

## Resumen

El virus del mosaico de la alfalfa (AMV) afecta a la producción global de alfalfa y a otros cultivos económicamente importantes, como patata (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*) o soja (*Glycine max*). Este virus es el único miembro del género Alfamovirus, perteneciente a la familia *Bromoviridae*, y su genoma consta de tres moléculas de RNA monocatenario de polaridad positiva. Los RNAs de AMV presentan una estructura de tipo cap ( $m^7GG$ ) en el 5'UTR y una secuencia homóloga en el 3'UTR que adopta dos conformaciones mutuamente excluyentes. Se ha propuesto que este cambio conformacional podría actuar como un interruptor molecular de la traducción a la replicación. Las dos subunidades de la replicasa viral, P1 y P2, se codifican a partir del RNA1 y RNA2, respectivamente. El RNA3 codifica la proteína de movimiento (MP) y la proteína de la cápside (CP), aunque esta última se traduce a partir de un RNA subgenómico (sgRNA4). Muchos estudios han demostrado que las CPs son proteínas multifuncionales implicadas en diversas etapas del ciclo viral y, además, en el caso del AMV y los ilarvirus adquieren una relevancia especial ya que, para iniciar la infección, se requiere la presencia de moléculas de CP o sgRNA4. Por lo tanto, la identificación de proteínas del huésped que interactúan con la CP es una estrategia frecuente para clarificar los mecanismos moleculares que rigen las infecciones virales. Las modificaciones químicas postranscripcionales de los RNAs pueden afectar a las interacciones intramoleculares o su reconocimiento por las proteínas de unión a RNA y, por lo tanto, implican un nuevo nivel de modulación de la expresión génica. La metilación del nitrógeno en posición 6 de la adenosina ( $m^6A$ ) es la modificación interna más abundante de mRNAs en eucariotas. Las proteínas conocidas como  $m^6A$  *writers* y *erasers* definen el estado de metilación de un mRNA, mientras que las  $m^6A$  *readers* reconocen este nucleótido modificado y controlan el destino de los mRNAs metilados. En mamíferos, las *erasers* pertenecen a la familia AlkB (2-oxoglutarato y Fe (II) dependiente de la oxigenasa), que en *Escherichia coli* protege los ácidos nucleicos contra el daño por metilación, mientras que las *readers* son proteínas de unión al RNA que contienen un dominio llamado YT521-B homolog (YTH).

Al comienzo de esta Tesis, se habían caracterizado algunos componentes del complejo de metilación en plantas. Sin embargo, a diferencia de mamíferos y levadura, ninguno de los 13 homólogos de AlkB (atALKBH1-10B) y las 13 proteínas de la familia YTH (proteínas de la región C-terminal conservada evolutivamente 1-11, ECT1- 11, At4g11970 y CPSF30) identificadas en el genoma de *Arabidopsis* se habían caracterizado funcionalmente. Además, desde principios de los años 70, varios estudios han descrito la presencia de residuos  $m^6A$  en RNAs de virus de mamíferos con genomas de RNA y DNA, así como las diferentes funciones que desempeña esta

modificación y la maquinaria m<sup>6</sup>A del huésped en la regulación de las infecciones virales. Sin embargo, hasta la fecha, no se conoce ningún virus en plantas que contenga nucleótidos m<sup>6</sup>A, ni se ha estudiado la posible implicación de este mecanismo molecular en las infecciones virales de plantas.

El descubrimiento de la interacción entre la CP de AMV y una proteína de Arabidopsis con homología a una RNA desmetilasa humana perteneciente a la familia AlkB fue el punto de partida de esta Tesis. De este modo, un ensayo de doble híbrido en levadura de una librería de cDNA específica de hoja de Arabidopsis usando la CP como cebo reveló la interacción entre esta proteína y la proteína ALKBH9B de Arabidopsis (atALKBH9B; At2g17970). En este trabajo se muestra un análisis de Complementación de Fluorescencia Bimolecular (BiFC) y una coimmunoprecipitación in vitro que confirman esta interacción, y, mediante un ensayo northwestern, se demuestra que atALKBH9B también puede reconocer los RNAs virales. Además, los resultados obtenidos demuestran que atALKBH9B tiene la capacidad de desmetilar m<sup>6</sup>A a partir de moléculas de RNA monocatenario in vitro. Se observó que esta proteína se acumula en gránulos citoplasmáticos que se colocalizan con siRNA bodies y se asocian a P-bodies, lo que sugiere que la actividad de atALKBH9B podría estar relacionada con los procesos de silenciamiento y/o degradación de mRNA. Por otro lado, ensayos preliminares, que consisten en la IP anti- m<sup>6</sup>A y detección viral, muestran que los RNAs virales del AMV, el virus del mosaico del pepino (CMV), el virus de la arruga del nabo (TCV) y el virus del mosaico de la coliflor (CaMV), pero no el virus del cascabel del tabaco (TRV), se metilan durante la infección en Arabidopsis. Además, para AMV y CMV, los resultados han sido confirmados por análisis UPLC-PDA-Tof-MS y los sitios m<sup>6</sup>A a lo largo de los tres RNAs del AMV se han identificado mediante MeRIP-seq. De acuerdo con la capacidad de desmetilación in vitro de atALKBH9B, los resultados presentados aquí confirman que la relación m<sup>6</sup>A/A a lo largo de los RNAs virales aumenta en las plantas atalkbh9b en comparación con WT, mientras que la traducción y/o la replicación se ven afectadas y el movimiento sistémico a los tallos florales está prácticamente bloqueado. A diferencia de la CP de AMV, la de CMV no interacciona con atALKBH9B por Y2H y, como ocurre con el resto de los virus analizados (CMV, TCV y CaMV), su ciclo de infección no se ve afectado en plantas atalkbh9b en comparación con las WT. Por lo tanto, mientras que la metilación m<sup>6</sup>A de RNAs virales durante el proceso de infección parece ser un mecanismo generalizado en infecciones de plantas provocadas por virus de DNA y RNA, la modulación viral dependiente de atALKBH9B podría ser específica para AMV. Cabe mencionar que, en el transcurso de esta Tesis, se describió que atALKBH10A elimina la metilación m<sup>6</sup>A de los mRNAs, tanto in vitro como in vivo, y es necesaria para una floración y un crecimiento vegetativo adecuados.

Por otro lado, se ha descrito que, en algunos casos, las infecciones virales en mamíferos están reguladas de manera dependiente de m<sup>6</sup>A *readers*. Además, recientemente ECT2, ECT3 y ECT4 han sido caracterizadas como *readers* citoplasmáticos que tienen un papel clave en el control del desarrollo de la planta. En línea con estos descubrimientos, el análisis de secuenciación de mRNA realizado en este trabajo revela que la infección por AMV induce algunos genes de *Arabidopsis* pertenecientes a la maquinaria m<sup>6</sup>A, MTA, MTB, VIR y ECT5. De acuerdo con el efecto antiviral dependiente de m<sup>6</sup>A para el AMV, los mutantes del módulo ECT2/ECT3/ECT5 aumentan significativamente los títulos sistémicos de AMV y CMV. Además, el efecto antiviral de ECT2 sobre AMV parece estar modulado a través de su unión directa a los residuos de m<sup>6</sup>A presentes en los RNAs virales, ya que un mutante de la proteína ECT2 defectuoso en el reconocimiento de m<sup>6</sup>A pierde la actividad antiviral que sí presenta el WT y no es capaz de arrastrar RNAs virales in vivo. Por otro lado, de acuerdo con la localización subcelular descrita previamente para ECT2 y ECT4 y la capacidad de ECT2 para experimentar una fase similar al gel in vitro, la expresión transitoria de ECT5 en *Nicotiana benthamiana* muestra un patrón citoplasmático con la formación de algunos gránulos y agregados. Por lo tanto, se propone que, como se ha descrito para las proteínas YTH de mamíferos, la interacción entre las ECTs y el RNA polimetilado (en este caso, RNA viral) promovería la formación de gránulos de estrés y, en consecuencia, reduciría las tasas de traducción y replicación viral. Además, la observación de que ECT2 y ECT5 se asocian con atALKBH9B podría ser una evidencia de un posible mecanismo de autorregulación a través de la asociación entre *readers* y *erasers*, aunque se necesitan análisis adicionales para confirmar estas interacciones y revelar su significado biológico.

En resumen, en este trabajo de Tesis, se caracteriza la primera m<sup>6</sup>A *eraser* de plantas, atALKBH9B, y, por primera vez, se describe la influencia del mecanismo de metilación m<sup>6</sup>A en las infecciones virales de plantas. Por tanto, la presente Tesis proporciona nuevas observaciones que extienden el amplio repertorio de rutas moleculares que las plantas emplean para controlar las infecciones virales.