to be involved in the generation of sg mRNAs 1 and 2 of TBSV (Choi and White, 2002;

Lin and White, 2004) and sg mRNA2 of CLSV (Xu and White, 2008). The length of the genome stretch separating AS and RS elements varies among these molecules and range from 998 nt (AS and RS elements implicated in TBSV sg mRNA1 production) to 2258 nt (AS and RS elements implicated in TBSV sg mRNA2 production). Besides this variation, these AS/RS interactions differ in the number and composition of base pairs and in the presence/absence of bulged nucleotides (Fig. 7). Remarkably, as observed in the PLPV AS/RS interaction that contains a GU bp, those involved in the formation of the TBSV sg mRNA2 and CLSV sg mRNA2 contain non-canonical GU base pairs (1 and 3, respectively), reinforcing the notion of their (+)-strand activity. In line with this view, GU base pairs would be also present in the putative AS/RS interactions predicted in PCRPV and RrLDV (Fig. 3).

Capítulo 1

A



B

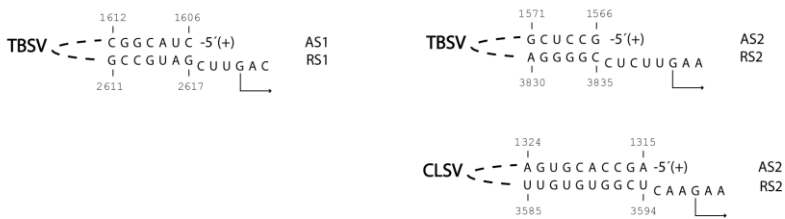


Fig. 7. Long-range AS/RS interactions described in several *Tombusviridae*. (A) Relative positions of AS and RS interacting elements are depicted on a schematic representation of virus genomes. The bent arrow indicates the initiation site of the corresponding sg mRNA. (B) Detailed AS/RS base pairings. Virus acronyms: tomato bushy stunt virus (TBSV), cucumber leaf stunt virus (CLSV).

MFOLD analysis suggested that the global folding of the PLPV genome likely assists the formation of the AS/RS base paired segment *in cis* via colocalizing the participating sequences. Local structures could additionally facilitate this interaction. Indeed, PLPV AS and flanking sequences are predicted to adopt a stem-loop (SL) structure in which the AS

would form part of the terminal loop (Fig. 8). Similar presentations have been predicted for AS segments of other *Tombusviridae* and it has been proposed that such positioning could aid the base pairing of the AS with the RS element (Choi and White., 2002; Sit et al., 1998). Consistent with this possibility, the predicted AS of other pelarspoviruses may fold into similar conformations (Fig. 8). Whether AS/RS interaction is sufficient by itself for polymerase pausing or serves as seed to nucleate the formation of a larger structure, as suggested in other *Tombusviridae* (Choi and White, 2002), remains to be ascertained. In this context, it should be mentioned that SL structures adjacent to the PLPV RS and putative RS of other pelarspoviruses can be predicted (Fig. 8) that, as proposed for TBSV (Choi and White, 2002), could further stabilize the AS/RS helix through coaxial stacking. Moreover, the participation of protein factors to the attenuation signal can neither be discarded.

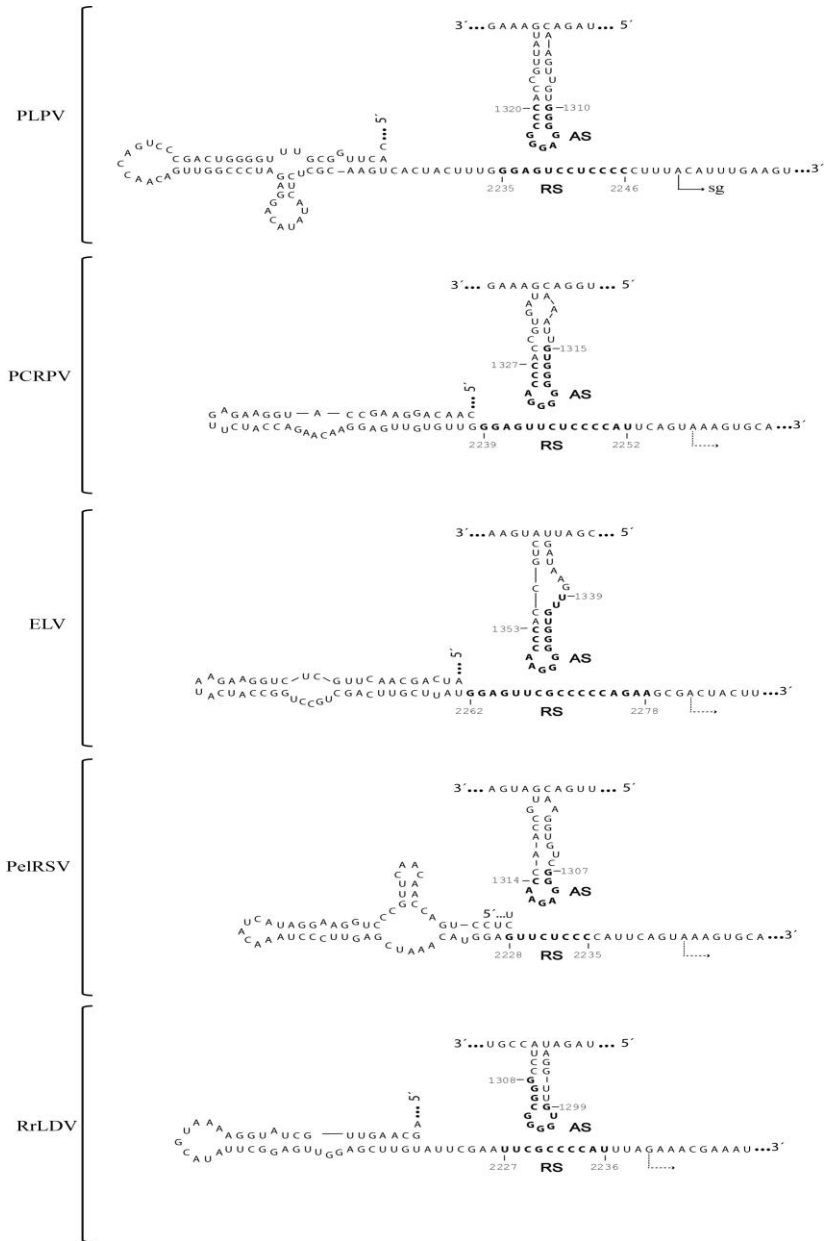


Fig. 8. Mfold analysis of AS and RS elements and flanking sequences of PLPV and of equivalent segments of other pelarspoviruses. Virus acronyms as in Fig. 3.

In addition to the positive indicators of a PT mechanism for PLPV transcription discussed above, the PT model also predicts that the 3' end of the (-)-strand sg RNA acts as promoter for sg mRNA transcription. In agreement with this idea, the 5' terminus of sg mRNAs whose formation are likely to follow a PT mechanism is similar in sequence to the 5' terminus of the corresponding g RNA, as the viral RdRp has to be able to recognize both types (genomic and subgenomic) of promoters (Jiwan and White, 2011). As expected, the 5' termini of PLPV g RNA and sg mRNA, (A)ACA(A/U), also show sequence resemblances adding further support to the use of the sg (-)-strand as template for the synthesis of the sg mRNA. Similar start sequences are found in the g RNA and sg mRNA of RCNMV (ACAAA) which also seems to employ a PT mechanism (Sit et al., 1998). Despite such parallelism among the two viruses, an essential difference among them concerns the location of the corresponding AS and RS elements. Whereas such elements have been mapped on different genomic components in the case of the bipartite RCNMV (Sit et al., 1998) and, thus, act in *trans*, the AS and RS of PLPV are on the unique genomic component and seem to operate exclusively (or preferentially) in *cis*, as proposed for other monopartite *Tombusviridae* (Choi and White, 2002).

In contrast with that observed with mutants carrying nucleotide replacements that disrupted the AS/RS interaction (and thus impaired in sg mRNA production), the AS/RS compensatory mutants were viable and their infections persisted in local leaves for ten days and beyond, as those of the wt virus (Fig. 6). This highlights the biological relevance of the identified AS/RS interaction and, also, the key role of the proteins produced from the sg mRNA for the progress of infection, as reported previously (Castaño et al., 2009; Pérez-Cañamás and Hernández, 2015). Despite the good accumulation in local leaves and the capacity to form viral particles of the AS/RS compensatory mutants, the inability of these mutants to invade plants systemically indicated that the engineered mutations were deleterious to some stage(s) of the infectious cycle. In any case, the results showed that, concerning transcription, the wt AS/RS interaction can be replaced by alternative ones that are functionally very similar.

To conclude, the results obtained in this work together with those reported earlier (Castaño et al., 2009) indicate that expression of internal ORFs of PLPV genome is tightly regulated at both transcriptional and translational levels. Moreover, the finding that PLPV most likely employs a PT mechanism to produce its unique sg mRNA extends previous observations with other *Tombusviridae* and suggests that PT is favoured over

internal initiation for the transcription process in this viral family. It is worth mentioning in this context that a reassessment of TCV sg mRNA² production revealed that this RNA is probably produced by PT rather than by internal initiation as initially proposed (Jiwan et al., 2011; Wang et al., 1999) and, thus, erroneous assignment of transcriptional mechanisms may have occurred in other cases. It should be also added that a PT mechanism has been advanced for some sg mRNAs generated by other plant virus (citrus tristeza virus, family *Closteroviridae*; Gowda et al., 2001) and by a few animal viruses (Lindenbach et al., 2002; van Vliet et al., 2002), though more experimental work is needed to confirm this issue. Further investigations will help to ascertain how prevalent the PT mechanism is among (+)-RNA viruses.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank K. Andrew White for his kind advice on this study. This work was supported by grants BFU2009-11699 and BFU2012-36095 from the Ministerio de Investigación, Ciencia e Innovación (MICINN, Spain) and the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, Spain), respectively, and ACOMP/2012/100 to the Generalitat Valenciana (to C. H). M. B.-P. was the recipient of predoctoral contracts from MICINN and MINECO.

REFERENCES

Adams MJ, King AM, Carstens EB. 2013. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.* **158**: 2023-203.

Ball LA. 2007. Virus Replication Strategies. En: Knipe, D. & Howley, P. (eds.), *Fields Virology. 5th*, Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 120-140

Buck KW. 1996. Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Adv. Virus Res.* **47**: 159-251.

Castaño A, Hernandez C. 2005. Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pelargonium line pattern virus* and its relationship with the family Tombusviridae. *Arch Virol.* **150**: 949-465.

Castaño A, Hernandez C. 2007. Biological activity of transcripts from cDNA of *Pelargonium line pattern virus*. *Acta Virol.* **51**: 271-274.

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

Choi IR, Ostrovsky M, Zhang G, White KA. 2001. Regulatory activity of distal and core RNA elements in tombusvirus subgenomic mRNA2 transcription. *J Biol Chem.* **276**: 41761-8.

Choi IR, White KA. 2002. An RNA activator of subgenomic mRNA1 transcription in tomato bushy stunt virus. *J Biol Chem.* **277**: 3760-6.

Dreher TW, Miller WA. 2006. Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology.* **344**: 185-97.

Drugeon G, Urcuqui-Inchima S, Milner M, Kadaré G, Valle RPC, Voyatzakis A, Haenni AL, Schirawski J. 1999. The strategies of plant virus gene expression: models of economy. *Plant Sci.* **148**: 77-88.

Gale MJr, Tan SL, Katze MG. 2000. Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol. Mol Biol Rev.* **64**: 239-280.

Gowda S, Satyanarayana T, Ayllon MA, Albiach-Marti MR, Mawassi M, Rabindran S, Garnsey SM, Dawson WO. 2001. Characterization of the cis-acting elements controlling subgenomic mRNAs of citrus tristeza virus: production of positive and negative-stranded 3'-terminal and positive-stranded 5'-terminal RNAs. *Virology.* **286**: 134-51.

Hasnoot PCJ, Brederode FT, Olsthoorn RCL Bol JF. 2000. A conserved hairpin structure in alfamovirus and bromovirus subgenomic promoters is required for efficient RNA synthesis *in vitro*. *RNA*. **6**: 708-16.

Ivars P, Alonso M, Borja M, Hernández C. 2004. Development of a non-radioactive dot-blot hybridisation assay for the detection of *Pelargonium flower break virus* and *Pelargonium line pattern virus*. *Eur J Plant Pathol*. **110**: 275-83.

Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **11**: 113–27.

Jiwan SD, Wu B, White KA. 2011. Subgenomic mRNA transcription in *Tobacco necrosis virus*. *Virology*. **418**: 1-11.

Jiwan SD, White KA. 2011. Subgenomic mRNA transcription in *Tombusviridae*. *RNA Biol*. **8**: 287-94.

Kinard GR, Jordan, R. 2002. Genome organization of pelargonium chlorotic ring pattern virus: further implications for *Tombusviridae* taxonomy. *Acta Hortic*. **568**: 17-27.

Kozak M. 1999. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. **34**: 187–208.

Lin H, White KA. 2004. A complex network of RNA-RNA interactions controls subgenomic mRNA transcription in a tombusvirus. *EMBO J.* **23**: 3365-74.

Lindenbach BD, Sgro JY, Ahlquist P. 2002. Long-distance base pairing in flock house virus RNA1 regulates subgenomic RNA3 synthesis and RNA2 replication. *J Virol.* **76**: 3905-19.

Maia IG, Seron K, Haenni AL, Bernardi F. 1996. Gene expression from viral RNA genomes. *Plant Mol Biol.* **32**: 367–91.

Miller WA, Dreher TW, Hall TC. 1985. Synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA *in vitro* by internal initiation on (-)-sense genomic RNA. *Nature.* **313**: 68–70.

Miller WA, Koev G. 2000. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology.* **273**: 1-8.

Pasternak AO, van der Born E, Spaan WJ, Snijder EJ. 2001. Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *EMBO J.* **20**: 7220-8.

Pérez-Cañamás M, Hernández C. 2015. Key importance of small RNA binding for the activity of a glycine/tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *J Biol Chem.* **290**: 3106-20.

Renovell A, Gago S, Ruiz-Ruiz S, Velázquez K, Navarro L, Moreno P, Vives MC, Guerri J. 2010. Mapping the subgenomic RNA promoter of the Citrus leaf blotch virus coat protein gene by *Agrobacterium*-mediated inoculation. *Virology*. **406**: 360-9.

Rochon D, Lommel S, Martelli GP, Rubino L, Russo M. 2012. Family *Tombusviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds), *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, San Diego, CA., 1111-1138.

Rochon D, Scheets K, White A, Martelli G, Rubino L. 2014. ICTV taxonomic proposal 2013.010a,bP.A.v2.Umbravirus_move. Move genus *Umbravirus* into family *Tombusviridae*.

Sawiki SG, Sawiki DL. 1998. A new model for coronavirus transcription. *Adv Exp. Med. Biol.* **440**: 215-9.

Scheets K, Jordan R, White KA, Hernández C. 2015. *Pelarspovirus*, a proposed new genus in the family *Tombusviridae*. *Arch Virol.* **160**: 2385-93.

Siegel RW, Adkins S, Kao CC. 1997. Sequence-specific recognition of a subgenomic RNA promoter by a viral RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**: 11238–43.

Sit TL, Vaewhongs AA, Lommel SA. 1998. RNA-mediated trans-activation of transcription from a viral RNA. *Science*. **281**: 829-32.

Sola I, Mateos-Gomez PA, Almazan F, Zuñiga S, Enjuanes L. 2011. RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biol*. **8**: 237-48.

van Vliet AL, Smits SL, Rottier PJ, de Groot RJ. 2002. Discontinuous and non-discontinuous subgenomic RNA transcription in a nidovirus. *EMBO J*. **21**: 6571-80.

Verwoerd, T. C., Dekker, M. M., and Hoekema, A. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res*. **17**: 2362.

Wang J, Carpenter CD, Simon AE. 1999. Minimal sequence and structural requirements of a subgenomic RNA promoter for turnip crinkle virus. *Virology*. **253**: 327–36.

White KA. 2002. The premature termination model: a possible third mechanism for subgenomic mRNA transcription in (+)-strand RNA viruses. *Virology*. **304**: 147-54.

Wu B, Oliveri S, Mandic J, White KA. 2010. Evidence for a premature termination mechanism of subgenomic mRNA transcription in a carmovirus. *J Virol*. **84**: 7904-7.

Wu B, White KA. 2007. Uncoupling RNA virus replication from transcription via the polymerase: functional and evolutionary insights. *EMBO J.* **26**: 5120–30.

Xu W, White, KA. 2008. Subgenomic mRNA transcription in an aureusvirus: downregulation of transcription and evolution of regulatory RNA elements. *Virology.* **371**: 430-8.

Xu W, White KA. 2009. RNA-based regulation of transcription and translation of aureusvirus subgenomic mRNA1. *J Virol.* **83**: 10096-105.

Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3406-15.

Capítulo 2

Efficient Translation of *Pelargonium line pattern virus* RNAs Relies on a TED-Like 3'-Translational Enhancer that Communicates with the Corresponding 5'-Region through a Long-Distance RNA-RNA Interaction: Implications for Viral Infectivity

Marta Blanco-Pérez, Leticia Ruiz^{#a}, Carmen Hernández*

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Politécnica de Valencia), Valencia, Spain

^{#a}Current Address: IFAPA, Crop Protection, La Mojonera, Almería, Spain

* Corresponding author

E-mail: cahernan@ibmcp.upv.es (CH)

Short title: PLPV Translation via a TED-Like CITE

(Submitted to PLoS One)

Capítulo 2

ABSTRACT

Cap-independent translational enhancers (CITEs) have been identified at the 3'-terminal regions of distinct plant positive-strand RNA viruses belonging to families *Tombusviridae* and *Luteoviridae*. On the bases of their structural and/or functional requirements, at least six classes of CITEs have been defined whose distribution does not correlate with taxonomy. The so-called TED class has been relatively under-studied and its functionality only confirmed in the case of satellite tobacco necrosis virus, a parasitic subviral agent. The 3'-untranslated region of the monopartite genome of pelargonium line pattern virus (PLPV), the proposed type member of a tentative new genus (*Pelarspovirus*) in the family *Tombusviridae*, was predicted to contain a TED-like CITE. Similar CITEs can be anticipated in some other related viruses though none of them has been experimentally verified. Here we provide experimental evidence supporting the *in vivo* activity of the PLPV-TED in the genomic (g) RNA and, also, in the subgenomic (sg) RNA that the virus produces to express 3'-proximal genes. Besides other structural features, the results highlight the key role of long-distance kissing-loop interactions between the 3'-CITE and 5'-proximal hairpins for g and sg RNA translation. Bioassay of CITE mutants confirmed the importance of the identified 5'-3' RNA communication for viral infectivity

and, moreover, underlined the strong evolutionary constraints that may operate on genome stretches with both regulatory and coding functions.

INTRODUCTION

Translation of viral products is the first step in the reproductive cycle of eukaryotic plus-strand RNA viruses once they enter a cell and become uncoated. As viruses do not encode their own ribosomes, such process entirely relies on the translational machinery of the host (1-3). In eukaryotes, the cytosolic translation apparatus usually recognizes monocistronic mRNAs with a 5'-cap (m^7GpppN) and a 3'-poly(A) tail, two structures that function synergistically to facilitate translation (4, 5). The 5'-cap is bound by eukaryotic initiation factor (eIF) 4E, the smallest component of the eIF4F complex. The largest component of this complex, eIF4G, acts as scaffold for assembly of other initiation factors including eIF4A, eIF4B and poly(A)-binding protein (PABP) which, in turn, binds to the 3'-poly(A) tail. The 43S ribosomal preinitiation complex (comprising the 40S subunit, the eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met} ternary complex, eIF5, eIF3, eIF1 and eIF1A) is then recruited to the mRNA via an eIF3-bridged interaction with eIF4G, and starts scanning in a 5'-to-3' direction until an initiation codon is reached. At this point, most of the initiation factors are released, the 60S ribosomal subunit joins, the 80S ribosome is then formed and protein synthesis ensues (6, 7). During the initiation stage, the simultaneous interaction of eIF4G to eIF4E,

bound to the 5'-cap, and to PAPB, bound to the 3'-poly(A) tail, causes circularization of the mRNA which seems to enhance recruitment and recycling of the 40S ribosomal subunit (8, 9).

Despite the absolute dependence of viruses on the host for translation, many eukaryotic viral mRNAs lack the 5'-cap structure and/or the 3'-poly(A) tail typically found in cellular mRNAs. That is the case of the vast majority of plant plus-strand RNA viruses but, remarkably, still they are fully competent for translation. This competence is normally achieved through alternative, non-canonical translation mechanisms (10-12). One of these mechanisms involves the use of 3'-proximal RNA sequences as cap-independent translational enhancers (CITEs) (12, 13). So far, at least six classes of CITEs have been defined that differ in their structural and/or functional requirements (14, 15). No correlation among CITE classes and viral groups can be established suggesting that these regulatory elements have evolved independently and/or have been acquired through modular shuffling via recombination (15-17). Though the mechanism of action of the CITEs is not fully understood, it is generally accepted that they recruit key components of the host translational machinery that will be subsequently delivered near the 5'-end of the viral mRNA to initiate translation. Two main pieces of evidence supporting this model are: i) the detection of interactions (at

least *in vitro*) of CITEs with components of the eIF4F complex (or of its plant isoform, eIFiso4F; 18) or even directly with ribosomal subunits, and ii) the frequent complementarity between CITEs and 5'-proximal sequences of the corresponding viral RNA that may aid transfer of the CITE-recruited factor(s) (14, 15). In addition, genetic evidence for the interaction among a viral 3'-CITE and eIF4E has been obtained in one case (19).

Pelargonium line pattern virus (PLPV) possesses a monopartite, plus-strand RNA genome that is encapsidated into icosahedral particles of about 30 nm in diameter. The 3,883 nt genomic RNA (gRNA) lacks both a 5'-cap and a 3'-poly(A) tail and contains five open reading frames (ORFs) flanked by an unusually short 5'-untranslated region (5'-UTR), with only 6 nt, and by a 3'-UTR of 246 nt. The two 5'-proximal ORFs encode two proteins involved in replication, p27 and p87 (the viral RNA dependent-RNA polymerase, RdRp). Two centrally located ORFs encode two small movement proteins (MPs), p7 and p9.7, and the 3'-proximal ORF encodes a protein, p37, that has a dual role as coat protein (CP) and as viral suppressor of RNA silencing (VSR) (20-22). PLPV is a member of large family *Tombusviridae*, which currently embraces thirteen genera and more than fifty species (23-25), and bears close resemblances with species of genus *Carmovirus* as regards its genomic

organization and protein sequences. However, several traits differentiates PLPV from carmoviruses including: i) the production of a single, tricistronic subgenomic (sg) RNA for expression of 3'-proximal ORFs in contrast with carmoviruses that generate two sgRNAs for this purpose, ii) the presence of a non-AUG start codon in MP2 gene conversely to the canonical AUG found in the corresponding gene of carmoviruses and, iii) the lack of AUGs in any frame between the AUG initiation codons of MP1 and CP genes unlike carmoviruses that harbour 1-8 AUGs in the equivalent region (20). These molecular features are shared by at least four structurally and phylogenetically related viruses which has prompted the proposal of their inclusion into a new genus, tentatively named *Pelarspovirus*, within family *Tombusviridae*, with PLPV recommended as the type species (20, 26-28).

Data obtained in recent years have revealed interesting aspects concerning the regulation of gene expression in PLPV. Some of those data enabled us to confirm, as expected from comparative analysis with related viruses (20), that ORFs p27 and p87 are translated directly from the gRNA, the latter via readthrough of the ORF p27 leaky stop codon. On its side, the unique viral sgRNA that is produced during infection serves as mRNA for translation of ORFs p7, p9.7 and p37 (20, 21). Expression of all three genes from the tricistronic sgRNA seems

coordinated through leaky-scanning favoured by the suboptimal translational context of the initiating AUG of MP1 gene, the non-canonical start codon (GUG) of MP2 gene and the lack of any AUG triplet between the AUG initiation codons of MP1 and CP genes. Despite these significant advances in understanding the gene expression strategy of PLPV, little is known about how PLPV (g and sg) RNAs attract the translation machinery in the absence of a 5'-cap structure and a 3'-poly(A) tail. *In silico* analyses allowed prediction of a potential CITE in the viral 3'-UTR that would have structural resemblances with the so-called translation enhancer domain (TED) of satellite tobacco necrosis virus (STNV), the first 3'-CITE discovered (29, 30). However, experimental evidence supporting this prediction is lacking. Moreover, information on the mechanistic bases of the activity of the TED-CITE in STNV, a subviral agent that only encodes its own CP and parasitizes tobacco necrosis virus D (genus *Betanecrovirus*, family *Tombusviridae*) (31), is scarce.

In this work, we have pursued a threefold objective: i) to assess whether the TED-like CITE predicted in the 3'-UTR of PLPV really works as such and, if so, ii) to get insights into the RNA features that influence its activity and, iii) to verify the relevance of the CITE-mediated translation for viral infectivity. The results have confirmed that the predicted PLPV CITE is active *in vivo* (though not *in vitro*) from both the g and the sg

RNAs and that its activity depends on the establishment of a long-range RNA-RNA interaction with a hairpin of the corresponding 5'-region. Data on some other structural requirements for CITE function have also been obtained. In addition, bioassay of CITE mutants in plants have corroborated that maintenance of the base-pairing interaction between the 5'-region and 3'-CITE is critical for virus viability and have suggested that the regulatory and coding functions of the 5'-partner(s) impose important evolutionary constraints.

MATERIAL AND METHODS

DNA constructs

Two pUC18-based PLPV wild-type (wt) constructs containing cDNAs encompassing full-length gRNA and sgRNA sequences, respectively, plus an added 5'-proximal T7 RNA promoter have been described previously (21, 32). These plasmids were used as templates to generate a set of mutant constructs bearing deletions in the PLPV 3'-UTR. The deletion mutants were generated through PCR using *Pfu Ultra* DNA polymerase (Stratagene) and different pairs of primers (one complementary and one homologous to distinct regions of the PLPV sequence in each pair) that harbored appropriate restriction sites to facilitate subsequent cloning steps. PCR

products (comprising the cloning vector, pUC18, fused to a PLPV 5'-region at one side and to a PLPV 3'-region at the other side) were eluted after agarose electrophoresis, digested with the corresponding restriction enzyme(s), self-ligated and cloned following standard protocols.

PLPV gRNA- or sgRNA- derived reporter constructs were generated through replacement of specific viral genome segments by Firefly luciferase (Fluc) gene. To facilitate such replacement, proper restriction sites (*NcoI* and *PstI* at the 5'- and 3'-side, respectively) were introduced in both genomic and subgenomic T7-driven constructs. Deletions in some reporter constructs were made as indicated above and nucleotide replacements in other constructs were engineered by PCR with the Quick Change Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) and specific oligonucleotide pairs.

Each mutant construct was verified by DNA sequencing with an ABI PRISM DNA sequencer 377 (Perkin-Elmer). The type and position of the modifications present in each construct is indicated in the Figures depicting the mutants.

***In vitro* transcription and translation**

Uncapped transcripts were synthesized *in vitro* with T7 RNA polymerase (Thermo Scientific) from PLPV (genomic and

subgenomic)-derived constructs linearized with *Sma*I (32). Capping of some RNAs was performed with ScriptCap m⁷G Capping System according to the manufacturer's protocol (Epicentre Biotech.). The transcripts were used for *in vitro* translation experiments with Wheat Germ Extract (WGE, Promega) including [¹⁴C]leucine to label *de novo* synthesized proteins as described previously (21). Translation products were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and labelled proteins were quantified with the aid of a PhosphorImager (Fujifilm FLA-5100, GE Healthcare).

Protoplast preparation, inoculations and measurement of luciferase activity

Protoplasts (0.5×10^6), prepared from *Nicotiana benthamiana* leaves as previously described (33), were inoculated with 20 µg of uncapped transcripts generated from each Fluc reporter construct along with 1 µg of capped transcripts synthesized from a Renilla luciferase (Rluc) reporter construct (internal control; 19) using polyethylene glycol. Protoplasts were harvested 3 h later and lysed with 1× passive lysis buffer (Promega). Luciferase activity was measured with Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) employing GloMax-Multi Detection System (Promega). All samples were tested in triplicate.

Inoculation of plants

Uncapped transcripts from PLPV gRNA constructs were used to mechanically inoculate *N. benthamiana* plants (two carborundum dusted-leaves per plant employing approximately 2 µg of transcript per leaf). Plants were maintained under greenhouse conditions (16 h days at 24 °C, 8 h nights at 20 °C) and leaf material was harvested 15 days after inoculation for further analysis. For serial passage experiments, *Chenopodium quinoa* plants were mechanically inoculated with transcripts (passage 0) and sap from infected material was used as inoculum for serial viral transfer to new *C. quinoa* plants at 10 day intervals.

RNA extraction, Northern blot hybridization and RT-PCR amplification

Total RNA preparations of either *N. benthamiana* or *C. quinoa* leaves were obtained by phenol extraction and lithium precipitation (33). Northern blot analysis was performed with a ³²P-radioactive RNA probe, derived from PLPV p37 gene (nt 2621-3637), as previously described (22). In serial passage experiments, total RNA extracts from virus-infected leaf material were subjected to RT-PCR amplification with SuperScript II One-Step RT PCR System (Invitrogen) using virus-

specific primers. Purified PCR products were either directly sequenced or cloned into pTZ57R/T vector (Thermo Scientific) prior to sequencing.

RNA secondary structure prediction

Secondary structure predictions were performed using the Mfold program version 4.6 (www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold) (34).

RESULTS

Potential TED-like CITE in the 3'-UTR of PLPV and prediction of similar CITEs in other proposed pelarospoviruses

The genome organization of PLPV as well as the putative structure of its 3'-UTR is depicted in Fig 1. Such 3'-UTR structure, that is based on computational predictions with the Mfold program (34), on phylogenetic comparisons with related viruses and on molecular variability data from different viral isolates (35), consists of several hairpins (HPs). As found in other members of family *Tombusviridae*, the 3'-proximal HP (HP5 in Fig 1B) most likely works as core promoter for transcription of complementary strands (36, 37) whereas the 3'-penultimate HP (HP4 in Fig 1B) contains a large symmetrical internal loop whose 3'-side is expected to act, through a base-

pairing interaction with the four 3'-terminal nucleotides, as repressor of minus-strand synthesis (32, 38). The potential TED-like CITE was predicted in the 5'-proximal HP of the 3'-UTR (HP1 in Fig 1B) (15, 39) whose primary (and, consequently, secondary) structure is strictly conserved in all PLPV isolates characterized so far, conversely to that found for the 3'-adjacent HP (HP2 in Fig 1B) that concentrated most of the heterogeneity detected in the non-coding region (35). No potential regulatory motifs could be recognized neither in HP2 nor in the intermediate, small HP3 (Fig 1B). Comparison of the putative PLPV-TED with STNV-TED showed clear structural resemblances (Figs 1 and 2) and also some differences. Prominent among the latter are the dissimilar sequences of the 6 nt-apical loop and of the 4 bp-stem at the base of that loop (though the global bp composition of the stems was identical) as well as the sequence and length of a 3'-side upper bulge loop (Figs 1 and 2). Remarkably, TED-like CITEs have been also predicted in pelargonium chlorotic ring pattern virus (PCRPV), a proposed member of genus *Pelarspovirus*, and in calibrachoa mottle virus (CbMV), a member of genus *Carmovirus* (15), and can be also anticipated in the other three proposed pelarspoviruses, elderberry latent virus (ELV), rosa rugosa latent virus (RrLDV) and pelargonium ringspot virus (PelRSV) (Fig 2). It is noteworthy that the sequence of the apical loop (5'-

Capítulo 2

CGCCAA-3') as well as that of the closing base pair (G:C) was identical in the predicted TED-like CITEs of all pelarspoviruses further extending the number of common traits between members of the proposed new genus.

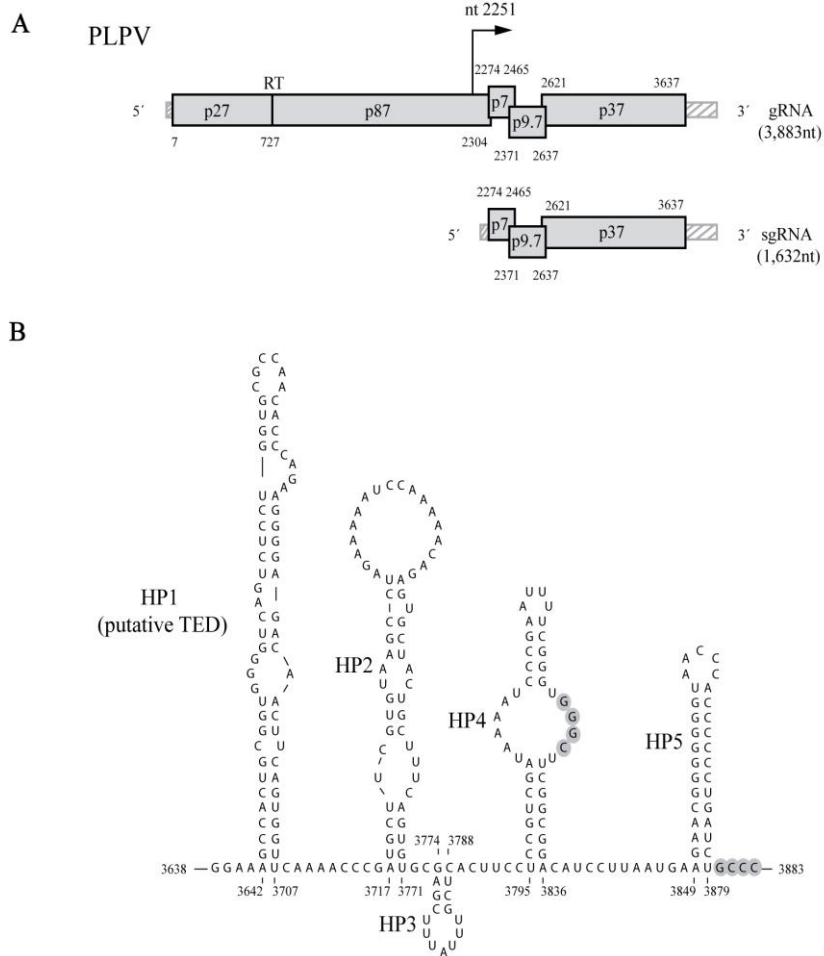


Fig 1. PLPV genome organization and relevant features in the predicted structure of its 3'-UTR and in those of related viruses. (A)

Capítulo 2

Schematic representation of PLPV genome. PLPV gRNA contains five ORFs (represented by grey boxes) flanked by 5'- and 3'-UTRs (striped boxes). The viral RNA dependent-RNA polymerase, p87, is the ribosomal read-through (RT) product of p27, an auxiliary replication protein. PLPV sgRNA is tricistronic and serves as mRNA for expression of two small movement proteins, p7 and p9.7, and of a protein, p37, that functions as coat protein and as suppressor of RNA silencing. **(B)** Putative secondary structure of PLPV 3'-UTR consisting of several hairpins (HP1 to HP5). Nucleotides likely involved in a 3'-terminus interaction that presumably acts as repressor of minus-strand synthesis are within grey circles. HP1 might contain a CITE of the class known as Translation Enhancer Domain (TED).

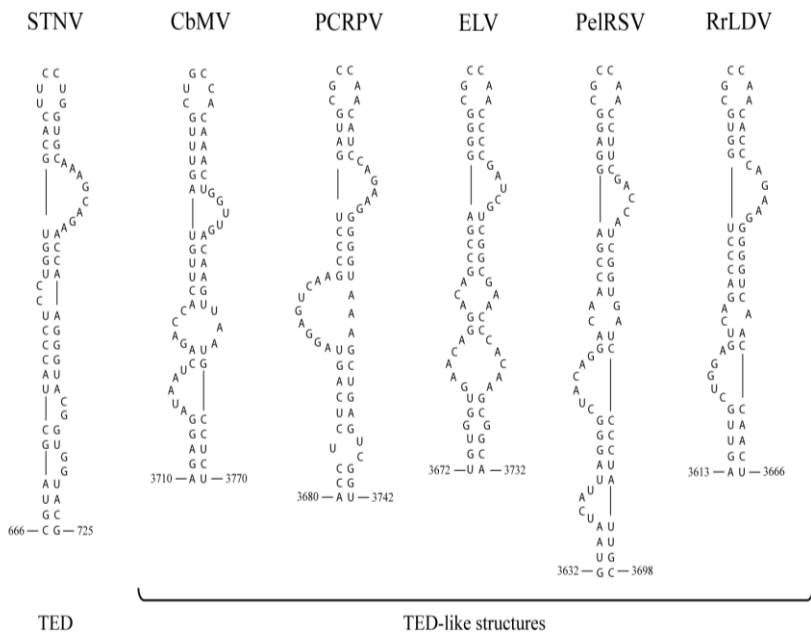


Fig 2. Proposed structures of STNV-TED and of TED-like CITEs predicted in several viruses. Virus acronyms: satellite tobacco necrosis virus (STNV), calibrachoa mottle virus (CbMV), pelargonium chlorotic ring pattern

virus (PCRPV), elderberry latent virus (ELV), pelargonium ring spot virus (PeIRSV), and rosa rugosa leaf distortion virus (RrLDV). CbMV is a member of genus *Carmovirus* and PCRPV, ELV, PeIRSV and RrLDV are recommended to be included in the tentative new genus *Pelarspovirus*, all within family *Tombusviridae*.

***In vivo* translation assays confirm the functionality of the predicted PLPV TED-like CITE**

To evaluate if the predicted CITE or other element of the 3'-UTR was relevant for PLPV translation, several deletions were made in a full-length genomic construct (Fig 3). The engineered deletions led to removal of segments of the 3'-UTR encompassing nt 3661-3694 (gD2), 3698-3733 (gD3), 3774-3883 (gD4) or the entire region (nt 3638-3883, gD1). When wt and truncated viral genomic transcripts were employed as templates for *in vitro* translation reactions in WGE, the amount of *de novo* synthesized p27 was essentially maintained irrespectively of the template (Fig 3). These results suggested that no element for translation regulation was present at the 3'-UTR of PLPV or, alternatively, that if existed, it was not active in *in vitro* translation assays with WGE.

PLPV

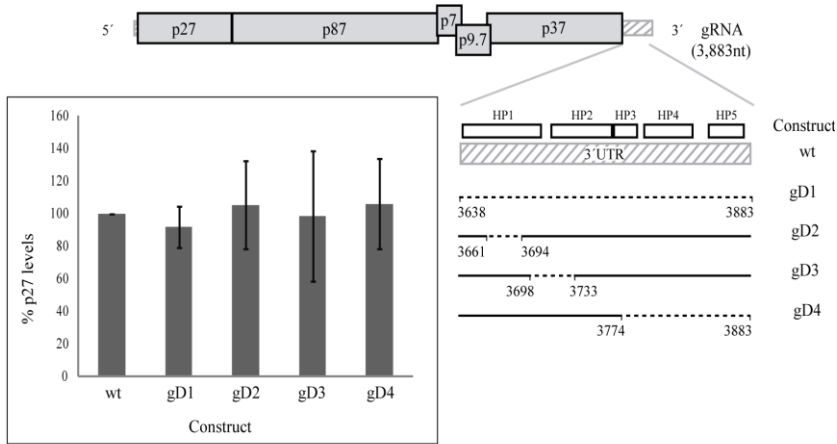


Fig 3. *In vitro* translation assay in WGE of wt and mutant genomic PLPV transcripts. A scheme of PLPV gRNA constructs carrying deletions (depicted as dashed lines) in the 3'-UTR is shown. Segments at the 3' UTR forming potential hairpins (HP1-HP5) are indicated by small white rectangles on the wt 3'-UTR. A graphic representation of p27 levels produced *in vitro* from each construct is shown within an inset at the left. The protein expression levels from wt gRNA were set to 100% and the translation efficiencies from other templates are indicated as percentages with respect the wt. Each percentage is shown as the mean and standard error of the mean from three replicates. Other details as in Fig 1.

In the light of the inconclusive results with the *in vitro* approach, we decided to set up an *in vivo* translation assay for PLPV. To this end, the wt genomic construct was modified by replacing most of the RdRp gene (nt 126-2271) by the Fluc reporter gene. A series of mutants derived from this genomic

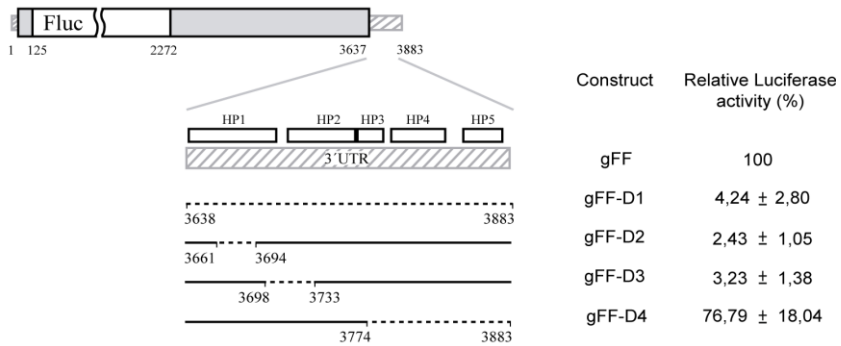
reporter construct, named gFF and considered the reference wt construct, was generated by introducing deletions in the 3'-UTR as described above (Fig 4A). Uncapped transcripts synthesized from the distinct constructs were assayed in *N. benthamiana* protoplasts along with a control Rluc reporter RNA. Deletion of the entire 3'-UTR in construct gFF-D1 reduced translation to almost background levels, pointing to the presence of a key regulatory element in the missing region. Smaller deletions affecting the predicted HP1 (constructs gFF-D2 and gFF-D3) led to similar results whereas a deletion encompassing 3'-terminal 110 nt (and thus embracing the predicted HP3, HP4 and HP5) did have only minor effects (~77 % of wt levels) on translation efficiency (Fig 4A). These results were consistent with the initial prediction that HP1 corresponds to a TED-like CITE.

Additional constructs in which coding regions either downstream of the 5'-UTR (construct gFF-s5R) or upstream of 3'-UTR (construct gFF-s3R1 to R3) were removed, were also assayed for translation. The results showed that the 5'-region of 22 nt (6 nt corresponding to the 5'-UTR plus 16 nt of the p27/RdRp coding region) present in construct gFF-s5R was ~65% less efficient in directing translation than the 5'-region of 125 nt (6 nt of the 5'-UTR plus 119 nt of the p27/RdRp coding region) of the parental construct gFF (Fig 4B). This observation

indicated that the genome segment comprised between nt 23-125 must contain a key regulatory translation element. The removal of coding sequences upstream of the 3'-UTR had disparate effects on translation efficiency (Fig 4B). The lack of viral coding sequences immediately upstream of the 3'-UTR in construct gFF-s3R1 caused a severe (~ 83%) drop in translation when compared to wt levels. Inclusion a short segment of the p37 gene (nt 3560-3637) in construct gFF-s3R2 raised translation to ~ 330% with regard that of gFF, whereas an additional 5'-extension of the coding segment (nt 3238-3637) did not further improve translation yields but rather reduced them to 265%. As construct gFF contained a 3'-coding region larger than those present in the two latter constructs but showed lower translation levels, a plausible explanation for these results was that some genome stretches might down-regulate the translation process (further comments on this issue in the Discussion section).

Capítulo 2

A



B

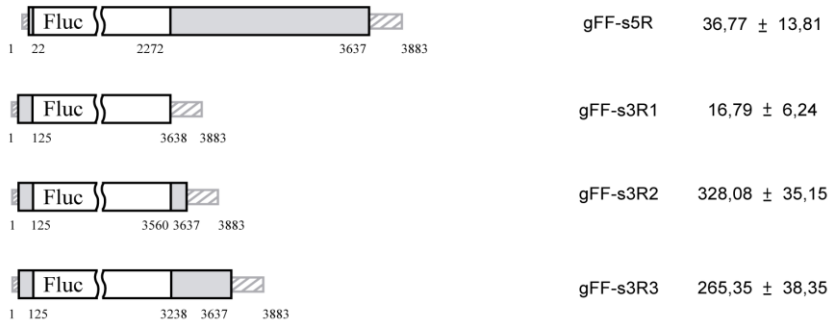


Fig 4. *In vivo* translation assay of genomic PLPV transcripts. A parental PLPV construct (gFF at the top) for assessment of translation efficiency was generated by replacing most of the p27/RdRp ORF by the Fluc reporter gene (represented by a white box). This parental construct served as template for the generation of a series of mutant constructs carrying deletions either at the 3'-UTR (gFF-D1 to D4) (**A**) or at the 5'-terminal coding region (gFF-s5R) or the 3'-terminal coding region (gFF-s3R1 to s3R3) (**B**). Uncapped transcripts from each construct were inoculated into *N. benthamiana* protoplasts along with a control capped Rluc transcript and luciferase levels were measured 4 h post-inoculation. Translation

efficiencies of constructs are given as percentages with regard the parental gFF (set to 100%) The mean and standard error of the mean from three replicates are indicated. Other details as in Fig 3.

Efficient translation of PLPV gRNA requires establishment of a long-range RNA-RNA interaction among the TED-like CITE and a p27 ORF hairpin

The deletion analysis supported the involvement of the predicted TED-like CITE in PLPV gRNA translation. To further corroborate this notion, nucleotide substitutions were introduced into the apical loop of the element as its sequence was strictly conserved in TED-like CITEs predicted in other pelarspoviruses (Figs 1 and 2). Variation of the wt loop sequence, 5'-CGCCAA-3', to either 5'-CAGGUA-3' (gFF-M1) or to 5'-UGCGAG-3' (gFF-M2) (nucleotide substitutions underlined) resulted in a severe drop in translation efficiency (less than 10% of that of parental construct gFF) (Fig 5) which further supported the key role of the identified CITE in the translation process and, moreover, indicated that the targeted loop has a major contribution to PLPV-TED function. Previous *in silico* analyses led to the suggestion that such loop could establish a long-range interaction with the apical loop (5'-UUGGCG-3') of a hairpin presumably formed by a segment located within p27 ORF (gHP3 in Fig 5A) (15). The relevance of

that segment for translation was supported by the results with construct gFF-s5R that showed an important reduction in Fluc production when nt 23-125 were removed from the 5'-region of the parental construct gFF (Fig 4).

To experimentally assess whether the apical loop of gHP3 was involved in an interaction with the CITE, its sequence was changed from 5'-UUGGCG-3' to either 5'-UACCUG-3' (gFF-M3) or 5'-CUCGCA-3' (gFF-M4). The translation efficiency of these new mutants, in which the predicted long-range base pairing with the CITE would be disrupted, was reduced to less than 10% of wt levels (Fig 5B), underlining the importance of mutagenized loop. Combination of the nucleotide replacements present in mutants gFF-M3 and gFF-M4 with those of the CITE mutants gFF-M1 and gFF-M2, respectively, was expected to allow reconstitution of the presumed gHP3-CITE interaction (Fig 5B). Assay of the compensatory mutants gFF-M1/M3 and gFF-M2/M4 in protoplasts revealed that, in both cases, translation efficiency was basically restored to wt levels. This remarkable full recovery was consistent with the establishment of the predicted 5'-3' long-range interaction *in vivo* and with it playing a critical role in translation.

Capítulo 2

A



B

	Construct	Relative Luciferase activity (%)
gHP3: TED interaction	5'...UUGGCG...3' 3'...AACCGC...5'	gFF (wt) 100
	5'...UUGGCG...3' 3'...AUGGAC...5'	gFF-M1 5,60 ± 1,21
	5'...UU ^G GCG...3' 3'...GAGCGU...5'	gFF-M2 5,29 ± 1,95
	5'...U ^A CCUG...3' 3'...AACCGC...5'	gFF-M3 9,12 ± 1,74
	5'...C ^C CGCA...3' 3'...AACCGC...5'	gFF-M4 8,88 ± 2,69
	5'...U ^A CCUG...3' 3'...AUGGAC...5'	gFF-M1/M3 88,33 ± 13,58
	5'...C ^C CGCA...3' 3'...GAGCGU...5'	gFF-M2/M4 107,17 ± 12,32

C

	Construct	Relative Luciferase activity (%)
	gFF- Δ BG	13,02 ± 0,62
	gFF-ST	13,41 ± 2,79

Fig 5. Effect of mutations in the TED-CITE and/or in a hairpin within p27 ORF on genomic PLPV translation. (A) Putative secondary structure of the 5'-proximal 125 nt of PLPV according Mfold predictions. A potential long-range interaction between the apical loop of a hairpin (gHP3) predicted within p27 ORF and the apical loop of the 3'-CITE is shown. Nucleotides that can putatively pair are connected by dotted lines. **(B)** Translation efficiency of transcripts bearing mutations that disrupted or reconstituted the potential kissing-loop interaction among apical loops of gHP3 and the CITE. All mutants were generated from parental construct gFF and assayed in *N. benthamiana* protoplasts as described in Fig 4 legend. Only the sequences of the loops involved in the potential base-pairing are shown. The engineered nucleotide substitutions are on a gray background and putative G:U base pairs are in italics. **(C)** Translation efficiency of transcripts bearing mutations in the CITE outside of its apical loop. In B and C, levels of translation as a percentage of that of gFF construct are given. Results are from three experiments with standard deviations. Other details as in Fig 4.

Apart of the apical loop of the CITE (directly involved in an essential long-distance interaction as shown above), some other conserved structural features of the element were also altered to assess their contribution to functionality. Particularly, one construct in which the 4 nt upper bulge was removed (gFF- Δ BG) and another in which the 4 bp stem at the base of the apical loop was destabilized by one nucleotide replacement (gFF-ST), were generated (Fig 5C). Both engineered mutations reduced translation at similar extent (\sim 13% of wt levels),

highlighting the importance of the targeted traits for TED activity.

Addition of a 5'-cap structure restores translation of CITE-deficient RNAs

As mentioned above, 3'-CITEs are thought to promote cap-independent translation by functionally substituting for the 5'-cap structure with high efficiency, leading to ribosome entry at or near the 5'-terminus followed by ribosome scanning to the initiation codon (13, 40, 41). To further explore this issue in the case of PLPV-TED, we wondered whether addition of a cap could restore *in vivo* translation of CITE mutants. To this aim, we generated capped *in vitro* transcripts from parental construct gFF and from constructs gFF-D2 and gFF-M2 (Figs 4A and 5B). Measurement of Fluc activities showed that all RNAs (wt and CITE mutants) were translated with similar efficiencies (Fig 6), supporting the functional equivalence between the CITE and the cap structure. In these assays, addition of a cap to gFF transcripts increased translation by ~ 8-fold with regard uncapped gFF RNAs, which is significantly lower than the >20-fold stimulation of the cap for RNAs lacking *cis*-elements required for cap-independent translation (42). Conversely, translation efficiencies of capped gFF-D2 and gFF-M2 were much higher (150-fold and more than 200-fold, respectively)

than those of their uncapped counterparts underlining the absence of a functional CITE in the latter constructs.

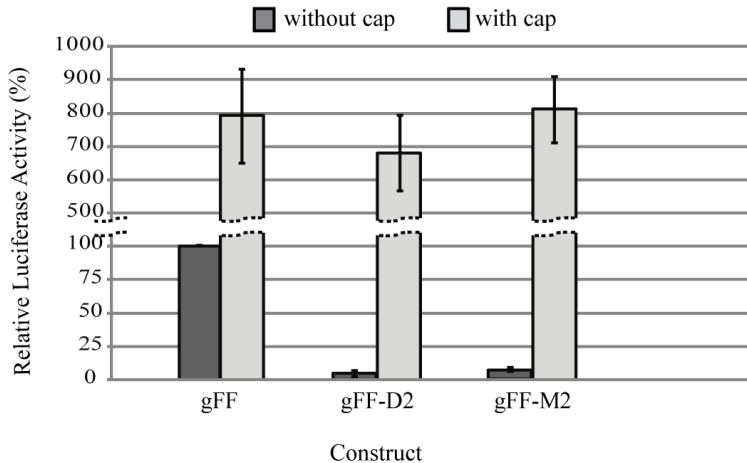


Fig 6. Effect of the addition of a 5'-cap on translation of PLPV genomic transcripts. Uncapped and capped transcripts from the wt construct gFF and from CITE mutants gFF-D2 and gFF-M2 (depicted in Figs 4 and 5, respectively) were generated and their translation efficiencies estimated through assay in *N. benthamiana* protoplasts. Translation efficiencies of transcripts are shown as percentages with respect to that of the uncapped gFF (set to 100%). The mean and standard error of the mean from three replicates are represented.

A long-range RNA-RNA interaction involving the TED-like 3'-CITE and a hairpin of the 5'-UTR is also indispensable for efficient translation of PLPV sgRNA

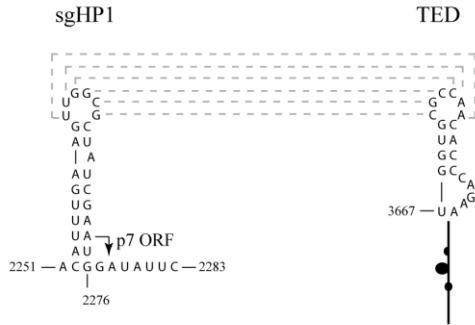
The above results with genomic constructs supported that communication of the CITE with the 5'-end is aided by a long-distance RNA-RNA interaction. A similar interaction could be predicted in the sgRNA, an uncapped viral RNA species whose translation was expected to rely also on the CITE. The elements directly involved in the potential interaction would be the apical loop of the CITE and the apical loop of a hairpin (sgHP1) formed by the 5'-UTR plus the start codon of p7 ORF (Fig 7A). Remarkably, the sequence of the apical loop of sgHP1 is identical to that of gHP3 and, thus, the putative kissing-loop interaction in the sgRNA would be formed by the same base pairs than that of the gRNA.

To evaluate *in vivo* translation of the sgRNA, the almost entire p7 ORF (nt 2284-2467) was replaced by the Fluc reporter gene giving rise to the parental construct sgFF (Fig 7B) from which efficient translation was recorded in *N. benthamiana* protoplasts. Alteration of the apical loop of the CITE from 5'-CGCCAA-3' to 5'-CAGGUA-3' in construct sgFF-M1, which would abrogate the presumed kissing-loop interaction with sgHP1, diminished translation to less than 5% of wt levels (Fig 7B). These results were essentially identical to those obtained with the genomic construct carrying the same alteration (gFF-M1, Fig 5B) and confirmed the functionality of CITE in the sgRNA context. Introduction of disrupting mutations in the apical loop

of sgHP1, particularly change of 5'-UUGGCG-3' to 5'-UACCUG-3' (construct sgFF-M3, Fig 7B), had a similar effect as translation was decreased to ~ 4% of wt levels. Combination of the nucleotide substitutions of both mutants, that were compensatory regarding the predicted kissing-loop interaction, in construct sgFF-M1/M3 raised translation to 50 % of wt levels. The results nicely supported that, as observed in the gRNA, a long-range interaction among the 3'-CITE and the 5'-region is needed for efficient sgRNA translation. Formation of the entire sgHP1 was apparently required for the establishment of such interaction as the translation of construct sgFF-s5R, with a shortened 5'-region (nt 2251-2277) and with the formation of the lower stem of sgHP1 impaired (as a consequence of the introduction of an *NcoI* restriction site to insert the Fluc gene), was reduced to ~ 14% of wt levels. Finally, it is also worth noting that parallel assay of sgFF and gFF transcripts revealed that translation levels were about 4-fold higher with the former, indicating that the 5'-region of the sgRNA is more efficient in directing translation than that of the gRNA.

Capítulo 2

A



B



	Construct	Relative Luciferase activity
sgHP1: TED interaction	5'...UUGGCG...3' 3'...AACCGC...5'	sgFF (wt) 100%
	5'...UUGGC...3' 3'...AUGGAC...5'	sgFF-M1 3,07% ± 1,58
	5'...UACCU...3' 3'...AACCGC...5'	sgFF-M3 3,73% ± 2,75
	5'...UACCU...3' 3'...AUGGAC...5'	sgFF-M1/M3 49,04% ± 10,65

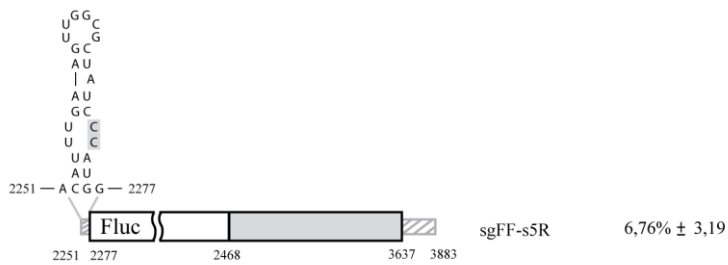


Fig 7. Assessment of the relevance of the 3'-TED and/or a 5'-hairpin, that can potentially establish a kissing-loop interaction, on PLPV

subgenomic translation. (A) Putative secondary structure of the 5'-proximal 33 nt of PLPV sgRNA according Mfold predictions. The start codon of p7 ORF is indicated by an arrow. A potential long-range interaction between the apical loop of a 5'-hairpin (sgHP1) and the apical loop of the TED-like CITE is shown. Nucleotides that can putatively pair are connected by dotted lines.

(B) *In vivo* translation assay of subgenomic PLPV transcripts. A parental subgenomic construct for assessment of translation efficiency was generated by replacing almost the entire p7 ORF by the Fluc reporter gene. This parental construct, named sgFF, is shown at the top and mutants derived from it are depicted below. One of the mutants had a shorter 5'-region (sgFF-s5R) and the others carried mutations that disrupted (sgFF-M1 and M3) or preserved (sgFF-M1/M3) the potential kissing-loop interaction between the 3'-CITE and the 5'-sgHP1. For the latter mutants, only the sequences of the loops involved in the potential base-pairing are shown. The engineered nucleotide substitutions are on a gray background and putative G:U base pairs in potential kissing-loop interaction(s) are in italics. Translation efficiencies were measured in protoplasts and the mean and standard error of the mean from three replicates is shown. Other details as in Fig 4.

Preservation of translationally relevant 5'-3' communication is critical for PLPV infectivity

Our assays in protoplasts with PLPV reporter constructs clearly highlighted the importance of a 5'-region/3'-CITE communication for efficient translation. In order to corroborate the key role of such communication in the context of infection, *N. benthamiana* plants were inoculated with uncapped

transcripts from PLPV constructs containing mutations that either disrupted (gPLPV-M2 and M4, with mutations in the apical loop of the CITE and gHP3, respectively) or restored (gPLPV-M2/M4) the gHP3-CITE kissing-loop interaction (Table 1). We choose these specific mutations because they had been tested in translation assays with the corresponding reporter constructs (gFF-M2, gFF-M4 and gFF-M2/M4; Fig 5) and, also, because those affecting gHP3 did not cause alterations at amino acid level (i.e., the p27/RdRp sequences of the mutants were identical to those of the wt virus). Northern blot analysis of the inoculated plants revealed that neither mutant gPLPV-M2 nor -M4 were able to establish infections (Table 1). Conversely, viral RNAs were detected in all plants inoculated with mutant gPLPV-M2/M4 (Table 1) indicating that the maintenance of the long-range interaction between the 5'-region and the 3'-CITE is a prerequisite for viral infectivity. Nevertheless, mutant gPLPV-M2/M4 accumulated in inoculated leaves at levels considerably lower than those of the wt virus and, most likely for this reason, failed to systemically invade the plants. As this mutant did not present changes in the encoded proteins, we reasoned that this lower accumulation could either be due to the participation of the mutagenized regions in processes other than translation or, more likely, to the disruption of the interaction among the 3'-CITE and sgHP1, as

the nucleotide substitutions in the former were not compensated in the latter. To alleviate this lack of compensation, two additional viral mutants were generated using construct gPLPV-M2/M4 as template: mutants gPLPV-M2/M4-sgHPa and -sgHPb, in which the apical loop of sgHP1 was changed from 5'-UUGGCG-3' to 5'-CUCGCA-3' and 5'-UUCGCG-3', respectively. In the first case, the sgHP1-CITE interaction would be formed by canonical G:C and A:U base pairs, as in the wt virus, whereas in the second construct such interaction would contain two non-Watson-Crick G:U base pairs (Table 1). Bioassay of the new constructs showed that none of them was capable to infect *N. benthamiana* plants. Since the mutations introduced in sgHP1 to reconstitute the interaction with the CITE led to one (construct gPLPV-M2/M4-sgHP1b) or three (construct gPLPV-M2/M4-sgHP1a) amino acid replacements at the C-terminus of the RdRp (Table 1), the possibility that these replacements were lethal to the virus seemed very plausible.

Table 1. Bioassay of PLPV (wt and mutants) in *N. benthamiana* plants

Virus variant	gHP3:CITE interaction	sgHP1:CITE interaction	p87 aa sequence (nt sequence)	No. infected plants/ No. inoculated plants	^a	^b Viral accumulation
gPLPV (wt)	5'...UUUGGCG...3' 3'...AACCGC...5'	5'...UUUGGCG...3' 3'...AACCGC...5'	wt	6/6		+++
gPLPV-M2	5'...UUUGGCG...3' 3'...GAGCGU...5'	5'...UUUGGCG...3' 3'...GAGCGU...5'	wt	0/4		-
gPLPV-M4	5'...CUCGCA...3' 3'...ACCGC...5'	5'...UUUGGCG...3' 3'...AACCGC...5'	wt	0/4		-
gPLPV-M2/M4	5'...CUCGCA...3' 3'...GAGCGU...5'	5'...UUUGGCG...3' 3'...GAGCGU...5'	wt	6/6		+
gPLPV-M2/M4 (sgHP1a)	5'...CUCGCA...3' 3'...GAGCGU...5'	5'...CUCGCA...3' 3'...GAGCGU...5'	V752A G753R A754T (T2261C) (G2263C) (G2266A)	0/6		-
gPLPV-M2/M4 (sgHP1b)	5'...CUCGCA...3' 3'...GAGCGU...5'	5'...UUUGGCG...3' 3'...GAGCGU...5'	G753R (G2263C)	0/6		-

^a Analyses performed in local leaves

^b Assessment of viral accumulation was performed by Northern blot analysis

In the light of the above results, we decided to explore whether evolution of mutant gPLPV-M2/M4 could lead to accumulation of changes in the virus genome that tended to stabilize the sgHP1-CITE interaction. To this aim, this construct was inoculated into *C. quinoa* plants and the viral progeny was subjected to serial passages in the same plant species. We chose this local host because studies with related viruses suggested it promotes quick virus evolution (43, 44). In agreement with the results in *N. benthamiana* plants (Table 1), appearance of lesions on *C. quinoa* leaves inoculated with mutant gPLPV-M2/M4 was delayed 3-5 days with regard to that observed with the wt virus (inoculated as a control in parallel assay) and, also, the number of lesions caused by the former was considerably lower than that recorded with the latter. After six serial passages, the relative timing of appearance and number of lesions were essentially maintained between both virus lineages. RT-PCR amplification and sequencing of gPLPV-M2/M4 progeny at the third to sixth passages showed that the original mutations in gHP3 and in the CITE were maintained in all cases and that no additional mutations were present within sgHP1. The lack of compensatory mutations in sgHP1 that could favour its interaction with the mutated CITE probably reflects the strong selection pressure that imposes the coding nature of the sequences involved in formation of sgHP1. On its side,

variations in the CITE enhancing its base-pairing with sgHP1 are neither likely tolerated because they might impair interaction of the element with gHP3 or drive variations in the latter that could result in p27/RdRp amino acid changes incompatible with protein function.

DISCUSSION

PLPV g and sg RNAs lack a 5'-cap structure and a 3'-poly(A) tail which suggested that their translation must rely on a 3'-CITE as reported for other members of family *Tombusviridae* and also in the closely related genus *Luteovirus* of the family *Luteoviridae* (13, 15). Previous *in silico* analyses led to the prediction of a TED-like CITE in the 3'-UTR of PLPV genome (15, 39), a type of CITE that was initially identified in STNV (29, 30). Through the generation of PLPV-based reporter constructs and their assay in plant protoplasts, in the present work we have confirmed the functionality of the predicted element and its key role for translation.

Apart from STNV-TED, no other TED-like CITE had been previously investigated. Moreover, data on the structural and/or functional requirements of STNV-TED are relatively scarce. STNV-TED was reported to interact with eIF4F and eIFiso4F in WGE through their cap binding subunits, eIF4E and

eIFiso4E (45). The way in which the recruited factors would be transferred to the 5'-end was not ascertained. It was proposed that the global tertiary structure of the viral RNA could bring the 5'- and 3'-UTRs of STNV RNA into close proximity (46). Also, that communication among both terminal regions would be mediated by proteins (45) or could be facilitated by stretches of sequence complementarity (30, 42). However, attempts to prove the relevance of potential 5'-3' base-pairing(s) (as that shown in Fig 8) were unfruitful (42). Conversely, the work presented here has clearly shown that, in the case of PLPV-TED, establishment of a long-range RNA-RNA interaction among the 3'-CITE and the 5'-region of the viral RNA is imperative for efficient translation. Remarkably, interaction of the putative TED-like CITE of CbMV or of PCRPV with a 5'-terminal genomic hairpin has been also predicted (15) and similar interactions can be anticipated for ELV, PeIRSV and RrLDV (Fig 8), suggesting that the activity of all of them might rely on communication through base-pairing with the 5'-terminus. Long-range RNA-RNA interactions have been proposed to mediate the activity of essentially all types of CITEs but the T-shaped class (47), though formal demonstration of such issue has been achieved only for a limited number of CITE-containing viruses. Some examples are the barley yellow dwarf virus (BYDV) -translational enhancer (BTE) of BYDV (genus *Luteovirus*, family *Luteoviridae*)

(41, 48), the panicum mosaic virus (PMV)-like translational enhancer (PTE) of saguaro cactus virus (SCV, genus *Carmovirus*, family *Tombusviridae*) (49), or the Y-shaped CITE of tomato bushy stunt virus (TBSV, genus *Tombusvirus*, family *Tombusviridae*) (39, 40). Such common strategy to establish communication with the 5'-region highlights the mechanistic convergence among 3'-CITEs that exhibit no similarity to each other regarding primary or secondary structure.

Capítulo 2

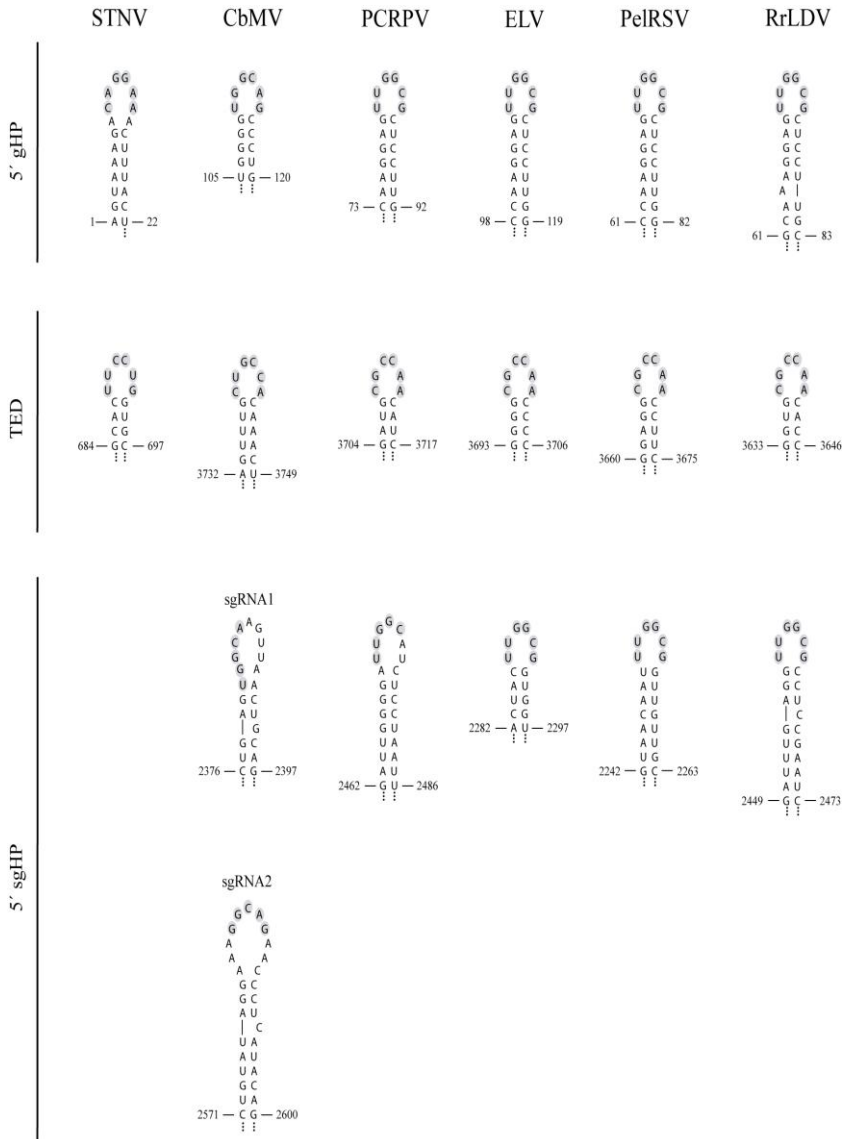


Fig 8. STNV-TED and putative TED-like CITEs predicted in the 3' UTR of several viruses (middle panel) can potentially base-pair with the 5'-region in the gRNA (upper panel) or sgRNA (lower panel) context. Virus acronyms as is Fig 2.

Early *in silico* analyses led to the suggestion that PLPV-TED would interact with sequences of the so-called gHP1 in Fig 5 (39). In this respect, it is worth mentioning that some initial mutations we engineered in gHP1 to impair the potential gHP1-CITE interaction did not cause any significant effect on translation (data not shown). Instead, the mutagenesis compensatory approach shown here has clearly revealed that gHP3 contains the genomic 5'-partner of the CITE, as proposed lately (15). Two different set of mutations designed to re-establish disrupted base-pairing between the CITE and gHP3 (implying three -construct gFF-M2/M4- or four -construct gFF-M1/M3- nucleotide replacements in each element) were fully effective at restoring cap-independent translation. This indicated that the primary sequences of the apical loops directly involved in the interaction are not relevant and that the main role of such loops in translation is to promote contact among the 5'- and the 3'- regions of the gRNA. Similar results were obtained when multiple compensatory mutations were engineered to target the kissing-loop interaction that connects the Y-shaped CITE of TBSV with the 5'-genomic region (40). In contrast, equivalent mutagenesis approaches affecting the interaction of the PTE-like CITE of SCV with a 5'-proximal hairpin of the gRNA showed that mono- but not dinucleotide compensatory replacements were tolerated in the interacting

loops (49). Similarly, the kissing-loop interaction that communicates BYDV-BTE and the genomic 5'-region tolerated an exchange of the middle base of each loop to maintain complementarity but not more extensive variations (41, 48). These observations could be interpreted as that long-distance RNA-RNA interactions mediating activity of PTE- and BTE-CITEs require more sequence specificity in the interacting residues than do PLPV-TED and Y-shaped CITEs though, in the former cases, other structural effects of the assayed mutations (e.g. disruption of local, relevant structures) cannot be ruled out.

PLPV-TED has been found to be active in both, the genomic and the subgenomic RNA contexts. This observation parallels that reported in other *Tombusviridae* that, like PLPV, produce sgRNA(s) during infection such as SCV and PMV (both with a PTE-like CITE) (49, 50), or TNV-A (with a BTE-like CITE) (51). Besides, potential base-pairings among the corresponding CITE and 5'-terminal hairpins of sgRNAs have been predicted for other viruses (e.g., TBSV, with a Y-shaped CITE, or maize necrotic streak virus, with a I-shaped CITE; 40, 52), though they await experimental confirmation. Moreover, despite the precise 5'-end of the sgRNA generated by other pelarspoviruses has not been mapped, complementarity among the TED-like CITE and a sequence located close to the initiation codon of p7 gene can be detected in all cases (Fig 8). Such sequence could

occupy the apical loop of a hairpin and would fit the motif 5'-UUGGCG-3' as in the genomic molecule (with the only exception of PCRPV in which the motif would be restricted to the first five nucleotides; Fig 8). In a similar line, complementarity between the apical loop of the potential TED-like CITE of CbMV and the apical loop of a HP structure predicted in the 5'-region of either the sgRNA1 or the sgRNA2 of this virus, can be found (Fig 8). Interestingly, the 5'-region of the PLPV sgRNA, in conjunction with the CITE, drove translation with an efficiency considerably higher (~ 4-fold) than that of the gRNA. These relative efficiencies were consistent with that expected from the coding capacities of each viral RNA: while the gRNA serves as mRNA for expression of proteins required to low amounts (replicases) during infection, the sgRNA directs synthesis of proteins needed to considerably greater amounts (MPs and CP/VSR). Moreover, recruitment of the translation machinery by the latter must be good enough to achieve translation of three products (p7, p9.7 and p37) through leaky scanning processes (21).

In addition to highlighting the relevance of the apical loop of both the CITE and 5'-terminal hairpins (gHP3 and sgHP1), the results have shown that the 3'-lateral bulge of the former is also essential to preserve the translational activity of the element. Most likely, such lateral bulge induces bending of the

CITE structure, enhancing its flexibility and favouring its interaction with the 5'-partner. Alternatively, the bulge might direct binding of essential factor(s), since such type of motif has been identified as recognition site for proteins in different viral and non-viral RNAs (53). Bulges similar to that of PLPV-TED are present in STNV-TED and in the TED-like CITEs predicted in CbMV and in the other pelarspoviruses (Fig 2), a phylogenetic conservation that further supports their functional significance. The maintenance of the 4 bp helix at the base of the apical loop of PLPV-TED, another conserved secondary structure trait (Figs 1 and 2), seemed also critical for CITE function. Further mutagenesis of the CITE will help to define further details on its structural requirements.

Another question somehow related with structural demands that deserves attention concerns the design of reporter constructs for measurement of translation efficiency. In distinct reports on CITEs (41, 54), just the 5'- and 3'-UTRs of the corresponding viral RNA were fused to the reporter gene. As suggested by comparison of the results with constructs gFF, gFF-s3R1, -s3R2 and -s3R3 (Fig 4), this approach is likely too simplistic and not without drawbacks. Those drawbacks may arise from both the reporter gene, that might affect global folding of the RNA that is being translated, and the restrictive selection of the viral sequences included in the reporter

construct. Such factors may preclude the establishment of either the essential interactions (for instance by hampering formation of required local structures) or of other interactions (apart from the essential ones) within the viral RNA that might contribute to some extent to translation efficiency. The contribution of other interactions could be either positive or negative as suggested by the fact that the parental construct gFF (which contained a 3'-region comprising p7, p9.7 and p37 genes plus the 3'-UTR), showed higher translation efficiency than gFF-s3R1 (in which the 3'-region was limited to the 3'-UTR) but significantly lower than those of gFF-s3R2 and gFF-s3R3 (which contained a 3'-region comprising just 78 and 400 nt, respectively, of p37 gene plus the 3'-UTR). Though other explanations cannot be ruled out, this observation might imply that the maximum translation efficiency is not necessarily the optimal for the virus that it must, on one side, be able to fine-tune expression of five distinct genes and, on the other, integrate many regulatory (replication, transcription, encapsidation, translation) as well as coding functions in a tiny RNA genome.

The bioassay of PLPV mutants have confirmed both the key role of the CITE in the life cycle of PLPV and its functionality via establishment of a long-range RNA-RNA interaction with the 5'-region. The maintenance of the 5'-3' gRNA communication

has been shown to be critical for virus infectivity and must be an important constraint for genome variation. However, the coding nature of 5'-partner(s) of the long-distance RNA-RNA interaction(s) must impose additional selective pressures on population genetic structure as suggested by the absence of mutations in either sgHP1 or the CITE of gPLPV-M2/M4 progenies after serial passages. Compensatory mutations in the former would lead to amino acid change(s) with detrimental effects on RdRp function whereas sequence modifications in the latter would most likely force alterations in gHP3 leading to amino acid replacement(s) in p27/p87 that might severely impair their activity. The notably reduced fitness (with regard the wt virus) of gPLPV-M2/M4 and progenies in plant bioassays is consistent with an inefficient interaction between sgHP1 and the CITE that must result in low sgRNA translation levels.

To conclude, the results presented here have provided remarkable insights into the structural requirements of a TED-like CITE, one of the least studied CITE classes, and into its interacting partners within the viral genome. Evidence in support of a key role of the CITE-mediated translation for viral infectivity has also been obtained. The apparent lack of functionality of PLPV-TED in *in vitro* assays, which parallels that found for the Y-shaped CITE of TBSV or the T-shaped CITE of turnip crinkle virus (46, 55), has precluded performance of

binding assays with WGE (or with purified wheat eIFs) in order to identify factors recruited by this regulatory element. Alternative approaches are being developed to tackle this question that may substantially improve our knowledge on the mechanistic bases of PLPV CITE.

Acknowledgements

We are grateful to Verónica Truniger (CEBAS, Murcia, Spain) for providing a Rluc reporter construct. We also thank pregraduate students (Beatriz Val and Ana Mencher) for contribution to gFF and sgFF construct generation. This work was supported by grants BFU2009-11699 and BFU2012-36095 from the Ministerio de Investigación, Ciencia e Innovación (MICINN, Spain) and the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, Spain), respectively, and ACOMP/2012/100 to the Generalitat Valenciana (to C. H). M. B.-P. was the recipient of predoctoral contracts from MICINN and MINECO.

REFERENCES

1. **Gale MJr, Tan SL, Katze MG.** 2000. Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64(2)**: 239-80.
2. **Gallie DR.** 1996. Translational control of cellular and viral mRNAs. *Plant Mol. Biol.* **32(1-2)**: 145-58.
3. **Komarova AV, Haenni AL, Ramirez BC.** 2009. Virus versus host cell translation: love and hate stories. *Adv Virus Res.* **73**: 99-170.
4. **Gallie DR.** 1991. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translation efficiency. *Genes Dev.* **5(11)**: 2108-16.
5. **Sonenberg N, Hinnebusch AG.** 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell.* **136(4)**: 731-45.
6. **Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV.** 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11(2)**: 113-27.
7. **Kozak M.** 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem.* **266(30)**: 19867-70.

8. **Gallie DR.** 1998. A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene*. **216(1)**:1-11.
9. **Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB.** 1998. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell*. **2(1)**:135-40.
10. **Dreher TW, Miller WA.** 2006. Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology*. **344(1)**: 185-97.
11. **Firth AE, Brierley I.** 2012. Non-canonical translation in RNA viruses. *J Gen Virol*. **93(7)**: 1385-409.
12. **Kneller EL, Rakotondrafara AM, Miller WA.** 2006. Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Res*. **119(1)**: 63-75.
13. **Nicholson BL, White KA.** 2011. 3' Cap-independent translation enhancers of positive-strand RNA plant viruses. *Curr Opin Virol*. **1(5)**: 373-80.
14. **Miller WA, Wang Z, Treder K.** 2007. The amazing diversity of cap-independent translation elements in the 3'-untranslated regions of plant viral RNAs. *Biochem Soc Trans*. **35(6)**: 1629-33.

15. **Simon AE, Miller WA.** 2013. 3' Cap-independent translation enhancers of plant viruses. *Annu Rev Microbiol.* **67**: 21-42.
16. **Miras M, Sempere RN, Kraft JJ, Miller WA, Aranda MA, Truniger V.** 2014. Interfamilial recombination between viruses led to acquisition of a novel translation-enhancing RNA element that allows resistance breaking. *New Phytol.* **202(1)**: 233-46.
17. **Nicholson BL, Zaslaver O, Mayberry LK, Browning KS, White KA.** 2013. Tombusvirus Y-shaped translational enhancer forms a complex with eIF4F and can be functionally replaced by heterologous translational enhancers. *J Virol.* **87(3)**: 1872-83.
18. **Browning KS, Webster C, Roberts JK, Ravel JM.** 1992. Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J Biol Chem.* **267(14)**: 10096-100.
19. **Truniger V, Nieto C, Gonzalez-Ibeas D, Aranda M.** 2008. Mechanism of plant eIF4E-mediated resistance against a carmovirus (*Tombusviridae*): cap-independent translation of a viral RNA controlled in *cis* by an (a)virulence determinant. *Plant J.* **56(5)**: 716-27.
20. **Castaño A, Hernández C.** 2005. Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pelargonium line pattern virus* and

its relationship with the family *Tombusviridae*. *Arch Virol*. **150(5)**: 949-65.

21. **Castaño A, Ruiz L, Hernández, C.** 2009. Insights into the translational regulation of biologically active open reading frames of *Pelargonium line pattern virus*. *Virology*. **386(2)**: 417-26.
22. **Pérez-Cañamás M, Hernández C.** 2015. Key importance of small RNA binding for the activity of a glycine/tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *J Biol Chem*. **290(5)**: 3106-20.
23. **Adams MJ, King AM, Carstens EB.** 2013. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*. **158(9)**: 2023-30.
24. **Rochon D, Rubino L, Russo, M, Martelli GP, Lommel S.** *Tombusviridae* .In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. Virus taxonomy-Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London; 2012. pp 1111-38.
25. **Rochon D, Scheets K, White A, Martelli G, Rubino L.** ICTV taxonomic proposal 2013.010a,bP.A.v2.Umbravirus_move. Move genus *Umbravirus* into family *Tombusviridae*. 2014.

26. **Kinard GR, Jordan R.** 2002. Genome organization of pelargonium chlorotic ring pattern virus: further implications for *Tombusviridae* taxonomy. *Acta Hort.* **568**: 17-27.
27. **Scheets K, Jordan R, White KA, Hernández C.** 2015a. *Pelarspovirus*, a proposed new genus in the family *Tombusviridae*. *Arch. Virol.* **160(9)**: 2385-93.
28. **Scheets K, Jordan R, White A, Hernández C.** 2015b. ICTV taxonomic proposal 2014.006b-fP.U.v3. Create the genus *Pelarspovirus* in the family *Tombusviridae*.
29. **Danthinne X, Seurinck J, Meulewaeter F, Van Montagu M, Cornelissen M.** 1993. The 3' untranslated region of satellite tobacco necrosis virus RNA stimulates translation in vitro. *Mol Cell Biol.* **13(6)**:3340-49.
30. **Timmer RT, Benkowski LA, Schodin D, Lax SR, Metz AM, Ravel JM et al.** 1993. The 5' and 3' untranslated regions of satellite tobacco necrosis virus RNA affect translational efficiency and dependence on a 5' cap structure. *J Biol Chem.* **268(13)**: 9504-10.
31. **Bringloe DH, Gultyaev AP, Pelpel M, Pleij CW, Coutts RH.** 1998. The nucleotide sequence of satellite tobacco necrosis virus

strain C and helper-assisted replication of wild-type and mutant clones of the virus. *J Gen Virol.* **79(6)**: 1539-46.

32. **Castaño A, Hernández C.** 2007. Biological activity of transcripts from cDNA of *Pelargonium line pattern virus*. *Acta Virol.* **51(4)**: 271-4.
33. **Martínez-Turiño S., Hernández C.** 2011. A membrane-associated movement protein of *Pelargonium flower break virus* shows RNA-binding activity and contains a biologically relevant leucine zipper-like motif. *Virology.* **413(2)**: 310-9.
34. **Zuker M.** 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31(13)**: 3406-3415.
35. **Castaño A, Ruiz L, Elena SF, Hernández C.** 2011. Population differentiation and selective constraints in *Pelargonium line pattern virus*. *Virus Res.* **155(1)**: 274-82.
36. **Song C, Simon AE.** 1995. Requirement of a 3'-terminal stem-loop in *in vitro* transcription by an RNA-dependent RNA polymerase. *J Mol Biol.* **254(1)**: 6-14.
37. **Panavas T, Pogany J, Nagy PD.** 2002. Analysis of minimal promoter sequences for plus-strand synthesis by the Cucumber necrosis virus RNA-dependent RNA polymerase. *Virology.* **296(2)**: 263-74.

38. **Pogany J, Fabian MR, White KA, Nagy PD.** 2003. A replication silencer element in a plus-strand RNA virus. *EMBO J.* **22(20)**: 5602-11.
39. **Fabian MR, White KA.** 2006. Analysis of a 3'-translation enhancer in a tombusvirus: a dynamic model for RNA–RNA interactions of mRNA termini. *RNA.* **12(7)**: 1304-14.
40. **Fabian MR, White KA.** 2004. 5'-3' RNA-RNA interaction facilitates cap- and poly(A) tail-independent translation of *Tomato bushy stunt virus* mRNA: a potential common mechanism for *Tombusviridae*. *J Biol Chem.* **279(28)**: 28862-72.
41. **Rakotondrafara AM, Polacek C, Harris E, Miller WA.** 2006. Oscillating kissing stem-loop interactions mediate 5' scanning-dependent translation by a viral 3'-cap-independent translation element. *RNA.* **12(10)**: 1893-906.
42. **Meulewaeter F, Danthinne X, Van Montagu M, Cornelissen M.** 1998. 5'- and 3'-sequences of Satellite tobacco necrosis virus RNA promoting translation in tobacco. *Plant J.* **14(2)**: 169-76.
43. **Liang XZ, Lee BTK, Wong SM.** 2002. Covariation in the capsid protein of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* induced by serial passing in a host that restricts movement leads to avirulence in its systemic host. *J Virol.* **76(23)**: 12320-4.

44. **Rico P, Ivars P, Elena SF, Hernández C.** 2006. Insights on the selective pressures restricting *Pelargonium flower break virus* genome variability: evidence for host adaptation. *J. Virol.* **80(16)**: 8124-32.
45. **Gazo BM, Murphy P, Gatchel JR, Browning KS.** 2004. A novel interaction of cap-binding protein complexes eukaryotic initiation factor (eIF) 4F and eIF(iso)4F with a region in the 3'-untranslated region of satellite tobacco necrosis virus. *J Biol Chem.* **279(14)**: 13584-92.
46. **van Lipzig R, Gultyaev AP, Pleij CW, van Montagu M, Cornelissen M, Meulewaeter F.** 2002. The 5' and 3' extremities of the satellite tobacco necrosis virus translational enhancer domain contribute differentially to stimulation of translation. *RNA.* **8(2)**: 229-36.
47. **Stupina VA, Meskauskas A, McCormack JC, Yingling YG, Shapiro BA, Dinman JD Simon AE.** 2008. The 3' proximal translational enhancer of *Turnip crinkle virus* binds to 60S ribosomal subunits. *RNA.* **14(11)**: 2379-93.
48. **Guo L, Allen E, Miller WA.** 2001. Base-pairing between untranslated regions facilitates translation of uncapped, nonpolyadenylated viral RNA. *Mol Cell.* **7(5)**: 1103-9.

49. **Chattopadhyay M, Shi K, Yuan X, Simon AE.** 2011. Long-distance kissing loop interactions between a 3' proximal Y-shaped structure and apical loops of 5' hairpins enhance translation of *Saguaro cactus virus*. *Virology*. **417(1)**: 113-25.
50. **Batten JS, Desvoyes B, Yamamura Y, Scholthof KB.** 2006. A translational enhancer element on the 3'-proximal end of the *Panicum mosaic virus* genome. *FEBS Lett*. **580(11)**: 2591-7.
51. **Meulewaeter F, van Lipzig R, Gulyaev AP, Pleij CW, Van Damme D, Cornelissen M, et al.** 2004. Conservation of RNA structures enables TNV and BYDV 5' and 3' elements to cooperate synergistically in cap-independent translation. *Nucleic Acids Res*. **32(5)**: 1721-30.
52. **Scheets K, Redinbaugh MG.** 2006. Infectious cDNA transcripts of *Maize necrotic streak virus*: infectivity and translational characteristics. *Virology*. **350(1)**: 171-83.
53. **Hermann T, Patel DJ.** 2000. RNA bulges as architectural and recognition motifs. *Structure*. **8(3)**: R47-54.
54. **Shen R, Miller WA.** 2004. The 3' untranslated region of tobacco necrosis virus RNA contains a barley yellow dwarf virus-like cap-independent translation element. *J Virol*. **78(9)**: 4655-64.

55. **Wu B, White KA.** 1999. A primary determinant of cap-independent translation is located in the 3'-proximal region of the Tomato bushy stunt virus genome. *J Virol.* **73(11)**: 8982–8.

Capítulo 3

Profile of Pelargonium line pattern virus-derived small RNAs from *Nicotiana benthamiana* plants

ABSTRACT

In plants, RNA silencing functions as an antiviral mechanism that is triggered by double-stranded or highly structured single-stranded RNA which serve as a substrate for Dicer-like ribonucleases (DCL) to produce virus small RNAs (vsRNAs) of 21-24 nt. These small duplexes are unwound, and one strand is incorporated into Argonaute (AGO)-containing effector complexes that can then target complementary viral RNA for degradation. Pelargonium line pattern virus (PLPV) possesses a monopartite positive sense RNA genome and is the proposed type member of a tentative new genus in the family *Tombusviridae*. As commonly observed in its natural hosts (*Pelargonium* spp.), PLPV establishes systemic, low-titer and asymptomatic infections in a variety of experimental hosts. As in other plant-virus interactions, the particularities of the PLPV infection process may be largely determined by the silencing-based host defence and the corresponding viral counterdefence, with the vsRNAs being a main component of the interplay between the host and the pathogen. Throughout deep-sequencing, blot hybridization and computational approaches, here we have characterized the vsRNAs that

accumulate in PLPV-infected *Nicotiana benthamiana* plants. The data indicate that PLPV sRNAs: i) represent more than 90 % of total sRNAs in infected tissue, ii) are predominantly of 21-22 nt, with those of minus polarity being in moderate excess with respect to those of plus polarity, iii) display a bias in their 5'-terminal nucleotide and, iv) derive from the entire virus genome though there is a prevalent contribution of certain regions. In the light of these results, the nature of the viral substrates that trigger silencing as well as the potential identity of the DCL and AGO proteins involved in anti-PLPV defence are discussed.

INTRODUCTION

RNA silencing is a general term that embraces a series of pathways leading to transcriptional or post-transcriptional gene downregulation in a sequence-specific manner. These pathways are essentially conserved in most eukaryotes and are involved in developmental control, maintenance of genome stability and stress-induced responses (Baulcombe, 2005; Pickford and Cogoni, 2003). The silencing process is triggered by double-stranded (ds) and highly structured single-stranded (ss) RNA which serve as substrates for Dicer-like ribonucleases (DCL) to produce small RNAs (sRNAs) of 20-25 nt, the key elements of the process (Ghildiyal and Zamore, 2009; Margis et al., 2006; Moazed, 2009; Vaucheret, 2006; Xie and Qi, 2008). These small duplexes are unbound by an RNA helicase and one strand is loaded into an RNA-induced silencing complex (RISC), whose essential catalytic component is an Argonaute (AGO) protein. Once incorporated, the sRNA strand guides RISC to target and inactivate their cognate RNAs (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) or DNAs (*transcriptional gene silencing*, TGS), the former through cleavage or translation inhibition and the latter through methylation (Baulcombe, 2005; Vaucheret, 2008).

In plants, RNA silencing is recognized as a major immune system against viruses (Ding, 2010; Hull, 2014). In the case of RNA viruses, the viral molecules that elicit the RNA silencing machinery may correspond to dsRNA replication intermediates (generated by the action of the virus-encoded RNA dependent-RNA polymerase, RDR) or to self-complementary regions of the viral genome (Ding and Voinnet, 2007). The DCL activities that target the inductor molecules leading to production of viral sRNAs (vsRNAs) may be diverse. *Arabidopsis thaliana* encodes four distinct DCL, three of which, DCL4, DCL2 and DCL3, function in a hierarchical fashion to yield vsRNAs of 21, 22 and 24 nt, respectively (Blevins et al., 2006; Deleris et al., 2006; Liu et al., 2009). Concerning RISC effector proteins, AGO1 seems to be particularly relevant in antiviral silencing, at least in *Arabidopsis thaliana* that contains 10 distinct AGO genes, although other AGO proteins may also have a significant role in this defence mechanism (Carbonell and Carrington, 2015; Harvey et al., 2011; Morel et al., 2002; Qu et al., 2008; Scholthof, et al., 2011). Cellular RDR enzymes, such as RDR6 and, to lesser extent, RDR1 and RDR2 in *A. thaliana* (Díaz-Pendón et al., 2007; Donaire et al., 2008; Qi et al., 2009), could be involved in the generation of viral dsRNA triggers. In addition, they can amplify the primary antiviral response by using vsRNAs to prime synthesis of complementary strands of

viral templates. This will result in the generation of new dsRNA substrates for DCL enzymes, leading to secondary vsRNA production and promoting the spread of the silencing signal from cell to cell (Díaz-Pendón et al., 2007; Donaire et al., 2008; García-Ruiz et al., 2010; Qi et al., 2009).

In order to survive in hosts employing RNA silencing, viruses have evolved a counterdefense by encoding proteins that disrupt the RNA silencing pathway, termed viral suppressors of RNA silencing (VSRs) (Li and Ding 2006). VSRs from plant viruses display high sequence diversity and can be endowed with additional function(s) (Li and Ding, 2006; Pumplin and Voinnet, 2013). VSRs may block the antiviral silencing at various stages. For instance, many of these proteins sequester sRNAs which will impair the amplification of silencing thus debilitating host defence. VSRs can also target long dsRNAs or protein components of the silencing machinery such as DCL, AGO, RDR or auxiliary proteins which may as well have an impact on vsRNA profiles (Csorba et al., 2015; Pumplin and Voinnet, 2013).

Pelargonium line pattern virus (PLPV) is a member of the family *Tombusviridae* with a single genomic RNA (gRNA) of 3,883 nt. This gRNA lacks a 5' cap and a poly(A) tail and contains five open reading frames (ORFs) flanked by

untranslated regions of 6 and 246 nt at the 5' and 3' end, respectively. From 5' to 3', the ORFs encode two replication proteins (p27 and its readthrough product p87), two small movement proteins (MP1 or p7 and MP2 or p9.7) and a coat protein (CP or p37) that also functions as VSR (Castaño and Hernández, 2005; Castaño et al., 2009; Pérez-Cañamás and Hernández, 2015). Among the thirteen genera that currently embraces family *Tombusviridae* (Rochon et al., 2012, 2014; Adams et al., 2013), PLPV shows the closest resemblances with members of genus *Carmovirus* at both genomic and protein level. However, its gene expression strategies differ from members of that genus, particularly because it produces a sole subgenomic RNA (sgRNA) for expression of the internal (p7 and p9.7) and 3'-proximal (p37) ORFs (Castaño and Hernández, 2005; Castaño et al., 2009) in contrast with carmoviruses that generate two sgRNAs. This characteristic together with other genomic traits (that facilitate translation of three genes from the sgRNA though leaky scanning processes) are shared by four structurally and phylogenetically related viruses. These resemblances have prompted the proposal of the inclusion of all five viruses into a prospective new genus, *Pelarspovirus*, within the family *Tombusviridae*, with PLPV recommended as type species (Castaño and Hernández, 2005; Kinard and Jordan, 2002; Scheets et al., 2015).

As commonly observed in its natural hosts (*Pelargonium* ssp.), PLPV establishes systemic, low-titer and asymptomatic infections in a variety of experimental hosts, including *N. benthamiana* (Alonso et al., 2005; Ivars et al., 2004; Castaño et al., 2007) a model plant species to study plant-pathogen interactions (Goodin et al., 2008). Like in other plant-virus interactions, the particularities of the PLPV infection process may be largely determined by the silencing-based host defence and the corresponding viral counterdefence, with the vsRNAs being a main component of the interplay between the host and the pathogen. At a first approach to study this relationship, here we have analysed the composition and molecular nature of the vsRNAs that accumulate in PLPV-infected *N. benthamiana* plants. The results have provided valuable insights into structural and genetic factors likely involved in the production of the hallmarks of PLPV silencing.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and viral inoculation

N. benthamiana plants at four-to-six leaf stages were inoculated with *in vitro* transcripts synthesized from an infectious PLPV clone as previously described (Castaño et al., 2007). Inoculated plants were kept under greenhouse

conditions (16 h days at 24 °C, 8 h nights at 20 °C) and systemically infected plant leaves were harvested at 30 days after inoculation. Infection was corroborated through Northern blot analysis as indicated earlier (Castaño et al., 2007).

Extraction, fractionation and detection of sRNAs

Total nucleic acid preparations were obtained by phenol-chloroform extraction according Verwoerd et al. (1989), though the lithium chloride precipitation step of the original protocol was omitted and, instead, nucleic acids were recovered from the aqueous phase by ethanol precipitation. Separation of nucleic acids was performed by PAGE on 20% gels containing 1xTBE and 8 M urea, loading oligodeoxyribonucleotides of known lengths (18–27 nt) in the external lanes to be used as size markers. After ethidium bromide staining, nucleic acids were electrotransferred from the gel to nylon membranes (Hybon+, GE Healthcare) and fixed through UV irradiation. The membranes were hybridized with ³²P-labelled PLPV-specific RNA probes of plus or minus polarity, generated by *in vitro* transcription from suitable constructs, using the conditions previously described (Pérez-Cañamás and Hernández, 2015). Hybridization signals were visualized by autoradiography or with a PhosphorImager (Fujifilm FLA-5100).

Deep sequencing of sRNAs

The fraction of sRNAs was recovered from gels by elution and subsequent ethanol precipitation, and quantitated with a spectrophotometer (Nanodrop). Amplification and sequencing was performed by Fasteris Life Science Co. Briefly, the sRNAs were subjected to single-stranded ligation of a bar-coded 5' and 3' adapter and, subsequently, reverse transcription and PCR amplification to generate the DNA colony template library. A PAGE purification step was included after each of the former steps. Quality control of the DNA colony template library was done by cloning an aliquot into a TOPO plasmid and capillary sequencing of 8-10 clones. After library purification, dilution to a concentration of 10 nM and flow cell preparation on the cluster station, high-throughput DNA sequencing was accomplished on the Illumina Genome Analyzer HiSeq2000.

Sequencing analysis of sRNAs

The obtained sequences were examined for the presence of the adapters and low quality regions and, after their removal and trimming, they were sorted into separate files according to their length. For further analysis the 18–26 nt reads were pooled and each set was analyzed by Burrows-Wheeler Alignment (BWA) tool (Li and Durbin, 2009) against the

nucleotide sequence of PLPV (Genbank accession EU835946). A set of perl scripts was developed to filter, analyze and visualize the mapping data. Alignment against plant host genome was also performed using BWA tool and *N. benthamiana* genome (Naim et al., 2012).

RESULTS AND DISCUSSION

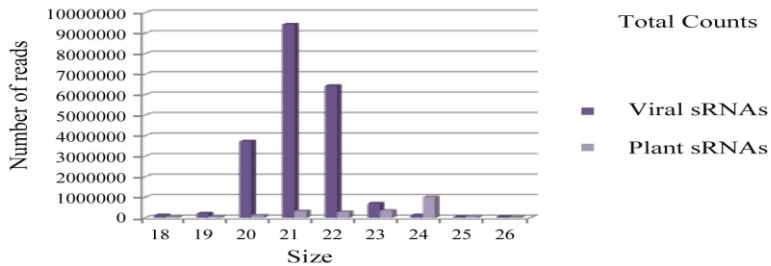
vsRNAs accumulate at high levels in PLPV-infected *N. benthamiana*

To establish the profile of vsRNAs, a cDNA library of short RNAs was generated using total RNA extracted from systemically infected leaves of *N. benthamiana* plants inoculated with PLPV *in vitro*-synthesized transcripts (Castaño et al., 2007). Illumina sequencing of this library resulted in over twenty-nine million reads, most of which (92.96%) ranging in the size interval of 18-26 nt. Closer inspection of these reads revealed that ~ 90% were sRNAs matching the PLPV genome sequence (Fig. 1). When non-redundant reads were considered, viral sRNAs represented only ~ 5% of sRNAs (Fig. 1B) which illustrated the highly repetitive condition of many vsRNAs. Indeed, some vsRNAs were represented by more than 25,000 reads (data not shown). The global results indicated that PLPV, as other plant viruses (e.g., Deleris et al., 2006; Donaire et al.,

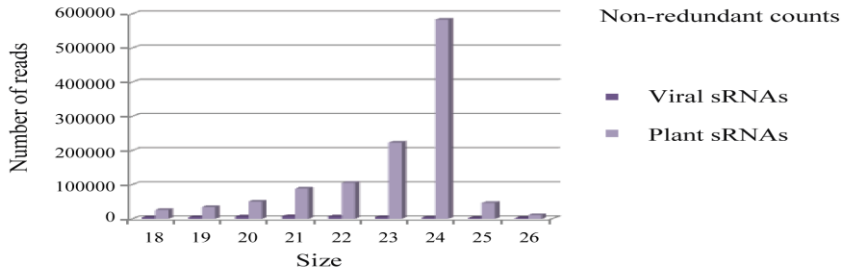
Capítulo 3

2009; Mitter et al., 2013; Ruiz-Ruiz et al., 2011, Yan et al., 2010), is efficiently targeted by the RNA silencing machinery of the host, despite encoding a strong VSR (Pérez-Cañamás and Hernández, 2015).

A



B



C

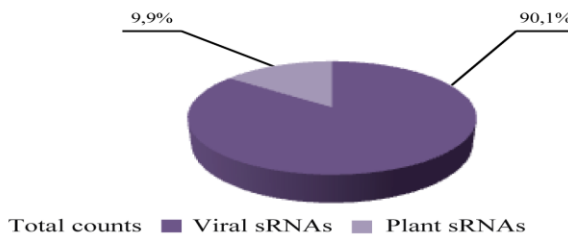


Fig 1. Global profile of vsRNAs and plant sRNAs in PLPV- infected *N. benthamiana* plants. (A) Histogram showing the distribution of 18-26-nt total sRNA reads. (B) Histogram showing the distribution of 18-26-nt non-redundant reads. (C) Graphic representation of relative proportions of 18-26-nt total sRNA reads from the plant and the virus.

The extremely high proportion of PLPV sRNAs in infected tissue has few precedents in the literature. For instance, vsRNAs from cymbidium ringspot virus (CymRSV, genus *Tombusvirus*) and melon necrotic spot virus (genus *Carmovirus*), two viruses belonging to the same family than PLPV, have been reported to represent about 65% and 57%, respectively, of the sRNA fraction of infected *N. benthamiana* and melon, respectively (Donaire et al., 2009; Szittyá et al., 2010). The percentages are considerable lower in other cases, even below 0.5% as reported for vsRNAs derived from tomato spotted wilt virus (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*) or pepper mild mottle virus (PMMoV, genus *Tobamovirus*, family *Virgaviradae*) in *N. benthamiana* or for vsRNAs of cotton leaf roll dwarf virus (genus *Polerovirus*, family *Luteoviridae*) in cotton (Mitter et al., 2013; Donaire et al., 2009; Silva et al., 2011). All these data together with the observation that the accumulation of vsRNAs derived from a given virus may vary among different plant species (Mitter et al., 2013; Xu et al., 2012) suggest that vsRNA accumulation is mostly inherent to

each plant-virus interaction. As proposed previously (Mitter et al., 2013; Lin et al., 2010), intrinsic differences in the replication and accumulation rates between different viruses and also differences in the efficiency of the RNA silencing machinery to recognize and target the viral genome, most likely account for distinctions in vsRNA populations. In addition, other factors such as environmental conditions may have a significant influence in vsRNA production (Qu et al., 2005; Szittyá et al., 2003; Zhang et al., 2012).

Analysis of the size and polarity of PLPV sRNAs provides clues on the potential triggers and DLC activities involved in anti-PLPV silencing

The PLPV sRNA sequences of 20-25 nt constituted the vast majority (93.30%) within the 18-26 range. Though the differences in percentage among size classes were less remarkable when considering non-redundant reads, a strong bias was evident when total reads were examined (Fig. 1 and 2). In the latter case, those of 21 and 22 nt represented the first (41.65%) and second (32.90%) largest fraction of 20-25 nt viral reads, respectively, while 20 nt (16.47%), and particularly 23 nt (7.83%), 24 nt (0.82%) and 25 nt (0.30%) classes were relatively under-represented (Fig. 1 and 2). This observation was consistent with a major role of DCL4 and DCL2 in antiviral

defence, in agreement with that reported in distinct plant-virus interactions (Deleris et al., 2006; Donaire et al., 2009; Qi et al., 2009; Ruiz-Ruiz et al., 2011; Mitter et al., 2013). Nevertheless, it is worth mentioning that the predominance of vsRNAs of 21 nt in PLPV-infected *N. benthamiana* plants differed from that observed in *A. thaliana* plants infected by turnip crinkle virus (TCV) in which vsRNAs of 22 nt showed an accumulation significantly higher than those of 21 nt (Deleris et al., 2006; Qu et al., 2008). TCV (genus *Carmovirus*, family *Tombusviridae*) is phylogenetically related to PLPV. Their VSRs, the viral CPs (TCV p38 and PLPV p37), are structurally similar and their mode of action exhibits also resemblances (Azevedo et al., 2010; Mérai et al., 2006; Pérez-Cañamás and Hernández, 2015). Both products have a GW motif that is involved in interaction with AGO1 and also in the capacity of the protein to bind sRNAs, a property that seems essential for the VSR function of, at least, PLPV p37. However, a striking difference is that TCV p38 has the additional ability to bind long dsRNAs whereas PLPV p37 has not, and this ability is likely to interfere with the DCL4-mediated processing of dsRNAs (Deleris et al., 2006; Xie et al., 2004). In this scenario, DCL2 acts as a DCL4 surrogate taking over the task of cleaving viral dsRNAs and explaining the dominance of vsRNAs of 22 nt in TCV-infected plants (Bouche et al., 2006; Deleris et al., 2006; Fusaro et al., 2006). In addition, it

has been proposed that the presence of TCV p38 changes homeostasis of RNA silencing components, down-regulating AGO1 which, in turn, causes down-regulation of DCL4 and up-regulation of DCL2 (Azevedo et al., 2010). On a separate issue, it is also worth mentioning that, conversely to that found for vsRNAs, the predominant class of endogenous sRNAs corresponded to those of 24 nt (Fig. 1A and B), paralleling that found previously in *N. benthamiana*, either mock-inoculated or infected by distinct viruses (Margarita et al., 2015; Mitter et al., 2013; Pantaleo et al., 2010), as well as in other plant species (Hu et al., 2011; Morin et al., 2008; Ruiz-Ruiz et al., 2011).

Sequence comparison of vsRNAs with the viral genome revealed similar ratios of those derived from the positive and negative strands though with a slight preponderance of the latter ones (46.5% versus 53.5%) when analysing data sets containing total, redundant reads (Fig. 2). In order to confirm the deep sequencing results and to rule out potential bias derived from the cloning approach, Northern blot hybridizations were performed using RNA preparations from PLPV-infected plants and two equalized riboprobes of plus and minus polarity, respectively, encompassing the entire PLPV genome. In accordance with the sequencing data, both probes yielded signals of similar intensity, though that of the probe detecting minus vsRNAs was slightly stronger (Fig. 2D). Also in

agreement with the sequencing information, the major signals corresponded to vsRNAs of 21-22 nt while those of 24 nt (or of other sizes) were less easily detected. No signals at all were observed in RNA preparations from a mock inoculated control, corroborating the reliability of the hybridization assays (Fig. 2D). These results pointed to viral dsRNAs as the main substrates for DCL activity and contrasted with those found in several plant-virus interactions in which an overabundance (~80%) of plus vsRNAs was noticed (e.g., *N. benthamiana*-potato virus X, genus *Potexvirus*, family *Alphaflexiviridae*, or *A. thaliana*-turnip mosaic virus, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*, among others), suggesting that the infectious plus-strand viral RNA was directly targeted by DCLs (Donaire et al., 2009; Ho et al., 2006; Molnar et al., 2005; Qi et al., 2009; Szittyá et al., 2010). Nevertheless, as in the case of PLPV in *N. benthamiana*, a balanced ratio of plus and minus vsRNAs was observed, for instance, in *N. benthamiana* plants infected by CymRSV or in *A. thaliana* plants infected by cucumber mosaic virus or by tobacco rattle virus (Donaire et al., 2009; Silva et al., 2011; Xia et al., 2014), indicating that the viral molecules that act as inducers of silencing can vary depending on the pathosystem. The structural features of the infectious viral RNA, the accessibility and subcellular localization of such RNA and/or of dsRNA replication intermediates, as well as the

particularities of the host RNA silencing machinery are most likely factors that influence the selection of viral triggers.

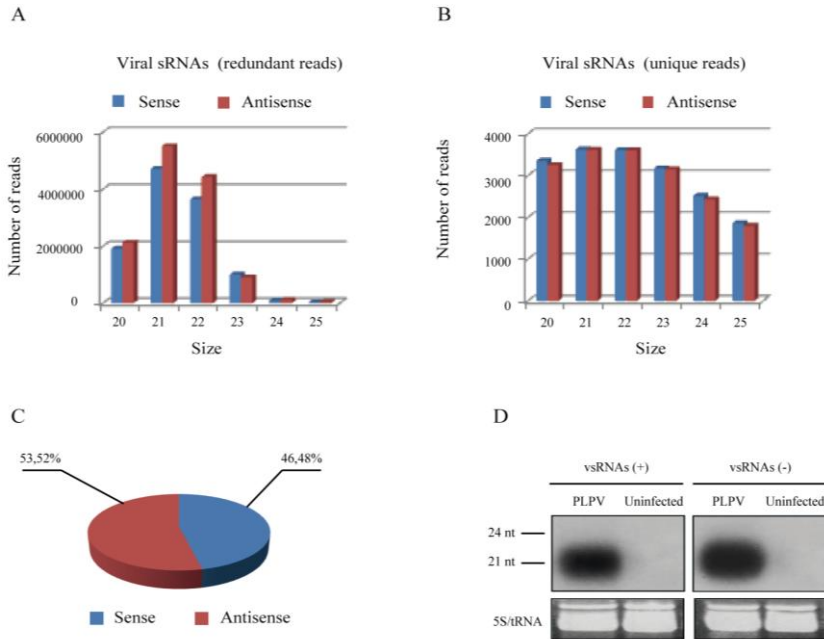


Fig 2. Analysis of the PLPV-vsRNA population. (A) Histogram showing the size and polarity distribution of vsRNA total reads ranging from 20 to 25 nt. **(B)** Histogram showing the size and polarity distribution of vsRNA non-redundant reads ranging from 20 to 25 nt. **(C)** Graphic representation of relative proportions of sense and antisense total (20-25 nt) vsRNA reads. **(D)** Northern blot for detection of sense (+) and antisense (-) vsRNAs in *N. benthamiana* plants.

PLPV sRNAs covered the entire viral genome with some specific regions up-represented

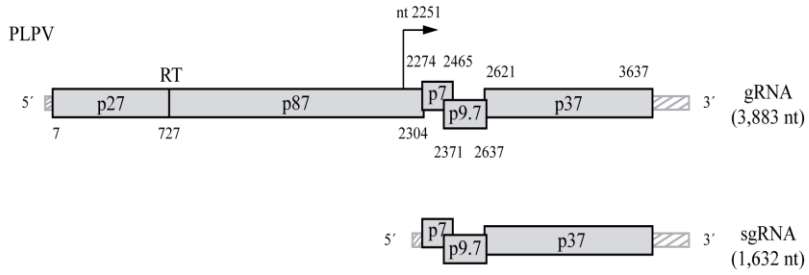
Mapping of vsRNAs on the PLPV genome revealed that those of either polarity encompassed the whole viral molecule, irrespectively of considering all vsRNA sizes or each size independently (Fig. 3). Indeed, all nucleotide positions in the genome were represented when plus or minus vsRNAs of any given size class were separately taken into account, with the only exception of the 5'-terminal 7 nt that were not covered by minus vsRNAs of 25 nt. This widespread distribution of vsRNAs of any size class paralleled that found in other plant-virus interactions (e.g., Donaire et al., 2009; Margaria et al., 2015; Ruiz-Ruiz et al., 2011; Szittyá et al., 2010) and suggested that all genomic positions can be targeted by the distinct DCL activities. The total number of vsRNAs derived from the 3'-terminal 1633 nt was slightly greater than that of those derived from the 5'-proximal 2250 nt (about 13,1 million *versus* 11,4 million), likely due to a higher amount of substrates from the former region because of the presence of the PLPV sgRNA. This accumulation trend was also found for vsRNAs of other viruses that produce sgRNAs and was particularly pronounced in the case of citrus tristeza virus (genus *Closterovirus*, family *Closteroviridae*), a pathogen that produces till ten sgRNAs 3'-coterminal with the gRNA (Donaire et al., 2009; Ruiz-Ruiz et al., 2011).

The distribution pattern drawn from sequencing data indicated the existence of several hotspots for PLPV sRNA production (Fig. 3). In order to assess the reliability of this picture, three probes of minus polarity were synthesized from viral regions with calculated high (nt 1230-1480, 1,554,403 viral reads), medium (nt 1800-2050, 673,215 viral reads), and low (nt 3550-3800, 232,957 viral reads), density of vsRNAs of plus polarity. Hybridization assays with these probes gave rise to strong, medium and weak signals, respectively, validating once more the sequencing information (Fig. 3D). RNA preparations of infected material from two distinct inoculation events (including the one used for vsRNA sequencing; Fig. 3D) displayed equivalent hybridization patterns (data not shown), indicating that the composition of the vsRNA pool is highly similar among distinct PLPV-infected plants. It is worth mentioning that, according the sequencing outcome, the hotspot profiles for vsRNAs of different size classes were very similar (Fig. 3B and data not shown), pointing to the existence of regions in the viral substrates that are preferentially targeted by all DCLs. Similar targeting affinities of the distinct DCLs towards regions of virus genomes have been reported previously (Donaire et al., 2009; Ruiz-Ruiz et al., 2011; Silva et al., 2011), though the factors that influence the selection of targets remain to be ascertained. It has been proposed that GC-

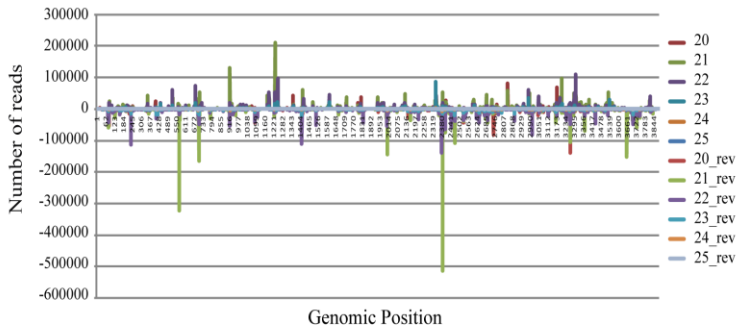
rich segments might provide a relatively more stable substrate for DCL processing (Ho et al., 2007). In agreement with this view, hotspots of vsRNAs that map on genomic stretches with a bias towards GC content have been found in some instances (Donaire et al., 2009; Ho et al., 2007). In contrast, no significant enrichment in GC content was recognized in hotspots for PLPV sRNA formation, suggesting that other factors must contribute to the choice of substrates by DCLs. Finally, it should be also noticed that hotspots of PLPV sRNAs were not necessarily coincidental in location on the positive and negative strand (Fig. 3C) despite, as indicated above, vsRNAs most likely originate from dsRNA precursors. Preferential stabilization of certain vsRNAs by binding to protein components (e.g.: p37, AGOs) or by chemical modifications might affect the relative abundance of vsRNAs in the plant cell.

Capítulo 3

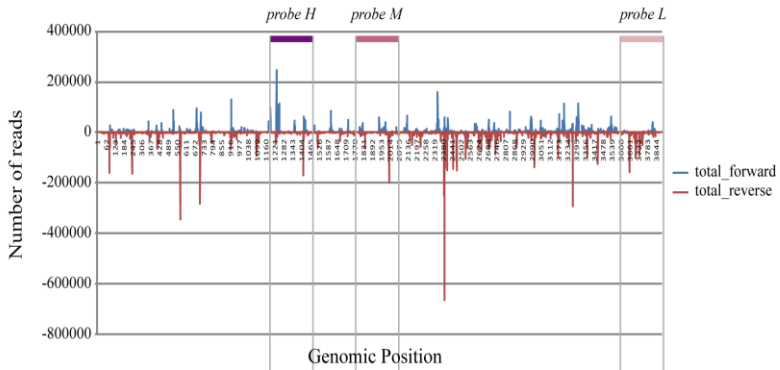
A



B



C



D



Fig 3. Distribution of vsRNAs from PLPV-infected *N. benthamiana* plants along the viral genome. (A) Schematic representation of PLPV gRNA and sgRNA. (B) Graph plotting total vsRNAs of each size that hit every genomic position. Sense and antisense vsRNAs are represented above and below x axis, respectively. (C) Graph plotting total vsRNAs, without size distinction, that hit every genomic position. Sense and antisense vsRNAs are represented above and below x axis, respectively. (D) Hybridization with probes of minus polarity derived from PLPV regions with presumed high, medium and low density of vsRNAs of plus polarity.

PLPV sRNAs display a bias in their 5'-terminal nucleotide

Analysis of the 5'-terminal nucleotides in the vsRNAs of 20-25 nt showed a bias towards those having an A or U in that position, either when considering redundant or non-redundant sequences (Fig. 4A). This unbalanced distribution is unlikely to result from the base composition of the PLPV genome which has an A, U, C and G content corresponding to 26.7%, 22.82%, 23.07% and 27.4%, respectively. The frequencies of the distinct residues at the 5'-terminus were more disproportionate when analysing redundant sequences, indicating preferential production/accumulation of vsRNAs bearing 5'-terminal U and, specially, A (Fig. 4A). Nevertheless, the percentage of vsRNAs harbouring a 5'-terminal G or C was neither negligible. Sense and antisense vsRNAs showed a differential distribution of 5'-terminal nucleotides with A, U and C being predominant in the

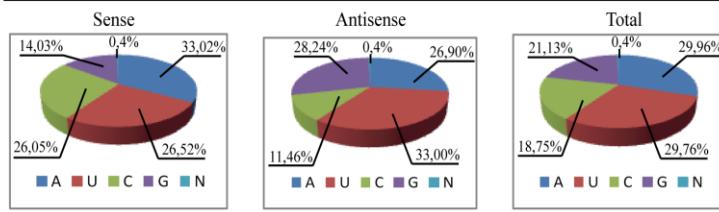
former ones, and U, G and A in the latter ones (Fig. 4A). The relative proportions of 5'-terminal residues were essentially maintained when vsRNAs were distinguished by size classes (Fig. 4B). The only exception corresponded to the pool of redundant sense vsRNAs of 23 nt in which those exhibiting a C at the 5'-terminus were more abundant than those harbouring an A, whereas those exhibiting a U or G had lower but similar frequencies (Fig. 4B). Collectively, these observations resemble those reported for vsRNAs derived from other plant RNA viruses, which also showed bias at the 5'-terminal nucleotide (Donaire et al., 2009; Mitter et al., 2013; Qi et al., 2009; Ruiz-Ruiz et al., 2011). Moreover, as for PLPV, a preponderance of A and U at the 5'-end of vsRNAs has been found in several instances (Donaire et al., 2009; Mitter et al., 2013) though putative implications of this finding are unclear. In any case, taking into account that incorporation of sRNAs into a particular AGO is dictated by the 5'-terminal nucleotide (Mi et al., 2008; Takeda et al., 2008), the diversity of residues at the 5'-terminus of PLPV sRNAs suggests they have the potential to be loaded in multiple AGO-containing complexes: Among them, those containing AGO1, AGO2 or AGO4 might be favoured since these proteins have preferred binding affinities by sRNAs with a 5'-terminal U (AGO1) or A (AGO2, AGO4) (Mi et al., 2008; Takeda et al., 2008). Strikingly, interactions between PLPV p37

and AGO1 and AGO4 have been detected (Pérez-Cañamás and Hernández, 2015) which could further suggest that these components of the silencing pathway have a major role in anti-PLPV defence. However, this observation has to be taken with caution since the significance of those interactions remains to be determined and, in addition, assessment of the association of PLPV p37 with other AGO proteins has yet to be performed.

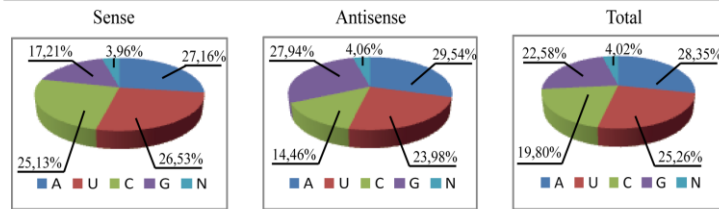
Capítulo 3

A

Redundant reads vsRNAs

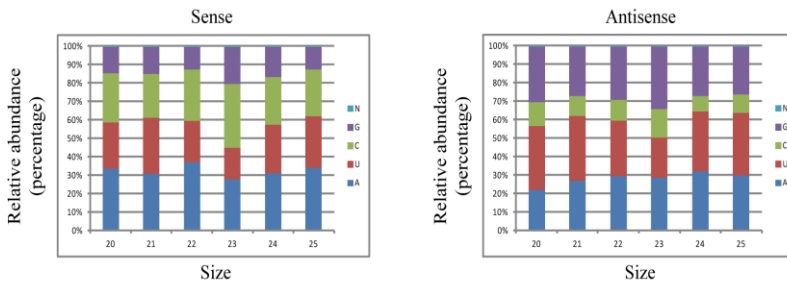


Unique reads vsRNAs



B

Redundant reads vsRNAs



Unique reads vsRNAs

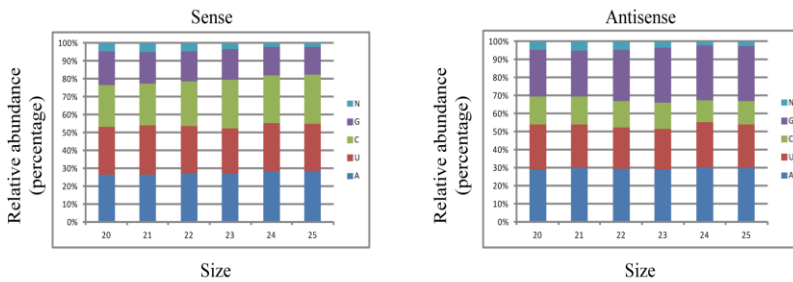


Fig 4. Distribution of vsRNAs 5'-terminal nucleotide. (A) Relative abundance of distinct 5'-terminal nucleotides in total (above) and non-redundant (below) vsRNAs (range 20-25 nt) from PLPV-infected plants. (B) Relative proportion of distinct 5'-terminal nucleotides in total PLPV sRNAs of every size (range 20-25 nt) and of plus (left) and minus (right) polarity.

CONCLUDING REMARKS

High-throughput sequencing of sRNAs has revealed that PLPV sRNAs represent an extraordinarily elevated fraction of total RNAs in virus-infected *N. benthamiana* leaves. The high effectiveness of the virus as trigger and target of RNA silencing must be one of the key factors determining the reduced viral titers that characterize PLPV infections. This result is surprising, particularly taking into account that PLPV encodes a strong VSR that should efficiently protect the virus against the silencing response of the host. Many factors may contribute to this observation such as for instance: i) modulation of the VSR expression/activity in the course of the infection (Pérez-Cañamás and Hernández, 2015), ii) unusual good accessibility of viral silencing inducers to the silencing machinery, or iii) major contribution of dicing *versus* slicing for defence against PLPV, as the dicing step would not be interfered by PLPV p37, an VSR that exerts its action mainly by sequestering vsRNAs, thus preventing their incorporation into RISC (Pérez-Cañamás and Hernández, 2015). In any case, the results presented here have

provided valuable information on potential host components involved in PLPV sRNA biogenesis and in anti-PLPV silencing. These data together with future investigations using genetic approaches similar to those employed in some other plant-virus interactions (Azevedo et al., 2010; Deleris et al., 2006; Morel et al., 2002; Scholthof et al., 2011), may help to get a clearer picture on the complex interplay between the virus and its host.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants BFU2009-11699 and BFU2012-36095 from the Ministerio de Investigación, Ciencia e Innovación (MICINN, Spain) and the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, Spain), respectively, and ACOMP/2012/100 to the Generalitat Valenciana (to C. H). We also thank the Bioinformatics Core Service at the IBMCP for the support provided in the bioinformatics analyses.

REFERENCES

Adams MJ, King AM, Carstens EB. 2013. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.* **158**: 2203-2203.

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

Azevedo J, García D, Pontier D, Ohnesorge S, Yu A, García S, Braun L, Bergdoll M, Hakimi MA, Lagrange T, Voinnet O. 2010. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev.* **24**: 904-915.

Baulcombe D. 2005. RNA silencing. *Trends Biochem Sci.* **30**: 290-293.

Blevins T, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, Beknazariants D, Si-Ammour A, Park HS, Vazquez F, Robertson D, Meins Jr F, Hohn T, Pooggin MM. 2006. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res.* **34**: 6233-6246.

Bouche N, Laressergues D, Gascioli V, Vaucheret H. 2006. An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and

a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *EMBO J.* **25**: 3347-3356.

Carbonell A, Carrington JC. 2015. Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Curr. Opin. Plant Biol.* **27**: 111-117.

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

Castaño A, Hernández C. 2007. Biological activity of transcripts from cDNA of *Pelargonium line pattern virus*. *Acta Virol.* **51**: 271-274.

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

Csorba T, Kontra L, Burgyán J. 2015. Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology.* **479-480C**: 85-103 .

Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O. 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science.* **313**: 68-71.

Díaz-Pendón JA, Li F, Li WX, Ding SW. 2007. Suppression of antiviral silencing by *Cucumber mosaic virus* 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell.* **19**: 2053-2063.

Ding SW. 2010. RNA based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**: 632-644.

Ding SW, Voinnet O. 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell.* **130**: 413-426.

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

Donaire L, Wang Y, González-Ibeas D, Mayer KF, Aranda MA, Llave C. 2009. Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology.* **392**: 203-214.

Fusaro AF, Matthew L, Smith NA, Curtin SJ, Dedic-Hagan J, Ellacott GA, Watson JM, Wang MB, Brosnan C, Carroll BJ, Waterhouse PM. 2006. RNA interference-inducing hairpin

RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO Rep.* **7**: 1168-1175.

García-Ruiz H, Takeda A, Chapman EJ, Sullivan CM, Fahlgren N, Brempelis KJ, Carrington JC. 2010. Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during *Turnip mosaic virus* infection. *Plant Cell.* **22**: 481-496.

Ghildiyal M, Zamore PD. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 94-108.

Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA. 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. Review. *Mol Plant Microbe Interact.* **21**: 1015-26.

Harvey JJ, Lewsey MG, Patel K, Westwood J, Heimstädt S, Carr JP, Baulcombe DC. 2011. An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One* **6**: e14639.

Ho T, Pallett D, Rusholme R, Dalmay T, Wang H. 2006. A simplified method for cloning of short interfering RNAs from *Brassica juncea* infected with turnip mosaic potyvirus and turnip crinkle carmovirus. *J. Virol. Methods.* **136**: 217-223.

Ho T, Wang H, Pallett D, Dalmay T. 2007. Evidence for targeting common siRNA hotspots and GC preference by plant Dicer-like proteins. *FEBS Lett.* **581**: 3267-3272.

Hu Q, Hollunder J, Niehl A, Kørner CJ, Gereige D, Windels D, Arnold A, Kuiper M, Vazquez F, Pooggin M, Heinlein M. 2011. Specific impact of tobamovirus infection on the Arabidopsis small RNA profile. *PLoS One.* **6**: e19549.

Hull R. 2014. Virus plant interactions: RNA silencing. *In: Matthew's Plant Virology. Academic Press, San Diego, CA*, pp. 477–530.

Ivars P, Alonso M, Borja M, Hernández C. 2004. Development of a non-radioactive dot-blot hybridisation assay for the detection of Pelargonium flower break virus and *Pelargonium line pattern virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* **110**: 275-283.

Kinard GR, Jordan R. 2002. Genome organization of pelargonium chlorotic ring pattern virus: further implications for *Tombusviridae* taxonomy. *Acta Hortic.* **568**: 17-27.

Li F, Ding SW. 2006. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 503-531.

Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. **25**: 1754-60.

Lin KY, Cheng CP, Chang CH, Wang WC, Huang YW, Hsu YH, Lin NS. 2010. Global analyses of small interfering RNAs derived from *Bamboo mosaic virus* and its associated satellite RNAs in different plants. *PLoS One*. **5**: e11928.

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

Margaria P, Miozzi L, Ciuffo M, Rosa C, Axtell MJ, Pappu HR, Turina M. 2015. Comparison of small RNA profiles in *Nicotiana benthamiana* and *Solanum lycopersicum* infected by *Polygonum ringspot tospovirus* reveals host-specific responses to viral infection. *Virus Res*. **211**: 38-45.

Margis R, Fusaro AF, Smith NA, Curtin SJ, Watson JM, Finnegan EJ, Waterhouse PM. 2006. The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Lett*. **580**: 2442-2450.

Mérai Z, Kerényi Z, Kertész S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J. Virol*. **80**: 5747-5756.

Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E et al. 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*. **133**: 116-127.

Mitter N, Koundal V, Williams S, Pappu H. 2013. Differential expression of Tomato spotted wilt virus derived viral small RNAs in infected commercial and experimental host plants. *PLoS One*. **8**: e76276.

Moazed D. 2009. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature*. **457**: 413-420.

Molnar A, Csorba T, Lakatos L, Varallyay E, Lacomme C, Burgyan J. 2005. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol*. **79**: 7812-7818.

Morel JB, Godon C, Mourrain P, Beclin C., Boutet S., Feuerbach F, Proux F, Vaucheret H. 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell*. **14**: 629-639.

Morin RD, Aksay G, Dolgosheina E, Ebhardt HA, Magrini V, Mardis ER, Sahinalp SC, Unrau PJ. 2008. Comparative analysis of the small RNA transcriptomes of *Pinus contorta* and *Oryza sativa*. *Genome Res*. **18**: 571-584.

Naim F, Nakasugi K, Crowhurst RN, Hilario E, Zwart AB, Hellens RP, Taylor JM, Waterhouse PM, Wood CC. 2012. Advanced engineering of lipid metabolism in *Nicotiana benthamiana* using a draft genome and the V2 viral silencing-suppressor protein. *PLoS ONE*. 7: e52717.

Pantaleo V, Saldarelli P, Miozzi L, Giampetruzzi A, Gisel A, Moxon S, Dalmay T, Bisztray G, Burgyan J. 2010. Deep sequencing analysis of viral short RNAs from a Pinot Noir infected grapevine. *Virology*. **408**: 49–56.

Pérez-Cañamás M, Hernández C. 2015. Key importance of small RNA binding for the activity of a glycine/tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *J. Biol. Chem.* **290**: 3106-31020.

Pickford AS, Cogoni C. 2003. RNA-mediated gene silencing. *Cell Mol. Life. Sci.* **60**: 871-882.

Pumplin N, Voinnet O. 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 745-760.

Qi X, Bao FS, Xie Z. 2009. Small RNA deep sequencing reveals role for *Arabidopsis thaliana* RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. *PLoS One*. **4**: e4971.

Qu F, Morris TJ. 2005. Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *FEBS Lett.* **579**: 5958-5964.

Qu F, Ye X, Morris TJ. 2008. *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**: 14732-14737.

Qu F, Ye X, Hou G, Sato S, Clemente TE, Morris J. 2005. RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *J. Virol.* **79**: 15209-15217.

Rochon D, Rubino L, Russo, M, Martelli GP, Lommel S. 2012. *Tombusviridae*. In King. AMQ: Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds). Virus taxonomy-Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London, pp 1111-1138.

Rochon D, Scheets K, White A, Martelli G, Rubino L. 2014. ICTV taxonomic proposal 2013.010a,bP.A.v2.Umbravirus_move. Move genus *Umbravirus* into family *Tombusviridae*. http://www.ictvonline.org/proposals-14/2013.010a,bP.A.v2.Umbravirus_move.pdf

Ruiz-Ruiz S, Navarro B, Gisel A, Peña L, Navarro L, Moreno P, Di Serio F, Flores R. 2011. Citrus tristeza virus infection induces the accumulation of viral small RNAs (21-24-nt) mapping preferentially at the 3'-terminal region of the genomic RNA and affects the host small RNA profile. *Plant Mol Biol.* **75**: 607-19.

Scholthof HB, AlvaradoVY, Vega-Arreguin JC, Ciomperlik J, Odokonyero D, Brosseau C, Jaubert M, Zamora A, Moffett P. 2011. Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* **156**: 1548-1555.

Scheets K, Jordan R, White KA, Hernández C. 2015. *Pelarspovirus*, a proposed new genus in the family *Tombusviridae*. *Arch Virol.* **160**: 2385-93.

Silva TF, Romanel EAC, Andrade RRS, Farinelli L, Osteras M, Deluen C, Correa RL, Schrago CEG, Vaslin MFS. 2011. Profile of small interfering RNAs from cotton plants infected with the polerovirus *Cotton leafroll dwarf virus*. *BMC Mol. Biol.* **12**: 40.

Szittyta G, Moxon S, Pantaleo V, Toth G, Rusholme Pilcher RL, Moulton V, Burgyan J, Dalmay T. 2010. Structural and functional analysis of viral siRNAs. *PLoS Pathog.* **6**: e1000838.

Szittyá G, Silhavy D., Molnár A, Havelda Z, Lovas A, Lakatos L, Bánfalvi Z, Burgyan J. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J.* **22**: 633-640.

Takeda A, Iwasaki S, Watanabe T, Utsumi M, Watanabe Y. 2008. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol.* **49**: 493-500.

Vaucheret H. 2006. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* **20**: 759-771.

Vaucheret H. 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci.* **13**: 350-358

Verwoerd TC, Dekker MM, Hoekema A. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* **17**: 2362.

Xia Z, Peng J, Li Y, Chen L, Li S, Zhou T, Fan Z. 2014. Characterization of small interfering RNAs derived from sugarcane mosaic virus in infected maize plants by deep sequencing. *PLoS One.* **9**: e97013.

Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC. 2004. Genetic and

functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* **2**: E104.

Xie Z, Qi X. 2008. Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1779**: 720-724.

Xu Y, Huang L, Fu S, Wu J, Zhou X. 2012. Population diversity of *Rice stripe virus*-derived siRNAs in three different hosts and RNAi-based antiviral immunity in *Laodelphax striatellus*. *PLoS One.* **7**: e46238.

Yan F, Zhang HM, Adams MJ, Yang J, Peng JJ et al. 2010. Characterization of siRNAs derived from *Rice stripe virus* in infected rice plants by deep sequencing. *Arch Virol.* **155**: 935-940.

Zhang X, Singh J, Li D, Qu F. 2012. Temperature-dependent survival of Turnip crinkle virus-infected arabidopsis plants relies on an RNA silencing-based defense that requires dcl2, AGO2, and HEN1. *J. Virol.* **86**: 6847-6854.

Discusión general

El PLPV (familia *Tombusviridae*) es uno de los patógenos virales con mayores porcentajes de incidencia en especies vegetales del género *Pelargonium*. El pequeño tamaño de su genoma unido a su organización genómica sencilla y a su capacidad para infectar huéspedes experimentales diversos (incluyendo *N. benthamiana*, una especie modelo dentro de la Biología Vegetal; Goodin *et al.*, 2008), lo convierten en un sistema muy adecuado para estudiar aspectos básicos de la interacción virus-planta a nivel molecular. Trabajos previos con este agente infeccioso habían permitido determinar su organización genómica, disponer de un clon infeccioso, obtener datos sobre su variabilidad molecular, identificar funciones de las proteínas que codifica y recabar información valiosa acerca de sus mecanismos de traducción. Los resultados presentados en esta memoria han permitido profundizar en el conocimiento de estos últimos y, además, han desvelado aspectos relevantes sobre la etapa de transcripción del virus y sobre algunos de los procesos de degradación a los que se encuentra sometido.

La transcripción del único sgrNA del PLPV sigue un modelo de terminación prematura en el que está implicada una interacción RNA:RNA a larga distancia

Una de las características distintivas de los miembros del género propuesto *Pelarspovirus* (del que el PLPV sería el

miembro tipo) respecto a los del género *Carmovirus*, con los que están estrechamente relacionados estructural y filogenéticamente, es la producción de un solo sgRNA para la expresión de los genes situados en la mitad 3'-proximal del genoma, en contraste con los dos sgRNAs que generan los carmovirus (Scheets *et al.*, 2015). La síntesis de este tipo de RNAs subvirales va a permitir, no sólo la traducción de genes que son inaccesibles a la maquinaria traduccional del huésped en el contexto del genoma viral, sino también una regulación temporal y cuantitativa de dicha traducción. Se trata, pues, de un proceso esencial en el ciclo biológico de los virus de RNA (+) que siguen esta estrategia de expresión génica, por lo que ha recibido una atención considerable en la investigación de numerosos virus tanto de animales como de plantas (Jiwan y White, 2011; Sola *et al.*, 2011; Sztuba-Solińska, *et al.*, 2011; White *et al.*, 2011).

De los tres modelos propuestos para la generación de sgRNAs, síntesis discontinua, iniciación interna y terminación prematura (PT), sólo los dos últimos parecen aplicables a virus de plantas (Sztuba-Solińska, *et al.*, 2011). Entre ellos, la iniciación interna era considerado el más común mientras que el mecanismo de terminación prematura había sido propuesto en casos muy contados (White, 2002). En los últimos años, estudios realizados con distintos miembros de la familia

Tombusviridae han puesto de manifiesto que el mecanismo de PT podría no ser tan anecdótico como se suponía (Jiwan y White, 2011). A la vista de estos resultados y para ampliar nuestro conocimiento sobre cómo el PLPV regula aspectos tan fundamentales como la transcripción y, en consecuencia, la expresión génica, uno de los objetivos de este trabajo ha sido el estudio del mecanismo por el cuál el virus produce su sgRNA. Mediante una aproximación de mutagénesis y agroinoculación, se han obtenido resultados que indican que la producción de dicho sgRNA sigue un modelo de PT. Estos resultados se suman pues a los obtenidos con miembros de cinco de los trece géneros actualmente incluidos en la familia *Tombusviridae*, concretamente con el TBSV (género *Tombusvirus*) (Choi *et al.*, 2001; Choi y White, 2002; Lin y White, 2004), el CLSV (género *Aureusvirus*) (Xu y White, 2008; 2009), el TCV (género *Carmovirus*) (Wu *et al.*, 2010), el TNV-D (genus *Betanecrovirus*) (Jiwan *et al.*, 2011), y el RCNMV (genus *Dianthovirus*) (Sit *et al.*, 1998).

La generación del sgRNA del PLPV cumple con las premisas que se han establecido para el modelo de PT: a) se detectan formas negativas de la molécula en tejido infectado, b) su síntesis se puede desacoplar de la de las correspondientes cadenas negativas que, además, parece ser anterior, c) un elemento estructural probablemente provoca la parada y

disociación de la RDR viral durante la síntesis de cadenas negativas actuando, pues, como señal de atenuación, y, d) los presuntos promotores de la síntesis de cadenas positivas del gRNA y del sg mRNA presentan semejanzas a nivel de secuencia. Uno de los aspectos más remarcables del proceso de transcripción en el PLPV es la participación de dos segmentos del gRNA viral, AS y RS, separados por una distancia de más de 900 nt en la formación de la señal atenuadora. Como se ha comentado en el Capítulo 1, una situación similar se ha descrito para la formación de sgRNAs de dos miembros de la familia *Tombusviridae*, el TBSV y el CLSV (Choi *et al.*, 2001; Choi y White, 2002; Lin y White, 2004; Xu y White, 2008). Una situación incluso más extrema se da en el RCNMV, donde los elementos AS y RS se localizan en distintos componentes genómicos gracias al carácter bipartito del genoma de este virus (Sit *et al.*, 1998), en contraposición con los genomas monopartitos del resto de especies virales para las que se ha propuesto un mecanismo de PT.Cuál o cuáles pueden ser las ventajas de una localización distante de los elementos AS y RS es una cuestión por determinar. Sin embargo, una posibilidad es que este tipo de localización contribuya a la selección de moléculas viables en la población viral, ya que aquellas que tengan mutaciones muy drásticas tendrán probablemente afectado su plegamiento, lo que repercutirá en el

establecimiento de la interacción AS/RS. La falta de formación de un sgRNA a partir de estas moléculas, evitará el reclutamiento de la RDR viral para copiar moléculas de reducida eficacia biológica con lo que esta enzima quedará disponible para otros moldes. Otra cuestión relacionada para la que se dispone de poca información, es si la interacción AS/RS es suficiente para provocar la parada de la RDR viral o bien sirve como elemento nucleador de una estructura de orden superior, que podría aglutinar tanto a otros elementos del RNA viral como a algún componente proteico. En este sentido, tal como se ha comentado en el Capítulo 1, la presencia de estructuras de tipo horquilla adyacentes al elemento RS podría favorecer el apilamiento de hélices, lo que obstaculizaría el avance de la RDR de forma más eficaz que la mera interacción AS/RS. A esto hay que unir la observación de pequeños segmentos de complementariedad entre las secuencias 3' adyacentes al elemento AS y 5' adyacentes al elemento RS (datos no mostrados), lo que facilitaría la formación de una estructura compleja con un entramado de interacciones notable, de forma similar a lo propuesto en el caso del TBSV (Choi y White, 2002).

En el modelo de PT, el extremo 3' de las cadenas negativas del sgRNA debe funcionar como promotor de la síntesis de las cadenas de polaridad positiva. Así pues, la principal diferencia desde un punto mecanístico entre los

procesos de replicación y transcripción sería la forma en la que se genera el molde de polaridad negativa: terminación prematura en sitios internos del molde de polaridad positiva *versus* terminación en el extremo 5' de dicho molde. Como se ha propuesto previamente (Jiwan y White, 2011), el mecanismo de PT probablemente surgió como un medio de reposicionar a un promotor de tipo genómico situado internamente en una localización 3' terminal, dotándole de mayor exposición (Panavas *et al.*, 2003). La relativa similitud de secuencia entre el promotor genómico y subgenómico es consistente con esta posibilidad y con el reconocimiento de ambos por la RDR viral. Es interesante mencionar a este respecto que, en el caso del TBSV, se han obtenido datos que sugieren que los procesos de replicación y de transcripción pueden ser desacoplados (Wu y White, 2007), una cuestión sumamente interesante ya que podría indicar que ambos procesos están sustentados por complejos replicativos distintos y que podrían diferir en su composición. No obstante, será necesario ampliar las investigaciones sobre este punto para poder disponer de información más concluyente al respecto.

Aunque el diseño de mutaciones para evaluar la relevancia potencial de la interacción RNA-RNA a larga distancia predicha *in silico* se ha visto limitada por la naturaleza codificante de los elementos AS y RS, los resultados han puesto

de manifiesto que la interacción silvestre puede ser remplazada por interacciones similares que preservan la funcionalidad a nivel transcripcional. No obstante, los virus con las interacciones alternativas, aunque viables a nivel de infección local, no fueron capaces de dispersarse en la planta de forma sistémica. Como se ha indicado en el Capítulo 1, las razones de esta incapacidad no están claras, aunque es muy posible que se deba en gran parte a la acumulación reducida de los mutantes en hojas locales con respecto a lo observado para el virus silvestre. Esta acumulación reducida, provocada probablemente por una replicación menos eficaz por parte de las correspondientes RDRs mutadas, puede limitar notablemente la eficiencia de salida del virus desde la hoja local al sistema vascular. En este contexto, estudios recientes han mostrado que la concentración de virus “circulante” en dicho sistema puede condicionar notablemente el progreso de una infección a nivel sistémico (Gutiérrez *et al.*, 2012). Más aún, aunque se produjera la entrada de virus en tejido sistémico, la población “fundadora” sería de un tamaño mínimo lo que, unido a la actividad subóptima de las RDRs mutadas, podría bloquear el establecimiento de la infección en otros puntos de la planta (Gutiérrez *et al.*, 2010; 2012). Es reseñable también la aparente rigidez de la secuencia de la RDR viral, ya que la introducción de mutaciones nucleotídicas en el gen p87 no

conservadoras a nivel de aminoácido fue letal en todos los casos (Capítulo 1). En este sentido, un estudio previo de variabilidad del PLPV ya había puesto de manifiesto que la RDR debe encontrarse bajo fuertes presiones selectivas pues su conservación (al menos de estimaciones deducidas de su región C-terminal) entre distintos aislados era superior que la que presentaban las proteínas p7, p9.7 o p37 (Castaño *et al.*, 2009).

Por último, destacar que nuestros resultados en este apartado unidos a los obtenidos previamente con miembros de la familia *Tombusviridae* (Jiwan y White, 2011) apoyan que el modelo de PT podría estar generalizado en dicha familia y, quizá en otros virus de RNA de polaridad positiva. En este sentido, este modelo se ha propuesto también para la generación de sgRNAs del CTV (Gowda *et al.*, 2001) e incluso de algunos virus de animales (Lindenbach *et al.*, 2002; van Vliet *et al.*, 2002), y también se ha sugerido para la síntesis de sgRNAs de algún virus de plantas de polaridad negativa (Goldbach y Peters., 1996; Geerts-Dimitriadou *et al.*, 2012). Será interesante ver si nuevos trabajos en este campo extienden la prevalencia del modelo de PT a otros grupos virales.

Un elemento de la región 3' del PLPV actúa como un estimulador de la traducción independiente de cap (CITE)

Además de la información recabada acerca de la regulación de la expresión génica del PLPV a nivel transcripcional, en este trabajo se han obtenido datos adicionales acerca de dicha regulación a nivel traduccional. Dichos datos han permitido corroborar que los RNAs virales (g y sg), a pesar de carecer de una estructura cap en 5' y de una cola poli(A) en 3', son capaces de traducirse eficientemente gracias a la presencia de un CITE en su 3' UTR. Este CITE es además de la clase TED, un tipo de CITE que había sido estudiado previamente sólo en el STNV, un virus satélite cuyo genoma está constituido por 1063 nt y que contiene exclusivamente un gen que codifica la CP que lo encapsida (Danthinne *et al.*, 1993; Timmer *et al.*, 1993).

Los resultados de este trabajo han permitido corroborar la funcionalidad del PLPV-TED *in vivo* y, además, han demostrado que dicha funcionalidad depende del establecimiento de una interacción RNA-RNA a larga distancia entre el CITE y la región 5' del RNA correspondiente. Aunque en el caso del STNV se había apuntado también la posibilidad de una comunicación entre el TED y la región 5' del RNA en base a la existencia de distintos segmentos de complementariedad entre ambos elementos, las aproximaciones experimentales para evaluar este supuesto no permitieron confirmar el establecimiento de una interacción a larga distancia (Meulewater *et al.*, 1998). Se

planteó, pues, que la comunicación 5'-3' podría producirse por otras vías como: a) el plegamiento global del RNA que podría aproximar los dos extremos de la molécula (van Lipzig *et al.*, 2002), b) interacciones RNA-proteína (Gazo *et al.*, 2004) o, c) interacciones simultáneas de las regiones 5' y 3' con el rRNA 18S, al haberse detectado cierta complementariedad (Meulewater *et al.*, 1998). Sin embargo, no existe apoyo experimental claro para ninguno de estos modelos y, a la vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo con el PLPV-TED, sería conveniente evaluar de nuevo el posible papel de interacciones RNA-RNA a larga distancia en la actividad del STNV-TED. De hecho, en la mayoría de los casos de CITEs en los que se ha analizado la relevancia potencial de este tipo de interacciones, se ha visto que eran fundamentales para la actividad del elemento traduccional. Esto es aplicable a CITEs de prácticamente todas las clases incluyendo a los del tipo BTE (Guo *et al.*, 2001; Rakotondrafara *et al.*, 2006), PTE (Chattopadhyay *et al.*, 2011), YSS (Fabian y White, 2004; 2006) e ISS (indicado como resultados no publicados en Miras *et al.*, 2014). Sin embargo, en varios casos particulares no se pudo confirmar la relevancia de las interacciones 5'-3' CITE predichas, como ocurre con el CITE-BTE del RCNMV (Sarawaneeyaruk *et al.*, 2009) o el CITE-PTE del RNA 2 del PEMV (Wang *et al.*, 2009). En estos casos, es posible que haya interacciones redundantes

que no se hayan mutado simultáneamente o que se hayan excluido de las construcciones deladoras, tal como se ha sugerido recientemente (Simon y Miller, 2013). De hecho, tal como se ha comentado en la Introducción, estudios recientes han puesto de manifiesto que el RNA 2 del PEMV contiene, además del CITE-PTE, hasta dos CITEs adicionales (kl-TSS y 3' TSS) que, junto con algún otro elemento estructural de la 3' UTR, parecen facilitar la comunicación entre las regiones 5' y 3' del RNA viral (Gao *et al.*, 2012; 2014). Cabe no obstante señalar, que en el caso del CITE-TSS del TCV, ni tan siquiera se ha podido predecir una interacción entre el mismo y la región 5' de la molécula viral, de modo que se ha propuesto que la aproximación entre las dos regiones estaría mediada por interacciones proteína-proteína debido a la unión de la región 5' a la subunidad 40S del ribosoma y la del CITE a la subunidad 60S (Stupina *et al.*, 2011).

Los datos mencionados anteriormente sugieren que la comunicación entre cualquier CITE y la región 5' es indispensable, como cabe esperar si el CITE promueve la traducción de la ORF 5' proximal. Esta comunicación supone una pseudocircularización del mRNA viral similar a la descrita en mRNAs típicos y, como en ellos, debe favorecer el reciclaje de factores esenciales en distintas rondas de traducción (Well *et al.*, 1998). Sin embargo, es curioso que la adición de cap a

mutantes del gRNA del PLPV sin un CITE funcional permitió que se tradujeran muy eficientemente, de hecho tan eficientemente como el gRNA silvestre con estructura cap, a pesar de que en este último el CITE podía establecer una interacción con la región 5' mientras que no ocurría así en los mutantes (Figura 5 de Capítulo 2). Esta observación, unida a algunos trabajos que indican que ciertos CITEs pueden ser desplazados a una posición 5' proximal sin perder su funcionalidad (Guo *et al.*, 2000; Meulewaeter *et al.*, 1998; Rakotondrafara *et al.*, 2006), podría indicar que la circularización del mensajero no es un factor tan crítico durante la traducción. No se puede descartar, no obstante, que otras interacciones en el mRNA viral que no involucren al CITE puedan facilitar el acercamiento entre los extremos de la molécula.

Los resultados mostrados en el Capítulo 2 también han puesto de manifiesto que los lazos del CITE y de la horquilla del gRNA (o del sgRNA) implicados en la interacción RNA-RNA a larga distancia requerida en traducción, admiten bastante variabilidad (siempre que se preserve la interacción) en ensayos de traducción *in vivo*. Aunque existen precedentes de ello en otros CITEs (Fabian y White, 2004), esto sorprende en cierta manera ya que, si las predicciones *in silico* son correctas, las secuencias de dichos lazos están estrictamente conservada entre pelarspovirus. Más aún, estas secuencias de interacción

estarían conservadas no sólo entre pelarspovirus sino, al menos parcialmente, también en virus relacionados pero con otros tipos de CITE. De hecho, tal como se ha resaltado recientemente (Simon y Miller, 2013), las secuencias de interacción entre el 3' CITE y una horquilla 5' proximal se ajustarían a los motivos YGCCA/UGGCR (Y: pirimidina, R: purina) en carmovirus y pelarspovirus, independientemente de que el CITE sea del tipo TED, como ocurre en pelarspovirus, o del tipo PTE o ISS como ocurre en los distintos carmovirus. Puesto que, como se ha indicado anteriormente, esta conservación parece prescindible para traducción, es probable que esté condicionada por la naturaleza codificante del elemento adaptador de 5'. En este sentido, la localización de dicho elemento adaptador en el gRNA es similar en todos los pelarspovirus (Figura 8, Capítulo 2) y la secuencia del lazo en todos los casos codifica el doblete de amino ácidos LeuAla que está, además, incluido en un motivo bastante conservado en las proteínas p27/RDR de las distintas especies virales (datos no mostrados). Es pues razonable pensar que el mantenimiento de este motivo debe ser importante para el funcionamiento de las replicasas y, probablemente, determina la secuencia del lazo terminal del CITE. Los resultados de los bioensayos de mutantes del PLPV TED (Tabla 1, Capítulo 2) son consistentes con esta posibilidad y subrayan el delicado equilibrio al que está

sometido el genoma del virus: las interacciones del CITE con las regiones 5' del gRNA y del sgRNA deben mantenerse y esto no debe repercutir sustancialmente en la actividad de proteínas virales.

Aparte del lazo apical, otras dos características estructurales del PLPV TED se han revelado como importantes para su función: la estabilidad de la hélice en la base de dicho lazo y la presencia de un lazo protuberante lateral en la parte 3' constituido por 7 nt. La relevancia de este lazo lateral no es sorprendente ya que lazos similares, aunque variables en secuencia y longitud (Figura 2 en Capítulo 2), se pueden predecir en todos los CITEs de tipo TED postulados hasta el momento. El significado biológico preciso de este lazo está por determinar pero, tal como se ha comentado previamente en Capítulo 2, muy probablemente confiere a la estructura la flexibilidad adecuada para facilitar su interacción con el adaptador de 5'. Alternativamente, este tipo de estructuras se han identificado en RNAs muy diversos como sitios de unión a proteínas, tal como se ha descrito, por ejemplo, en el caso del motivo de reconocimiento del genoma del fago R17 por su CP (Wu y Uhlenbeck, 1987), en el elemento de respuesta al transactivador reconocido por la proteína TAT del virus de la inmunodeficiencia humana (Roy *et al.*, 1990) o en el motivo de unión de la proteína S8 al RNA ribosomal 16S (Wu *et al.*, 1994).

La falta de actividad *in vitro* del TED del PLPV dificulta tanto la identificación del factor (o factores) reclutados por este elemento traduccional como la caracterización de los motivos estructurales que participan directamente en este reclutamiento. El abordaje de esta cuestión en el futuro requerirá el desarrollo de herramientas apropiadas.

El PLPV como inductor y diana del mecanismo antiviral del huésped basado en el silenciamiento por RNA: características de los vsRNAs resultantes de este proceso

La caracterización de los vsRNAs en tejido infectado por el PLPV ha mostrado que el virus es un potente inductor y diana muy accesible del proceso de silenciamiento, ya que la proporción de vsRNAs en plantas infectadas es extraordinariamente elevada. De hecho, de acuerdo con lo descrito en otras interacciones planta-virus, sería uno de los casos más extremos descritos de abundancia relativa de vsRNAs, ya que normalmente estos últimos representan desde un 0.5%, o incluso menos (ej: Mitter *et al.*, 2013; Donaire *et al.*, 2009) hasta alrededor de un 65% (ej: Donaire *et al.*, 2009; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011; Margaria *et al.*, 2015) del total de sRNAs en tejido infectado. Esta observación podría, al menos en parte, explicar la habitual baja acumulación del virus (< 5 µg de partículas víricas por g de tejido infectado; Ivars *et al.*, 2004).

No obstante, no se puede excluir que más factores contribuyan a esta baja acumulación como, por ejemplo, una reducida tasa de replicación (relacionada de algún modo con su eficiencia traduccional, ya que de esta depende la producción de p27/p87) o un movimiento célula a célula relativamente ineficaz que dificulte o ralentice la dispersión del virus en la planta. El hecho de que los vsRNAs de polaridad positiva y negativa estén muy igualados sugiere que los dsRNAs virales disparan el silenciamiento y son los sustratos de las DCLs. Aunque esta situación es similar a la encontrada en otras interacciones planta-virus (Donaire *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2014), en otros casos se ha encontrado una considerable prevalencia de vsRNAs de polaridad positiva (Molnar *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2006; Donaire *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2009; Szittyá *et al.*, 2010). Las razones de esta prevalencia no están claras y, como se ha indicado en el Capítulo 3, podría indicar que la molécula viral infecciosa es la diana principal de la actividad DCL, en particular, las regiones con alta estructura secundaria del genoma (Donaité *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2009). Sin embargo, en la mayoría de los casos no se ha podido establecer una correlación clara entre *hotspots* de vsRNAs y regiones particularmente estructuradas del gRNA (Donaire *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2009), de modo que también se ha propuesto que podrían estar reflejando diferencias en la

contribución de las distintas vías de formación de dsRNAs virales o la participación de proteínas virales o celulares en la estabilización de determinados vsRNAs. Asimismo, también se ha sugerido que ciertas marcas estructurales o bioquímicas podrían estar asociadas a la cadena positiva del vsRNA favoreciendo su reclutamiento selectivo en proteínas AGO y, por tanto, su estabilización (Donaire *et al.*, 2009). En cualquier caso, la mayor abundancia de vsRNAs de polaridad positiva no es incompatible con el procesamiento del dsRNAs dependientes de RDR como está ejemplificado por los vsRNAs del TMV o del TRV (Donaire *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2009). En lo que respecta al PLPV, si las moléculas de dsRNA son los precursores mayoritarios de los vsRNAs, la actividad RDR implicada en la síntesis de estas moléculas podría ser la codificada por el virus (correspondiendo los dsRNAs a intermediarios replicativos), alguna(s) de las codificada(s) por la planta o, más probablemente, una combinación de los dos tipos de RDR. Cabe señalar que, como se ha sugerido previamente (Axtell *et al.*, 2006; Curaba y Chen, 2008), las características atípicas de algunos RNAs virales podrían hacer que la planta los reconociera como RNAs aberrantes, estimulando especialmente su utilización como sustratos por las RDR celulares. Esto podría ser particularmente relevante para el

PLPV, cuyos RNAs carecen de la estructura cap y de la cola poli(A) presentes en los extremos 5' y 3' de los mRNAs típicos.

La población de sRNAs del PLPV también se caracteriza por un predominio de aquellos con un tamaño de 21 y 22 nt, en especial de los primeros, reproduciendo lo observado en la mayoría de infecciones virales y apuntando a las enzimas DCL4 y DCL2 como las principales responsables de la generación de los vsRNAs (Blevins *et al.*, 2006; Bouche *et al.*, 2006; Deleris *et al.*, 2006; Donaire *et al.*, 2009). Las distintas actividades DCL que actúan sobre el PLPV parecen, además, tener afinidades similares por las distintas partes de las moléculas inductoras, ya que el perfil de distribución y abundancia relativa de vsRNAs a lo largo del genoma viral fue similar independientemente del tamaño de vsRNA considerado (Figura 3 del Capítulo 3). Más aún, el genoma viral completo podía ser reconstruido con el grupo de vsRNAs de cada clase de tamaño, y cada posición nucleotídica podía ser reconocida como sitio de corte para la formación de vsRNAs, también en consonancia con lo descrito para otros virus en huéspedes muy diversos (Donaire *et al.*, 2009; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011; Margaria *et al.*, 2015). Estas observaciones indican que, a pesar de las particularidades que deben existir entre genomas virales y maquinarias de silenciamiento de distintas especies vegetales, el proceso de

silenciamiento antiviral presenta características que están bastante conservadas entre distintos patosistemas.

La presencia de los cuatro tipos de nucleótidos en el extremo 5' de los sRNAs del PLPV nos ha permitido sugerir que distintas proteínas AGO podrían estar implicadas en la respuesta de silenciamiento frente al virus. Entre ellas, podrían destacar AGO1, AGO2 y AGO4, que son la que muestran mayor afinidad por sRNAs con una U o una A en el extremo 5' (Mi *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008), los nucleótidos predominantes en la población de vsRNAs. La participación de estas AGOs en respuesta frente a distintos virus en diferentes especies vegetales se ha descrito previamente (Morel *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2008; Harvey *et al.*, 2011; Scholthof *et al.*, 2011; Carbonell y Carrington, 2015) y, más aún, para algunas de ellas se ha demostrado su unión a sRNAs de origen viral o subviral (Takeda *et al.*, 2008; Minoia *et al.*, 2014). La gran cantidad de vsRNAs encontrados, su gran diversidad de secuencia y la posibilidad de que puedan ser cargados en múltiples AGOs, además de condicionar el título del virus, podrían tener efectos diversos sobre el huésped, que derivarían de la existencia de complementariedad de bases entre los vsRNAs y genes de la planta. Algunos de estos efectos podrían favorecer el progreso de la infección viral, mediante mecanismos de PTGS o de TGS, mientras que otros podrían ser fortuitos. De hecho, se han

descrito algunos ejemplos de interacciones funcionales entre sRNAs derivados de patógenos virales o subvirales y mRNAs de la planta, que son responsables de, al menos, parte de la sintomatología causada por el patógeno correspondiente (Shimura *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2012; Miozzi *et al.*, 2013). Interacciones con implicaciones fenotípicas de este tipo no parecen ocurrir en el caso del PLPV, ya que sus infecciones son asintomáticas. Si esta característica es el resultado de un proceso de selección positiva durante la evolución del virus para reducir su impacto sobre el huésped o es fruto de una casualidad, es una cuestión actualmente abierta.

Para finalizar, aparte de lo ya mencionado anteriormente, los resultados presentados en este trabajo han subrayado la relevancia tanto de regiones del RNA viral como del plegamiento global de la molécula en la regulación de etapas esenciales del ciclo infeccioso del PLPV. Este papel regulador, que debe involucrar una red compleja de interacciones RNA-RNA al igual que se ha propuesto para otros virus (Wu *et al.*, 2013; Newburn y White, 2015), debe ser tan importante como el papel codificante del genoma en la determinación de la estructura molecular de las poblaciones virales.

Conclusiones

Conclusiones

1. La síntesis del único sgRNA del PLPV se ajusta muy probablemente, a un modelo de terminación prematura. En este proceso participa una interacción RNA-RNA a larga distancia que actúa en *cis* en el gRNA de polaridad positiva y que dirige específicamente la formación del sgRNA de polaridad negativa. Esta interacción puede ser remplazada por otras que son equivalentes desde un punto de vista transcripcional, pero que aparentemente disminuyen la eficacia del virus probablemente al afectar otros aspectos del ciclo biológico del mismo.
2. Análisis *in silico* han revelado interacciones RNA-RNA a larga distancia similares a la que dirige la generación del sgRNA del PLPV en virus estrechamente relacionados lo que, unido a datos previos, sugiere que el modelo de terminación prematura podría ser aplicable a un número amplio de miembros de la familia *Tombusviridae*.
3. Se ha demostrado la funcionalidad *in vivo* de un CITE de tipo TED predicho con anterioridad en la 3' UTR del PLPV. Además, se ha constado que el CITE es activo tanto en el gRNA como en el sgRNA y se ha puesto de manifiesto que, en ambos casos, su actividad depende

del establecimiento de una interacción RNA-RNA a larga distancia con una estructura en horquilla de la región 5'.

4. Se han obtenido datos que apoyan la relevancia del CITE durante el ciclo infeccioso del virus y que, además, sugieren que el papel regulador y codificante de las secuencias 5'-proximales con las que interacciona, impone fuertes restricciones a la estructura de las poblaciones virales.

5. La caracterización de vsRNAs en plantas de *N. benthamiana* infectadas por el PLPV, ha revelado que el virus es un potente inductor y diana de procesos de silenciamiento por RNA. El perfil general de estos vsRNAs sugiere que dsRNAs virales son los principales sustratos para su generación, que DCL4 y DCL2 actúan preferentemente sobre dichos sustratos con especial afinidad por determinadas regiones, y que distintas proteínas AGO podrían estar implicadas en la respuesta antiviral del huésped.

Bibliografia

Bibliografía

Adams MJ, King AM, Carstens EB. 2013. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.* **158**: 2023-203.

Adkins S, Kao CC. 1998. Subgenomic RNA promoters dictate the mode of recognition by bromoviral RNA-dependent RNA polymerases. *Virology.* **252**: 1–8.

Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* **67**: 657–685.

Agrios GN. 2005. *Plant pathology, 5th edn. Elsevier-Academic Press, San Diego*

Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC. 2005. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell.* **121**: 207-221.

Alonso M, Gisbert E, Fraga M, Borja M. 1999. Sintomatología de los virus que infectan geranio. *Libro de resúmenes del VI Congreso Nacional de Virología.* **136.**

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

Axtell MJ, Jan C, Rajagopalan R, Bartel DP. 2006. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell*. **127**: 565–577.

Azevedo J, Garcia D, Pontier D, Ohnesorge S, Yu A, Garcia S, Braun L, Bergdoll M, Hakimi MA, Lagrange T, Voinnet O. 2010. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev*. **24**: 904-15.

Balmori E, Gilmer D, Richards K, Guilley H, Jonard G. 1993. Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Biochimie*. **75**: 517-521.

Balvay L, Rifo RS, Ricci EP, Decimo D, Ohlmann T. 2009. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Gene Regul. Mech.* **1789**: 542–557.

Barends S, Rudinger-Thirion J, Florentz C, Giegé R, Pleij CWA, Kraal B. 2004. tRNA-like structure regulates translation of Brome mosaic virus RNA. *Journal of Virology*. **78**: 4003-4010.

Barry JK, Miller WA. 2002. A programmed -1 ribosomal frameshift that requires base-pairing across four kilobases suggests a novel mechanism for controlling ribosome and replicase traffic on a viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 11133–11138.

Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. **116**: 281-297.

Basnayake VR, Sit TL, Lommel SA. 2006. The genomic RNA packaging scheme of *Red clover necrotic mosaic virus*. *Virology*. **345**: 532-539.

Basso J, Dallaire P, Charest PJ, Devantier Y, Laliberte JF. 1994. Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of turnip mosaic potyvirus RNA. *J Gen Virol*. **75**: 3157-3165.

Batten JS, Desvoyes B, Yamamura Y, Scholthof KB. 2006. A translational enhancer element on the 3'-proximal end of the *Panicum mosaic virus* genome. *FEBS Lett*. **580**: 2591-97.

Baulcombe DC. 2004. RNA silencing in plants. *Nature*. **431**: 356-363.

Baumberger N, Baulcombe D C. 2005. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **102**: 11928-11933.

Baumberger N, Tsai CH, Lie M, Havecker E, Baulcombe DC. 2007. The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol*. **17**: 1609–1614.

Bertram G, Innes S, Minella O, Richardson J, Stansfield I. 2001. Endless possibilities: translation termination and stop codon recognition. *Microbiology*. 2001. **147**: 255-69.

Blevins T, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, Beknazariants D, Si-Ammour A, Park HS, Vazquez F, Robertson D, Meins Jr F, Hohn T, Pooggin MM. 2006. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res.* **34**: 6233–6246.

Boevink P, Oparka KJ. 2005. Virus-host interactions during movement processes. *Plant Physiol.* **138**: 1815-1821.

Bol JF. 2005. Replication of alfamo- and ilarviruses: role of the coat protein. *Annu Rev Phytopathol.* **43**: 39-62.

Borsani O, Zhu J, Verslues PE, et al., 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell.* **123**: 1279-1291.

Bouche N, Laressergues D, Gascioli V, Vaucheret H. 2006. An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *EMBO J.* **25**: 3347-3356.

Bouwen I, Maat DZ. 1992. *Pelargonium flower-break* and *Pelargonium line pattern* viruses in the Netherlands;

Bibliografia

purification, antiserum preparation, serological identification, and detection in pelargonium by ELISA. *Neth J Plant Pathol.* **98**: 141-156.

Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O. 2008. Wide spread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science.* **320**: 1185–1190.

Brosnan C.A., Mitter N., Christie M., Smith N.A., Waterhouse P.M, Carroll B.J. 2007. Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 14741–14746.

Browning KS, Webster C, Roberts JK, Ravel JM. 1992. Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J Biol Chem.* **267**(14): 10096-100.

Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ. 1996. *Pelargonium flower break virus* and *Pelargonium line pattern virus*. *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database.* Version: 16th January (1997). URL (<http://biology.anu.edu.au./Groups/MES/vide/>, 21.09.01).

Bibliografia

Buchon N, Vaury C. 2006. RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements. *Heredity (Edinb)*. **96**: 195-202.

Buck KW. 1996. Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Adv Virus Res*. **47**: 159–251.

Buck KW. 1999. Replication of tobacco mosaic virus RNA. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. **354**: 613-627.

Burgyán J, Havelda Z. 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci*. **16**: 265-72.

Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, Gilbert KB, Montgomery TA, Nguyen T, Cuperus JT, Carrington JC. 2012. Functional analysis of three *Arabidopsis* ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell*. **24**: 3613-3629.

Carbonell A, Carrington JC. 2015. Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Curr. Opin. Plant Biol*. **27**: 111–117.

Carstens EB. 2010. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*. **155**: 133–146.

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

Castaño A, Hernández C. 2007. Biological activity of transcripts from cDNA of *Pelargonium line pattern virus*. *Acta Virol.* **51**: 271–274.

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

Chattopadhyay M, Shi K, Yuan X, Simon AE. 2011. Long-distance kissing loop interactions between a 3' proximal Y-shaped structure and apical loops of 5' hairpins enhance translation of *Saguaro cactus virus*. *Virology.* **417**: 113–25.

Chattopadhyay M, Kuhlmann MM, Kumar K, Simon AE. 2014. Position of the kissing-loop interaction associated with PTE-type 3' CITEs can affect enhancement of cap-independent translation. *Virology.* **0**: 43–52.

Che X, Piestun D, Mawassi M, Yang G, Satyanarayana T, Gowda S, Dawson WO, Bar-Joseph M. 2001. 5' Coterminial

Bibliografia

Subgenomic RNAs in Citrus Tristeza Virus-Infected Cells
Virology. **283**: 374-381.

Cheng CP, Nagy PD. 2003. Mechanism of RNA recombination in carmo- and tombusviruses: evidence for template switching by the RNA-dependent RNA polymerase in vitro. *J. Virol.* **77**: 12033–12047.

Chetverin AB, Kopein DS, Chetverina HV, Demidenko AA, Ugarov VI. 2005. Viral RNA-directed RNA polymerases use diverse mechanisms to promote recombination between RNA molecules. *J. Biol. Chem.* **280**: 8748–8755.

Chicas A, Macino G. 2001. Characteristics of post-transcriptional gene silencing. *EMBO Rep.* **11**: 992-996.

Chitwood DH, Timmermans MCP. 2010. Small RNAs are on the move. *Nature*. **467**: 415-419.

Choi IR, Ostrovsky M, Zhang G, White KA. 2001. Regulatory activity of distal and core RNA elements in tombusvirus subgenomic mRNA2 transcription. *J. Biol. Chem.* **276**: 41761-8.

Choi IR, White KA. 2002. An RNA activator of subgenomic mRNA1 transcription in tomato bushy stunt virus. *J. Biol. Chem.* **277**: 3760-6.

Csorba T, Pantaleo V, Burgyán J. 2009. RNA Silencing: An antiviral Mechanism. *Advances in Virus Research.* **75**: 0065-3527.

Csorba T, Kontra L, Burgyán J. 2015. Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology.* **479-480C**: 85-103.

Curaba J, Chen X. 2008. Biochemical activities of Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase 6. *J. Biol. Chem.* **283**: 3059-3066.

Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC. 2000. An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell.* **101**: 543–553.

Dalmay TD, Horsefield R, Braunstein TH, Baulcombe DC. 2001. *SDE3* encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *EMBO J.* **20**: 2069-2078.

Danthinne X, Seurinck J, Meulewaeter F, Van Montagu M, Cornelissen M. 1993. The 3' untranslated region of satellite tobacco necrosis virus RNA stimulates translation in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 3340–49.

Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O. 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science*. **313**: 68–71.

den Boon JA, Ahlquist P. 2010. Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**: 241-256.

Díaz JA, Nieto C, Moriones E, Truniger V, Aranda MA. 2004. Molecular characterization of a Melon necrotic spot virus strain that overcomes the resistance in melon and nonhost plants. *Mol Plant Microbe Interact.* **17**: 668–675.

Díaz-Pendón JA, Li F, Li WX, Ding SW. 2007. Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell.* **19**: 2053–2063.

Díaz-Pendón JA, Ding SW. 2008. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol.* **46**: 303-26.

Ding SW, Voinnet O. 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell.* **130**: 413–426.

Ding SW. 2010. RNA based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**: 632-644.

Dlagic M. 2006. DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold. *Bioinformatics.***22**: 2711–2714.

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

Donaire L, Wang Y, Gonzalez-Ibeas D, Mayer KF, Aranda MA, Llave C. 2009. Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology.* **392**: 203-214.

Dorokhov YL, Skulachev MV, Ivanov PA, Zvereva SD, Tjulkina LG, Merits A, Gleba YY, Hohn TJ, Atabekov JG. 2002. Polypurine (A)-rich sequences promote cross-kingdom conservation of internal ribosome entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 5301–5306.

Dougherty WG, Lindbo JL, Smith HA, Parks TD, Swaney S & Proebsting WM. 1994. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: Exploitation of a cellular pathway possibly

involved in RNA degradation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **7**: 544-552.

Dreher TW, Miller WA. 2006. Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology*. **344**: 185-197.

Dugeon G, Urcuqui-Inchima S, Milner M, Kadaré G, Valle RPC, Voyatzakis A, Haenni A-L, Schirawski J. 1999. The strategies of plant virus gene expression: Models of economy. *Plant Sci*. **148**: 77-88.

Dunoyer P, Schott G, Himber C, Meyer D, Takeda A, Carrington JC, et al. 2010. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science*. **328**: 912–916.

Fabian MR, White KA. 2004. 5′-3′ RNA-RNA interaction facilitates cap- and poly(A) tail-independent translation of Tomato bushy stunt virus mRNA: a potential common mechanism for Tombusviridae. *J. Biol. Chem.* **279**: 28862–72.

Fabian MR, White KA. 2006. Analysis of a 3′-translation enhancer in a tombusvirus: a dynamic model for RNA-RNA interactions of mRNA termini. *RNA*. **12**: 1304–14.

Finnegan EJ, Margis R, Waterhouse PM. 2003. Post-transcriptional gene silencing is not compromised in the

Bibliografia

Arabidopsis CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) mutant, a homolog of Dicer-1 from *Drosophila*. *Curr. Biol.* **13**: 236-240.

Firth AE, Brierley I. 2012. Non-canonical translation in RNA viruses. *J.Gen.Virol.* **93**: 1385–1409.

Franck A, Loebenstein G. 1994. Virus and virus-like diseases of *Pelargonium* in Israel. *Acta Hortic.* **377**: 31–39.

French R, Ahlquist P. 1988. Characterization and engineering of sequences controlling in vivo synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA. *J. Virol.* **62**: 2411-2420.

Fukunaga R, Doudna JA. 2009. dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *EMBO J.* **28**: 545-55.

Furuchi Y, Shatkin AJ. 2000. Viral and cellular mRNA capping: Past and prospects. *Adv. Virus Res.* **55**: 135-184.

Fusaro AF, Matthew L, Smith NA, Curtin SJ, Dedic-Hagan J, Ellacott GA, Watson JM, Wang MB, Brosnan C, Carroll BJ, Waterhouse PM. 2006. RNA interference inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO Rep.* **7**: 1168–1175.

Fütterer J, Kiss-László Z, Hohn T. 1993. Nonlinear ribosome migration on *Cauliflower mosaic virus* pregenomic 35S RNA. *Cell*. **73**: 789-802.

Gale M Jr, Tan SL, Katze MG. 2000. Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 239-280.

Galiakparov N, Goszczynski DE, Che X, Batuman O, Bar-Joseph M, Mawassi M. 2003. Two classes of subgenomic RNA of Grapevine virus A produced by internal controller elements. *Virology*. **312**: 434–448.

Gallie DR. 1991. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* **5**: 2108-2116.

Gallie DR. 1993. Post-translational regulation of gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 77-105.

Gallie DR. 1996. Translational control of cellular and viral mRNAs. *Plant Mol. Biol.* **32**: 145-158.

Gallie DR. 1998. A tale of two termini: A functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene*. **216**: 1-11.

Gallie DR. 2001. Cap-independent translation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *J Virol.* **75**: 12141–12152.

Gallie D. 2002. Protein-protein interactions required during translation. *Plant Molecular Biology.* **50**: 949-970.

Gao F, Kasprzak W, Stupina VA, Shapiro BA, Simon AE. 2012. A ribosome-binding 3' translational enhancer has a T-shaped structure and engages in a long-distance RNA-RNA interaction. *J. Virol.* **86**: 9828–42.

Gao F, Kasprzak WK, Szarko C, Shapiro BA, Simon AE. 2014. The 3' untranslated region of Pea Enation Mosaic Virus contains two T-shaped, ribosome-binding, cap-independent translation enhancers. *J Virol.* **88**: 11696-712.

García-Ruíz H, Takeda A, Chapman EJ, Sullivan CM, Fahlgren N, Brempelis KJ, Carrington JC. 2010. *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and Dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during *Turnip mosaic virus* infection. *Plant Cell.* **22**: 481-496.

Gazo BM, Murphy P, Gatchel JR, Browning KS. 2004. A novel interaction of cap-binding protein complexes eukaryotic initiation factor (eIF) 4F and eIF(iso)4F with a region in the 3'-

untranslated region of satellite tobacco necrosis virus. *J. Biol. Chem.* **279**: 13584–92.

Geerts-Dimitriadou C, Lu Y, Geertsema C, Goldbach R, Kormelink R. 2012. Analysis of the Tomato spotted wilt virus ambisense S RNA-encoded hairpin structure in translation. *PLoS ONE* **7**: e31013.

Gergerich RC, Dolja VV. 2006. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *The Plant Health Instructor*.

Ghoshal B, Sanfaçon. 2015. Symptom recovery in virus-infected plants: Revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology.* **479-480**: 167-179.

Giner A, Lakatos L, Garcia-Chapa M, Lopez-Moya JJ, Burgyan J. 2010. Viral Protein Inhibits RISC Activity by Argonaute Binding through Conserved WG/GW Motifs. *Plos Pathog.* **6(7)**.

Glazov E, Phillips K, Budziszewski GJ, Schob H, Meins Jr F, Levin JZ. 2003. A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for post-transcriptional silencing in Arabidopsis. *Plant J.* **35**: 342–349.

Glick E, Zrachya A, Levy Y, Mett A, Gidoni D, Belausov E, Citovsky V, Gafni Y. 2008. Interaction with host SGS3 is

required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**: 157-61.

Goldbach R, Peters D. 1996. Molecular and biological aspects of tospoviruses. In: *Elliot, R.M. (Ed.), The Bunyaviridae. Plenum Press, New York*, pp. 129–157.

Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA. 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. Review. *Mol Plant Microbe Interact.* **21**: 1015-26.

Gordon K, Fütterer J, Hohn T. 1992. Efficient initiation of translation at non-AUG triplets in plant cells. *Plant J.* **2**: 809-813.

Gowda S, Satyanarayana T, Ayllon MA, Albiach-Marti MR, Mawassi M, Rabindran S, Garnsey SM, Dawson WO. 2001. Characterization of the cis-acting elements controlling subgenomic mRNAs of citrus tristeza virus: production of positive and negative-stranded 3'-terminal and positive-stranded 5'-terminal RNAs. *Virology.* **286**: 134–51.

Gowda S, Ayllón MA, Satyanarayana T, Bar-Joseph M, Dawson WO. 2003. Transcription strategy in a closterovirus: a novel 5'-proximal controller element of citrus tristeza virus produces 5'-

and 3'-terminal subgenomic RNAs and differs from 3'-open reading frame controller elements. *J. Virol.* **77**: 340–352.

Grzelishvili VZ, Chapman SN, Dawson WO, Lewandowski DJ. 2000. Mapping of the tobacco mosaic virus movement protein and coat protein subgenomic RNA promoters in vivo. *Virology.* **275**: 177–192.

Guenther RH, Sit TL, Gracz HS, Dolan MA, Townsend HL, Liu G, Newman WH, Agris PF, Lommel SA. 2004. Structural characterization of an intermolecular RNA–RNA interaction involved in the transcription regulation element of a bipartite plant virus. *Nucleic Acids Res.* **32**: 2819–2828.

Guo L, Allen E, Miller WA. 2000. Structure and function of a cap-independent translation element that functions in either the 3' or the 5' untranslated region. *RNA.* **6**: 1808–20.

Guo L, Allen EM, Miller WA. 2001. Base-pairing between untranslated regions facilitates translation of uncapped, nonpolyadenylated virus RNA. *Mol. Cell.* **7**: 1103-1109.

Gutiérrez S, Yvon M, Thébaud G, Monsion B, Michalakis Y, Blanc S. 2010. Dynamics of the multiplicity of cellular infection in a plant virus. *PLoS Pathog.* **6**:e1001113.

Gutiérrez S, Yvon M, Pirolles E, Garzo E, Fereres A, Michalakis Y, et al. 2012. Circulating virus load determines the size of bottlenecks in viral populations progressing within a host. *PLoS Pathog.* **8**:e1003009.

Haasnoot PCJ, Olsthoorn RCL, Bol JF. 2002. The Brome mosaic virus subgenomic promoter hairpin is structurally similar to the iron-responsive element and functionally equivalent to the minus-strand core promoter stem-loop C. *RNA.* **8**: 110–122.

Harries P, Ding B. 2011. Cellular factors in plant virus movement: at the leading edge of macromolecular trafficking in plants. *Virology.* **411**: 237-243.

Harris CJ, Molnar A, Müller SY, Baulcombe DC. 2015. NAR FDF-PAGE: a powerful technique revealing previously undetected small RNAs sequestered by complementary transcripts. *Nucleic Acids Research.* **43**: 7590-7599.

Harvey JJW, Lewsey MG, Patel K, Westwood J, Heimsta S, Carr J P, et al. 2011. An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS ONE* **6**:e14639 10.1371/journal.pone.0014639

He L, Hannon GJ. 2004. MicroRNAs: Small RNAs with a Big Role in Gene Regulation. *Nature Reviews Genetics.* **5**: 522-531.

Henderson IR, Zhang X, Lu C, Johnson L, Meyers BC, Green PJ, Jacobsen SE. 2006. Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nature Genetics*. **38**: 721-725.

Hentze MW, Gebauer F, Preiss T. 2007. Cis-Regulatory Sequences and trans-Acting Factors in Translational Control. *Translational Control in Biology and Medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, pp. 269-295.

Herranz MC, Navarro JA, Sommen E, Pallas V. 2015. Comparative analysis among the small RNA populations of source, sink and conductive tissues in two different plant-virus pathosystems. *BMC Genomics*. **16**: 117.

Hilf ME, Karasev AV, Pappu HR, Gumpf DJ, Niblett CL, Garnsey SM. 1995. Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected plants. *Virology*. **208**: 576-582.

Hiraguri A, Itoh R, Kondo N, Nomura Y, Aizawa D, Murai Y, Koiwa H, Seki M, Shinozaki K, Fukuhara T. 2005. Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **57**: 173–188.

Ho T, Pallett D, Rusholme R, Dalmay T, Wang H. 2006. A simplified method for cloning of short interfering RNAs from *Brassica juncea* infected with turnip mosaic potyvirus and turnip crinkle carmovirus. *J. Virol. Methods.* **136**: 217-223.

Ho T, Wang H, Pallett D, Dalmay T. 2007. Evidence for targeting common siRNA hotspots and GC preference by plant Dicer-like proteins. *FEBS Lett.* **581**: 3267–3272.

Hull R. 2002. *Matthews' Plant Virology. 4th Edition. Academic Press, San Diego, CA.*

Hull R. 2008. History of Virology. Plant Viruses. Encyclopedia of Virology, vol 2. Academic Press, San Diego

Hull R. 2014. Chapter 7- Replication of Plant Viruses. Plant Virology (Fifth Edition), 341-421

Hunter TR, Hunt T, Knowland J, Zimmern D. 1976. Messenger RNA for the coat protein of *Tobacco mosaic virus*. *Nature (London).* **260**: 759-764.

Incarbone M, Dunoyer P. 2013. RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends Plant Sci.* **18**: 382-392.

Ivanov PA, Karpova OV, Skulachev MV, Tomashevskaya OL, Rodionova NP, Dorokhov YL, Atabekov JG. 1997. A tobamovirus genome that contains an internal ribosome entry site functional in vitro. *Virology*. **232**: 32–43.

Ivars P, Alonso M, Borja M, Hernández C. 2004. Development of a non-radioactive dot-blot hybridisation assay for the detection of *Pelargonium flower break virus* and *Pelargonium line pattern virus*. *Eur J Plant Pathol*. **110**: 275-83.

Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **11**: 113–27.

Jacobson A. 1996. Poly(A) metabolism and translation: The closed-loop model. In *Translational control* (ed. N. Sonenberg). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp. 451–480.

Jang SK, Kriusslich H-G, Nicklin MJH, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. 1988. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol*. **62**: 2636-2643.

Jiwan SD, White KA. 2011. Subgenomic mRNA transcription in *Tombusviridae*. *RNA Biology*. **8:2**, 287-294.

Jiwan SD, Wu B, White KA. 2011. Subgenomic mRNA transcription in *tobacco necrosis virus*. *Virology*. **418**: 1-11.

Johnston JC, Rochon DM. 1995. Deletion analysis of the promoter for the cucumber necrosis virus 0.9-kb subgenomic RNA. *Virology*. **214**: 100-109.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP. 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol. Cell*. **14**: 787–799.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**:19–53

Joshi CP, Zhou H, Huang X, Chiang VL. 1997. Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Mol. Biol.* **35**: 993-1001.

Kartiyar-Agarwal S, Gao S, Vivian-Smith A, Jin H. 2006. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **103**: 18002-18007.

Khan, M. A., Yumak, H., Gallie, D. R., Goss, D. J. 2008. Effects of poly(A)-binding protein on the interactions of translation initiation factor eIF4F and eIF4F.4B with internal ribosome

Bibliografia

entry site (IRES) of tobacco etch virus RNA. *Biochim. Biophys. Acta* **1779**: 622-627.

Kidner CA, Martienssen RA. 2005. The developmental role of microRNA in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 38–44.

Kim VN. 2008. Sorting out small RNAs. *Cell.* **133**: 25-26.

Kinard GR, Hurtt SS, Jordan RL. 1996. Partial characterization of pelargonium line pattern and pelargonium ringspot viruses. *Acta Hortic.* **432**: 48-155.

Kinard GR, Jordan R. 2002. Genome organization of *Pelargonium chlorotic ring pattern virus*: further implications for *Tombusviridae* taxonomy. *Acta Hortic.* **568**: 17-27.

King AMQ, Adams MJ, Lefkowitz EJ. 2011. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Elsevier Ltd, Oxford*

Kneller ELP, Rakotondrafara AM, Miller WA. 2006. Cap-independent translation of plant viral RNAs *Virus Research.* **119**: 63-75.

Koev G, Mohan BR, Miller WA. 1999. Primary and secondary structural elements required for synthesis of barley yellow dwarf virus subgenomic *RNA1*. *J. Virol.* **73**: 2876–2885.

Koev G, Miller WA. 2000. A positive-strand RNA virus with three very different subgenomic RNA promoters. *J Virol.* **74**: 5988-5996.

Koonin EV, Dolja VV. 1993. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28 (5): 375-430.

Kozak, M. 1989. Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eukaryotic cell free translation systems. *Mol. Cell Biol.* **9**: 5134-5142.

Kozak M. 1991. Structural features of eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *Journal of Biological Chemistry.* **266**: 19867-19870.

Kozak M. 1994. Determinants of translational fidelity and efficiency in vertebrate mRNAs. *Biochimie.* **76**: 815-821.

Kozak M. 2002. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene.* **299**: 1–34

Krab IM, Caldwell C, Gallie DR, Bol JF. 2005. Coat protein enhances translational efficiency of Alfalfa mosaic virus RNAs and interacts with the eIF4G component of initiation factor eIF4F. *Journal of General Virology*. **86**: 1841-1849.

Kraft JJ, Treder K, Peterson MS, Miller WA. 2013. Cation-dependent folding of cap-independent translation elements facilitates interaction of a 17 nucleotide conserved sequence with eIF4G. *Nucleic Acids Res.* **41**: 3398–413.

Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja VV, Calvino LF, Lopez-Moya JJ, Burgyan J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* **25**: 2768–2780.

Laliberte JF, Sanfacon H. 2010. Cellular remodeling during plant virus infection. *Annu Rev. Phytopathol.* **48**:69–91

Léonard S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin MG, Laliberte JF. 2000. Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J. Virol.* **74**: 7730–7737.

Li JJ, Yang ZY, Yu B, Liu J, Chen XM. 2005. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **15**: 1501-1507.

Li F, Ding SW. 2006. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA silencing immunity. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 503–531.

Lin H, White KA. 2004. A complex network of RNA-RNA interactions controls subgenomic mRNA transcription in a tombusvirus. *EMBO J.* **23**: 3365-74.

Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM, Dougherty WG. 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell.* **5**: 1749-1759.

Lindenbach BD, Sgro JY, Ahlquist P. 2002. Long-distance base pairing in flock house virus RNA1 regulates subgenomic RNA3 synthesis and RNA2 replication. *J Virol.* **76**: 3905-19.

Liu Q, Feng Y, Zhu Z. 2009. Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Funct Integr Genomics.* **9**: 277-86.

Llave C. 2010. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci.* **15**: 701-7.

Lukaszewicz M, Feuermann M, Jerouville B, Stas A, Boutry M. 2000. In vivo evaluation of the context sequence of the translation initiation codon in plants. *Plant Sci.* **154**: 89-98.

Lutcke HA, Chow KC, Mickel FS, Moss KA, Kern HF, Scheele GA. 1987. Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.*, **6**: 43–48.

Macrae IJ, Li F, Zhou K, Cande WZ, Doudna JA. 2006. Structure of Dicer and mechanistic implications for RNAi. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **71**: 73-80.

Man M, Epel BL. 2004. Characterization of regulatory elements within the coat protein (CP) coding region of Tobacco mosaic virus affecting subgenomic transcription and green fluorescent protein expression from the CP subgenomic RNA promoter. *Journal of General Virology.* **85**: 1727-1738.

Mandahar CL. 2006. Multiplication of RNA plant viruses. Dordrecht, The Netherlands: Springer. p 339 ISBN: 978-1-4020-4724-4.

Margarita P, Bosco L, Vallino M, Ciuffo M, Mautino GC, Tavella L, Turina M. 2014. The NSs protein of Tomato spotted wilt virus is required for persistent infection and transmission by *Frankliniella occidentalis*. *J. Virol.* **88**: 5788-5802.

Margarita P, Miozzi L, Ciuffo M, Rosa C, Axtell MJ, Pappu HR, Turina M. 2015. Comparison of small RNA profiles in *Nicotiana benthamiana* and *Solanum lycopersicum* infected by

polygonum ringspot tospovirus reveals host-specific responses to viral infection. *Virus Res.* **211**: 38-45.

Margis R, Fusaro AF, Smith NA, Curtin SJ, Watson JM, Finnegan EJ, Waterhouse PM. 2006. The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Lett.* **580**: 2442-2450.

Marsh LE, Dreher TW, Hall TC. 1988. Mutational analysis of the core and modulator sequences of the BMV RNA3 subgenomic promoter. *Nucleic Acids Res.* **16**: 981-995.

Matsuda D, Dreher TW. 2004. The tRNA-like structure of *turnip yellow mosaic virus* RNA is a 3'-translational enhancer. *Virology.* **321**: 36-46.

Matzke MA, Matzke AJ, Pruss GJ, Vence VB. 2001. RNA-based silencing strategies in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**: 221-227.

McCormack JC, Yuan X, Yingling YG, Kasprzak W, Zamora RE, et al. 2008. Structural domains within the 3'untranslated region of *Turnip crinkle virus*. *J. Virol.* **82**: 8706–20.

Melnyk CW, Molnár A, Baulcombe DC. 2011. Intercellular and systematic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.* **30**: 3553-3563.

Meng Y, Shao C, Wang H, Chen M. 2011. The Regulatory Activities of Plant MicroRNAs: A More Dynamic Perspective. *Plant Physiology*. **257**: 1583-1595.

Mérai Z, Kerényi Z, Kertész S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol*. **80**: 5747-56.

Merits A, Rajamäki ML, Lindholm P, Runeberg-Roos P, Kekarainen T, Puustinen P, Mäkeläinen K, Valkonen JP, Saarma M. 2002. Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *J. Gen Virol*. **83**: 1211-21.

Metz AM, Wong KCH, Malmström SA, Browning KS. 1999. Eukaryotic initiation factor 4B from wheat and *Arabidopsis thaliana* is a member of a multigene family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **266**: 314-321.

Meulewaeter F, Danthinne X, van Montagu M, Cornelissen M. 1998. 5'- and 3'-sequences of satellite tobacco necrosis virus RNA promoting translation in tobacco. *The Plant Journal*. **14**: 169-176.

Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, Bartel DP, Baulcombe D, Bowman JL, Cao X, Carrington JC, Chen X, Green PJ, Griffiths-Jones S, Jacobsen SE, Mallory AC, Martienssen RA, Poethig RS, Qi Y, Vaucheret H, Voinnet O, Watanabe Y, Weigel D, Zhu JK. 2008. Criteria for annotation of plant microRNAs. *Plant Cell*. **20**: 3186–3190.

Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, Ni F, Wu L, Li S, Zhou H, Long C, Chen S, Hannon GJ, Qi Y. 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*. **133**: 116–127.

Miller WA, Dreher TW, Hall TC. 1985. Synthesis of bromemosaic virus subgenomic RNA in vitro by internal initiation on (-)-sense genomic RNA. *Nature*. **313**: 68–70.

Miller WA, Dinesh-Kumar SP, Paul CP. 1995. Luteovirus gene expression. *Crit. Rev. Plant Sci*. **14**: 179-211.

Miller WA, Koev G. 2000. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology*. **273**: 1–8.

Miller WA, Wang Z, Treder K. 2007. The amazing diversity of capindependent translation elements in the 3'-untranslated regions of plant viral RNAs. *Biochem. Soc. Trans*. **35**: 1629–1633.

Miller WA, Giedroc DP. 2010. Ribosomal frameshifting in decoding plant viral RNAs. In recoding: expansion of decoding rules enriches gene expression. *Nucleic Acids and Molecular Biology.* **24:** 193–220.

Minoia S, Carbonell A, Di Serio F, Gisel A, Carrington JC, Navarro B, Flores R. 2014. Specific argonautes selectively bind small RNAs derived from potato spindle tuber viroid and attenuate viroid accumulation in vivo. *J Virol.* **88:**11933-45.

Miozzi L, Gambino G, Burgyan J, Pantaleo V. 2013. Genome-wide identification of viral and host transcripts targeted by viral siRNAs in *Vitis vinifera*. *Mol Plant Pathol.* **14:**30-43.

Miras M, Sempere RN, Kraft JJ, Miller WA, Aranda MA, Truniger V. 2014. Interfamilial recombination between viruses led to acquisition of a novel translation-enhancing RNA element that allows resistance breaking. *New Phytologist.* **202:** 233-46.

Mitter N, Koundal V, Williams S, Pappu H. 2013. Differential expression of Tomato spotted wilt virus derived viral small RNAs in infected commercial and experimental host plants. *PLoS One.* **8:** e76276.

Moissiard G, Voinnet O. 2004. Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol. Plant. Pathol.* **5:** 71- 82.

Moissiard G, Voinnet O. 2006. RNA silencing of host transcripts by Cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 19593–19598.

Molnar A, Csorba T, Lakatos L, Varallyay E, Lacomme C, Burgyan J. 2005. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol.* **79**: 7812–7818.

Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R, Baulcombe DC. 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science.* **328**: 872–875

Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, Li D, Hansen JE, Alexander AL, Chapman EJ, Fahlgren N, Allen E, Carrington JC. 2008. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell.* **133**: 128-141.

Morel J-B, Godon C, Mourrain P, Beclin C, Boutet S, Feuerbach F, Proux F, Vaucheret H. 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell.* **14**: 629–639.

Morris T, Carrington J. 1988. *Carnation mottle virus* and viruses with similar properties. In: Koenig R (ed). *The plant viruses*, vol 3: Polyhedral virions with monopartite RNA genomes. *Plenum Press, New York*, pp 73–112.

Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H. 2000. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*. **101**: 533–542.

Nagy PD, Pogany J. 2008. Multiple roles of viral replication proteins in plant RNA virus replication. *Methods Mol Biol*. **451**: 55-68.

Nagy PD, Pogany J. 2012. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nature reviews. Microbiology*. **10**: 137-149.

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

Nayudu MV. 2008. *Plant viruses*. Tata Mc Graw—Hill Publishing Company Limited, New Delhi, p 1249.

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

Newburn LR, White KA. 2015. Cis acting elements in positive – strand RNA plant virus genomes. *Virology.* **479-480C**: 434-443.

Nicholson BL, White KA. 2008. Context-influenced cap-independent translation of *Tombusvirus* mRNAs in vitro. *Virology.* **380**: 203-212.

Nicholson BL, Wu B, Chevtchenko I, White KA. 2010. Tombusvirus recruitment of host translational machinery via the 3' UTR. *RNA.* **16**: 1402–19.

Nicholson BL, White KA. 2011. 3' Cap-independent translation enhancers of positive-strand RNA plant viruses. *Curr. Opin. Virol.* **1**: 373-80.

Nicholson BL, Zaslaver O, Mayberry LK, Browning KS, White KA. 2013. Tombusvirus Y-shaped translational enhancer forms a complex with eIF4F and can be functionally replaced by heterologous translational enhancers. *J. Virol.* **87**: 1872–83.

Nieto C, Morales M, Orjeda G, Clepet C, Monfort A, Sturbois B, Puigdomenech P, Pitrat M, Caboche M, Dogimont C, et al.

Bibliografía

2006. An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and nonpolyadenylated RNA virus in melon. *Plant J.* **48**: 452–462.

Nieto C, Rodriguez-Moreno L, Rodriguez-Hernandez AM, Aranda MA, Truniger V. 2011. *Nicotiana benthamiana* resistance to non-adapted *Melon necrotic spot virus* results from an incompatible interaction between virus RNA and translation initiation factor 4E. *Plant J.* **66**: 492–501.

Panavas T, Panaviene Z, Pogany J, Nagy PD. 2003. Enhancement of RNA synthesis by promoter duplication in tombusviruses. *Virology.* **310**:118-29.

Pantaleo V. 2011. Plant RNA silencing in viral defence. *Adv. Exp. Med. Biol.* **722**: 39-58.

Pelletier J, Sonenberg N. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature.* **334**: 320–325.

Peremyslov VV, Dolja VV. 2002. Identification of the Subgenomic mRNAs That Encode 6-kDa Movement Protein and Hsp70 Homolog of Beet Yellow Virus. *Virology.* **295**: 299-306.

Pérez-Cañamás M, Hernández C. 2015. Key Importance of Small RNA Binding for the Activity of a Glycine/Tryptophan

Bibliografia

(GW) Motif-Containing Viral Suppressor of RNA Silencing* *The Journal of biological chemistry*. **290**: 3106-3120.

Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 7029–7036.

Pooggin MM, Ryabova LA, He X, Fütterer J, Hohn T. 2006. Mechanism of ribosome shunting in Rice tungro bacilliform pararetrovirus. *RNA*. **12**: 841-850.

Pooggin MM, Rajeswaran R, Schepetilnikov MV, Ryabova LA. 2012. Short ORF-dependent ribosome shunting operates in an RNA picorna-like virus and a DNA pararetrovirus that cause rice tungro disease. *PLoS Pathog.* **8**(3): e1002568.

Pumplin N, Voinnet O. 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*. **11**: 745–760.

Qi Y, Denli AM, Hannon GJ. 2005. Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. *Mol. Cell*. **19**: 421-428.

Qi X, Bao FS, Xie Z. 2009. Small RNA deep sequencing reveals role for *Arabidopsis thaliana* RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. *PLoS One* **4**, e4971.

Qu F, Ye X, Morris TJ. 2008. *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10514732–14737 10.1073/pnas.0805760105

Rakotondrafara AM, Polacek Ch, Harris E, Miller WA. 2006. Oscillating kissing stem-loop interactions mediate 5' scanning-dependent translation by a viral 3'capindependent translation element. *RNA*. **12**: 1893–1906.

Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC. 1997. A similarity between viral defence and gene silencing in plants. *Science*. **276**: 1558-1560.

Rochon D, Lommel S, Martelli GP, Rubino L, Russo M. 2012. Family *Tombusviridae*. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. & Lefkowitz, E.J. (eds.), *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, San Diego, CA., 1111-1138.

Rochon DA, Scheets K, White A, Martelli G, Rubino L. 2014. ICTV taxonomic proposal 2013.010a,bP.A.v2.Umbravirus_move. Move genus Umbravirus into family Tombusviridae.

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

Roy S, Delling U, Chen CH, Rosen CA, Sonenberg N. 1990. A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated transactivation. *Genes Develop*. **4**, 1365–1373.

Ruiz-Ruiz S, Navarro B, Gisel A, Peña L, Navarro L, Moreno P, Di Serio F, Flores R. 2011. Citrus tristeza virus infection induces the accumulation of viral small RNAs (21-24-nt) mapping preferentially at the 3'-terminal region of the genomic RNA and affects the host small RNA profile. *Plant Mol Biol*. **75**: 607-19.

Sachs AB, Sarnow P, Hentze MW. 1997. Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell*. **89**: 831–838.

Salem NM, Miller WA, Rowhani A, Golino DA, Moyne A-L, Falk BW. 2008. Rose spring dwarf-associated virus has RNA structural and gene-expression features like those of *Barley yellow dwarf virus*. *Virology*. **375**: 354-360.

Sarawaneeyaruk S, Iwakawa H-O, Mizumoto H, Murakami H, Kaido M et al., 2009. Host-dependent roles of the viral 5' untranslated region (UTR) in RNA stabilization and cap-independent translational enhancement mediated by the 3' UTR of *Red clover necrotic mosaic virus* RNA1. *Virology*. **391**: 107-18.

Scheets K, Redinbaugh MG. 2006. Infectious cDNA transcripts of *Maize necrotic streak virus*: infectivity and translational characteristics. *Virology*. **350**: 171–83.

Scheets K, Hernández C, Jordan R, White A. 2014. ICTV taxonomic proposal 2014.006aP.A.v2.Tombusviridae_4sp. Create 4 new species unassigned in the family *Tombusviridae*. http://www.ictvonline.org/proposals-14/2014.006aP.A.v2.Tombusviridae_4sp.pdf

Scheets K, Jordan R, White KA, Hernández C. 2015. *Pelarspovirus*, a proposed new genus in the family *Tombusviridae*. *Arch Virol*. **160**: 2385-93.

Scholthof, K-B G. 2001. 1898 – the beginning of virology...time marches on. *The Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2001-0129-01.

Scholthof HB, AlvaradoVY, Vega-Arreguin JC, Ciomperlik J, Odokonyero D, Brosseau C, Jaubert M, Zamora A, Moffett P. 2011. Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* **156**: 1548-1555.

Schwach F, Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC. 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.

Shanks M, Lomonossoff GP. 1990. The primary structure of the 24K protease from red clover mottle virus: implications for the mode of action of comovirus proteases. *Journal of General Virology.* **71**: 735-738.

Shih DS, Lane LC, Kaesberg P. 1972. Origin of the small component of brome mosaic virus RNA. *J. Mol. Biol.* **64**: 353-362.

Shimura H, Pantaleo V. 2011. Viral induction and suppression of RNA silencing in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.* **1809**: 11–12.

Shimura H, Pantaleo V, Ishihara T, Myojo N, Inaba J, Sueda K, Burguán J, Masuta C. 2011. A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathog.* **7**:e1002021.

Sijen T, Steiner FA, Thijssen KL, Plasterk RH. 2007. Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science.* **315**: 244–247.

Silva TF, Romanel EAC, Andrade RRS, Farinelli L, Østerås M, Deluen C, Corrêa RL, Schrago CEG, Vaslin MFS. 2011 Profile of small interfering RNAs from cotton plants infected with the poliovirus Cotton leafroll dwarf virus. *BMC Molecular Biology.* **12**: 40.

Simon AE, Miller WA. 2013. 3'Cap-Independent Translation Enhancers of Plant Viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**: 21-42.

Sit TL, Vaewhongs AA, Lommel SA. 1998. RNA-mediated trans-activation of transcription from a viral RNA. *Science.* **281**: 829-32.

Sivakumaran K, Choi S-K, Hema M, Kao CC. 2004. Requirements for Brome mosaic virus subgenomic RNA

Bibliografía

synthesis in vivo and replicase-core promoter interactions in vitro. *J. Virol.* **78**: 6091–6101.

Smith NA, Eamens AL, Wang MB. 2011. Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathog* **7**:e1002022.

Sola I, Mateos-Gomez PA, Almazan F, Zuñiga S, Enjuanes L. 2011. RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biol.* **8**: 237-48.

Song, JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science.* **305**: 1434-1437.

Stone OM, Hollings M. 1971. Annual Report Glasshouse Crops Research Institute for 1970, *Littlehampton, UK*, 153-155.

Stone OM, Hollings M. 1976. Annual Report Glasshouse Crops Research Institute for. 1975, *Littlehampton, UK*, 119-120.

Stuart GW, Moffett PK, Bozarth RF. 2006. A comprehensive open reading frame phylogenetic analysis of isometric positive strand ssRNA plant viruses. *Arch Virol.* **151**: 1159-1177.

Stupina VA, Meskauskas A, McCormack JC, Yingling YG, Shapiro BA, et al. 2008. The 3' proximal translational enhancer

of *Turnip crinkle virus* binds to 60S ribosomal subunits. *RNA*. **14**: 2379–93.

Stupina VA, Yuan X, Meskauskas A, Dinman JD, Simon AE. 2011. Ribosome binding to a 5' translational enhancer is altered in the presence of the 3' UTR in cap-independent translation of *Turnip crinkle virus*. *J. Virol.* **85**: 4638–53.

Sunkar R, Li YF, Jagadeeswaran G. 2012. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci.* **17**: 196–203.

Szittyá G, Molnár A, Silhavy D, Hornyik C, Burgyán J. 2002. Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell.* **14**:359-72.

Szittyá G, Moxon S, Pantaleo V, Toth G, Rusholme Pilcher RL, Moulton V, Burgyan J, Dalmay T. 2010. Structural and functional analysis of viral siRNAs. *PLoS Pathog.* **6**: e1000838.

Sztuba-Solińska J, Bujarski JJ. 2008. Insights into the single-cell reproduction cycle of members of the family Bromoviridae: lessons from the use of protoplast systems. *J. Virol.* **82**: 10330–10340.

Sztuba-Solińska J, Stollar V, Bujarski JJ. 2011. Subgenomic messenger RNAs: mastering regulation of (+)-strand RNA virus life cycle. *Virology*. **412**: 245–255.

Takeda A, Iwasaki S, Watanabe T, Utsumi M, Watanabe Y. 2008. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol*. **49**: 493–500.

Tanguay, R. L., Gallie, D. R. 1996. Isolation and characterization of the 102-kilodalton RNA-binding protein that binds to the 5' and 3' translational enhancers of *Tobacco mosaic virus* RNA. *J. Biol. Chem.* **271**: 14316-14322.

Tatineni S, Afunian MR, Gowda S, Hilf ME, Bar-Joseph M, Dawson WO. 2009. Characterization of the 5'- and 3'-terminal subgenomic RNAs produced by a capillovirus: evidence for a CP subgenomic RNA. *Virology*. **385**: 521–528.

Tatsuta M, Mizumoto H, Kaido M, Mise K, Okuno T. 2005. The Red clover necrotic mosaic virus RNA2 trans-activator is also a cis-acting RNA2 replication element. *J. Virol.* **79**: 978–986.

Thiébeauld O, Pooggin MM, Ryabova LA. 2007. Alternative translation strategies in plant viruses. *Plant Viruses Global Science Books*.**1**: 1-20.

Thivierge K, Nicaise V, Dufresne PJ, Cotton S, Laliberte J-F, LeGall O, Fortin MG. 2005. Plant virus RNAs. coordinated recruitment of conserved host functions by (+) ssRNA viruses during early infection events. *Plant Physiol.* **138**: 1822–1827.

Timmer RT, Benkowski LA, Schodin D, Lax SR, Metz AM, et al. 1993. The 5′ and 3′ untranslated regions of satellite tobacco necrosis virus RNA affect translational efficiency and dependence on a 5′ cap structure. *J. Biol. Chem.* **268**: 9504–10.

Treder K, Kneller ELP, Allen EM, Wang Z, Browning KS, Miller WA. 2008. The 3′ capindependent translation element of *Barley yellow dwarf virus* binds eIF4F via the eIF4G subunit to initiate translation. *RNA.* **14**: 134–47.

Truniger V, Nieto C, Gonzalez-Ibeas D, Aranda M. 2008. Mechanism of plant eIF4E-mediated resistance against a carmovirus (*Tombusviridae*): cap-independent translation of a viral RNA controlled in *cis* by an (a) virulence determinant. *Plant J.* **56**: 716–27.

van der Kuyl AC, Langereis K, Howing CJ, Jaspars EMJ, Bol JF. 1990. cis-acting elements involved in replication of alfalfa mosaic virus RNAs in vitro. *Virology.* **176**: 346-354.

van der Vossen EA, Notenboom T, Bol JF. 1995. Characterization of sequences controlling the synthesis of alfalfa mosaic virus subgenomic RNA in vivo. *Virology*. **212**: 663-672.

van Lipzig R, Gulyaev AP, Pleij CW, van Montagu M, Cornelissen M, Meulewaeter F. 2002. The 5' and 3' extremities of the satellite tobacco necrosis virus translational enhancer domain contribute differentially to stimulation of translation. *RNA*. **8**: 229–36.

van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. (Eds.). 2000. Virus Taxonomy: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Academic Press, San Diego*.

van Vliet AL, Smits SL, Rottier PJ, de Groot RJ. 2002. Discontinuous and non-discontinuous subgenomic RNA transcription in a nidovirus. *EMBO J*. **21**: 6571-80.

Van wolfswinkel JC, Ketting RF. 2010. The role of small non-coding RNAs in genome stability and chromatin organization. *Journal of cell science*. **123**: 2825-2839.

Vanyushin BF, Ashapkin VV. 2011. DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta.* **1809**: 360-368.

Vaucheret H. 2006. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: Mechanisms and regulations. *Genes Dev.* **20**: 759–771. doi: 10.1101/gad.1410506.

Vaucheret H. 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci.* **13**: 350-358.

Vives MC, Galipienso L, Navarro L, Moreno P, Guerri J. 2002. Characterization of two kinds of subgenomic RNAs produced by citrus leaf blotch virus. *Virology.* **295**: 328–336.

Voinnet O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* **17**: 449-459.

Voinnet O. 2008. Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci.* **13**: 317–328.

Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science.* **297**: 1833-1837.

Walkey D. 1991. Applied Plant Virology. 2nd edition. Chapman and Hall, London.

Wang J, Simon AE. 1997. Analysis of the two subgenomic RNA promoters for *turnip crinkle virus* in vivo and in vitro. *Virology*. **232**: 174-86.

Wang S, Miller WA. 1995. A sequence located 4.5 to 5 kilobases from the 5' end of the barley yellow dwarf virus (PAV) genome strongly stimulates translation of uncapped mRNA. *J. Biol. Chem.* **270**: 13446–13452.

Wang S, Browning KS, Miller WA. 1997. A viral sequence in the 3'-untranslated region mimics a 5' cap in facilitating translation of uncapped mRNA. *EMBO J.* **16**: 4107–16.

Wang J, Carpenter CD, Simon AE. 1999. Minimal sequence and structural requirements of a subgenomic RNA promoter for turnip crinkle virus. *Virology*. **253**: 327-336.

Wang A, Sanfaçon H. 2000. Proteolytic processing at a novel cleavage site in the N-terminal region of the tomato ringspot nepovirus RNA-1-encoded polyprotein in vitro. *J. Gen. Virol.* **81**: 2771-81.

Wang XJ, Reyes JL, Chua NH, Gaasterland T. 2004. Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol.* **5(9)**: R65.

Wang S, Mortazavi L, White KA. 2008. Higher-order RNA structural requirements and small-molecule induction of Tombusvirus subgenomic mRNA transcription. *J. Virol.* **82**: 3864-71.

Wang Z, Treder K, Miller WA. 2009. Structure of a viral cap-independent translation element that functions via high affinity binding to the eIF4E subunit of eIF4F. *J. Biol. Chem.* **284**: 14189–202.

Wang Z, Kraft JJ, Hui AY, Miller WA. 2010. Structural plasticity of *Barley yellow dwarf virus*-like cap-independent translation elements in four genera of plant viral RNAs. *Virology.* **402**: 177–86.

Wang Z, Parisien M, Scheets K, Miller WA. 2011. The cap-binding translation initiation factor, eIF4E, binds a pseudoknot in a viral cap-independent translation element. *Structure.* **19**: 868–80.

Wassenegger M, Krczal G. 2006. Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.* **11**, 142–151.

Welch EM, Wang W, Peltz SW. 2000. Translation termination: it's not the end of the story. In: Sonenberg N, Hershey JWB,

Bibliografia

Mathews MB (Eds) *Translational Control of Gene Expression*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 467-485

White KA. 2002. The premature termination model: a possible third mechanism for subgenomic mRNA transcription in (+)-strand RNA viruses. *Virology*. **304**: 147–154.

White KA, Nagy PD. 2004. Advances in the molecular biology of tombusviruses: gene expression, genome replication and recombination. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **78**: 187–226.

White PW, Faucher AM, Goudreau N. 2011. Small molecule inhibitors of the human papillomavirus E1-E2 interaction. *Curr Top Microbiol Immunol.* **348**:61–88.

Wierzchoslawski R, Dziañott A, Bujarski JJ. 2004. Dissecting the requirement for subgenomic promoter sequences by RNA recombination of Brome mosaic virus in vivo: evidence for functional separation of transcription and recombination. *J. Virol.* **78**: 8552–8564.

Wierzchoslawski R, Urbanowicz A, Dziañott A, Figlerowicz M, Bujarski JJ. 2006. Characterization of a novel 5' subgenomic RNA3a derived from RNA3 of Brome mosaic bromovirus. *J. Virol.* **80**: 12357–12366.

Wittmann S, Chatel H, Fortin MG, Laliberte JF. 1997. Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology*. **234**: 84–92.

Wu X, Xu Z, Shaw JG. 1994. Uncoating of tobacco mosaic virus RNA in protoplasts. *Virology*. **200**: 256–262.

Wu H-N, Uhlenbeck O C. 1987. Role of a bulged A residue in a specific RNA protein interaction. *Biochemistry*, **26**, 8221–8227.

Wu B, White KA. 1999. A primary determinant of cap-independent translation is located in the 3'-proximal region of the tomato bushy stunt virus genome. *Journal of Virology*. **73**: 8982-8988.

Wu B., K.A. White. 2007. Uncoupling RNA virus replication from transcription via the polymerase: functional and evolutionary insights. *EMBO J.*, **26**: 5120-5130.

Wu B, Oliveri S, Mandic J, White KA. 2010. Evidence for a premature termination mechanism of subgenomic mRNA transcription in a carmovirus. *J. Virol.* **84**: 7904–7907.

Bibliografia

Wu B, Grigull J, Ore MO, Morin S, White KA. 2013. Global Organization of a Positive-strand RNA Virus Genome. *PLoS Pathog.* **9**: e1003363.

Xia Z, Peng J, Li Y, Chen L, Li S, Zhou T, Fan Z. 2014. Characterization of smallinterfering RNAs derived from sugarcane mosaic virus in infected maize plants by deep sequencing. *PLoS One.* **9**: e97013.

Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC. 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* **2**(5):E104.

Xie Z, Allen E, Wilken A, Carrington JC. 2005. DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 12984-12989.

Xu W, White, KA. 2008. Subgenomic mRNA transcription in an aureusvirus: downregulation of transcription and evolution of regulatory RNA elements. *Virology.* **371**: 430-8.

Xu W, White KA. 2009. RNA-Based regulation of transcription and translation of Aureusvirus subgenomic mRNA1. *J. Virol.* **83**:10096-10105.

Yoshii M, Yoshioka N, Ishikawa M, Naito S. 1998. Isolation of an *Arabidopsis thaliana* mutant in which the multiplication of both cucumber mosaic virus and turnip crinkle virus is affected. *J. Virol.* **72**: 8731–37.

Yoshii M, Nishikiori M, Tomita K, Yoshioka N, Kozuka R, et al. 2004. The *Arabidopsis cucumovirus* multiplication 1 and 2 loci encode translation initiation factors 4E and 4G. *J. Virol.* **78**: 6102–11.

Yoshikawa M, Peragine A, Park MY, Poething RC. 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNA in *Arabidopsis*. *Genes & Development.* **19**: 2164-2175.

Yu D, Fan B, MacFarlane SA, Chen Z. 2003. Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 206–216.

Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X. 2005. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science.* **307**: 932-935.

Yuan XF, Shi KR, Meskauskas A, Simon AE. 2009. The 3' end of *Turnip crinkle virus* contains a highly interactive structure

including a translational enhancer that is disrupted by binding to the RNA-dependent RNA polymerase. *RNA*. **15**: 1849–64.

Yuan XF, Shi KR, Young MYL, Simon AE. 2010. The terminal loop of a 3' proximal hairpin plays a critical role in replication and the structure of the 3' region of *Turnip crinkle virus*. *Virology*. **402**: 271–80.

Yuan XF, Shi KR, Simon AE. 2012. A local, interactive network of 3' RNA elements supports translation and replication of *Turnip crinkle virus*. *J. Virol.* **86**: 4065–81.

Zaitlin M. 1998. The discovery of the causal agent of tobacco mosaic disease. Pages 105-110 in: *Discoveries in Plant Biology*. World Publishing Co. Ltd. Hong Kong.

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. 2000. RNAi double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. **101**: 25-33.

Zavriev SK, Hickey CM, Lommel SA. 1996. Mapping of the red clover necrotic mosaic virus subgenomic RNA. *Virology*. **216**: 407-10.

Zeenko V, Gallie DR. 2005. Cap-independent translation of tobacco etch virus is conferred by an RNA pseudoknot in the 5'-leader. *J. Biol. Chem.* **280**: 26813–26824.

Zhang G, Slowinski V, White KA. 1999. Subgenomic mRNA regulation by a distal RNA element in a (+)-strand RNA virus. *RNA*. **5**: 550-61.

Zhang G, Zhang J, Simon AE. 2004. Repression and derepression of minus-strand synthesis in a plus-strand RNA virus replicon. *J. Virol.* **78**: 7619-7633.

Zhang XR, Yuan YR, Pei Y, Lin SS, Tuschl T, Patel DJ, et al. 2006a. *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Gene Dev.* **20**: 3255-3268.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. 2006b. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Dev Biol.* **289**: 3-16.

Zheng X, Zhu J, Kapoor A, Zhu JK. 2007. Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO Journal.* **26**: 1691-1701.

Zhu H, Guo H. 2012. The role of virus-derived small interfering RNAs in RNA silencing in plants. *Sci China Life Sci.* **55**: 119-25.

Ziegler A, Cowan G, Torrance L. 2009. Comparative sequence analysis and serological and infectivity studies indicate that

Bibliografia

cocksfoot mild mosaic virus is a member of the genus Panicovirus. *Arch. Virol.* **154**: 1545-1549.

Zrachya A, Glick E, Levy Y, Arazi T, Citovsky V, Gafni Y. 2007. Suppressor of RNA silencing encoded by Tomato yellow leaf curl virus-Israel. *Virology.* **358**: 159–165.

Zuo XB, Wang JB, Yu P, Eyler D, Xu H, et al. 2010. Solution structure of the cap-independent translational enhancer and ribosome-binding element in the 3' UTR of *Turnip crinkle virus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**: 1385–90.

Zvereva AS, Pooggin MM. 2012. Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. *Viruses.* **4**: 2578-2597.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer de todo corazón la oportunidad que me concedió mi Directora (Carmen Hernández Fort), al confiar en mí para llevar a cabo esta tesis. Gracias por su paciencia, dedicación, esfuerzo y ayuda.

Gracias a tod@s mis compañer@s, tanto de mi laboratorio como de laboratorios vecinos (en particular a Sofía Minoia y a Miryam Pérez Cañamás), por vuestra ayuda, ánimo, y por los buenos momentos que hemos pasado.

A todos los profesionales que trabajan en el IBMCP (UPV): servicio de secuenciación, microscopía, biblioteca, informática, almacén, autoclave, etc. gracias por la atención, los sabios consejos y la amabilidad con la que me han tratado durante estos años.

A mi hermana y en especial a mi madre, a la que admiro por su gran fuerza interior, gracias por vuestro enorme apoyo.

