



# ANÁLISIS FUNCIONAL DE PROTEÍNAS CODIFICADAS POR EL VIRUS DE LA ROTURA DEL COLOR DE LA FLOR DEL PELARGONIUM

Sandra Martínez Turiño

Director: Dra. Carmen Hernández Fort

Valencia, junio 2012



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA





**ANÁLISIS FUNCIONAL DE PROTEÍNAS  
CODIFICADAS POR EL VIRUS DE LA ROTURA  
DEL COLOR DE LA FLOR DEL *PELARGONIUM***

**Sandra Martínez Turiño**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la  
Universidad Politécnica de Valencia.



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 Sandra Martínez Turiño ha realizado bajo su dirección el trabajo que, con el título “Análisis funcional de proteínas codificadas por el virus de la rotura del color de la flor del *Pelargonium*”, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia a 3 de julio de 2012.

Firmado: Carmen Hernández Fort



*“Need I remind you not a lot of scientific discoveries were made by people having a good time?”* Sheldon Cooper.





# Índice

Acrónimos de virus .....	9
Acrónimos.....	15
Resumen.....	21
Summary.....	25
Resum .....	27
Publicaciones .....	31
INTRODUCCIÓN .....	33
Los virus de plantas .....	35
1.1. Orígenes de la Virología de plantas .....	35
1.2. Definición y clasificación de virus .....	37
1.3. Características moleculares y ciclo infeccioso de los virus de plantas.....	38
Replicación de virus de ssRNA(+) .....	43
2.1. Replicación. Aspectos generales.....	43
2.2. Moldes virales. Requerimientos estructurales y de secuencia.....	44
2.3. Proteínas implicadas en replicación.....	45
2.3.1. RNA polimerasa dependiente de RNA .....	47
2.3.2. Proteínas auxiliares de la replicación.....	48
2.4. Localización subcelular del complejo replicativo .....	50
2.4.1. Direccionamiento de proteínas a mitocondrias .....	52
Movimiento viral .....	59
3.1. El movimiento de los virus de plantas.....	59
3.1.1. Movimiento célula a célula .....	59
3.1.2. Movimiento sistémico .....	62
3.2. Proteínas de movimiento viral .....	63
3.2.1. Superfamilia “30K” .....	63
3.2.2. Bloque doble de genes .....	66
3.2.3. Bloque triple de genes .....	66
3.2.4. Otras proteínas de movimiento .....	68
3.3. Localización subcelular de las proteínas de movimiento .....	68
3.4. Propiedades de unión a RNA de las proteínas de movimiento .....	71
Silenciamiento por RNA.....	75
4.1. Silenciamiento por RNA: generalidades .....	75

4.2	<i>Rutas de silenciamiento en plantas</i> .....	75
4.3.	<i>Los virus como inductores y dianas del PTGS</i> .....	78
4.4.	<i>Supresión viral del silenciamiento por RNA</i> .....	80
4.4.1.	Características generales de los supresores del silenciamiento .....	80
4.4.2.	Mecanismos de supresión de los virus de plantas .....	81
	Familia <i>Tombusviridae</i> .....	85
5.1.	<i>Aspectos generales</i> .....	85
5.2.	<i>Proteínas implicadas en la replicación en la familia Tombusviridae</i> .....	88
5.2.1.	Localización subcelular .....	89
5.2.2.	Propiedades de unión a RNA.....	91
5.2.3.	Factores celulares que intervienen en la replicación .....	92
5.3.	<i>Proteínas implicadas en el movimiento en la familia Tombusviridae</i> .....	94
5.3.1.	Localización subcelular .....	95
5.3.2.	Propiedades de unión a RNA.....	96
5.4.	<i>Supresores del silenciamiento génico en la familia Tombusviridae</i> .....	98
5.5.	<i>Género Carmovirus</i> .....	101
5.5.1.	Organización genómica .....	102
	El virus de la rotura del color de la flor del <i>Pelargonium</i> .....	105
6.1.	<i>Virosis del geranio. Incidencia</i> .....	105
6.2.	<i>El virus de la rotura del color de la flor del Pelargonium</i> .....	106
6.2.1.	Propiedades biológicas y modo de transmisión del PFBV .....	106
6.2.2.	Organización genómica y regulación de la expresión génica.....	107
6.2.3.	Proteínas codificadas por el PFBV. Antecedentes .....	109
	OBJETIVOS .....	111
	CAPÍTULO I.....	115
	CAPÍTULO II .....	133
	CAPÍTULO III.....	149
	CAPÍTULO IV.....	165
	DISCUSIÓN GENERAL.....	175
	CONCLUSIONES .....	191
	BIBLIOGRAFÍA .....	195
	ANEXO .....	235

# Acrónimos de virus

- ACLSV:** *Apple chlorotic leaf spot virus*  
Virus de las manchas cloróticas de la hoja del manzano
- ACMV:** *African cassava mosaic virus*  
Virus del mosaico de la yuca africana
- AFBV:** *Angelonia flower break virus*  
Virus de la rotura del color de la flor de la Angelonia
- AMCV:** *Artichoke mottled crinkle virus*  
Virus de las manchas onduladas de la alcachofa
- AMV:** *Alfalfa mosaic virus*  
Virus del mosaico de la alfalfa
- AWBV:** *Ahlum waterborne virus*  
Virus del ajo transmitido por el agua
- BCTV:** *Beet curly top virus*  
Virus del rizado superior de la remolacha
- BDMV:** *Bean dwarf mosaic virus*  
Virus del mosaico del frijol enano
- BMMV:** *Bean mild mosaic virus*  
Virus del mosaico suave de la judía
- BMoV:** *Blackgram mottle virus*  
Virus del moteado del *Blackgram*
- BMV:** *Brome mosaic virus*  
Virus del mosaico del bromo
- BNYVV:** *Beet necrotic yellow vein virus*  
Virus del amarillamiento de la remolacha occidental
- BSMV:** *Barley stripe mosaic virus*  
Virus de mosaico rayado de la cebada
- BSV:** *Banana streak virus*  
Virus del estriado del banano
- BWYV:** *Beet western yellows virus*  
Virus del amarilleo de la remolacha del oeste
- BYV:** *Beet yellows virus*  
Virus del amarilleo de la remolacha
- CaMV:** *Cauliflower mosaic virus*  
Virus del mosaico de la coliflor
- CarMV:** *Carnation mottle virus*  
Virus del moteado del clavel
- CCFV:** *Cardamine chlorotic fleck virus*  
Virus del salpicado clorótico del cardamomo

- CGMMV:** *Cucumber green mottle mosaic virus*  
Virus del moteado verde en mosaico del pepino
- CIRV:** *Carnation Italian ringspot virus*  
Virus de las manchas en anillos del clavel italiano
- CMoV:** *Calibrachoa mottle virus*  
Virus del moteado de la Calibrachoa
- CMV:** *Cucumber mosaic virus*  
Virus del mosaico del pepino
- CNV:** *Cucumber necrosis virus*  
Virus de la necrosis del pepino
- CLCuMV:** *Cotton leaf curl Multan virus*  
Virus de la hoja rizada del algodón de Multan
- CPMoV:** *Cowpea mottle virus*  
Virus del moteado del chícharo
- CPMV:** *Cowpea mosaic virus*  
Virus del mosaico del chícharo
- CSBV:** *Cucumber soil-borne virus*  
Virus del pepino transmitido por el suelo
- CTV:** *Citrus tristeza virus*  
Virus de la tristeza de los cítricos
- CVYV:** *Cucumber vein yellowing virus*  
Virus del amarillamiento de las venas del pepino
- CymRSV:** *Cymbidium ringspot virus*  
Virus de las manchas anulares del Cymbidium
- EILDV:** *Elderberry latent virus*  
Virus latente de la baya del saúco
- FHV:** *Flock house virus*  
Virus del escarabajo neozelandés
- GaMV:** *Galinsoga mosaic virus*  
Virus del mosaico de la Galinsoga
- GMoV:** *Glycine mottle virus*  
Virus del moteado de la glicina
- GRV:** *Groundnut rosette virus*  
Virus de la roseta del cacahuete
- GVA:** *Grapevine virus A*  
Virus A de la vid
- HCRSV:** *Hibiscus chlorotic ringspot virus*  
Virus de las manchas cloróticas en anillo del Hibisco
- HCV:** *Hepatitis C virus*  
Virus de la hepatitis C
- HnRSV:** *Honeysuckle ringspot virus*  
Virus de las manchas anulares de la madreSelva

- INSV:** *Impatiens necrotic spot virus*  
Virus de las manchas necróticas del *Impatiens*
- JINRV:** *Japanese iris necrotic ring virus*  
Virus de los anillos necróticos del iris japonés
- MCMV:** *Maize chlorotic mosaic virus*  
Virus del moteado clorótico del maíz
- MNSV:** *Melon necrotic spot virus*  
Virus de las manchas necróticas del melón
- MYMV:** *Mungbean yellow mosaic virus*  
Virus del mosaico amarillo del frijol mungo
- NLVCV:** *Nootka lupine vein clearing virus*  
Virus del aclaramiento de las venas del lupino Nootka
- NTNV:** *Narcissus tip necrosis virus*  
Virus de la necrosis apical del narciso
- 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*
- PCV:** *Peanut clump virus*  
Virus del macizo del cacahuete
- PFBV:** *Pelargonium flower break virus*  
Virus de la rotura del color de la flor del *Pelargonium*
- PLCV:** *Pelargonium leaf curl virus*  
Virus del rizado de la hoja del *Pelargonium*
- PLPV:** *Pelargonium line pattern virus*  
Virus del arabesco del *Pelargonium*
- PMTV:** *Potato mop-top virus*  
Virus mop-top de la patata
- PMV:** *Panicum mosaic virus*  
Virus del mosaico del *Panicum*
- PoLV:** *Pothos latent virus*  
Virus latente del Pothos
- PSNV:** *Pea stem necrosis virus*  
Virus de la necrosis del tallo del guisante
- PVX:** *Potato virus X*  
Virus X de la patata
- PVY:** *Potato virus Y*  
Virus Y de la patata
- PZSV:** *Pelargonium zonale spot virus*  
Virus del punteado del geranio zonal
- RBSDV:** *Rice black streaked dwarf virus*  
Virus del enanismo de las rayas negras del arroz

- RCNMV:** *Red clover necrotic mosaic virus*  
Virus del mosaico necrótico del trébol rojo
- RDV:** *Rice dwarf virus*  
Virus del enanismo del arroz
- RHBV:** *Rice hoja blanca virus*  
Virus de la hoja blanca del arroz
- RSV:** *Rice stripe virus*  
Virus del rayado del arroz
- SFV:** *Semliki Forest virus*  
Virus del bosque de Semliki
- SgCV:** *Saguaro cactus virus*  
Virus del cactus Saguaro
- SPCSV:** *Sweet potato chlorotic stunt virus*  
Virus del enanismo clorótico de la batata
- SPMMV:** *Sweet potato mild mottle virus*  
Virus del moteado suave de la batata
- SqNV:** *Squash necrosis virus*  
Virus de la necrosis de la calabaza
- SYMMV:** *Soybean yellow mottle mosaic virus*  
Virus del moteado amarillo en mosaico de la soja
- TAV:** *Tomato aspermy virus*  
Virus de la aspermia del tomate
- TBSV:** *Tomato bushy stunt virus*  
Virus del enanismo arbustivo del tomate
- TBV:** *Tulip breaking virus*  
Virus de la rotura del color del tulipán
- TCV:** *Turnip crinkle virus*  
Virus del arrugamiento del nabo
- TeSV:** *Tephrosia symptomless virus*  
Virus asintomático de la tefrosia
- TEV:** *Tobacco etch virus*  
Virus del grabado del tabaco
- TGMV:** *Tomato golden mosaic virus*  
Virus del mosaico dorado del tomate
- TMV:** *Tobacco mosaic virus*  
Virus del mosaico del tabaco
- TNV:** *Tobacco necrosis virus*  
Virus de la necrosis del tabaco
- TNV-D:** *Tobacco necrosis virus D*  
Cepa D del virus de la necrosis del tabaco
- ToMV:** *Tomato mosaic virus*  
Virus del mosaico del tomate

- ToRSV:** *Tomato ringspot virus*  
Virus de las manchas anulares del tomate
- TRSV:** *Tobacco ringspot virus*  
Virus de las manchas anulares del tabaco
- TRV:** *Tobacco rattle virus*  
Virus del cascabeleo del tabaco
- TSWV:** *Tomato spotted wilt virus*  
Virus del bronceado del tomate
- TYLCV:** *Tomato yellow leaf curl virus*  
Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate
- TYMV:** *Turnip yellow mosaic virus*  
Virus del mosaico amarillo del nabo
- WWBV:** *Weddel waterborne virus*  
Virus de las malas hierbas transmitido por el agua





# Acrónimos

- ADK:** *Adenosine kinase*  
Enzima adenosina kinasa
- AGO:** *Argonaute (family protein)*  
Familia de proteínas Argonauta
- ATP:** *Adenosine Triphosphate*  
Trifosfato de adenosina
- cap:** Estructura 7-metilguanosina
- casiRNA:** *Cis-acting siRNA*  
Pequeño RNA que actúa en *cis*
- cDNA:** *Complementary DNA*  
DNA complementario
- CGN:** cisternas del *cis*-Golgi
- CP:** *Coat Protein*  
Proteína de cubierta o proteína de la cápsida
- C-t:** *Carboxyl-terminal*  
Extremo carboxilo terminal
- DCL:** *Dicer-like*  
RNasa tipo DICER
- DGB:** *Double gene block*  
Bloque doble de genes
- DGBp:** *Double gene block protein*  
Proteína del bloque doble de genes
- DI RNA:** *Defective Interfering RNA*  
RNA defectivo interferente
- DNA:** *Deoxyribonucleic acid*  
Ácido desoxiribonucleico
- dpi:** *Days post-inoculation*  
Días post-inoculación
- DRB:** *ds-RNA-binding protein*  
Proteína de unión a dsRNA
- dsDNA:** *Double-stranded DNA*  
DNA de doble cadena
- dsRNA:** *Double-stranded RNA*  
RNA de doble cadena
- DT:** Desmotúbulos
- ERMES:** *Endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure*  
Complejo que conecta la mitocondria con el retículo endoplásmico

- ESCRT:** *Endosomal sorting complexes required for transport*  
Complejo de transporte y distribución endosomal
- FS:** *Frameshift*  
Mecanismo de corrimiento de pauta de lectura
- GA:** *Golgi Apparatus*  
Aparato de Golgi
- GDD:** *GDD Motif*  
Motivo Gly-Asp-Asp
- GFP:** *Green Fluorescent Protein*  
Proteína verde fluorescente
- gRNA:** *Genomic RNA*  
RNA genómico
- HC-Pro:** *Helper Component Proteinase*  
Componente ayudante de proteasa
- hc-siRNA:** *Heterochromatic siRNA*  
Pequeño RNA heterocromático
- HEL:** Dominio con actividad helicasa/NTPasa
- Hsp:** *Heat shock protein*  
Proteína de choque térmico
- ICTV:** *International Committee on Taxonomy of Viruses*  
Comité Internacional para la Taxonomía Viral
- IMP:** *Inner membrane peptidases*  
Peptidasas de la membrana mitocondrial interna
- IMS:** *Intermembrane space*  
Espacio Intermembrana
- IRES:** *Internal ribosome entry site*  
Sitio de entrada interna de los ribosomas
- LZ:** *Leucine zipper*  
Motivo tipo cremallera de leucina
- M:** Matriz mitocondrial
- MET:** Dominio con actividad metil-transferasa
- MF:** Microfilamentos
- MIA:** *Mitochondrial intermembrane space assembly*  
Maquinaria de ensamblaje del espacio intermembrana
- MIM:** *Mitochondrial inner membrane*  
Membrana mitocondrial interna
- miRNA:** microRNA
- MOM:** *Mitochondrial outer membrane*  
Membrana mitocondrial externa
- MP:** *Movement Protein*  
Proteína de movimiento

<b>MPP:</b>	<i>Mitochondrial processing peptidase</i> Peptidasa de procesamiento de la matriz mitocondrial
<b>mRNA:</b>	<i>Messenger RNA</i> RNA mensajero
<b>MT:</b>	Microtúbulos
<b>MTS:</b>	<i>Mitochondrial targeting signal</i> Señal de direccionamiento mitocondrial
<b>MVB:</b>	<i>Multivesicular bodies</i> Cuerpos multivesiculares
<b>nat-siRNA:</b>	<i>Natural antisense transcript siRNA</i> Transcritos naturales antisentido
<b>NSP:</b>	<i>Nuclear shuttle protein</i> Proteína lanzadera nuclear
<b>N-t:</b>	<i>N-terminal</i> Extremo amino terminal
<b>ORF:</b>	<i>Open Reading Frame</i> Pauta de lectura abierta
<b>PAM:</b>	<i>Presequence Translocase-associated Motor</i> Motor que emplea ATP para completar la entrada de proteínas a la matriz
<b>PAZ:</b>	<i>Piwi/Argonaute/Zwille</i> (dominio proteico)
<b>PD:</b>	Plasmodesmos
<b>POL:</b>	Dominio con actividad RNA polimerasa dependiente de RNA
<b>Poly(A):</b>	<i>Polyadenylation tail</i> Cola de poliadenilación
<b>PTGS:</b>	<i>Post-Transcriptional Gene Silencing</i> Silenciamiento génico post-transcripcional
<b>RBD:</b>	<i>RNA Binding Domain</i> Dominio de unión a RNA
<b>RdDp:</b>	<i>RNA-dependent DNA polymerase</i> DNA polimerasa dependiente de RNA
<b>RDR:</b>	RNA polimerasa celular dependiente de RNA
<b>RdRp:</b>	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> RNA polimerasa dependiente de RNA
<b>RE:</b>	Retículo endoplásmico
<b>RER:</b>	Retículo endoplásmico rugoso
<b>RISC:</b>	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i> Complejo de silenciamiento inducido por RNA
<b>RMN:</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RNA:</b>	<i>Ribonucleic acid</i> Ácido ribonucleico

<b>RNAi:</b>	<i>RNA interference</i> Interferencia mediada por RNA
<b>RNP:</b>	Ribonucleoproteína
<b>RT:</b>	<i>Read-through</i> Mecanismo de lectura a través
<b>SAM:</b>	<i>Sorting and Assembly Machinery</i> Maquinaria de distribución y ensamblaje
<b>satRNA:</b>	<i>Satellite RNA</i> RNA satélite
<b>SDS-PAGE:</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>SEL:</b>	<i>Size Exclusion Limit</i> Límite de exclusión por tamaño
<b>sgRNA:</b>	<i>Subgenomic RNA</i> RNA subgenómico
<b>siRNA:</b>	<i>Small interfering RNA</i> RNA pequeño de interferencia
<b>sRNA:</b>	<i>Small RNA</i> Pequeño RNA
<b>ssDNA:</b>	<i>Single-stranded DNA</i> DNA de simple cadena
<b>ssRNA:</b>	<i>Single-stranded RNA</i> RNA de simple cadena
<b>ssRNA(+):</b>	<i>Positive sense single-stranded RNA</i> RNA de simple cadena y polaridad positiva
<b>ssRNA(-):</b>	<i>Negative sense single-stranded RNA</i> RNA de simple cadena y polaridad negativa
<b>sTIM:</b>	<i>small TIM</i> Pequeñas proteínas TIM
<b>tasiRNA:</b>	<i>Trans-acting siRNA</i> Pequeño RNA que actúa en <i>trans</i>
<b>TGB:</b>	<i>Triple gene block</i> Bloque triple de genes
<b>TGBp:</b>	<i>Triple gene block protein</i> Proteína del bloque triple de genes
<b>TGS:</b>	<i>Transcriptional gene silencing</i> Silenciamiento génico transcripcional
<b>TIM:</b>	<i>Translocase of Inner Membrane</i> Complejo translocador de la membrana mitocondrial interna
<b>TM:</b>	Transmembrana
<b>TMD:</b>	<i>Transmembrane domain</i> Dominio transmembrana

- TOM:** *Translocase of Outer Membrane*  
Complejo transportador de la membrana mitocondrial externa
- UTR:** *Untranslational Region*  
Región no traducible
- vRISC:** *Antiviral RNA-induced silencing complex*  
Complejo efector RISC antiviral
- vRNA:** RNA viral
- vsiRNA:** *Viral small interfering RNA*  
Pequeño RNA de origen viral
- VSR:** *Viral suppressors of RNA silencing*  
Supresor viral del silenciamiento por RNA



# Resumen

El virus de la rotura del color de la flor del *Pelargonium* (*Pelargonium flower break virus*, PFBV) se encuentra asignado al género *Carmovirus* dentro de la familia *Tombusviridae*, y como el resto de los miembros de este grupo, posee un genoma monopartido de RNA simple cadena (ssRNA) y polaridad positiva de aproximadamente 4 kb, que se encapsida en partículas isométricas de 30 nm de diámetro. El RNA genómico del virus muestra una organización similar al resto de carmovirus, con cinco marcos abiertos de lectura (*open reading frames*, ORF) y dos regiones no codificantes de 32 y 236 nt en los extremos 5' y 3', respectivamente. La ORF 1, situada en 5', codifica una proteína de 27 kDa (p27) que termina en un codón ámbar, cuya lectura a través permite la traducción de la ORF 2, dando lugar a una proteína de 86 kDa (p86). Tanto p27 como p86 presentan gran homología con proteínas implicadas en la replicación en otros carmovirus. La proteína p86 contiene los motivos característicos de las RNA polimerasas dependientes de RNA, mientras que p27 no posee ningún motivo que explique su supuesta implicación en la replicación. Las dos ORF centrales (ORF 3 y 4) codifican dos pequeñas proteínas de 7 y 12 kDa (p7 y p12), presuntamente implicadas en el movimiento intracelular e intercelular del patógeno, y la ORF 5 codifica un polipéptido de 37 kDa (p37) que se ajusta al patrón estructural de las proteínas de cubierta (CP) del género *Carmovirus* y, de forma más general, de la familia *Tombusviridae*.

En este trabajo se ha establecido la etapa del ciclo infeccioso en la que se encuentran involucradas las distintas proteínas del PFBV y se han analizado relaciones estructura-función en dichos productos, centrándonos en ciertos rasgos atípicos y/o propiedades escasamente caracterizadas en virus relacionados.

El estudio de los productos codificados por las ORF 1 y 2 ha demostrado que tanto la proteína p27 como p86 son necesarias para la replicación del virus. La expresión en plantas y en levaduras de ambas replicasas fusionadas a proteínas fluorescentes y su posterior observación en el microscopio confocal, ha permitido determinar que ambas moléculas se dirigen de forma independiente a las mitocondrias, donde co-localizan y no inducen alteraciones visibles en la morfología o distribución de estos orgánulos. Un análisis de las señales que guían el direccionamiento mitocondrial de p27 ha revelado la implicación en el mismo de dos regiones, una de 29 residuos situada hacia el extremo amino terminal de la proteína y otra de 27 residuos que coincide con el extremo carboxilo terminal. Predicciones *in silico* apuntan a la presencia de hélices- $\alpha$  anfípáticas en las regiones identificadas que podrían mediar la asociación de p27 a las membranas mitocondriales. Dicha asociación parece ser, además,

independiente de muchos de los factores celulares que intervienen en la importación de proteínas a mitocondrias, ya que la ausencia de los mismos no afecta a la localización subcelular de p27, al menos en levaduras.

Estudios adicionales con la proteína p27 han mostrado que es capaz de unir RNA *in vitro*, con una elevada afinidad y siguiendo una cinética de cooperatividad positiva. Los resultados de ensayos de competición han sugerido que la proteína se une preferentemente a ssRNAs, y en particular a aquellos derivados del genoma viral, aunque también puede unir otros tipos de ácidos nucleicos (dsRNAs, ssDNAs, dsDNAs) con menor eficiencia. El hecho de que el complejo p27:ssRNA se mantenga estable frente a concentraciones salinas elevadas, sugiere que las interacciones iónicas no son las únicas que contribuyen a su formación/estabilidad. El análisis de versiones truncadas de p27 ha permitido identificar tres regiones de 40, 30 y 70 residuos aminoacídicos, respectivamente, que contribuyen de forma diferencial y aditiva a la unión al ácido nucleico. Tanto la localización mitocondrial como las propiedades de unión a RNA observadas para la replicasa de menor tamaño del PFBV sugieren que ésta desempeña un papel importante durante la replicación del patógeno, probablemente reclutando el molde de RNA y dirigiendo todo el complejo replicativo hacia las mitocondrias, donde presumiblemente tiene lugar la síntesis del RNA del virus.

Por otra parte, hemos confirmado el requerimiento *in vivo* de los pequeños polipéptidos codificados por las ORF 3 y 4, p7 y p12, para el movimiento del virus. Con el fin de obtener información sobre el modo de acción de al menos uno de estos productos virales, hemos determinado la localización subcelular de la proteína p12 y evaluado la posible relevancia funcional de algunas características atípicas que presenta, como son un putativo motivo tipo cremallera de leucina (*leucine zipper*, LZ) y una extensión N-t rica en residuos básicos. Los resultados obtenidos indican que p12 se une a membranas subcelulares, fundamentalmente del retículo endoplásmico, en concordancia con su perfil hidrofóbico y con lo observado para otras proteínas de movimiento, incluyendo las del género *Carmovirus*. Además, hemos concluido que el presunto LZ es necesario para el transporte célula a célula del virus y que la extensión N-t básica confiere a p12 propiedades de unión a RNA que están mediadas por residuos cargados positivamente. Estas últimas características no son compartidas por proteínas homólogas, lo que sugiere que el movimiento del PFBV puede diferir significativamente respecto al de virus relacionados.

Finalmente, hemos ensayado la capacidad de todas las proteínas codificadas por el PFBV de inhibir el silenciamiento por RNA, utilizando para ello un ensayo de expresión transitoria en plantas. Nuestros resultados han mostrado que la proteína p37 del virus es un fuerte supresor del silenciamiento, en línea con lo descrito previamente para las CP de al menos dos miembros del género *Carmovirus*. Asimismo, hemos observado que



esta proteína es capaz de unirse *in vitro* a pequeños RNAs interferentes (*small interfering RNAs*, siRNAs), una capacidad que se correlaciona *in vivo* con la actividad supresora del silenciamiento y con el aumento de la patogenicidad de un virus heterólogo. En conjunto, estos resultados sugieren que p37 inhibe el silenciamiento por RNA secuestrando siRNAs y previniendo su incorporación al complejo de silenciamiento inducido por RNA, un mecanismo ampliamente utilizado por supresores no relacionados.



# Summary

*Pelargonium flower break virus* (PFBV) belongs to the genus *Carmovirus* within the family *Tombusviridae* and, as the remaining members of the group, possesses a monopartite positive-sense single-stranded (ss) RNA genome of about 4 kb, which is encapsidated into isometric particles of 30 nm in diameter. Like other carmoviruses, the genomic RNA of PFBV harbours five open reading frames (ORF) flanked by non-coding regions of 32 and 236 nt at the 5' and 3', respectively. The 5'-proximal ORF 1 encodes a protein of 27 kDa (p27) and terminates with an amber codon, which may be read-through into an in-frame ORF2 to generate a protein of 86 kDa (p86). Both products (p27 and p86) exhibit high homology with proteins involved in replication in other carmoviruses. Protein p86 contains sequence motifs characteristic of RNA-dependent RNA polymerases while p27 does not present any motif to explain its presumed involvement in replication. Two internal ORF (ORF 3 and 4) encode small proteins of 7 and 12 kDa (p7 and p12), that probably mediate the viral intra- and intercellular movement, and ORF 5 encodes a polypeptide of 37 kDa (p37) that fits the structural pattern of coat proteins (CP) of the genus *Carmovirus* and, in general, of the family *Tombusviridae*.

The work presented here has been aimed at determining the step of the infectious cycle in which the different proteins of PFBV are involved and at analyzing structure-function relationships in these products, putting the focus on certain atypical features and/or properties poorly characterized in related viruses.

Mutation of ORF 1 and 2 has indicated that products p27 and p86 are essential for virus replication. The expression in plants and yeast of PFBV replicases tagged with fluorescent proteins and its subsequent observation under a confocal microscope, have revealed that both molecules are targeted independently to mitochondria. The morphology or distribution of these organelles is not affected by the presence of p27 and/or p86, which, moreover, show colocalization patterns. Analysis of the signals that guide the mitochondrial targeting of p27 has pointed to the involvement of two regions, one of 29 residues located toward the N-terminus of the protein and other of 27 residues, which match with its C-terminus. An *in silico* analysis has predicted the formation of amphipathic  $\alpha$ -helical regions that could mediate the association of p27 with mitochondrial membranes. Such association seems to be independent of many of the cellular factors related with protein import to mitochondria, since their absence does not affect the subcellular localization of p27, at least in yeast.

Additional studies with protein p27 have shown that it is also capable of binding RNA *in vitro*, with high affinity and with positive cooperativity. Competition assays

have indicated that the protein binds preferentially to ssRNAs and, particularly, to those derived from the viral genome; nonetheless, it can also bind other types of nucleic acids (dsRNAs, ssDNAs, dsDNAs), albeit with lower efficiency. The fact that the complex p27:ssRNA is stable at high salt concentrations, suggests that interactions other than ionic ones might contribute to its formation / stability. Assessment of truncated versions of the protein has allowed identification of three regions of 40, 30 and 70 residues, respectively, that contribute differentially to nucleic acid binding and in additive manner. Both, the mitochondrial localization and RNA binding properties observed for the smaller replicase of PFBV, suggest that it plays an important role during the replication of the pathogen, most likely by recruiting the RNA template and by targeting the replicative complex to mitochondrial membranes, the site where the viral RNA synthesis takes place.

On the other hand, it has been confirmed that the two small polypeptides encoded by ORF 3 (p7) and ORF 4 (p12) are required for viral movement. In order to obtain information about the mode-of-action of at least one of these viral products, the subcellular localization of protein p12 has been determined. In addition, the potential functional relevance of some atypical features, such as a putative leucine zipper motif (LZ) and an N-t extension rich in basic residues, has been evaluated. The results have indicated that p12 associates to subcellular membranes, primarily to endoplasmic reticulum, which is in accordance with its hydrophobic profile and with that observed for others movement proteins, including those of the genus Carmovirus. Furthermore, we have determined that the putative LZ is necessary for pathogen cell-to-cell transport and that the basic N-t extension of p12 confers RNA-binding properties to this protein, which are mediated by positively charged residues. These latter characteristics are not shared by homologous proteins, suggesting that the movement of PFBV may mechanistically differ from that of related viruses.

Finally, the ability of all proteins encoded by the PFBV to inhibit RNA silencing has been tested using a transient expression assay in plants. Our results have shown that protein p37 is a strong suppressor of silencing, in line with that reported for the CP of at least two members of the genus Carmovirus. It has also been observed that this protein is able to bind small interfering RNAs (siRNAs) *in vitro*. This capability is correlated, *in vivo*, with both silencing suppressor activity and enhancement of viral pathogenicity. Taken together, these results suggest that protein p37 inhibits the RNA silencing by sequestering siRNAs thus preventing their incorporation into an RNA-induced silencing complex, a mechanism commonly used by non-related suppressors.

# Resum

El virus de la ruptura del color de la flor del *Pelargonium* (*Pelargonium flower break virus*, PFBV) es troba assignat al gènere *Carmovirus* dins de la família *Tombusviridae*, i com la resta dels membres d'este grup, posseïx un genoma monopartit de RNA simple cadena (ssRNA) i polaritat positiva d'aproximadament 4 kb, que s'encapsida en partícules isomètriques de 30 nm de diàmetre. El RNA genòmic del virus mostra una organització semblant a la resta de carmovirus, amb 5 marcs oberts de lectura (open reading frames, ORF) i dues regions no codificants de 32 i 236 nt en els extrems 5' i 3', respectivament. L'ORF 1, situada en 5', codifica una proteïna de 27 kDa (p27) que acaba en un codó ambre, la lectura del qual a través permet la traducció de l'ORF 2, donant lloc a una proteïna de 86 kDa (p86). Tant p27 com p86 presenten gran homologia amb proteïnes implicades en la replicació en altres carmovirus. La proteïna p86 conté els motius característics de les RNA polimerases dependents de RNA, mentre que p27 no posseïx cap motiu que explique la seua suposada implicació en la replicació. Les dos ORF centrals (ORF 3 i 4) codifiquen dos xicotetes proteïnes de 7 i 12 kDa (p7 i p12), presumptament implicades en el moviment intracel·lular i intercel·lular del patogen, i l'ORF 5 codifica un polipèptid de 37 kDa (p37) que s'ajusta al patró estructural de les proteïnes de coberta (CP) del gènere *Carmovirus* i, de forma més general, de la família *Tombusviridae*.

En este treball s'ha establert l'etapa del cicle infecció en què es troben involucrades les distintes proteïnes del PFBV i s'han analitzat relacions estructural-funció en estos productes, centrant-nos en certs trets atípics i/o propietats escassament caracteritzades en virus relacionats

L'estudi dels productes codificats per les ORF 1 i 2 ha demostrat que tant la proteïna p27 com p86 són necessàries per a la replicació del virus. L'expressió en plantes i rents d'ambdues replicases fusionades a proteïnes fluorescents i la seua posterior observació en el microscopi confocal, ha permés determinar que ambdues molècules es dirigeixen de forma independent a les mitocondries, on co-localitzen i no induïxen alteracions visibles en la morfologia o distribució d'estos orgànuls. Una anàlisi dels senyals que guien el direccionament mitocondrial de p27 ha revelat la implicació en aquest de dues regions, una de 29 residus situada cap a l'extrem amine terminal de la proteïna i una altra de 27 residus que coincidix amb l'extrem carboxil terminal. Prediccions *in silico* apunten a la presència d'hèlices- $\alpha$  anfipàtiques en les regions identificades que podrien mediar l'associació de p27 a les membranes mitocondrials. L'esmentada associació pareix, a més, independent de molts dels factors cel·lulars que

intervenen en la importació de proteïnes a mitocondries, ja que l'absència dels mateixos no afecta la localització subcel·lular de p27, almenys en rents.

Estudis addicionals amb la proteïna p27 han mostrat que és capaç d'unir RNA *in vitro*, amb una elevada afinitat i seguint una cinètica de cooperativitat positiva. Els resultats d'assajos de competició han suggerit que la proteïna s'unix preferentment a ssRNAs, i en particular a aquells derivats del genoma viral, encara que també pot unir altres tipus d'àcids nucleics (dsRNAs, ssDNAs, dsDNAs) amb menor eficiència. El fet que el complex p27: ssRNA es mantinga estable enfront de concentracions salines elevades, suggereix que les interaccions iòniques no són les úniques que contribueixen a la seua formació/estabilitat. L'anàlisi de versions truncades de p27 ha permès identificar tres regions de 40, 30 i 70 residus aminoacídics, respectivament, que contribueixen de forma diferencial i additiva a la unió a l'àcid nucleic. Tant la localització mitocondrial com les propietats d'unió a RNA observades per a la replicasa més xicoteta del PFBV suggereixen que esta exercix un paper important durant la replicació del patogen, probablement reclutant el motle de RNA i dirigint tot el complex replicatiu cap a les mitocondries, on presumiblement té lloc la síntesi del RNA del virus.

D'altra banda, hem confirmat el requeriment *in vivo* dels xicotets polipèptids codificats per les ORF 3 i 4, p7 i p12, per al moviment del virus. A fi d'obtenir informació sobre el mode d'acció d'almenys un d'estos productes virals, hem determinat la localització subcel·lular de la proteïna p12 i avaluat la possible rellevància funcional d'algunes característiques atípiques que presenta, com són un putatiu motiu tipus cremallera de leucina (leucine zipper, LZ) i una extensió N-t rica en residus bàsics. Els resultats obtinguts indiquen que p12 s'unix a membranes subcel·lulars, fonamentalment del reticle endoplàsmic, en concordança amb el seu perfil hidrofòbic i amb allò que s'ha observat per a altres proteïnes de moviment, incloent les del gènere *Carmovirus*. A més, hem conclòs que el presumpte LZ és necessari per al transport cel·lula a cel·lula del virus i que l'extensió N-t bàsica conferix a p12 propietats d'unió a RNA que estan mediades per residus carregats positivament. Estes últimes característiques no són compartides per proteïnes homòlogues, la qual cosa suggereix que el moviment del PFBV pot diferir significativament respecte al de virus relacionats.

Finalment, hem assajat la capacitat de totes les proteïnes codificades pel PFBV d'inhibir el silenciament de RNA, utilitzant per a això un assaig d'expressió transitòria en plantes. Els nostres resultats han mostrat que la proteïna p37 del virus és un fort supressor del silenciament, en línia amb allò que s'ha descrit prèviament per a les CP d'almenys dos membres del gènere *Carmovirus*. Així mateix, hem observat que esta proteïna és capaç d'unir-se *in vitro* a xicotets RNAs interferents (small interfering RNAs, siRNAs), una capacitat que es correlaciona *in vivo* amb l'activitat supressora del silenciament i amb l'augment de la patogenicitat d'un virus heteròlogue. En conjunt,

estos resultats suggerixen que p37 inhibeix el silenciament de RNA segrestant siRNAs i prevenint la seua incorporació al complex de silenciament induït per RNA, un mecanisme àmpliament utilitzat per supressors no relacionats.





# Publicaciones

La realización de esta de Tesis Doctoral ha permitido la publicación de los siguientes artículos científicos:

- **Sandra Martínez-Turiño & Carmen Hernández** (2009). Inhibition of RNA silencing by the coat protein of *Pelargonium flower break virus*: distinctions from closely related suppressors. *Journal of General Virology* **90**: 519-525.
- **Sandra Martínez-Turiño & Carmen Hernández** (2010). Identification and characterization of RNA-binding activity in the ORF1-encoded replicase protein of *Pelargonium flower break virus*. *Journal of General Virology* **91**: 3075-3084.
- **Sandra Martínez-Turiño & Carmen Hernández** (2011). A membrane-associated movement protein of *Pelargonium flower break virus* shows RNA-binding activity and contains a biologically relevant leucine zipper-like motif. *Virology* **413**: 310-319.
- **Sandra Martínez-Turiño & Carmen Hernández** (2012). Analysis of the subcellular targeting of the smaller replicase protein of *Pelargonium flower break virus*. *Virus Research* **163**: 580-591.



# INTRODUCCIÓN





# Los virus de plantas

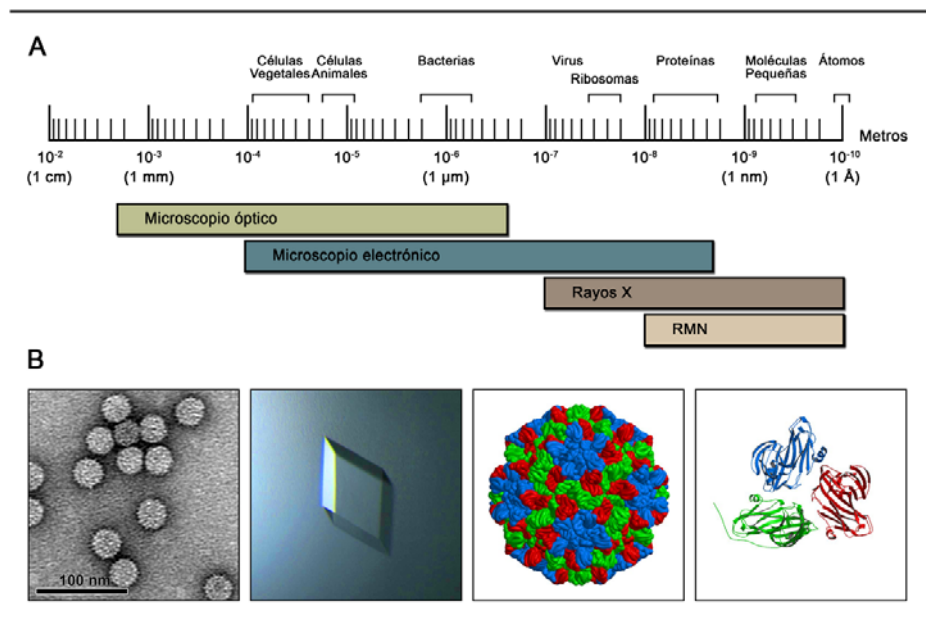
## 1.1. ORÍGENES DE LA VIROLOGÍA DE PLANTAS

Los orígenes de la actual Virología Vegetal se sitúan a finales del siglo XIX cuando en 1886 el agricultor y químico alemán Adolf Mayer describió los síntomas de una enfermedad que afectaba a solanáceas y que llamó enfermedad del mosaico del tabaco. Años más tarde, el científico ruso Dimitrii Iwanowski y el microbiólogo holandés Martinus Beijerinck comprobaron de manera independiente que el agente causal de la enfermedad no se comportaba como los patógenos conocidos hasta ese momento pues no podía ser retenido por filtros a prueba de bacterias, ni ser cultivado en un medio con nutrientes. En 1898 ya se contaba con datos experimentales que probaban la existencia de nuevos organismos capaces de multiplicarse únicamente dentro de células vivas en división. A partir de entonces, Beijerinck acuñó el término “virus” (del latín *virus*, “toxina” o “veneno”) para referirse a este “germen viviente soluble” (*contagium vivum fluidum*).

Durante los años 20 numerosos químicos y biólogos comenzaron a investigar distintas macromoléculas y descubrieron que muchas de ellas, como las enzimas, las hormonas, los anticuerpos y las toxinas, eran proteínas. A la vez, el desarrollo de métodos para purificar y cristalizar estos compuestos hizo posible su estudio a nivel estructural y funcional. Todo esto permitió que, entre los años 1920 y 1930, surgieran sorprendentes hipótesis concernientes a la naturaleza “enigmática” de los virus. Por ejemplo, en 1923, Benjamin Duggar y Joanne Karrer Armstrong postularon de forma independiente que el agente causal de la enfermedad del mosaico del tabaco era una “proteína biocoloide” capaz de “auto-reproducirse”. A pesar de lo impreciso de esta hipótesis, la misma sirvió para anticipar en algunas décadas la naturaleza “biológica” de los virus y representó la primera respuesta conceptual al enigma de estos organismos [Pennazio & Conti, 2002]. Por estas fechas, James Johnson comenzó a categorizar los patógenos que estudiaba, llegando a elaborar lo que sería el primer sistema racional de clasificación de los virus de plantas y, en 1933, Kenneth Smith publicó el primer libro de texto que trataba la Virología de Plantas como conocimiento científico sistematizado. También en el transcurso de estos años se formalizó el concepto de virus en un escenario físico-químico al realizarse importantes descubrimientos; entre ellos, el aislamiento y cristalización en 1935 del virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) por el norteamericano Wendell Stanley. Aunque entonces Stanley creyó que había obtenido un compuesto proteico, su hallazgo constituyó el primer aislamiento de un material biológico en forma cristalina y sirvió para demostrar que los virus no tenían una naturaleza líquida, sino que eran agentes particulados.

En 1937, Frederick Charles Bawden y Norman Wingate Pirie demostraron que el TMV estaba formado, además de por proteínas, por un 5 % de ácido ribonucleico (RNA); sin embargo, muchos investigadores aún pensaban que este último sólo podía desempeñar funciones estructurales y no entendían que una cantidad tan pequeña de RNA tuviese algún significado biológico. No fue hasta 1956 que Heinz Fraenkel-Conrat determinó que también el RNA podía contener toda la información genética necesaria para un organismo. Posteriormente, Harold McKinney demostraría que los virus podían mutar y otros investigadores como Harold Storey, Kenneth Smith y Harry Severin, probarían que podían ser transmitidos por insectos, proporcionando la primera interpretación de la relación virus-agente de transmisión. En esta década, también se obtuvieron las primeras pruebas experimentales acerca del poder antigénico de los virus de plantas y se elaboró el primer test para estimar la infectividad de estos patógenos.

Diversas técnicas analíticas, y en particular la microscopía electrónica, permitieron la determinación exacta de la forma y tamaño de las partículas virales. Desde entonces, con el apoyo de numerosas metodologías (**Fig. 1**), se ha podido estimar la actividad viral, estudiar la diseminación de un virus dentro de una planta, identificar



**Fig. 1:** Algunas técnicas utilizadas en Virología. **(A)** Poder resolutivo de la Microscopía óptica y electrónica, la Cristalografía de rayos X y la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). **(B)** Virus de las machas cloróticas en anillo del Hibisco (HCRSV). De izquierda a derecha se muestra: micrografía electrónica de viriones y de un cristal purificado (50,000x) para la Difracción por rayos X [Cheng *et al.*, 2009a], modelo del virión y dominios estructurales de la proteína de cubierta.

los tipos de resistencia del huésped, correlacionar genes vegetales individuales con patogenicidad viral, y llegar a acumular un conjunto de conocimientos que con el paso de los años han contribuido al desarrollo de la Virología de Plantas, primero como rama de la Patología Vegetal y más tarde afianzada como ciencia independiente.

## 1.2. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE VIRUS

Los virus representan no sólo un tipo particular de patógenos, sino una entidad biológica única, definida como el conjunto de una o más moléculas de ácidos nucleicos, normalmente encapsidadas dentro de una cubierta o cubiertas proteicas o lipoproteicas. Son organismos incapaces de capturar y almacenar energía por sí mismos que dependen para ser funcionalmente activos de la maquinaria metabólica del huésped, y que se multiplican a partir de la síntesis de todos sus componentes, generando progenies que pueden diferir en mayor o menor medida de las moléculas parentales [Hull, 2009].

Para un virus el concepto de especie puede ser aplicado totalmente, es decir, poseen genes, pueden replicarse, adaptarse, especializarse, evolucionar y ocupar nichos ecológicos específicos. Se trata de un entidad compleja que adopta diversas formas y atraviesa diferentes estadios a lo largo de su ciclo de vida; por ejemplo, puede ser un ácido nucleico mientras se replica en la célula huésped o en el vector, o formar, una vez ensamblado, partículas con propiedades físico-químicas intrínsecas [van Regenmortel & Mahy, 2004; Norrby, 2008]. Finalmente, el término “virus” no sólo hace referencia a los elementos constitutivos individuales, sino a características que posee el “biosistema viral” en conjunto, como la capacidad infecciosa, el uso de determinadas vías de transmisión, los efectos particulares sobre el hospedador, etc.

La gran diversidad de virus aislados de humanos, animales, plantas, hongos y bacterias, hace obvia la necesidad de contar con un sistema universal de clasificación. Con esta finalidad, en 1966 se constituye un grupo de expertos que más tarde pasaría a llamarse Comité Internacional para la Taxonomía Viral (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV). En la actualidad, el ICTV reconoce más de 1000 especies de virus de plantas (751 definitivas y 286 provisionales), agrupadas en 17 familias y 80 géneros [Rochon *et al.*, 2011]. Dada la enorme diversidad que existe entre los distintos virus de plantas, los criterios para su clasificación son muy variados, destacando: (1) el tipo de ácido nucleico, (2) la organización genómica y el mecanismo de replicación que utiliza el patógeno, (3) la forma y tamaño del virión, (4) la presencia o no de cubierta proteica o lipoproteica, (5) las características de algunas de las proteínas virales, (6) las propiedades antigénicas, o (7) las propiedades biológicas, como la gama de hospedador, la patogenicidad y el modo de transmisión.

### 1.3. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y CICLO INFECCIOSO DE LOS VIRUS DE PLANTAS

Los virus de plantas poseen una organización estructural bastante sencilla. Las partículas virales o viriones suelen estar formadas por una cubierta de naturaleza proteica y por un genoma constituido por moléculas de ácido nucleico (DNA o RNA). Ciertos virus complejos poseen además una envoltura externa formada por lipoproteínas, glicoproteínas o ambas. En otros casos, la forma madura del virión encierra junto al genoma pequeñas moléculas como las poliaminas o iones metálicos que estabilizan las partículas virales. También pueden estar presentes proteínas codificadas por el propio patógeno, con actividad polimerasa, proteasa o de cualquier otro tipo, que ayuden al establecimiento de la infección.

**Cubierta viral.** En el virión, el genoma se encuentra protegido de la degradación por nucleasas al estar recluido en el interior de una “carcasa” de naturaleza proteica o cápsida, formada por numerosas subunidades fuertemente unidas de la proteína de cubierta (CP). Estas subunidades son químicamente idénticas y constituyen el componente proteico mayoritario de los virus. Las CP se ensamblan siguiendo una simetría helicoidal o icosaédrica. En el primer caso, los virus adquieren apariencia de bastones rígidos o filamentos flexibles, mientras que en el segundo, se observan casi como esferas. Con este último tipo de reordenamiento se consiguen cubiertas de grandes dimensiones internas, de un diámetro aproximado de 30 nm. Las proteínas de cubierta de los virus helicoidales se pliegan principalmente como hélices tipo- $\alpha$ , mientras que las CP de los virus esféricos adoptan sobre todo conformaciones del tipo lámina- $\beta$ .

**Genoma viral.** Los genomas virales pueden organizarse de forma monopartida, bipartida, tripartida o multipartida, dependiendo de la cantidad de moléculas de ácido nucleico que lo integran. La mayoría de los virus que infectan animales y plantas son virus de RNA [Ball, 2007]. De hecho, hasta un 80 % de los virus de plantas poseen genomas de RNA simple cadena (ssRNA) y polaridad positiva [ssRNA(+)]. Además, pueden encontrarse, en orden de abundancia, genomas de ssRNA y polaridad negativa [ssRNA(-)], de RNA doble cadena (dsRNA), de DNA simple cadena (ssDNA) y de DNA doble cadena (dsDNA), siendo estos últimos los menos abundantes.

Los genomas de RNA raramente exceden las 30 kilobases (kb), y en la mayoría de los virus que afectan plantas no suelen superar las 10 kb. Estos patógenos contienen al menos tres genes: uno o más que codifican proteínas implicadas en replicación, uno o más que codifican proteínas de movimiento y uno o más a partir de los cuales se traducen componentes estructurales. También pueden presentar genes adicionales que codifiquen proteínas con otras funciones como, por ejemplo, proteasas, supresores del silenciamiento por RNA o componentes auxiliares del proceso de transmisión viral mediada por vectores biológicos. Además de las regiones codificantes, el genoma viral



contiene secuencias nucleotídicas no traducibles (*unstranlated regions*, UTR) en los extremos 5' y 3' que desempeñan un papel importante en la replicación y traducción del virus.

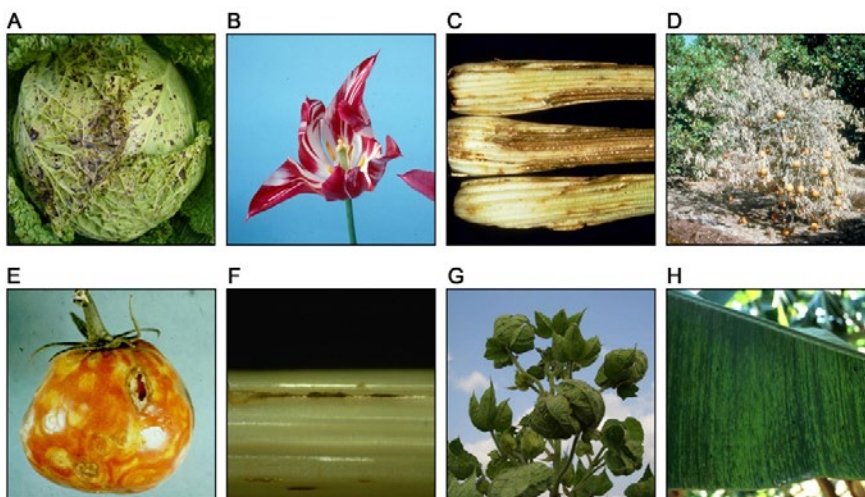
La cantidad limitada de información genética que poseen los virus de plantas debe ser compensada con una organización genómica optimizada y con el empleo de una serie de estrategias que les permitan llevar a cabo todas sus funciones de manera rápida y eficiente. Así, en los genomas virales las regiones codificantes suelen estar muy empaquetadas y separadas por un número mínimo de nucleótidos no codificantes. Más aún, algunos genes pueden estar contenidos totalmente en la pauta de lectura abierta (*open reading frame*, ORF) de otros y distintas ORF pueden estar solapadas. Es frecuente también la superposición de regiones reguladoras y codificantes. Además, la mayoría de proteínas virales son multifuncionales. Por otra parte, estrategias como el procesamiento de poliproteínas, el procesamiento alternativo de RNA (*splicing*) o la existencia de RNA *ambisense* (con capacidad codificante en las dos polaridades), redundan en un incremento de la diversidad de RNAs mensajeros (mRNAs) disponibles y de productos génicos. Otras estrategias permiten regular el nivel de síntesis de algunas proteínas virales. Por ejemplo, los ribosomas pueden comenzar la traducción de una proteína siguiendo una pauta de lectura y cambiar dicha pauta con cierta frecuencia ante determinadas señales en el mRNA del virus (mecanismo de *frameshift*, FS) dando lugar a una nueva proteína. De forma similar, en ciertas rondas de traducción los ribosomas pueden sobrepasar codones de terminación débiles realizando una “lectura a través” de ellos (mecanismo de *read-through*, RT) que genere polipéptidos de mayor longitud. Finalmente, mecanismos como la síntesis de RNA subgenómicos (sgRNAs), el escape al rastreo ribosomal (*leaky scanning*) o la iniciación interna mediada por la presencia de un sitio de entrada interna de los ribosomas (*internal ribosome entry site*, IRES), entre otros, posibilitan o mejoran la accesibilidad de algunos genes virales a la maquinaria de síntesis proteica de la célula huésped.

**Ciclo viral.** Un ciclo viral es un proceso complejo caracterizado por una serie de etapas definidas que pueden coexistir a la vez en uno o más sitios específicos o solaparse cronológicamente dentro de la célula huésped. La enorme variabilidad de los virus propicia la existencia de ciclos replicativos muy diversos; sin embargo, en líneas generales un ciclo de vida típico de un virus de plantas puede ser dividido de la siguiente forma:

- *Entrada en la célula huésped.* A diferencia de la mayor parte de los virus animales que ingresan a la célula a través de endocitosis mediada por receptores, los virus de plantas se encuentran con una barrera física representada por la pared celular y la cutícula vegetal que constituyen la primera línea de defensa contra las infecciones. Como son incapaces de atravesar dicha barrera, la entrada

en la célula de estos patógenos se produce de una forma un poco “forzada”, a través de heridas y/o asistida por vectores biológicos.

- *Desencapsidación.* El genoma viral queda al descubierto por disgregación de la partícula y eliminación de la cubierta viral.
- *Traducción de proteínas virales.* La mayoría de virus con genomas de RNA permanecen en el citoplasma de la célula huésped y los RNAs genómicos (gRNAs) servirán directamente como mRNAs [virus ssRNA(+)] o como moldes para la síntesis de mRNAs (virus ssRNA(-) y dsRNA). La maquinaria de síntesis proteica del hospedador se encargará de traducir las replicasas y el resto de proteínas codificadas por los distintos genes virales, aunque el momento en el que se traducen estas últimas puede diferir dependiendo del patógeno. En el caso de los virus con genoma de DNA, normalmente entrarán en el núcleo donde tendrá lugar la generación de mRNAs catalizada por RNA polimerasas celulares. Estos mRNAs saldrán al citoplasma para ser traducidos y algunas proteínas podrán entrar en el núcleo para completar el ciclo replicativo.
- *Replicación.* La replicación permite obtener múltiples copias del genoma viral. Las estrategias de replicación que siguen los distintos tipos de virus están condicionadas básicamente por el tipo de genoma que poseen. En el caso de los virus de RNA, normalmente transcurre en el citoplasma asistida por la RNA polimerasa dependiente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp) codificada por el patógeno. En el caso de los virus de ssDNA, la replicación tiene lugar en el núcleo asistida por la maquinaria celular de síntesis de DNA. A diferencia de los anteriores, la replicación de los virus de dsDNA presenta una fase nuclear y otra citoplasmática en la que se produce la síntesis de nuevas moléculas de dsDNA mediante un proceso de retrotranscripción mediado por una DNA polimerasa dependiente de RNA (*RNA-dependent DNA polymerase*, RdDp) viral.
- *Ensamblaje y encapsidación de la progenie viral.* Las subunidades de la CP reconocen las moléculas de RNA o de DNA de la progenie y se ensamblan formando partículas virales.
- *Propagación del virus.* El virus se disemina dentro de la planta moviéndose de una célula a otra e ingresando al sistema vascular a través de los tubos cribosos del floema. La transferencia a una nueva planta varía de un patógeno a otro, y puede ser vertical (a través de polen, semillas, propagación vegetativa) u horizontal. En este último caso puede producirse por inoculación mecánica o con la ayuda de un vector de transmisión, habitualmente un artrópodo herbívoro, un hongo o un nemátodo.



**Fig. 2:** Sintomatología inducida por distintos tipos de virus de plantas. Virus de ssRNA(+): **(A)** virus del mosaico amarillo del nabo (TYMV) (género *Tymovirus*/familia *Tymoviridae*), **(B)** virus de la rotura del color del tulipán (TBV) (*Potyvirus*/*Potyviridae*), **(C)** virus del mosaico del pepino (CMV) (*Cucumovirus*/*Bromoviridae*) y **(D)** virus de la tristeza de los cítricos (CTV) (*Closterovirus*/*Closteroviridae*). Virus de ssRNA(-): **(E)** virus del bronceado del tomate (TSWV) (*Tospovirus*/*Bunyaviridae*). Virus de dsRNA: **(F)** virus del enanismo de las rayas negras del arroz (RBSDV) (*Fijivirus*/*Reoviridae*). Virus de ssDNA: **(G)** virus de la hoja rizada del algodón de Multan (CLCuMV) (*Begomovirus*/*Geminiviridae*). Virus de dsDNA: **(H)** virus del estriado del banano (BSV) (*Badnavirus*/*Caulimoviridae*).

Aunque las infecciones virales pueden ser asintomáticas, en un número importante de casos la presencia del virus tiene un impacto negativo sobre el desarrollo de las plantas afectadas, lo que se traduce en la disminución de la calidad de los cultivos y en importantes pérdidas económicas (**Fig. 2**). Un buen conocimiento del ciclo infeccioso del patógeno y del papel que desempeñan en cada etapa sus distintos componentes, sin duda puede contribuir al diseño de herramientas y de estrategias efectivas para combatir los daños causados por el mismo.



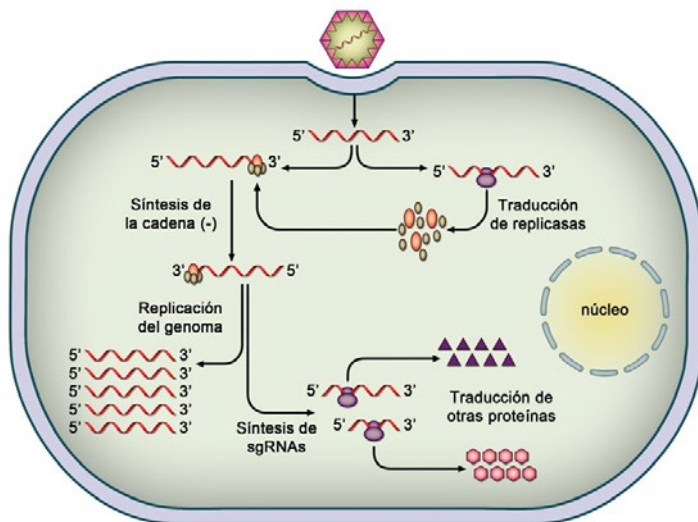
# Replicación de virus de ssRNA(+)

## 2.1. REPLICACIÓN. ASPECTOS GENERALES

La replicación es la etapa central del ciclo infeccioso viral y tiene como resultado la generación de grandes cantidades de ácidos nucleicos heterólogos dentro de células que, en principio, poseen límites estrictos para producirlos [Hull, 2009]. Este proceso aprovecha la gran diversidad de componentes y vías metabólicas del medio intracelular, entre ellos, complejos ribosomales que sintetizan las replicasas virales, enzimas que intervienen en las modificaciones post-traduccionales, nucleósidos para la síntesis del RNA, energía necesaria para la polimerización y factores celulares que participan en la formación de complejos replicativos funcionales [Thivierge *et al.*, 2005].

La replicación de los virus de ssRNA(+) transcurre en el citoplasma, pero no libremente, sino asociada a compartimentos membranosos especializados [Tao & Ye, 2010]. Otras características generales de este proceso son las siguientes: (1) las replicasas virales son traducidas directamente desde el genoma del patógeno que actúa como mRNA, (2) estas proteínas normalmente se producen en mucha menor cantidad que el resto de productos virales, y corresponden a una RdRp y a una o más proteínas auxiliares [Nagy & Pogany, 2008], (3) durante la replicación se forman intermediarios de RNA de polaridad negativa, complementarios al genoma, que sirven de molde para generar la progenie de ssRNA(+) y, en algunos casos, también para generar sgRNAs, (4) la producción de cadenas de polaridad positiva y negativa es asimétrica y permite la generación de una mayor cantidad de gRNA(+) (la progenie infecciosa) respecto a los intermediarios negativos [Buck, 1996; Ball, 2007], (5) los gRNAs deben servir como moldes para la traducción y la replicación, de manera que son necesarios interruptores moleculares que, con la ayuda de factores virales y celulares, permitan la utilización coordinada de los moldes en uno u otro proceso [Gamarnik & Andino, 1998; Thivierge *et al.*, 2005] (**Fig. 3**).

El estudio de la replicación en los virus de ssRNA(+) ha experimentado un fuerte auge en los últimos años, lo que ha permitido en muchos casos la identificación y caracterización detallada de regiones del genoma viral y de proteínas relevantes para este proceso. Todo ello ha sido posible gracias a la utilización de distintas aproximaciones tanto *in vitro* como *in vivo* y, en este último caso, al empleo de sistemas modelo tanto de plantas como heterólogos, particularmente levaduras [Nagy & Pogany, 2006]. A continuación, se comentarán las características generales de los moldes y de las proteínas virales implicadas en la replicación que, junto con diversos factores del huésped y en asociación a membranas subcelulares, constituyen el complejo replicativo viral.



**Fig. 3:** Representación esquemática de la replicación de un virus de ssRNA(+). El gRNA actúa como mRNA permitiendo la traducción de las replicasas virales. Estas proteínas se encargarán de copiar el gRNA, generando intermediarios de polaridad negativa que servirán de molde para la síntesis de nuevas cadenas positivas (la progenie viral) y, en algunos casos, de sgRNAs, a partir de los cuales se traducen otras proteínas virales.

## 2.2. MOLDES VIRALES. REQUERIMIENTOS ESTRUCTURALES Y DE SECUENCIA

Los gRNAs virales contienen elementos de estructura primaria, secundaria e incluso terciaria que actúan en *cis* y/o en *trans* regulando su replicación [Eckerle & Ball, 2002; Yi & Kao, 2008]. En las reacciones *cis*, el elemento que actúa y su sitio de acción se sitúan en el propio genoma [Dreher, 1999; Sivakumaran *et al.*, 1999; Fabian *et al.*, 2003], mientras que la mayoría de los factores *trans* que intervienen en la replicación son componentes proteicos virales o celulares que interactúan directa o indirectamente con el molde que va a ser copiado [Nagy & Pogany, 2008; Ishibashi *et al.*, 2010]. A continuación se describirán algunos aspectos relacionados con los elementos *cis* y, en el siguiente apartado, se tratarán las características de los factores proteicos que actúan en *trans*.

A los elementos *cis* que intervienen en la replicación se les atribuyen diversas funciones, entre ellas: (1) participar en la formación de los complejos replicativos [Panaviene *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2009], (2) actuar como promotores de la replicación promoviendo la síntesis *de novo* de la cadena complementaria [Kim *et al.*, 2000; Kao *et al.*, 2001], (3) regular la síntesis asimétrica de las cadenas de polaridad positiva y negativa [Ball, 2007], (4) intervenir en la transcripción de los distintos sgRNAs, si procede [Kim & Hemenway, 1999; Grdzelishvili *et al.*, 2005] y, (5) funcionar como chaperonas de RNA [McCormack & Simon, 2004].

Los elementos *cis* que funcionan como promotores se encuentran normalmente en la 3' UTR de los RNAs de polaridad positiva y negativa, adoptando conformaciones específicas que son reconocidas por las RdRp [Dreher, 2009]. Así, la RdRp se sitúa en el extremo 3' de la cadena de gRNA(+) para comenzar la síntesis de la cadena complementaria. A partir de esta última se iniciará la síntesis de nuevas cadenas positivas, tras la unión de la enzima a la región 3' UTR en la cadena negativa (reflejada en el extremo 5' del gRNA(+)) [Panavas *et al.*, 2002a; Wang & Wong, 2004]. Además de estos promotores, se han descrito elementos estimuladores de la replicación (*replication enhancers*), que actúan potenciando la síntesis de las cadenas positivas, y elementos supresores de la replicación, que provocan una disminución de la síntesis de las cadenas negativas [Ray & White, 1999; Nagy *et al.*, 1999, 2001; Pogany *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004a, 2004b; Panavas & Nagy, 2005; Na & White, 2006].

Aunque los requerimientos estructurales necesarios para la replicación del gRNA no siempre coinciden con aquellos que intervienen en la transcripción de sgRNAs, se han observado similitudes entre las secuencias de los extremos 5' de los gRNAs y sus correspondientes sgRNAs [Kelly *et al.*, 1994; Zavriev *et al.*, 1996; Vives *et al.*, 2002]. Para explicar la forma en la que tiene lugar la síntesis de estos últimos, se han propuesto al menos tres modelos distintos: (1) *el de iniciación interna*, en el que la replicasa viral inicia la transcripción del sgRNA internamente, a partir del gRNA de polaridad negativa, (2) *el de síntesis discontinua*, descrito en el caso concreto de la familia *Nidoviridae* y, (3) *el de terminación prematura* de la síntesis de las cadenas negativas, que servirán a su vez como moldes para producir sgRNAs de polaridad positiva [Miller & Koev, 2000; Jiwan & White, 2011].

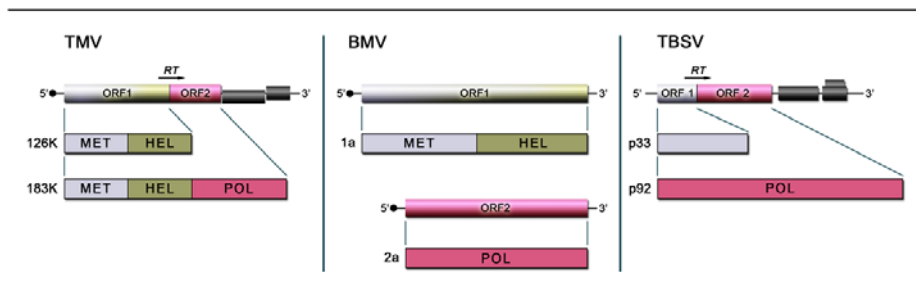
### 2.3. PROTEÍNAS IMPLICADAS EN REPLICACIÓN

Al conjunto de proteínas virales implicadas en la replicación se les llama replicasas, y puede incluir tanto proteínas con actividad enzimática como polipéptidos con otro tipo de funciones. Entre las primeras las más habituales son *la actividad RdRp* (asociada al dominio POL) y *la actividad helicasa-NTPasa* (dominio HEL). También es frecuente la implicación de una *actividad metil-transferasa* (dominio MET), pero únicamente en aquellos virus que presentan una estructura cap en 5' (una 7-metilguanosa). Esta última es típica de mRNAs celulares y resulta importante para el proceso convencional de traducción del RNA y el mantenimiento de su estabilidad.

Los dominios enzimáticos mencionados anteriormente suelen estar presentes en proteínas codificadas por el propio virus y se distribuyen de forma modular. Así, el dominio POL está contenido en la RdRp viral, pero el resto de dominios (HEL y MET) pueden estar incluidos en esta misma molécula o distribuidos en otras proteínas que, de aquí en adelante, denominaremos como proteínas auxiliares de la replicación [Ahlquist

*et al.*, 2003, 2005; Buck, 1996]. Por ejemplo, el TMV (género *Tobamovirus* / familia *Virgaviridae*) codifica dos replicasas, una de las cuales contiene los dominios MET y HEL y la otra, estos mismos dominios más el dominio POL [Merits *et al.*, 1999; Goregaoker & Culver, 2003]. Sin embargo, los miembros de la familia *Bromoviridae*, como el virus del mosaico del bromo (*Brome mosaic virus*, BMV) (género *Bromovirus*) o el virus del mosaico de la alfalfa (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) (género *Alfamovirus*), codifican también dos replicasas que contienen los dominios MET + HEL y POL, respectivamente [Ahola & Ahlquist, 1999; Kong *et al.*, 1999; Vlot *et al.*, 2003]. Para acabar de ilustrar la diversidad de posibles situaciones, cabe mencionar que virus de plantas con pequeños genomas de RNA pertenecientes a la familia *Tombusviridae*, tales como el virus del enanismo arbustivo del tomate (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV) (género *Tombusvirus*), carecen de dominios funcionales HEL y MET en las replicasas que codifican [Koonin & Dolja, 1993] (**Fig. 4**). En estos últimos, la actividad MET es prescindible ya que sus RNAs carecen de estructura cap mientras que la actividad HEL podría ser desempeñada por otros factores virales o celulares.

Cuando el virus codifica más de una proteína implicada en la replicación, estos productos se sintetizan en muchos casos en proporciones diferentes gracias a diversos mecanismos de traducción que, por lo general, permiten generar una mayor cantidad de proteína(s) auxiliar(es) que de la RdRp. Esto es así para furovirus, tobamovirus, tobravirus o tombusvirus, en los que la traducción de la proteína auxiliar a partir de la ORF 1 y el mecanismo de RT que sobrepasa su codón de parada débil para sintetizar la RdRp (codificada por la ORF 2) (**Fig. 4**), da lugar a que ambas replicasas se traduzcan en una proporción de 10:1 (proteína auxiliar:RdRp) [Osman & Buck, 1996; Buck, 1999]. De forma análoga, en algunos virus con genomas segmentados, como los



**Fig. 4:** Distribución de dominios funcionales en distintas replicasas virales. Actividad RdRp (dominio POL), metil-transferasa (MET) y helicasa (HEL). En tobamovirus (TMV), tanto la proteína auxiliar de la replicación (126K), como la RdRp (183K) contienen información redundante para dos de los tres dominios funcionales (MET y HEL). En bromovirus (BMV), las funciones se distribuyen entre ambas replicasas, la RdRp (2a) contiene el motivo POL y la proteína auxiliar (1a) contiene los motivos MET y HEL. En tombusvirus (TBSV), la RdRp (p92) y la proteína auxiliar (p33), carecen de los dominios MET y HEL.



miembros de la familia *Bromoviridae*, la replicación corre a cargo de una RdRp (proteína 2a) y una proteína auxiliar (proteína 1a) traducidas a partir de moldes virales separados (**Fig. 4**), cada uno de los cuales establece distintas interacciones con factores celulares, permitiendo finalmente que la proteína auxiliar se sintetice con una eficiencia hasta 25 veces mayor que la RdRp [Ahlquist *et al.*, 2003; Dreher & Miller, 2006]. Otras estrategias como los mecanismos de FS +1 o FS -1, empleadas por closterovirus o umbravirus, respectivamente, para traducir sus RdRp, también permiten regular las cantidades de replicasas virales a favor de las proteínas auxiliares [Karasev *et al.*, 1995; Taliensky & Robinson, 2003].

Con frecuencia, las proteínas auxiliares de la replicación son capaces de establecer interacciones entre sí y con la RdRp. Dichas interacciones resultan esenciales para el proceso replicativo, al favorecer la selección y reclutamiento del RNA viral (vRNA) y mediar la estabilidad, el ensamblaje y la localización intracelular del complejo replicativo [Nagy & Pogany, 2006]. La importancia de esta cuestión se ha demostrado para distintos virus de ssRNA(+), tanto de animales [Hope *et al.*, 1997; revisado en Tellinghuisen & Rice, 2002], como de plantas [Kao & Ahlquist, 1992; O'Reilly *et al.*, 1997; Goregaoker *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003].

Las replicasas virales pueden sufrir diversas modificaciones post-traduccionales, que permiten la regulación de sus funciones. En el caso de los virus de plantas, algunas de las modificaciones más importantes incluyen ubiquitinizaciones y fosforilaciones [Hericourt *et al.*, 2000; Jakubiec & Jupin, 2007]. Estas últimas pueden influir en el funcionamiento de la RdRp y/o de las proteínas auxiliares, probablemente al afectar a la capacidad de interacción entre ellas y/o con los moldes, previniendo el ensamblaje de nuevos complejos replicativos [Kim *et al.*, 2002; Stork *et al.*, 2005; Jakubiec *et al.*, 2006]. El papel de la ubiquitinación está menos claro pero, entre otras posibilidades, podría regular el nivel de acumulación de las replicasas a través de la ruta de degradación mediada por el proteosoma [Hericourt *et al.*, 2000].

### 2.3.1. RNA polimerasa dependiente de RNA

La RdRp desempeña un papel central en la replicación del RNA, catalizando la formación de enlaces fosfodiéster entre ribonucleótidos. Un análisis comparativo de las RdRp de virus de polaridad positiva mostró la presencia de hasta 8 motivos de secuencia característicos, el más conservado de los cuales interviene en la unión de iones  $Mg^{+2}$  y contiene el motivo Gly-Asp-Asp (GDD) flanqueado por segmentos hidrofóbicos [Koonin, 1991; Koonin & Dolja, 1993; O'Reilly & Kao, 1998]. En función de las secuencias particulares de los motivos mencionados anteriormente, se han definido hasta tres supergrupos de RdRp: el Supergrupo 1 (agrupa virus tipo picorna), el Supergrupo 2 (tipo carmo y tipo flavi) y el Supergrupo 3 (tipo alfa). En todos estos

grupos se pueden encontrar representantes de virus de plantas con genomas de ssRNA(+) (**Tabla 1**).

**Tabla 1:** Clasificación de las RdRp de distintos virus de plantas de ssRNA(+)

<b>Supergrupo 1</b> <b>(Tipo picornavirus)</b>	<b>Supergrupo 2</b> <b>(Tipo carmovirus)</b>	<b>Supergrupo 3</b> <b>(Tipo alfavirus)</b>	
<i>Comovirus</i> <sup>s</sup>	<i>Aureusvirus</i> <sup>m</sup>	<i>Alfamovirus</i> <sup>s, c</sup>	<i>Potexvirus</i> <sup>m, c</sup>
<i>Polerovirus</i> <sup>m</sup>	<i>Carmovirus</i> <sup>m</sup>	<i>Closterovirus</i> <sup>m, c</sup>	<i>Tobamovirus</i> <sup>m, c</sup>
<i>Potyvirus</i> <sup>m</sup>	<i>Luteovirus</i> <sup>m</sup>	<i>Bromovirus</i> <sup>s, c</sup>	<i>Tobravirus</i> <sup>s, c</sup>
<i>Sobemovirus</i> <sup>m</sup>	<i>Tombusvirus</i> <sup>m</sup>	<i>Hordeivirus</i> <sup>s, c</sup>	<i>Tymovirus</i> <sup>m</sup>

Los miembros del Supergrupo 1 poseen el extremo 5' del genoma unido a una proteína viral (VPg) y emplean, entre otras, la expresión de poliproteínas como estrategia de traducción. Su genoma puede ser monopartido (m) o segmentado (s). Los miembros de los Supergrupos 2 y 3 poseen genomas monopartidos o segmentados, y pueden presentar una estructura cap en 5' (c).

### 2.3.2. Proteínas auxiliares de la replicación

Además del papel fundamental de la RdRp, durante la replicación son necesarias una o varias proteínas auxiliares que pueden desempeñar funciones muy diversas [Wang & Nagy, 2008; Wang *et al.*, 2010], tal como se ha comentado anteriormente. A continuación pasan a describirse con algo más de detalle tanto las funciones enzimáticas HEL y MET como otras funciones de carácter no enzimático:

- *Actividad HEL/NTPasa*, permite separar cadenas complementarias de dsRNA o desestabilizar estructuras secundarias del molde a partir de la hidrólisis de nucleótidos trifosfatados.
- *Actividad metil-transferasa*, media la transferencia de grupos metilos al extremo 5' de las cadenas de RNA sintetizadas, que adquieren la estructura cap.
- *Unión al RNA*, permite seleccionar y reclutar los moldes destinados a la replicación.
- *Asociación con membranas celulares*, permite el anclaje del complejo replicativo a las estructuras celulares donde tiene lugar la replicación.
- *Actividad chaperona de RNA*, podría asistir los cambios conformacionales en el RNA.
- *Estabilización del complejo replicativo*, presumiblemente facilita y mantiene la conformación correcta y/o el ensamblaje de los componentes que forman parte fundamental de dicho complejo.

Aunque algunas de estas funciones son desempeñadas por proteínas virales, cada vez existen más datos que destacan la participación de factores del huésped en la replicación viral. Dichos factores pueden actuar en prácticamente todas las etapas del proceso y, en muchas ocasiones, sus funciones habituales son subvertidas para favorecer la multiplicación del virus. La naturaleza de tales factores es extremadamente variada y entre ellos destacan proteínas con propiedades de unión a RNA, como proteínas ribosomales, factores de traducción o enzimas que modifican el RNA [Buck, 1996, 1999; Strauss & Strauss, 1999; Noueiry & Ahlquist, 2003; Wang & Nagy, 2008; Nagy, 2008]. Igualmente se consideran factores clave para la replicación tanto a las enzimas que llevan a cabo modificaciones post-traduccionales de las replicasas virales como a las membranas subcelulares. Estas últimas son esenciales para el ensamblaje del complejo replicativo y serán tratadas con más detalle en el Apartado 2.4. de la presente memoria.

Los primeros intentos para identificar factores celulares se centraron en la purificación de complejos replicativos virales que posteriormente podían ser analizados empleando técnicas como el SDS-PAGE, seguido de la tinción con plata [Quadt *et al.*, 1993; Osman & Buck, 1996]. El sistema de doble híbrido en levaduras (*yeast two-hybrid*) también ha sido, y sigue siendo, útil en la búsqueda de interactores con replicasas virales (empleadas como “cebo”), que pueden ser ensayadas frente a multitud de factores celulares (“presas”) expresados a partir de bibliotecas de genes. Del mismo modo, se han intentado identificar factores del huésped potencialmente implicados en replicación utilizando técnicas de entrecruzamiento con luz UV, empleando la 5' o 3' UTR virales y extractos celulares. En algún caso esta estrategia ha permitido identificar proteínas con capacidad de unirse a estas secuencias reguladoras [Srisankanda *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2000], pero su efectividad ha sido, en general, limitada.

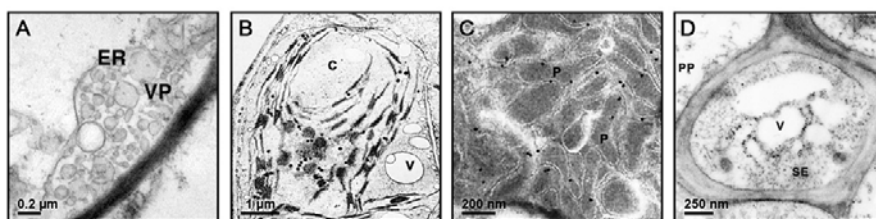
En los últimos años se han ido desarrollando otras aproximaciones con gran potencialidad para la identificación de factores del huésped implicados en la replicación. Entre ellas cabe destacar la puesta a punto de sistemas basados en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*, capaces de sustentar la replicación de ciertos virus de plantas, como el BMV, el TBSV, el virus de la necrosis del pepino (*Cucumber necrosis virus*, CNV) o el virus de las manchas en anillo del clavel italiano (*Carnation italian ringspot virus*, CIRV) [Janda & Ahlquist, 1993; Panavas & Nagy, 2003b; Pantaleo *et al.*, 2003; Panaviene *et al.*, 2004]. Algunos de estos sistemas han permitido acometer el escrutinio masivo o a gran escala (*genome-wide screening*) de proteínas celulares con un posible papel en la multiplicación del patógeno, gracias a la disponibilidad de colecciones muy completas de mutantes de levadura. Con este tipo de abordaje se han identificado alrededor de un centenar de proteínas que tienen un efecto estimulador o inhibitor sobre la replicación del BMV o del TBSV y que pertenecen a distintos grupos ontológicos [Kushner *et al.*, 2003; Panavas *et al.*, 2005b; Jiang *et al.*, 2006].

Finalmente, técnicas más recientes como los *microarrays* de proteomas de levadura, están permitiendo el análisis global y automatizado gracias a la existencia de más de 4000 proteínas de *S. cerevisiae* purificadas que pueden disponerse en una forma adecuada para comprobar la capacidad de interacción con sondas de vRNA marcadas con biotina. Esta técnica ha sido puesta a punto para el TBSV y el BMV, identificándose en conjunto unas 57 proteínas de levaduras con capacidad para unirse al RNA de uno o de ambos virus [Li *et al.*, 2009].

#### 2.4. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DEL COMPLEJO REPLICATIVO

Como ya se ha mencionado, la replicación de los virus de ssRNA(+) transcurre en la superficie de membranas derivadas de ciertos orgánulos intracelulares. Dichas membranas desempeñan un papel clave durante la replicación al proporcionar un soporte físico para el anclaje del complejo replicativo [Lyle *et al.* 2002; Salonen *et al.*, 2005]. Gracias a su flexibilidad, permiten la compartimentalización del proceso en estructuras específicas inducidas por el patógeno, en las cuales se reclutan y concentran factores celulares y virales, que quedan protegidos de mecanismos de defensa antiviral o dejan de estar disponibles para ser utilizados en procesos competidores como la traducción [Schwartz *et al.* 2002; Baulcombe, 2004; Mackenzie, 2005; Denison, 2008].

En la replicación pueden intervenir una amplia variedad de membranas en las que, por lo general, se inducen alteraciones que pueden ser observadas en el microscopio electrónico (Fig. 5). Estos cambios morfológicos comprenden agrupamientos de



**Fig. 5:** Micrografías electrónicas mostrando alteraciones morfológicas en diversas estructuras membranosas asociadas a la replicación viral. **(A)** Proliferación de membranas del retículo endoplásmico (ER) y formación de paquetes vesiculares (*vesicle packet*, VP) durante la infección de células foliares de *N. benthamiana* por el virus del mosaico del bromo (BMV) [Bamunusinghe *et al.*, 2011]. **(B)** Agregación y alteración morfológica (redondeo) de cloroplastos (c), así como aglutinación de numerosas vacuolas (v) en su entorno, durante la infección de células de *Chinese cabbage* por el virus del mosaico amarillo del nabo (TYMV) [Ushiyama & Matthews, 1970]. **(C)** Proliferación de peroxisomas en células de levadura que expresan la proteína auxiliar de la replicación (p33) del virus de las manchas anulares del Cymbidium (CymRSV). El marcaje muestra la proteína situada principalmente en las membranas peroxisomales [Navarro *et al.*, 2004]. **(D)** Localización de la RdRp (proteína 2a) del virus del mosaico del pepino (CMV) en las vesículas del tonoplasto vacuolar (v) en una sección transversal de un vaso criboso (*sieve element*, SE) en hojas de tabaco infectadas. También se aprecia el parénquima floemático (PP) [Cillo *et al.*, 2002].

orgánulos, proliferación de membranas derivadas de los mismos y/o formaciones de estructuras vesiculadas (*multivesicular bodies*, MVB) que funcionan como “mini-órganulos” donde transcurre la replicación viral [Salonen *et al.*, 2005; den Boon & Ahlquist, 2010; Sasvari & Nagy, 2010]. Además, hay que señalar que no puede establecerse una correlación entre el tipo de membrana a la que se asocia la replicación y el supergrupo al que pertenece la replicasa o la familia/género del patógeno (**Tabla 2**).

**Tabla 2:** Diversidad de membranas subcelulares que participan en la replicación de virus de plantas de ssRNA(+)

Membrana	Género	Familia	Ejemplos <sup>a</sup>	Referencias
RE	<i>Dianthovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	RCNMV	Turner <i>et al.</i> , 2004
	<i>Potexvirus</i>	<i>Flexiviridae</i>	PVX	Bamunusinghe <i>et al.</i> , 2009
	<i>Bromovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	BMV	Dohi <i>et al.</i> , 2001
	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	TMV	Más & Beachy, 1999
	<i>Pecluvirus</i>	No asignada	PCV	Dunoyer <i>et al.</i> , 2002b
	<i>Comovirus</i>	<i>Secoviridae</i>	CPMV	Carette <i>et al.</i> , 2002
Peroxisomas	<i>Tombusvirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	TBSV	McCartney <i>et al.</i> 2005
			CNV	Panavas <i>et al.</i> , 2005a
			CymRSV	Navarro <i>et al.</i> , 2004
Cloroplastos	<i>Tymovirus</i>	<i>Tymoviridae</i>	TYMV	Prod'homme <i>et al.</i> , 2001, 2003
Tonoplasto vacuolar	<i>Alfamovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	AMV	van der Heijden <i>et al.</i> , 2001
	<i>Cucumovirus</i>		CMV	Hatta & Francki., 1981
			TAV	
Mitocondrias	<i>Tombusvirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	CIRV	Weber-Lotfi <i>et al.</i> , 2002
	<i>Carmovirus</i>		MNSV	Mochizuki <i>et al.</i> , 2009
	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	CGMMV	Hatta <i>et al.</i> , 1971
	<i>Tobravirus</i>		TRV	Harrison & Roberts, 1968
	<i>Benyvirus</i>	No asignada	BNYVV	Erhardt <i>et al.</i> , 2001

a. Los virus a los que pertenecen estos acrónimos están especificados en la sección de abreviaturas de esta Tesis (Pág. 9). RE: retículo endoplásmico.

La compartimentalización de la replicación hace necesario el direccionamiento de todos los componentes del complejo replicativo hacia las estructuras subcelulares donde tiene lugar este proceso. Se ha sugerido que el gRNA probablemente es reclutado en *cis* y/o en *trans* por las replicasas virales que, junto a factores celulares, forman complejos multimoleculares en el citoplasma que son transportados intracelularmente. Diversos estudios han mostrado que las replicasas virales pueden mediar la asociación a membranas, en muchos casos gracias a la presencia de secuencias hidrofóbicas que actúan como dominios transmembrana (TM). Para algunos virus de plantas de

ssRNA(+), tanto la RdRp como una proteína auxiliar de la replicación conservan por separado la capacidad de dirigirse a los orgánulos intracelulares; sin embargo, en otros casos es necesaria la participación simultánea de ambas proteínas. Una tercera posibilidad, es que la proteína auxiliar de la replicación sea responsable, en última instancia, del direccionamiento de la RdRp, del vRNA y de todo el complejo replicativo hacia los sitios de replicación [Restrepo-Hartwig & Ahlquist, 1999; Chen & Ahlquist, 2000; Weber-Lotfi *et al.*, 2002; Prod'homme *et al.*, 2003; Jakubiec *et al.*, 2004; Nagy & Pogany, 2008]. Excepcionalmente, el anclaje del complejo replicativo puede no estar mediado directamente por las replicasas virales, sino por una proteína del huésped [Hagiwara *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2000]. Excepto en algunos casos, no se conocen muchos detalles acerca de la implicación de factores del huésped en el direccionamiento y localización de los complejos replicativos en membranas celulares, pero es previsible que al menos intervengan en la especificidad de tal localización

#### 2.4.1. Direccionamiento de proteínas a mitocondrias

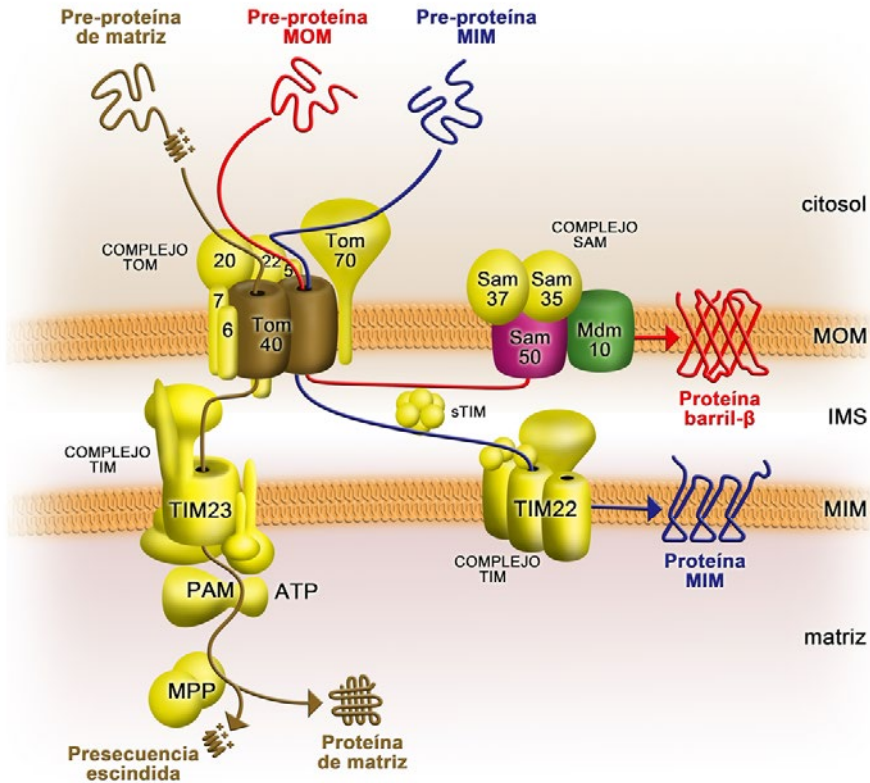
Las mitocondrias resultan esenciales para numerosos procesos celulares, como el metabolismo energético, la muerte celular programada (apoptosis), la señalización y la participación en diversas rutas metabólicas. Estos orgánulos poseen una membrana externa (*mitochondrial outer membrane*, MOM) y otra interna (*mitochondrial inner membrane*, MIM) que se pliega formando crestas, dando lugar a dos compartimentos acuosos, el espacio intermembrana (*intermembrane space*, IMS) y la matriz mitocondrial (M). Sólo una pequeña parte de las proteínas mitocondriales son sintetizadas en la matriz; la mayor parte de ellas son traducidas por ribosomas del citosol y luego deben ser incorporadas a los sub-compartimentos correspondientes siguiendo rutas específicas de importación.

El direccionamiento de las proteínas a los diferentes compartimentos mitocondriales corre a cargo de diversos complejos translocadores y de ensamblaje, que junto a chaperonas, utilizan el potencial de membrana, el ATP o diversas reacciones redox para llevar a cabo los distintos procesos de importación (**Fig. 6**). Entre los factores citosólicos que intervienen en el proceso de importación destacan las chaperonas Hsc70/Hsp70 y Hsp90, que funcionan coordinadamente a través de la hidrólisis de ATP y la unión al sustrato proteico [Fan & Young, 2011]. Por su parte, los complejos translocadores y de importación más importantes incluyen:

- *El complejo translocador de la membrana mitocondrial externa (Translocase of Outer Membrane, TOM)*. Funciona como una puerta de entrada para la inmensa mayoría de los precursores proteicos codificados en el núcleo. Está constituido por 7 subunidades diferentes, tres de las cuales (Tom20, Tom22 y Tom70) actúan como receptores para los distintos tipos de proteínas, mientras que el núcleo del

complejo (Tom40) forma varios canales que atraviesan la MOM [Model *et al.*, 2008]. El resto de componentes influyen en la estabilidad del complejo (Tom6 y Tom7) o participan en la inserción de las proteínas precursoras a los canales de Tom40 (Tom5).

- *La maquinaria de distribución y ensamblaje (Sorting and Assembly Machinery, SAM)*. Participa en el direccionamiento e inserción en la MOM de proteínas tipo barril- $\beta$  [Pfanner *et al.*, 2004; Paschen *et al.*, 2005]. Está constituida por tres subunidades, una de ellas (Sam50) se encuentra embebida en la MOM, mientras que las otras dos actúan de forma consecutiva, primero uniéndose a los precursores proteicos (Sam35) y luego estimulando la liberación desde el complejo (Sam37) [Chan & Lithgow, 2008]. Otros componentes que participan en este proceso son las pequeñas proteínas TIM (*small* TIM, sTIM), que funcionan como chaperonas protegiendo los segmentos hidrofóbicos durante su paso a través del IMS. Así, las sTIM mantienen los precursores tipo barril- $\beta$  en un estado competente para su inserción en la MOM, al pasar del complejo TOM al SAM.
- *El complejo encargado de conectar la mitocondria con el retículo endoplásmico (endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure, ERMES)*. Interviene entre otras funciones en el mantenimiento de la morfología, la motilidad y herencia mitocondrial y en el intercambio de fosfolípidos e iones  $\text{Ca}^{+2}$  entre RE y mitocondrias [Kornmann *et al.*, 2009]. Este complejo está constituido por al menos cuatro proteínas: Mmm1, una proteína integral de membrana del RE, Mdm12, un producto citosólico y Mdm34 y Mdm10, dos proteínas integrales de membrana de la MOM [Kornmann & Walter, 2010]. Mdm10 es capaz de unirse además al núcleo del complejo SAM y participa en el ensamblaje de las proteínas tipo barril- $\beta$  a la MOM [Meisinger *et al.*, 2004, 2006; Yamano *et al.*, 2010].
- *La maquinaria de ensamblaje del espacio intermembrana (Mitochondrial intermembrane space assembly, MIA)*. Participa en el plegamiento y la importación hacia el IMS de pequeñas proteínas que contienen motivos conservados ricos en residuos de Cys [Stojanovski *et al.*, 2008].
- *El complejo translocador de la membrana mitocondrial interna (Translocase of Inner Membrane, TIM)*. Participa en el ensamblaje de proteínas a la MIM (TIM22) o se encarga de transferir las proteínas hacia la matriz mitocondrial (TIM23). En este último caso, interviene además un motor que emplea ATP para completar la entrada a la matriz (*Presequence Translocase-associated Motor, PAM*). Las proteínas sTIM también ayudan a movilizar precursores desde la MOM hasta el complejo TIM22.



**Fig. 6:** Vías de importación de proteínas a la mitocondria. Los precursores proteicos son guiados por chaperonas citosólicas hasta el complejo TOM, a partir del cual siguen distintas vías de importación. El complejo translocador de la MIM (TIM23/ PAM) permite que algunas proteínas accedan a la matriz donde son procesadas por peptidasas mitocondriales (MPP). Los complejos de chaperonas (sTIM) guían proteínas hidrofóbicas a través del IMS para ser insertadas en la MIM con ayuda del complejo TIM22 o, en el caso de las proteínas tipo barril- $\beta$ , para ser insertadas en la MOM con ayuda del complejo SAM [adaptado de Pfanner *et al.*, 2004].

La presencia en los precursores proteicos de determinadas señales de direccionamiento y clasificación/distribución determinará la vía de importación que sigue la proteína y su destino final [revisado en Chacinska *et al.*, 2009; Dukanovic & Rapaport, 2011]. De forma general pueden definirse tres tipos de señales de direccionamiento mitocondrial (*mitochondrial targeting signals*, MTS) (**Fig. 7**):

- *Señales tipo pre-secuencia.* Se localizan hacia el extremo N-terminal (N-t) del precursor, poseen una longitud variable de entre 15 y 50 residuos y generalmente son escindidas por peptidasas específicas de la matriz (*mitochondrial processing peptidases*, MPP). Estas secuencias, consideradas



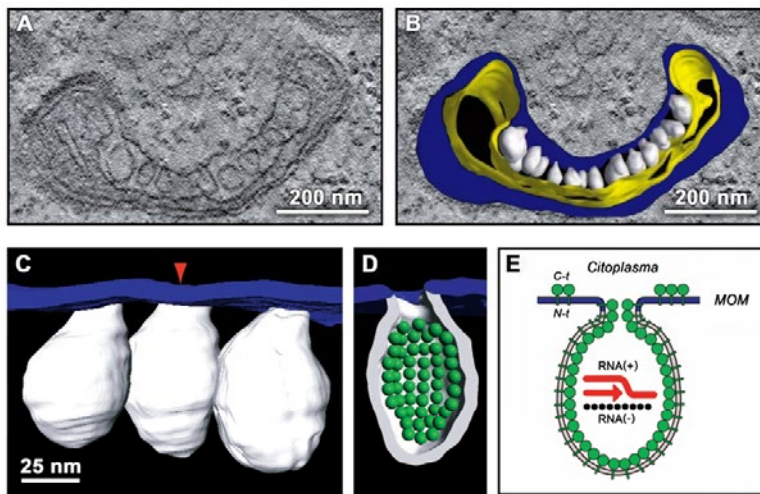
como MTS clásicas, se pliegan en forma de hélice- $\alpha$  anfipática cuya cara hidrofóbica es reconocida por el receptor Tom20, mientras que la otra, cargada positivamente, interacciona con Tom 22 [Saitoh *et al.*, 2007; Yamano *et al.*, 2008]. Cuando el destino final de la proteína es la matriz mitocondrial, la carga neta de la pre-secuencia suele ser determinante para la translocación a través de la MIM [Krayl *et al.*, 2007]. Algunas proteínas con señales de este tipo, poseen además una región hidrofóbica situada corriente abajo de la pre-secuencia, que les permite quedar retenidas en la MIM. Alternativamente, estas últimas proteínas pueden ser procesadas por peptidasas de la MIM (*inner membrane peptidases*, IMP) que efectúan el corte tras la región hidrofóbica liberando la proteína al IMS [Glick *et al.*, 1992; Gakh *et al.*, 2002].

- *Señales internas no escindibles de proteínas hidrofóbicas.* Se trata de un conjunto muy variado y en general no muy bien caracterizado de secuencias contenidas en prácticamente todas las proteínas de la MOM, en la mayoría de las que se dirigen a la MIM y en unas pocas de la matriz. Las señales de este tipo que han conseguido caracterizarse hasta el momento incluyen:
  - señales  $\beta$ , situadas hacia la región C-terminal (C-t) de proteínas tipo barril- $\beta$  que se insertan en la MOM tras ser reconocidas por el complejo SAM [Kutik *et al.*, 2008].
  - señales tipo  $\alpha$ -helicoidal, que constan generalmente de un segmento TM flanqueado por residuos con carga positiva que dirigen las proteínas hacia la MOM empleando diversas vías de inserción. Estas MTS pueden situarse en el extremo N-t (*signal-anchor sequence*), C-t (*C-tail anchor*) o en regiones intermedias de la secuencia (*internal signal*) [Otera *et al.*, 2007; Stojanovski *et al.*, 2007; Kemper *et al.*, 2008].
  - señales internas múltiples (*multiple internal signals*), que median la inserción en la MIM. La mayor parte de las proteínas mitocondriales que transportan metabolitos poseen este tipo de señales, que típicamente constan de 6 segmentos TM cortos distribuidos a lo largo de toda la secuencia.
  - señales internas tipo “pre-secuencia”, precedidas por una región hidrofóbica que permiten la translocación de proteínas a la MIM [Neupert & Herrmann, 2007].
- *Señales internas que dirigen proteínas al IMS.* Contienen varios residuos de Cys y un residuo hidrofóbico a través del cual se producen interacciones con receptores específicos del IMS [Milenkovic *et al.*, 2009; Banci *et al.*, 2009].

A Pre-secuencias y sus variaciones		Vía de importación	Destino
Hélice- $\alpha$ anfipática		TOM TIM23 PAM	M
Pre-secuencia + señal hidrofóbica de anclaje		TOM TIM23 (PAM)	MIM
Pre-secuencia + señal hidrofóbica de anclaje (escindible)		TOM TIM23 (PAM)	IMS
B Señales no escindibles de proteínas hidrofóbicas		Vía de importación	Destino
Señal $\beta$		TOM SAM	MOM (barril- $\beta$ )
Signal-anchor		Mim1	MOM (hélice- $\alpha$ )
C-tail anchor		?	MOM (hélice- $\alpha$ )
Señal interna		(TOM) (SAM)	
Señales internas múltiples		TOM Tim9-Tim10 TIM22	MIM
Señal interna tipo pre-secuencia		TOM TIM23	MIM
C Señal interna para IMS		Vía de importación	Destino
Señal que contiene Cys		TOM MIA	IMS

**Fig. 7:** Principales señales que dirigen y distribuyen las proteínas hacia los distintos compartimentos mitocondriales (MOM, IMS, MIN o M). Los sitios de corte por las peptidasas de la matriz (MPP) o del espacio inter-membrana (IMP) se señalan con flechas. Las regiones hidrofóbicas que retienen los precursores proteicos en la MIM se muestran en amarillo. En azul claro se muestra la putativa señal que permite el reconocimiento de las proteínas tipo barril- $\beta$  por parte del complejo TOM. El resto de señales internas se muestran en azul (conformación  $\beta$ ), verde (conformación  $\alpha$ ) o roja. Mim1, putativa insertasa de la MOM; Tim9-Tim10, chaperonas sTIM [adaptado de Chacinska *et al.*, 2009].

Aunque la mayoría de las proteínas conocidas utilizan uno o varios de los complejos de importación descritos anteriormente, se conocen varios ejemplos de proteínas que residen en la MOM y que poseen señales del tipo *C-tail anchor*, cuya inserción parece no depender de ninguno de los complejos translocadores identificados e incluso puede tener lugar en ausencia de factores citoplasmáticos que reconozcan específicamente tales señales. En estos casos se ha sugerido que la composición lipídica única de la membrana mitocondrial externa, caracterizada entre otros aspectos por los niveles particularmente bajos de ergosterol, podría contribuir a la inserción selectiva de la proteína [Lister *et al.*, 2005; Setoguchi *et al.*, 2006; Kemper *et al.*, 2008; Stapleford *et al.*, 2009].



**Fig. 8:** Mitocondrias de *Drosophila* modificadas durante la infección por el virus del escarabajo neozelandés (FHV), utilizado como modelo para estudiar la forma en la que tiene lugar el ensamblaje del complejo replicativo en las membranas mitocondriales del huésped. **(A)** y **(B)** Tomografía y reconstrucción posterior mostrando los cambios morfológicos y la esférulas inducidas (en blanco) entre la membrana mitocondrial externa (en azul) e interna (en amarillo). **(C)** Las estructuras donde tiene lugar la replicación se forman por invaginaciones de la membrana externa y quedan conectadas con el citoplasma a través de un estrecho cuello. **(D)** Cada esférula podría acomodar ~100 moléculas de la replicasa viral (proteína A), modelada como una esfera verde. Las proteínas se organizan recubriendo la superficie interna de la membrana y anclándose a ella a través de su extremo N-t. **(E)** Síntesis de las cadenas (+)/(-) durante la replicación viral [adaptado de Kopek *et al.*, 2007].

Como ha quedado reflejado en la **Tabla 2**, se han descrito numerosos virus de plantas cuyas replicasas se asocian a las mitocondrias, una cuestión que también se ha constatado para distintos virus animales [Miller & Ahlquist, 2002; Schwer *et al.*, 2004; Mezéth *et al.*, 2007] (**Fig. 8**). Las señales que dirigen estas proteínas a las mitocondrias presentan gran variabilidad y en algunos casos se desconocen. La información acerca del modo en que se asocian a las membranas y/o las posibles proteínas celulares involucradas también es escasa.



# Movimiento viral

## 3.1. EL MOVIMIENTO DE LOS VIRUS DE PLANTAS

Los virus carecen de autonomía fuera de la planta y dependen totalmente de un vector de transmisión o de un medio que los vehiculice; sin embargo, dentro del huésped deben ser capaces de facilitar su propio movimiento. Aunque existen ciertas similitudes en el movimiento de los patógenos virales de animales y de plantas en cuanto a la utilización de las distintas estructuras y componentes celulares [Radtke *et al.* 2006; Pollard & Cooper, 2009; Burckhardt & Greber 2009; Pierini *et al.* 2009], en plantas, la existencia de pared celular y de conexiones entre las células vegetales, denominadas plasmodesmos (PD), parecen haber dirigido la evolución de las distintas estrategias de movimiento [Niehl & Heinlein, 2011].

Todos los virus de plantas codifican en su genoma una o más proteínas específicas que intervienen en las funciones de movimiento (*movement proteins*, MP). Dependiendo del tipo viral, variarán el número de MP codificadas, la estructura de estas proteínas y su modo de acción. En muchos casos, las MP son los únicos productos virales necesarios para el movimiento, pero con frecuencia esta función puede requerir la asistencia de la CP, de las replicasas, de un homólogo viral de la chaperona Hsp70 o de algún factor de transporte nuclear en virus de DNA [Dolja *et al.*, 2006; Verchot-Lubicz *et al.*, 2010]. El proceso de translocación viral también dependerá, lógicamente, de factores del huésped [Waigmann *et al.*, 2004; Harries & Ding, 2011]. De forma general, el movimiento viral se divide en dos fases: (1) el movimiento a corta distancia o célula a célula y, (2) el movimiento sistémico o a larga distancia [Carrington *et al.*, 1996].

### 3.1.1. Movimiento célula a célula

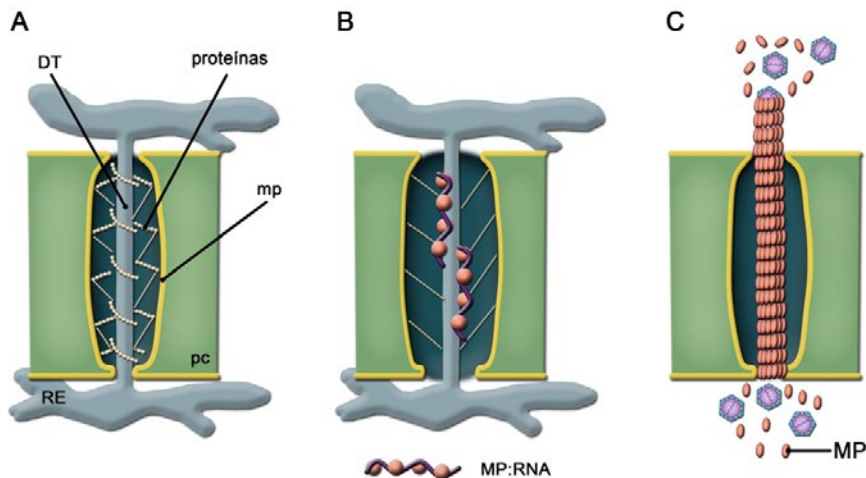
El movimiento viral a corta distancia comprende el desplazamiento del virus en el citoplasma de la célula infectada desde los sitios donde tiene lugar la replicación hasta la periferia celular (movimiento intracelular), y el transporte desde una célula inicialmente infectada a las células vecinas (movimiento intercelular) [revisado en Schoelz *et al.*, 2011; Ueki & Citovsky, 2011]. En principio, el movimiento intracelular podría ocurrir mediante un proceso de difusión a través del citoplasma hasta llegar a los PD [revisado en Benítez-Alfonso *et al.*, 2010; Niehl & Heinlein, 2011; Tilsner *et al.*, 2011]. Sin embargo, la dispersión de los virus dentro de la célula no parece ser un proceso pasivo, sino que está estrechamente regulada y tiene lugar a través de estructuras que normalmente participan en el transporte de vesículas, orgánulos y macromoléculas, como son las redes del citoesqueleto y/o el sistema de

endomembranas, con un papel preponderante del retículo endoplásmico (RE) [revisado en Harries *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011].

El citoesqueleto celular es un entramado proteico constituido principalmente por microtúbulos (MT) y microfilamentos (MF), ensamblados, respectivamente, a partir de heterodímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y monómeros de actina. Los primeros pueden unir moléculas de dineína/dinactina y kinesina, y los segundos de miosina. Las moléculas asociadas actúan como proteínas motoras que aprovechan la hidrólisis del ATP para generar energía mecánica que permite desplazar compuestos sobre la superficie de los MT y MF. Los distintos componentes del citoesqueleto pueden polimerizar y despolimerizar rápidamente, promoviendo cambios constantes y dinámicos que hacen posible el desplazamiento de compuestos celulares (y virales) dentro de las células o de una célula a otra [Burckhardt & Greber, 2009]. Los MT han podido relacionarse extensamente con el movimiento intracelular de virus de plantas, mientras que, comparativamente, se conoce menos acerca de la implicación de los MF en este tipo de transporte [revisado en Harries *et al.*, 2010].

Además del citoesqueleto, en el movimiento viral intervienen diversas estructuras membranosas. En el transporte intracelular participa sobre todo la red de membranas del RE, aunque se ha demostrado que algunos virus o componentes virales también pueden hacer uso de las rutas secretoras del aparato de Golgi (GA). En este último caso, resultan importantes las proteínas coatómeros o COP que recubren las vesículas de secreción. COP-I participa en el transporte retrógrado, que mueve vesículas originadas en las cisternas del *cis* Golgi (CGN) que retornan al retículo endoplásmico rugoso (RER). Por su parte COP-II es responsable del transporte anterógrado y forma las vesículas de transporte del RER que tienen como destino CGN [Ellgaard & Helenius, 2003; Hanton *et al.*, 2007; Moreau *et al.*, 2007]. Respecto a esto se ha descrito que diversas MP contienen motivos conservados de direccionamiento vesicular, lo que apuntaría a un posible transporte como parte de vesículas de secreción y/o endocíticas [Haupt *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2010; Genovés *et al.*, 2010].

Las estructuras membranosas y algunos de los componentes que forman parte del citoesqueleto también están involucrados en el movimiento del virus de una célula a otra a través de los PD. Estos últimos constituyen estrechos canales recubiertos por la membrana plasmática que contienen en su interior estructuras tubulares formadas a partir de proyecciones del RE conocidas como desmotúbulos (DT). Alrededor de los DT se disponen moléculas de actina y miosina, entre otras proteínas, que forman microcanales que restringen la difusión libre de moléculas a través de la pared celular (**Fig. 9A**). Estas estructuras proporcionan una continuidad citoplasmática que facilita el transporte regular de nutrientes y de algunas macromoléculas, y que es aprovechada por los virus durante su movimiento [Maule, 2008].



**Fig. 9:** Estrategias virales para el movimiento a través de los PD. **(A)** Los PD controlan el paso a través de la pared celular (pc). Son atravesados por estructuras continuas formadas por la membrana plasmática (mp) y el RE, este último se conecta con los desmotúbulos (DT) en la cavidad central. En el espacio restante diversas proteínas embebidas en la mp y el RE actúan a modo de tamiz. **(B)** Movimiento de complejos RNP virales (MP:RNA). En este caso, los virus se mueven sin encapsidarse y la MP incrementa el SEL del PD pero no llega a inducir en él cambios estructurales importantes. **(C)** Movimiento guiado por túbulos, donde distintas subunidades de las MP se ensamblan y reemplazan a los DT formando un conducto por donde son transportados los viriones [adaptado de Henlein, 2009].

El paso del virus a través de los PD requiere la intervención de las MP virales que normalmente modifican la estructura y/o el límite de exclusión por tamaño (*size exclusion limit*, SEL) de estos canales, un paso fundamental en el transporte intercelular [Wolf *et al.*, 1989; Waigmann *et al.*, 1994]. El movimiento célula a célula de los virus de plantas parece ajustarse a dos modelos básicos (**Fig. 9**):

- *Movimiento de complejos ribonucleoproteicos (RNP)*. Las MP y el vRNA forman complejos RNP que facilitan el paso del ácido nucleico a través de los PD, aumentando el SEL de los mismos de forma temporal, sin alterar a largo plazo la integridad de la comunicación intercelular [revisado en Lucas, 2006]. Este mecanismo está ejemplificado por el TMV, cuya MP unida al vRNA forma complejos transferibles de una célula a otra [Citovsky *et al.*, 1990, 1992].
- *Movimiento de partículas víricas guiadas por túbulos*. Las MP de ciertos virus se disponen formando estructuras tubulares que se extienden a través de los PD y por las que se mueven partículas ensambladas, como ocurre en los comovirus, nepovirus y caulimovirus, o nucleocápsidas no envueltas, como en los tospovirus. Este tipo de estrategia conlleva una modificación permanente de

la arquitectura original de los PD [Perbal *et al.*, 1993; Nurkiyanova *et al.*, 2001; Niehl & Heinlein, 2011]. La formación de estos canales fue observada por primera vez en infecciones por el virus del mosaico del chícharo (*Cowpea mosaic virus*, CPMV), en las que múltiples moléculas de MP se ensamblan capturando en su interior partículas virales que son liberadas en la célula contigua tras la desestructuración de los túbulos [van Lent *et al.*, 1991; Kasteel *et al.*, 1993].

No se conocen muchos detalles acerca de cómo ocurre el desplazamiento del RNA o del complejo RNP a través de los PD, pero los datos experimentales apuntan a la existencia de mecanismos diversos. Así, algunos estudios con el TMV sugieren que la MP del virus, embebida en las membranas del RE y asociada al vRNA, forma un complejo (vRNA:MP:RE), que podría también incluir a la replicasa viral, capaz de difundir a través de las membranas del RE del PD utilizando el gradiente de concentración de proteínas/partículas virales que se establece entre la célula infectada y la célula adyacente no infectada [Heinlein *et al.*, 1998b; Boevink & Oparka, 2005; Guenoune-Gelbart *et al.*, 2008]. Otros trabajos con este mismo virus sugieren que el aumento del SEL probablemente estaría facilitado por la interacción de la MP con la calreticulina, una enzima que regula los niveles locales de  $Ca^{+2}$  [Chen *et al.*, 2005] y/o con la pectin-metil-esterasa, encargada de modificar el estado estructural de la pectina que rodea los PD [Chen *et al.* 2000; Waigmann *et al.*, 2007]. Asimismo, algunos autores han podido relacionar el movimiento de tobamovirus (TMV), potexvirus, como el virus X de la patata (*Potato X virus*, PVX) y cucumovirus, como el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) con la interacción de sus respectivas MP con la enzima  $\beta$ -1,3-glucanasa, que a su vez degrada la callosa que normalmente se acumula en los PD y limita el paso de compuestos a través de ellos [Epel, 2009; Zavaliev *et al.*, 2011]. Recientemente, se ha propuesto que las MP del TMV y del CMV, formando parte del complejo RNP, podrían alcanzar los PD y cortar los MF de actina que rodean los DT, promoviendo así la modificación del SEL [Chen *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2010].

### 3.1.2. Movimiento sistémico

Tras la infección inicial, los patógenos virales pueden ser retenidos en un pequeño grupo de células o, alternativamente, propagarse sistémicamente hacia el resto de la planta. Los mecanismos que guían el transporte a larga distancia se conocen mucho menos que los que guían el movimiento a corta distancia y difieren significativamente de estos últimos. Normalmente el virus se desplaza a las zonas distales empleando los tubos cribosos del floema y siguiendo el flujo de metabolitos desde las hojas o tejidos “fuente” hasta los “sumideros” [Kehr & Buhtz, 2008; Vuorinen *et al.*, 2011]. Se conocen pocos virus capaces de moverse largas distancias a través del xilema, entre



ellos, algunas especies del género *Sobemovirus* [Opalka *et al.*, 1998; Verchot *et al.*, 2001].

Muchos virus se transportan a través del floema como viriones y, por tanto, en estos casos, la CP es necesaria para el transporte a largas distancias [Ding *et al.*, 1996]. En otros casos, no se requiere la CP bien porque los virus se mueven como complejos nucleoproteicos [Petty & Jackson, 1990; McGeachy & Barker, 2000]. Además de las MP y la CP, durante el movimiento sistémico pueden intervenir otros factores virales [Deom *et al.*, 1997; Schaad *et al.*, 1997; Sáenz *et al.*, 2002].

### 3.2. PROTEÍNAS DE MOVIMIENTO VIRAL

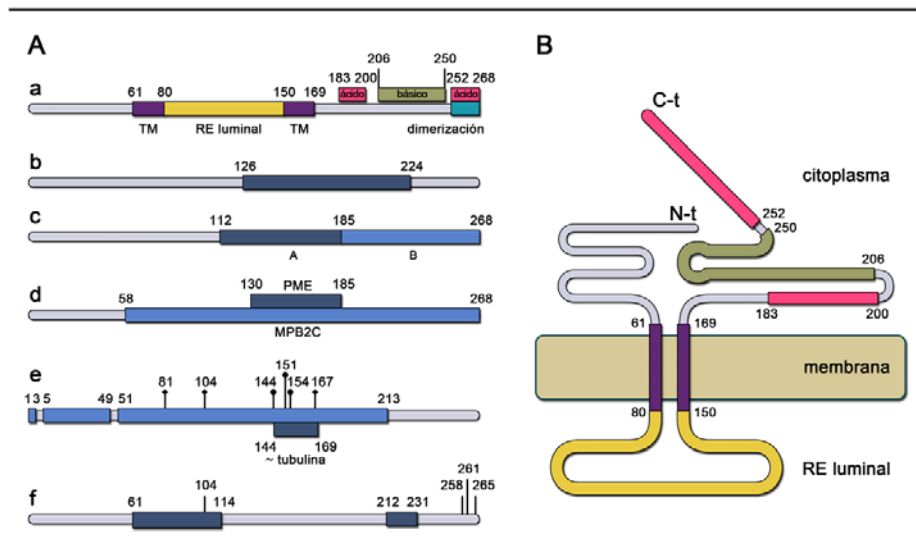
Dados los modelos de transporte viral mencionados anteriormente, es fácil deducir que las MP, a pesar de las diferencias que presentan en distintos grupos taxonómicos, van a compartir una serie de propiedades, entre las que destacan: capacidad de unir ácidos nucleicos [Waigmann *et al.*, 2004], interacción con sistemas de membranas celulares y con el citoesqueleto [Harries *et al.*, 2010], localización en PD y modificación del SEL de estos canales [Niehl & Heinlein, 2011].

Algunos virus codifican una única MP que está dotada con todas las funciones descritas, mientras que otros codifican dos, tres (o incluso más) MP, en cuyo caso existe un reparto de funciones entre los distintos polipéptidos. En general, se pueden definir cuatro grandes grupos de MP: (1) Superfamilia “30K”, (2) Bloque doble de genes, (3) Bloque triple de genes y, (4) un grupo que recoge aquellas proteínas que no pueden ser incluidas en el resto de categorías.

#### 3.2.1. Superfamilia “30K”

La superfamilia “30K” es un grupo muy amplio y variado de MP, en el que pueden ser incluidas aquellas codificadas por especies de los géneros *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Alfavirus*, *Ilarvirus*, *Dianthovirus*, *Tombusvirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Umbravirus*, *Begomovirus*, *Comovirus*, *Nepovirus*, *Tospovirus*, *Sequivirus*, *Capillovirus*, *Trichovirus*, *Furovirus*, *Idaeovirus*, *Caulimovirus* y *Badnavirus* [Melcher, 1990; Koonin *et al.*, 1991; Mushegian & Koonin, 1993; Mushegian, 1994]. Los componentes de este grupo poseen homologías de secuencia relativamente bajas, siendo el motivo -LXDX<sub>50-70</sub>G- el más conservado, aunque en varios miembros de la superfamilia también se ha descrito el tripéptido “SIS” hacia el extremo C-t de la proteína [Melcher, 2000]. Además, los elementos de estructura secundaria parecen disponerse según un patrón en el cual varias cadenas tipo  $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 7) quedan flanqueadas por cuatro hélices- $\alpha$  ( $\alpha$ A- $\alpha$ D) en la parte central de la proteína, sugiriendo la existencia de una estructura tridimensional común [Melcher, 2000].

La MP mejor estudiada dentro de este grupo y que da nombre a la superfamilia, es la proteína de aproximadamente 30 kDa codificada por el TMV (p30). Se trata de un único producto génico, con diferentes dominios, que desempeña todas las funciones asociadas al movimiento del virus [Berna *et al.*, 1991; Gafny *et al.*, 1992; Citovsky *et al.*, 1992; Waigmann *et al.*, 1994; Kahn *et al.*, 1998] (**Fig. 10A**). Por una parte, esta MP contiene dos regiones adyacentes que funcionan independientemente uniendo ácidos nucleicos de simple cadena de forma cooperativa e inespecífica de secuencia, al menos *in vitro* [Citovsky *et al.*, 1992]. Además, en la proteína también se ha podido acotar una región responsable de la interacción con los PD y la alteración del SEL [Waigmann *et al.*, 1994, 2004], un dominio implicado en la interacción con los MT [Kahn *et al.*, 1998; Boyko *et al.*, 2000a, 2000b, 2000c; Kotlizky *et al.*, 2001], y segmentos involucrados en interacciones con factores del huésped, esenciales para el transporte viral [Chen *et al.*, 2000; Kragler *et al.*, 2003]. Finalmente, la p30 posee dos segmentos hidrofóbicos del tipo hélice- $\alpha$  que podrían funcionar como dominios TM y se ha propuesto un modelo topológico de inserción en membrana [Reichel & Beachy, 1998; Brill *et al.*, 2000; Fujiki



**Fig. 10:** Dominios funcionales y topología de unión a membrana de la MP del virus del mosaico del tabaco (TMV) (p30). **(A)** Representación de p30 mostrando dominios estructurales relacionados con la unión a membrana, topología y dimerización **(a)**, apertura de PD **(b)**, unión a RNA **(c)**, interacción con factores del huésped, como la pectin-metil-esterasa (PME) y una proteína asociada a MT (MPB2C) **(d)**, dominios y residuos involucrados en la asociación con MT, así como una región homóloga a la tubulina vegetal **(e)** y dominios y residuos susceptibles a ser fosforilados **(f)** [Citovsky *et al.*, 1993; Haley *et al.*, 1995; Waigmann *et al.*, 2000; Karger *et al.*, 2003; Brill *et al.*, 2004; Trutnyeva *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005]. **(B)** Modelo topológico de unión de p30 a RE a través de dos putativos dominios TM (en magenta) que dejan el bucle intermedio (en amarillo) orientado hacia el lumen y los extremos N-t y C-t expuestos al citoplasma. El extremo C-t contiene dos dominios ácidos (en rosa) y un dominio básico (en verde) [Brill *et al.*, 2000].

*et al.*, 2006] (**Fig. 10B**). Este modelo está siendo cuestionado actualmente por resultados recientes que sugieren que las proteínas de esta familia podrían asociarse a las membranas de manera periférica [Martínez-Gil *et al.*, 2009].

Los distintos virus con MP que pertenecen a la superfamilia “30K” pueden moverse intercelularmente siguiendo cualquiera de los dos modelos anteriormente descritos, o bien como complejos RNP o como partículas ensambladas. En cuanto al movimiento intracelular, uno de los casos más ampliamente estudiado es el de la MP del TMV. A grandes rasgos el movimiento intracelular de este virus puede ser descrito a partir de un modelo que explica por una parte, la implicación de las diferentes estructuras del citoesqueleto y de la red del RE, y que considera, por otra parte, que existe una estrecha relación entre replicación y movimiento viral [Heinlein *et al.*, 1998a; Reichel & Beachy, 1998; Más & Beachy, 1999; Guenoune-Gelbart *et al.*, 2008]. Dicho modelo establece la existencia de las siguientes etapas:

- (1) en estadios tempranos de la infección, se traducen las replicasas virales. Una de ellas (p126), junto al vRNA asociado al RE por medio de la estructura 5' cap del genoma, induce la formación de cuerpos membranosos derivados del RE [Hirashima & Watanabe, 2003; Kawakami *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2009]. La MP, una vez producida, estabiliza estas estructuras, probablemente interaccionando con los MF, en particular con moléculas de actina [McLean *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 2007].
- (2) el complejo MP:vRNA inicia su movimiento hacia los PD. Este proceso parece requerir la interacción de la MP con elementos del citoesqueleto intacto o con componentes individuales de los MT o los MF [Ashby *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007; Sambade *et al.*, 2008; Hofmann *et al.*, 2009]. En este sentido, se ha especulado que los motivos homólogos a la tubulina vegetal presentes en p30 (**Fig. 10A-e**) podrían “imitar” el ensamblaje de estas proteínas del huésped y mediar el transporte del vRNA [Boyko *et al.*, 2000b; Gillespie *et al.*, 2002].
- (3) los complejos RNP, probablemente asociados con el complejo replicativo, son vehiculizados hasta las estructuras del RE que atraviesan la membrana plasmática guiados por los MF [Kawakami *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Guenoune-Gelbart *et al.*, 2008]. Llegados a este punto funcionarían los mecanismos de modificación del SEL descritos anteriormente para la p30, aunque también se ha sugerido que las replicasas podrían actuar junto a la MP alterando la conductividad del canal [Heinlein *et al.*, 1998a; Liu *et al.*, 2005; Harries *et al.*, 2009].

A pesar de que la mayoría de estos estudios han sido realizados con el TMV, muchos de estos resultados podrían ser aplicables a todos aquellos virus en los que el

RNA es transportado formando complejos con proteínas de movimiento, independientemente de que los virus posean una o más MP.

### 3.2.2. Bloque doble de genes

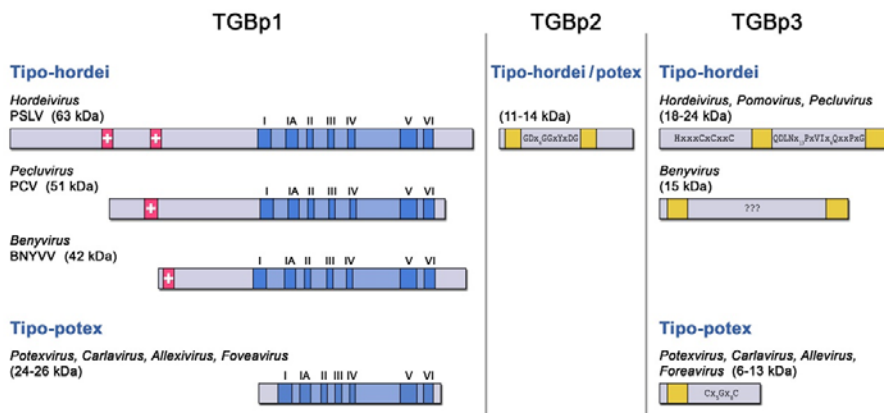
Distintos virus con pequeños genomas de ssRNA(+), entre los que se encuentran aquellos pertenecientes al género *Carmovirus*, poseen dos pequeñas ORF internas y normalmente superpuestas que forman el denominado bloque doble de genes (*doble gene block*, DGB). Dicho bloque codifica dos polipéptidos conocidos de forma general como proteínas del bloque doble de genes (*double gene block proteins*, DGBp), DGBp1 y DGBp2, según la posición que ocupan las respectivas ORF en el genoma, aunque en cada especie reciben un nombre específico de acuerdo con su masa molecular (Apartado 5.3).

### 3.2.3. Bloque triple de genes

Algunos virus de ssRNA(+) contienen en su genoma hasta tres ORF contiguas o parcialmente solapadas, conocidas como bloque triple de genes (*Triple gene block*, TGB), a partir de las cuales se traducen tres proteínas esenciales para el movimiento conocidas como proteínas del bloque triple de genes (*Triple gene block protein*, TGBp), TGBp1, TGBp2 y TGBp3 [Morozov & Solovyev, 2003]. Los virus con este sistema de MP pueden dividirse en dos clases. La clase 1 (tipo-hordeivirus) agrupa patógenos con morfología tipo varilla, mientras que en la clase 2 (tipo potexvirus) se encuentran virus filamentosos que además de las TGBp requieren la CP para el movimiento célula a célula.

Las proteínas TGBp1 de virus de la clase 2 poseen una masa molecular de entre 24-26 kDa y contienen un dominio NTPasa/helicasa que ocupa prácticamente la totalidad de la molécula. El mismo tipo de motivo se encuentra en las proteínas TGBp1 de la clase 1. Sin embargo, estas últimas presentan un mayor tamaño (39-63 kDa) debido fundamentalmente a una extensión N-t, rica en residuos de Arg y Lys, implicada en la unión al RNA, propiedad funcional que comparten con las proteínas de la clase 2 [Wung *et al.*, 1999; Kalinina *et al.*, 2002; Morosov & Solovyev, 2003; Leshchiner *et al.*, 2006; Makarov *et al.*, 2009] (**Fig. 11**).

En lo que respecta a las proteínas TGBp2 y TGBp3, son productos de menor tamaño y funcionan como proteínas integrales de membrana en ambas clases de virus [Tamai & Meshi, 2001; Cowan *et al.*, 2002; Zamyatin *et al.*, 2002; Krishnamurthy *et al.*, 2003; Gorshkova *et al.*, 2003]. El producto TGBp2, cuyo tamaño oscila entre 11-14 kDa, posee dos secuencias hidrofóbicas internas que median su inserción en RE, dejando la región intermedia hidrofílica, muy conservada, dispuesta a modo de lazo hacia la cara luminal del orgánulo y los extremos N-t y C-t expuestos al citoplasma



**Fig.11:** Representación esquemática de las MP del TGB. TGBp1 posee actividad helicasa y propiedades de unión a RNA. El dominio helicasa (en azul) contiene los correspondientes motivos conservados de secuencia (I–VI). También se indican los segmentos cargados positivamente situados en la región N-t de las proteínas. TGBp2 y TGBp3, de menor tamaño, se asocian a membranas del RE a través de segmentos TM hidrofóbicos (en amarillo). En el caso de TGBp3 se muestran los motivos de secuencia característicos de cada género, excepto en la proteína de benyivirus para la que no se dispone de información acerca de la conservación de secuencia.

[Zamyatnin *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010]. En cuanto a TGBp3, su secuencia se encuentra escasamente conservada entre homólogos, su estructura es más variable y su tamaño oscila entre 6 y 24 kDa [revisado en Verchot-Lubicz *et al.*, 2010]. De forma general, los virus tipo-potex poseen proteínas TGBp3 de menor tamaño (normalmente 7-8 kDa), con un único dominio TM, hacia N-t, que presuntamente permite la inserción dejando la porción C-t expuesta hacia el citosol y el extremo N-t orientado hacia el lumen del RE [Krishnamurthy *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2010]. Por su parte, las TGBp3 de los virus tipo-hordei suelen ser algo mayores (15-24 kDa) y muchos de los productos de mayor tamaño cuentan con una región N-t rica en residuos de Cys (**Fig. 11**). La mayoría de estas proteínas poseen dos segmentos TM, que median la inserción en RE exponiendo los extremos N-t y C-t al lumen [Morosov & Solovyev, 2003; Schepetilnikov *et al.*, 2005], aunque hay ejemplos en los cuales la topología de inserción parece ser justamente la opuesta [Tilsner *et al.*, 2010].

El movimiento intracelular e intercelular de los virus que poseen MP del TGB ha sido extensamente estudiado; sin embargo, aún no se comprende del todo cómo este conjunto de proteínas funcionan juntas para transportar el vRNA [revisado en Verchot-Lubicz *et al.*, 2010]. Se ha propuesto que el transporte dentro de la célula y de una célula a otra ocurre en forma de complejos RNP compuestos por TGBp1:RNA en los virus tipo-hordei o por TGBp1:RNA:CP en los tipo-potex, aunque en este último caso no se excluye totalmente un posible transporte como viriones. En el caso de hordeivirus,

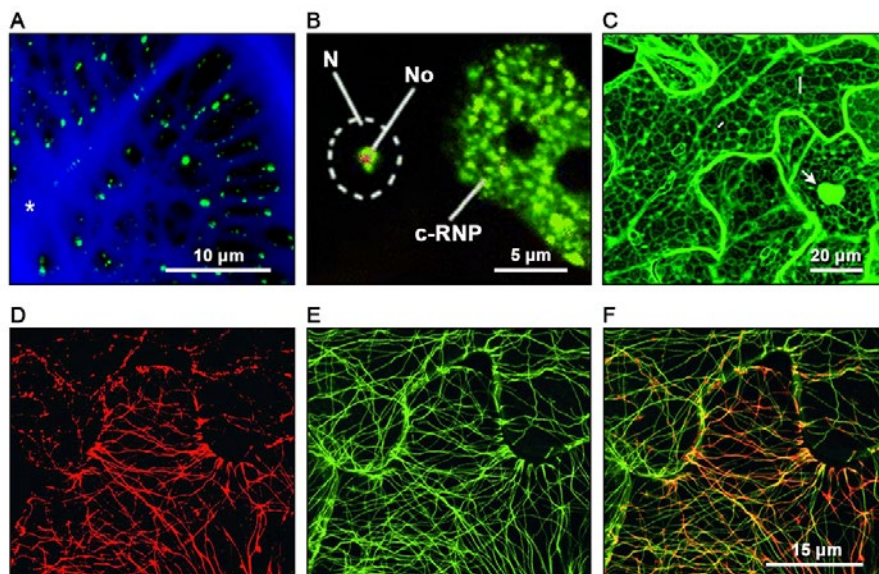
las proteínas TGBp2 y TGBp3, asociadas a la red de actina-RE forman gránulos móviles en los que se transporta a TGBp1 hacia y a través de los PD [Zamyatnin *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2009; Verchot-Lubicz *et al.*, 2010], donde el incremento del SEL correría a cargo de TGBp3 [Haupt *et al.*, 2005]. Por su parte en los virus tipo-potex, TGBp1 puede moverse independientemente dentro de la célula hasta los PD [Verchot-Lubicz *et al.*, 2010]. Las otras dos TGBp alcanzarían estas estructuras, moviéndose desde el RE hacia la periferia celular mediante vesículas derivadas del RE, que son transportadas a lo largo de MF de actina y miosina [Ju *et al.*, 2005, 2007; Samuels *et al.* 2007]. Una vez en los PD, tanto TGBp2 como TGBp3 podrían actuar aumentando su SEL [Tamai & Meshi, 2001; Zamyatnin *et al.*, 2004; Lucas & Lee, 2004].

#### 3.2.4. Otras proteínas de movimiento

Algunas MP no pueden ser agrupadas junto a ninguno de los tipos descritos anteriormente. Entre los virus de ssRNA(+), esto ocurre con la única MP codificada por algunos miembros del género *Tymovirus* (familia *Tymoviridae*), una proteína inusualmente grande (69-85 kDa) y muy rica en residuos de prolina. Esta proteína es capaz de unirse al RNA, transportarlo a través de los PD aumentando su SEL y, presumiblemente, unirse a estructuras membranosas [Bozarth *et al.*, 1992; Drugeon & Jupin, 2002]. En el otro extremo encontramos a los closterovirus que necesitan hasta cinco proteínas para moverse de una célula a otra, tres implicadas directamente en el movimiento (p6, p64, y Hsp70h) y dos estructurales (las CP mayor y menor), [Prokhnevsky *et al.*, 2002; Peremyslov *et al.*, 2004]. También podríamos incluir en este grupo a MP codificadas por geminivirus, que poseen un genoma de ssDNA y se replican en el núcleo. En su caso el movimiento del patógeno requiere dos proteínas virales: la denominada NSP (*nuclear shuttle protein*), encargada de transportar el genoma viral desde el núcleo al citosol y un segundo producto que se une a los complejos NSP:genoma viral para transportarlos a las células vecinas [Noueiry *et al.*, 1994].

### 3.3. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS DE MOVIMIENTO

La determinación de la localización subcelular de las MP virales ha sido, y sigue siendo, una cuestión extensamente abordada, ya que puede aportar pistas acerca del modo de acción de estas proteínas. Las aproximaciones empleadas son diversas e incluyen técnicas de fraccionamiento subcelular y microscopía, detección mediante marcaje inmunocitoquímico y, últimamente, fusión a proteínas fluorescentes. Las MP pueden localizarse en orgánulos del interior de la célula tan diversos como los PD, el citoesqueleto, la red del RE e incluso el núcleo celular (**Fig. 12**). Esta aparente ubicuidad hace más complejo su estudio y está relacionada con el dinamismo intrínseco a la función de movimiento.



**Fig.12:** Distintas localizaciones subcelulares de las MP. **(A)** MP del virus del mosaico del tabaco (TMV) (p30) fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) (puntos verdes) en PD de tabaco, donde la pared celular basal se ha teñido con calcofluór (en azul) [Faulkner *et al.*, 2008]. **(B)** Co-localización (en amarillo) de la MP del virus de la roseta del cacahuete (GRV) fusionada a GFP (canal verde) y la fibrilarina (canal rojo) en el nucléolo (No), dentro del contorno del núcleo (N). La MP también propicia la redistribución de la fibrilarina nucleolar en cuerpos de inclusión citoplasmática (c-RNP) [Kim *et al.*, 2007a]. **(C)** Expresión en células epidérmicas de TGBp2 fusionada a GFP. La fluorescencia marca la red del RE, el núcleo celular (flecha) y los gránulos vesiculares (señalados con líneas) [Ju *et al.*, 2007]. **(D-F)** Expresión de la MP del TMV en células epidérmicas (en rojo), co-localizando con MT del citoesqueleto (en verde) [Gillespie *et al.*, 2002].

**Localización en plasmodesmos.** Teniendo en cuenta que el uso de los PD es una estrategia común para el movimiento viral de una célula a otra, no es de extrañar que muchas MP puedan observarse adoptando el típico patrón de “punteaduras” en la pared celular, o cerca de ella, que caracteriza a los PD [Oparka *et al.*, 1997]. Este patrón ha podido observarse en plantas que expresan transitoria o constitutivamente la MP del TMV fusionada a un marcador fluorescente [Crawford & Zambryski, 2001; Roberts *et al.*, 2001] y en muchas otras proteínas que forman parte de la superfamilia “30K” [Ding *et al.*, 1995; van der Wel *et al.*, 1998]. En el caso de las proteínas del TGB, hay ejemplos descritos de localización en PD para las tres MP [Erhardt *et al.*, 1999; 2005]. También se han observado en PD las MP de algunos virus de ssDNA como las proteínas BR1 y BL1 del virus del mosaico del frijol enano (*Bean dwarf mosaic virus*, BDMV) [Noueiry *et al.*, 1994].

**Localización en membranas celulares y en estructuras del citoesqueleto.** Independientemente del tipo de MP(s) que presente un virus, al menos una de ellas

tendrá capacidad para interactuar con el sistema de membranas de la célula y con las estructuras de citoesqueleto [revisado en Harries *et al.*, 2010]. Como se ha comentado anteriormente, el RE es la principal estructura membranosa a la que se unen las MP, por lo general de forma co-traducciona y a través de las regiones hidrofóbicas de la proteína. Además, teniendo en cuenta que los PD poseen una composición mayoritariamente membranosa, no es de extrañar que muchas MP para las cuales se ha demostrado interacción con PD también puedan unirse al RE y viceversa [Vilar *et al.*, 2002; Verchot-Lubicz, 2005; Fujiki *et al.*, 2006]. En lo que respecta a los componentes del citoesqueleto, distintas MP se han visto asociadas o co-localizando con estas estructuras, lo que ha servido para anticipar o corroborar algunos de los aspectos acerca del movimiento intracelular que se han venido discutiendo [Wright *et al.*, 2007; Guenoune-Gelbart *et al.*, 2008; Epel, 2009].

La localización en membranas del RE y, en menor medida, en estructuras del citoesqueleto se ha verificado para muchas MP de la Superfamilia “30K”, del DGB y del TGB. En los casos mejor estudiados, como la proteína p30 del TMV, se ha observado que dicha localización sigue una distribución temporal, encontrándose la MP primero en cuerpos corticales asociados a la red del RE y luego asociada a los MT [Saldarelli *et al.*, 2000]. Asimismo, existen datos experimentales que muestran que p30 colocaliza con los MF e incluso los corta [Hofmann *et al.*, 2009]. En distintos casos, el empleo de inhibidores químicos ha permitido confirmar que el patógeno correspondiente requiere MF intactos para moverse, aportando un significado funcional a los datos de localización subcelular [Wright *et al.*, 2007; Harries *et al.*, 2009].

**Localización nuclear.** Las MP de los virus que se replican en el núcleo se encargan por lo general del transporte del genoma viral a través de las membranas nucleares. Así, una de las dos MP codificadas por geminivirus de genoma bipartido se localiza en el núcleo, donde se une al DNA viral e interviene en su transporte intracelular [Noueiry *et al.*, 1994]. Curiosamente, se ha observado que las MP de algunos virus de RNA pueden localizarse en el núcleo. Por ejemplo, la proteína codificada por la ORF 3 de un umbravirus, el virus de la roseta del cacahuete (*Groundnut rosette virus*, GRV), posee un dominio rico en Arg y una región rica en Leu responsables, respectivamente, de la entrada y salida del núcleo [Ryabov *et al.*, 2004]. Esta MP reorganiza los Cuerpos de Cajal y emplea las rutas de tráfico que involucran a estas estructuras para acceder al nucléolo, un paso que resulta esencial para la formación de partículas RNP competentes y para el movimiento sistémico del patógeno [Kim *et al.*, 2007b]. Recientemente se ha demostrado que también la proteína TGBp1 de un pomovirus, el virus mop-top de la patata (*Potato mop-top virus*, PMTV), puede localizarse en núcleo y nucléolo, y se ha sugerido que este producto podría interactuar con algún componente del núcleo y posiblemente con los MT [Wright *et al.*, 2010].



**Otras localizaciones subcelulares:** Algunas MP, como las del BMV, un bromovirus, o las de potyvirus pueden localizarse formando cuerpos de inclusión citoplasmáticos [Fujita *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1998]. También se ha observado en el citoplasma la TGBp1 de algunos hordeivirus y potexvirus, aunque en estos casos no formando parte de cuerpos de inclusión [Yang *et al.*, 2000; Zamyatin *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2010]. Igualmente, se ha descrito que alguna de las MP del DGB del género *Carmovirus* pueden localizarse en el citoplasma [Cohen *et al.*, 2000b; García-Castillo *et al.*, 2003].

La localización subcelular de las MP parece estar condicionada en muchos casos por modificaciones post-traduccionales, en particular fosforilaciones/ desfosforilaciones que también resultan importantes para la regulación de otras actividades de estas proteínas como la modificación del SEL o el transporte a través de los PD. Aún no se comprende del todo cuál es la dinámica de este tipo de modificaciones y en qué compartimentos subcelulares tienen lugar, aunque se han podido caracterizar algunas de las kinasas celulares responsables contenidas en las membranas celulares o en la pared celular [Atabekov & Taliensky, 1990; Citovsky *et al.*, 1993; Sokolova *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2005; Módena *et al.*, 2008]. La relevancia funcional de este tipo de modificaciones de la(s) MP(s) para el movimiento viral se ha demostrado en distintos casos [Kawakami *et al.*, 1999; Waigmann *et al.*, 2000; Trutnyeva *et al.*, 2005].

### 3.4. PROPIEDADES DE UNIÓN A RNA DE LAS PROTEÍNAS DE MOVIMIENTO

La capacidad de unir ácidos nucleicos, en particular RNA, es una característica compartida por la mayor parte de las MP virales. Esta propiedad es sobre todo evidente en aquellos virus que se mueven formando complejos RNP, en los cuales las MP funcionan como chaperonas que protegen el ácido nucleico frente a actividades enzimáticas celulares, empaquetándolo y manteniéndolo en un estado conformacional óptimo para atravesar los PD.

El estudio de la capacidad de unir ácidos nucleicos ha sido abordado con numerosas MP de virus de plantas, determinándose diversos parámetros como la fortaleza, especificidad y cinética de unión [revisado en Waigmann *et al.*, 2004]. Las propiedades de unión a ácidos nucleicos fueron primero descritas para la p30 del TMV [Citovsky *et al.*, 1990, 1992], extendiéndose posteriormente a la MP de otros grupos virales que también codifican proteínas de la Superfamilia “30K” [por ejemplo en Vaquero *et al.*, 1997; Soellick *et al.*, 2000; Nurkiyanova *et al.*, 2001; Herranz & Pallás, 2004]. Estas propiedades son compartidas también por muchas MP del DGB y del TGB. En estas últimas, la capacidad de unir RNA recae en la TGBp1 tanto de la clase potexvirus como de la clase hordeivirus, tal como se ha indicado anteriormente [Rouleau *et al.*, 1994; Bleykasten *et al.*, 1996; Kalinina *et al.*, 1996, 2001; Donald *et al.*,

1997; Lough *et al.*, 1998; Wung *et al.*, 1999]. Además de las MP de virus de ssRNA, las proteínas correspondientes de virus de dsRNA, ssDNA y dsDNA también puede unirse a ácidos nucleicos con distinta afinidad [Citovsky *et al.*, 1991; Pascal *et al.*, 1994; Thomas & Maule, 1995; Rojas *et al.*, 1998; Ji *et al.*, 2011]. Las MP de algunos virus que se mueven exclusivamente como partículas virales y no como complejos RNP, no parecen exhibir propiedades de unión a ácidos nucleicos, probablemente porque en su caso las uniones MP:CP son suficientes para facilitar el movimiento de los viriones completos [Lekkerkerker *et al.*, 1996; Pouwels *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2003].

Aunque se desconocen muchos detalles acerca del modo en el que interaccionan las distintas MP y los ácidos nucleicos virales, diversos estudios, sobre todo *in vitro*, han permitido caracterizar algunas de estas uniones. En el caso de MP de virus de ssRNA, se pueden destacar los siguientes rasgos generales:

- *Preferencia por ácidos nucleicos de simple cadena.* Algunas de estas proteínas muestran una afinidad de unión similar hacia ssDNA y ssRNA [Fujita *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 1998], pero normalmente la preferencia hacia estos últimos es mayor [Jansen *et al.*, 1998; Brill *et al.*, 2000; Herranz & Pallás, 2004].
- *Inespecificidad de secuencia.* Muchas de las MP son capaces de unir ácidos nucleicos independientemente de cuál sea su secuencia. No obstante, es de esperar que *in vivo* las MP lleven a cabo interacciones altamente específicas, probablemente por reconocimiento de estructuras secundarias y terciarias, gracias a la implicación de otros factores proteicos y celulares y/o debido a la compartimentalización del proceso dentro de la célula, que favorece la proximidad entre las partes que interaccionan.
- *Tolerancia a las altas concentraciones salinas.* Muchos complejos MP:RNA se caracterizan por resistir altas concentraciones salinas, aunque la fortaleza de la unión entre ambas moléculas varía de un caso a otro [Brantley & Hunt, 1993; Li & Palukaitis, 1996; Richmond *et al.*, 1998; Marcos *et al.*, 1999; López *et al.*, 2000].
- *Cinética cooperativa:* Durante las uniones inespecíficas las MP pueden unirse a la molécula de ácido nucleico al azar o, como ocurre en casi todos los casos descritos, siguiendo una cinética cooperativa. Durante las uniones al azar la MP se distribuye aleatoriamente a lo largo de la molécula de RNA, mientras que en las uniones cooperativas las MP tienden a agruparse en torno a ciertas regiones del ácido nucleico que quedan totalmente cubiertas, dejando otras libres de proteína.
- *Por lo general, las interacciones MP-RNA ocasionan cambios conformacionales en ambas moléculas.* Estos cambios de conformación

probablemente aumentan la especificidad de la unión y permiten a la MP adoptar un plegamiento que la hace competente para llevar a cabo otras funciones relacionadas con el transporte del virus [Uversky, 2002; Fink, 2005].

Los dominios involucrados en la unión a RNA (*RNA binding domain*, RBD) han sido identificados en numerosas MP. El número y la posición de los RBD pueden variar entre grupos virales e incluso entre virus relacionados [Schoumacher *et al.*, 1994; Fujita *et al.*, 1998]. A nivel de la composición aminoacídica los RBD carecen de motivos conservados; sin embargo, muchos de ellos son ricos en aminoácidos básicos (Arg y Lys) y, en cierta medida, en residuos amídicos (Asn y Gln) [Citovsky *et al.*, 1992; Osman *et al.*, 1993; Vaquero *et al.*, 1997; Herranz & Pallás, 2004]. En cuanto a su estructura secundaria, muchos RBD corresponden a regiones helicoidales, al igual que ha sido descrito para otras proteínas con propiedades de unión a RNA [Tau *et al.*, 1993; Tau & Frankel, 1995; Vaquero *et al.*, 1998; Marcos *et al.*, 1999; Vilar *et al.*, 2001; Herranz & Pallás, 2004]. En lo que respecta a las estructuras de orden superior, la característica más sobresaliente de los RBD es su alto grado de exposición, un aspecto que ha sido observado en las MP de varios miembros de la Superfamilia “30K” [Citovsky *et al.*, 1992; Osman *et al.*, 1993; Schoumacher *et al.*, 1994].



# Silenciamiento por RNA

## 4.1. SILENCIAMIENTO POR RNA: GENERALIDADES

El silenciamiento por RNA (*RNA silencing*) es un amplio sistema de regulación mediado por pequeños RNAs que causan la inactivación total o parcial de ácidos nucleicos a través de interacciones específicas [Tomari & Zamore, 2005]. Las primeras pruebas de la existencia del silenciamiento génico por RNA se obtuvieron en plantas, cuando investigadores que trataban de introducir transgenes en petunia para conseguir flores de un color violeta más intenso obtuvieron flores con zonas blancas que indicaban que tanto los transgenes introducidos como los genes endógenos homólogos habían sido silenciados [Napoli *et al.*, 1990]. Desde entonces este fenómeno, denominado inicialmente en plantas como cosupresión o silenciamiento génico post-transcripcional (*Post-transcriptional gene silencing*, PTGS), ha sido extensamente estudiado [Vaucheret *et al.*, 1998]. Trabajos posteriores pusieron de manifiesto que el silenciamiento no sólo tiene lugar en plantas, sino que se trata de un proceso evolutivamente conservado en prácticamente todos los seres vivos, y que se ha denominado interferencia mediada por RNA (*RNA interference*, RNAi) en animales [Fire *et al.*, 1998; Hammond *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006] y *gene quelling* en hongos [Pickford *et al.*, 2002].

En plantas superiores el silenciamiento por RNA actúa como un potente sistema endógeno de vigilancia que, una vez activado, interviene en numerosas funciones biológicas, desde la regulación de la expresión de genes endógenos hasta la respuesta frente a ácidos nucleicos invasivos, como transgenes, transposones y virus [Chicas & Macino, 2001; Matzke *et al.*, 2001; Voinnet, 2001; Baulcombe, 2004].

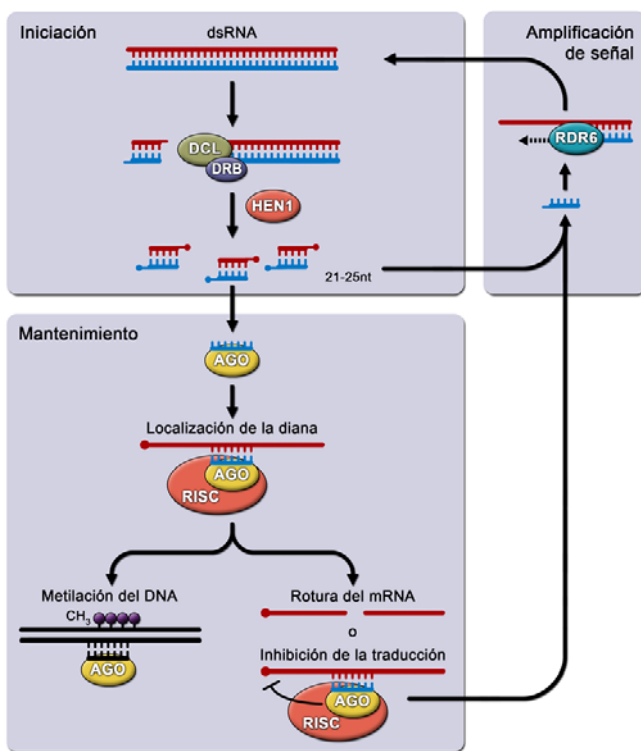
## 4.2 RUTAS DE SILENCIAMIENTO EN PLANTAS

Las plantas han desarrollado rutas especialmente complejas de silenciamiento por RNA que engloban una serie de procesos que pueden actuar a nivel transcripcional (*Transcriptional gene silencing*, TGS) o post-transcripcional (PTGS). Ambos fenómenos tienen en común el reconocimiento específico de secuencias de DNA o RNA por pequeñas moléculas de RNA (*small RNAs*, sRNAs) [Pantaleo, 2011; Vanyushin & Ashapkin, 2011].

El silenciamiento es inducido por la presencia de moléculas de dsRNA, o de ssRNA muy estructuradas, que pueden originarse por transcripción en el núcleo, durante las infecciones virales o por la acción de RNA polimerasas celulares dependientes de RNA (RDR) que las sintetizan a partir de ssRNAs. Estas moléculas son digeridas por enzimas con actividad RNasa, denominadas en plantas *Dicer-Like* (DCL), dando lugar a

dúplex de RNA de entre 19 y 25 nt. Una de las dos cadenas del dúplex es incorporada a un complejo multiproteico conocido como RISC (*RNA-induced silencing complex*). En el caso del PTGS, RISC es dirigido por el sRNA hasta un mRNA de secuencia complementaria (diana) al que este complejo se une induciendo su degradación o la represión de su traducción. En el TGS, RISC es guiado hasta un DNA complementario que resulta modificado por metilación, formando heterocromatina transcripcionalmente reprimida (**Fig. 13**).

Los sRNAs bicatenarios que dan especificidad al proceso de silenciamiento pueden tener orígenes diversos. Entre los que son codificados por el genoma de la planta se incluyen los microRNA (miRNA) y pequeños RNAs interferentes (*small interfering RNAs*, siRNAs) de naturaleza variada, entre ellos los pequeños RNAs que



**Fig.13:** Etapas del silenciamiento por RNA. Durante la iniciación una molécula de dsRNA es reconocida y procesada por Dicer (DCL), asistida por su cofactor (DRB), para generar dsRNAs que son metilados por HEN1. Durante el mantenimiento una hebra guía de sRNA se carga en el complejo RISC, cuyo componente principal es AGO, para reconocer específicamente y modificar una diana (RNA en el PTGS y DNA en el TGS). La amplificación de la señal corre a cargo de una polimerasa de RNA (RDR) que utiliza los sRNA primarios como cebadores para generar nuevas moléculas de dsRNA que pueden volver a procesarse.

actúan en *cis* (*cis-acting* siRNAs, casiRNAs) o en *trans* (*trans-acting* siRNAs, tasiRNAs), los siRNAs asociados a transcritos naturales antisentido (nat-siRNAs) o los siRNAs heterocromáticos (hc-siRNAs). Estas distintas clases de sRNAs difieren en su biogénesis, en el modo en que regulan a su diana y en los procesos en los que están involucrados. Además de estas moléculas de procedencia endógena, el silenciamiento puede estar mediado por siRNAs derivados de secuencias transgénicas, virales o de otras fuentes de dsRNA exógeno [revisado por Ghildiyal & Zamore, 2009].

En lo que se refiere a las características generales de las enzimas más relevantes involucradas en los procesos de silenciamiento, cabe mencionar que las proteínas DCL (~ 200 kDa) que degradan los dsRNAs poseen múltiples dominios, incluyendo dos catalíticos con actividad RNasa III que constituyen el centro activo, un dominio conservado tipo PAZ (*Piwi/Argonaute/Zwille*), un dominio de unión a dsRNAs situado hacia C-t, otro con actividad helicasa/ATPasa de RNA y un dominio de función desconocida (DUF283). La separación que existe entre el centro activo y el dominio PAZ en cada tipo de enzima determina la longitud de los sRNAs que se producen [Dunoyer *et al.*, 2005; MacRae *et al.*, 2006]. Por regla general, los ds-sRNAs generados por Dicer poseen un grupo fosfato en el extremo 5' y dos bases no apareadas en los extremos 3' hidroxilo [Hamilton & Baulcombe, 1999; Bernstein *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2002], que en la mayor parte de los casos resultan metilados por una metiltransferasa (HEN1) [Boutet *et al.*, 2003]. Esta modificación es compartida por todas las rutas de silenciamiento de plantas y consigue proteger a los sRNAs de la degradación [Li *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Frizzi & Huang, 2010].

Los dúplex de sRNA metilados se separan y normalmente la cadena antisentido (hebra guía) se incorpora al complejo RISC activándolo, a la vez que la cadena sentido es degradada [Baumberger & Baulcombe, 2005; Qi *et al.*, 2005; Matranga *et al.*, 2005]. La separación de las dos hebras del dúplex corre a cargo de una endonucleasa de la familia de proteínas Argonauta (AGO), que constituye el componente principal del complejo RISC. La proteína AGO contiene, entre otros, dos dominios característicos, el dominio PAZ, también presente en Dicer, y el dominio PIWI. El primero es responsable del reconocimiento y unión a los dúplex de sRNA a nivel de sus nucleótidos 3' protuberantes, mientras que el segundo proporciona la actividad endonucleotítica a RISC [Song *et al.*, 2004]. No está del todo claro cómo el complejo RISC activo localiza los mRNAs o DNAs complementarios, pero una vez que esto ocurre, la diana se corta en dos fragmentos que posteriormente son degradados por la maquinaria celular [Rana, 2007].

El otro componente importante de los mecanismos de silenciamiento son las enzimas RDR, que pueden intervenir en la generación inicial de los dsRNA inductores, como se ha indicado anteriormente, y también en la amplificación de la señal de

silenciamiento [Dalmay *et al.*, 2000; Wassenegger & Krczal, 2006]. Durante este último proceso, las hebras guía de los sRNAs localizan un mRNA complementario y actúan como cebadoras en una reacción de polimerización promovida por las RDR. Las nuevas moléculas de dsRNA sintetizadas son procesadas por Dicer generando dúplex de sRNA secundarios que podrían reprogramar a RISC, haciendo que la respuesta de silenciamiento persista, incluso si la molécula que disparó el mecanismo permanece localizada o es eliminada [Sijen *et al.*, 2001; Vaistij *et al.*, 2002; Voinnet, 2005a]. Esto ha llevado a dividir el silenciamiento en dos etapas distintas: la de iniciación, que transcurre desde la percepción del dsRNA inductor hasta la generación de los sRNAs y la de mantenimiento, que comprende lo que ocurre desde la incorporación de estas moléculas en RISC hasta su amplificación posterior. Este auto-reforzamiento del estado de silenciamiento se ha descrito tanto en procesos de TGS como de PTGS. Para estos últimos resulta particularmente importante en plantas la enzima RDR6 encargada de sintetizar 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].

En plantas, los mecanismos de silenciamiento activados en una célula simple pueden diseminarse a células adyacentes y a tejidos distantes [Voinnet & Baulcombe, 1997; Voinnet, 2005a]. Aún no se conoce cuál es la naturaleza exacta de la señal móvil, pero se dispone de datos que permiten especular la forma en la que tendría lugar esta dispersión. Por ejemplo, la transmisión de la señal de silenciamiento a largas distancias parece estar relacionada con la amplificación de la señal y con la actividad de RDR6 [Dalmay *et al.*, 2000]. Además, se ha sugerido que los sRNAs bicatenarios asociados con pequeñas proteínas podrían mediar la distribución floemática de la señal de silenciamiento [Schwach *et al.*, 2005]. En este sentido, estudios recientes han conseguido demostrar que tanto los siRNAs como los miRNAs tienen la capacidad de moverse de una célula a otra y alcanzar el sistema vascular, sustentando la posible implicación de estas especies en la propagación de la señal [Chitwood & Timmermans, 2010; Melnyk *et al.*, 2011].

### 4.3. LOS VIRUS COMO INDUCTORES Y DIANAS DEL PTGS

Cada vez existen más datos que indican que el silenciamiento por RNA constituye un importante sistema defensivo frente a patógenos virales que no precisa de genes específicos de resistencia [Ding & Voinnet, 2007; Eamens *et al.*, 2008]. Los virus, generan estructuras de dsRNA durante su ciclo infeccioso que pueden funcionar como inductoras del PTGS. La activación del silenciamiento los convierte en dianas de este mecanismo, dando lugar a la fragmentación de su genoma y a la formación de pequeños dúplex de RNA de origen viral (*viral small interfering*, vsRNAs) [Moissiard & Voinnet, 2004; Ding & Voinnet, 2007]. Como se ha descrito de forma general para el PTGS, en



este caso la señal también se amplifica mediante la producción de vsiRNAs secundarios. Asimismo, la señal antiviral puede diseminarse al resto de la planta, estableciendo una respuesta defensiva y una resistencia frente a la infección, previa a la llegada del patógeno [Brosnan *et al.*, 2007; Molnár *et al.*, 2010; Dunoyer *et al.*, 2010].

Los dsRNAs de origen viral que disparan el PTGS pueden provenir directamente de la transcripción bidireccional de los virus de DNA o de la replicación y transcripción de los virus de RNA [Ahlquist, 2006]. Además, para estos últimos se ha considerado que las regiones altamente estructuradas del genoma podrían actuar como dianas primarias del silenciamiento [Molnár *et al.*, 2005; Donaire *et al.*, 2009]. Las especies moleculares que disparan el silenciamiento también podrían ser el resultado de la utilización del vRNA como molde por las RDR celulares [Curaba & Chen, 2008].

En *Arabidopsis* se han descrito cuatro proteínas DCL que están involucradas de manera jerárquica en la biogénesis de vsiRNAs a partir de los dsRNAs virales [Margis *et al.* 2006; Blevins *et al.*, 2006; Deleris *et al.*, 2006; Moissiard & Voinnet, 2006]. En plantas infectadas por virus de RNA actúa preferentemente DCL4, para producir dúplex de 21 nt (vsiRNAs-21nt). En muchos casos ésta suele ser la especie más abundante y su acumulación puede correlacionarse con la magnitud del silenciamiento inducido por el virus, con la disminución del título viral o con la recuperación o la inmunidad alcanzada en tejidos no infectados inicialmente [Szittyta *et al.*, 2002; Dreher & Miller, 2006; Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009]. Además de DCL4, puede actuar su sustituto funcional, DCL2 (produciendo vsiRNAs-22nt), seguido de DCL3 (vsiRNAs-24nt) y de DCL1. Esta última contribuye en menor medida a la formación de vsiRNAs pero podría intervenir cuando están comprometidas las actividades de otras DCL o cuando es necesario un procesamiento previo que facilite el acceso al dsRNA de otras DCL [Donaire *et al.*, 2008; Llave, 2010; García-Ruiz *et al.*, 2010].

Una vez generados los vsiRNAs, estos se asocian con complejos efectores RISC antivirales (*antiviral RNA-induced silencing complex*, vRISC) encargados de reconocer las dianas virales y digerirlas [Ding & Voinnet, 2007; Vaucheret, 2008; Hutvagner & Simard, 2008]. La proteína Argonauta de tipo 1 (AGO1) suele contribuir en mayor medida al desarrollo de la respuesta antiviral, pero en algunas especies de plantas también se ha constatado la participación de las proteína Argonauta 2 y 7 (AGO2, AGO7) [Morel *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2008; Harvey *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011a; Jaubert *et al.*, 2011].

Como se ha mencionado anteriormente, las RDR celulares, además de participar en la etapa de iniciación, se encargan de amplificar la señal del silenciamiento inducida por virus [Voinnet, 2008]. La contribución de RDR6 a la respuesta antiviral parece ser bastante importante pues muchas veces, si las funciones de esta enzima se encuentran comprometidas, aumenta la susceptibilidad a estos patógenos y los meristemos

vegetales, normalmente inmunes a las infecciones, pueden ser invadidos [Schwach *et al.*, 2005]. Durante las infecciones por virus de ssRNA(+), 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].

#### 4.4. SUPRESIÓN VIRAL DEL SILENCIAMIENTO POR RNA

Los patógenos virales adoptan diferentes estrategias para contrarrestar la respuesta defensiva del hospedador. Una de las más importantes es la codificación de proteínas supresoras del silenciamiento por RNA (*viral suppressors of RNA silencing*, VSR) [Burgyán & Havelda, 2011]. Se asume que todos los virus de plantas codifican al menos un supresor del silenciamiento y en algunos caso más de uno, como ocurre por ejemplo en los géneros clostero-, crini- y begomovirus [Ding & Voinnet, 2007; Díaz-Pendón & Ding, 2008]. Muchos de los supresores virales de plantas han sido identificados a través de la infiltración con *Agrobacterium tumefaciens* (agroinfiltración), una aproximación sencilla y reproducible con la que se consigue la expresión transitoria y elevada de cualquier gen de interés en una zona definida del huésped [Voinnet & Baulcombe, 1997; Johansen & Carrington, 2001]. Normalmente, se evalúa la capacidad que tiene la proteína objeto de estudio de mantener o aumentar los niveles de expresión de genes delatores que, en ausencia de supresión, resultan silenciados por los mecanismos del hospedador. Esta metodología funciona bien en la mayoría de los casos aunque su eficacia puede ser limitada para la identificación de supresores que actúan a nivel distal o que poseen una actividad excesivamente baja.

##### 4.4.1. Características generales de los supresores del silenciamiento

1) Los supresores del silenciamiento son muy diversos, no comparten similitudes obvias de secuencia o de estructura, ni siquiera dentro de la misma familia o grupo viral, sino que parecen haber evolucionado de manera independiente para llevar a cabo la misma función [Ding & Voinnet, 2007].

2) Normalmente las proteínas virales con actividad supresora también están implicadas en otras funciones del ciclo vital del patógeno. Así, se ha identificado actividad supresora en proteínas estructurales como las CP y también en proteínas no estructurales que intervienen en la replicación, el movimiento o la regulación traduccional, entre otros procesos [Voinnet, 2005b].

3) Los supresores pueden interferir en prácticamente cualquier etapa de la ruta de silenciamiento [Roth *et al.*, 2004]. En el caso de los virus que codifican más de un supresor, los diversos productos normalmente actúan a través de distintos mecanismos que se complementan entre sí [Satyanarayana *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2004]. Asimismo,

cada vez existen más datos que indican que un supresor particular puede actuar en distintas etapas, reconociendo múltiples dianas a lo largo de la ruta.

4) Muchos supresores virales fueron descritos inicialmente como determinantes de patogenicidad y/o de la gama de hospedador. Esto es probablemente debido a que el efecto de la supresión se manifiesta indirectamente a través del incremento o mejora de ciertos procesos virales como la replicación y/o el movimiento [Díaz-Pendón & Ding, 2008]. Además, al menos parte de la sintomatología inducida por algunos virus puede ser consecuencia de la interacción del supresor viral con la ruta endógena de miRNAs y su efecto en el desarrollo de la planta [Kasschau *et al.*, 2003; Dunoyer *et al.*, 2004; Chellappan *et al.*, 2005].

5) Existe una relación más o menos clara entre la capacidad de un supresor viral de inhibir el silenciamiento y la capacidad del virus de moverse de una célula a otra o a largas distancias, probablemente al permitir alcanzar mayores concentraciones intracelulares del patógeno y/o al bloquear la señal antiviral [Kasschau & Carrington, 2001; Bayne *et al.*, 2005].

#### 4.4.2. Mecanismos de supresión de los virus de plantas

Los mecanismos de acción de los supresores virales son diversos y complejos y en muchos casos no se comprenden del todo. De forma general, los supresores contrarrestan el silenciamiento actuando sobre moléculas de RNA relacionadas con la ruta del silenciamiento o interaccionando con factores proteicos clave para la misma (**Fig. 14 y Tabla Anexa 1**).

**Influencia sobre los ácidos nucleicos de la ruta del silenciamiento.** Numerosos supresores virales del silenciamiento funcionan uniéndose a dsRNAs cortos y/o largos. De hecho, se trata de la estrategia más extendida entre los virus de plantas de los géneros tospo-, cucumo-, poty-, ipomo-, tombus-, clostero-, viti-, tobamo- y hordeivirus [Lakatos *et al.*, 2006; Mérai *et al.*, 2006]. Si el supresor se une a dsRNAs largos, la inactivación se produce al competir con la enzima Dicer por su sustrato [Deleris *et al.*, 2006], y si secuestra siRNAs, la inhibición tiene lugar porque estas especies dejan de estar disponibles para cargarse en el complejo RISC [Chao *et al.*, 2005; Mérai *et al.*, 2005, 2006; Lakatos *et al.*, 2006]. En algunos casos, la unión a los dúplex no tiene restricciones de tamaño y los supresores pueden unirse tanto a dsRNAs largos como a cortos. Una estrategia menos frecuente, pero igualmente efectiva, es la unión a siRNAs monocatenarios, antes o después de haberse incorporado a AGO [Zhou *et al.*, 2006b; Xiong *et al.*, 2009]. El bloqueo de la formación de complejos RISC activos también es posible a partir de mecanismos totalmente diferentes, como aquellos que interfieren en la metilación de los siRNAs por parte de la enzima HEN1 [Ebhardt *et al.*, 2005; Vogler *et al.*, 2007; Csorba *et al.*, 2007; Lozsa *et al.*, 2008] o los que tienen como consecuencia

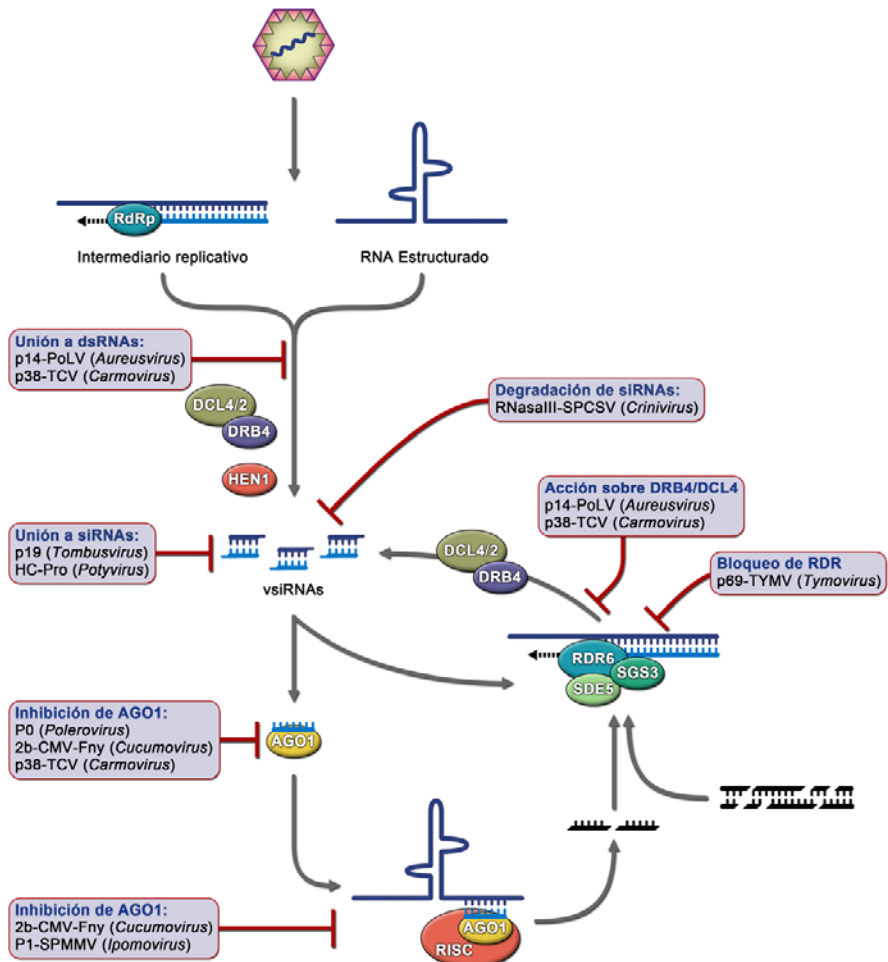
el corte de los dúplex en fragmentos aún más pequeños que no pueden ser incorporados a RISC [Kreuze *et al.*, 2005; Cuellar *et al.*, 2009].

***Influencia sobre componentes proteicos de la ruta del silenciamiento.*** Además de los mecanismos de supresión que actúan sobre los ácidos nucleicos, algunos supresores virales parecen ejercer su acción sobre componentes proteicos de la maquinaria de silenciamiento [Deleris *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Baumberger *et al.*, 2007; Glick *et al.*, 2008] o sobre reguladores de la misma [Anandalakshmi *et al.*, 2000; Endres *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010].

El primer punto importante en la ruta es el procesamiento del dsRNA por parte de proteínas DCL. En plantas, estas enzimas requieren para su funcionamiento de factores auxiliares que unen dsRNAs, conocidos como DRB (*dsRNA-binding protein*) [Vaucheret, 2006]. En particular DRB4, el factor auxiliar de DCL4, constituye la diana de algunos supresores virales que se unen a él, inhibiendo la formación de vsiRNA-21nt [Hiraguri *et al.*, 2005; Deleris *et al.*, 2006; Haas *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008].

Por su parte, el principal mecanismo dirigido contra RISC conlleva la inhibición de la unidad catalítica AGO1, por medio de la unión física [Zhang *et al.*, 2006], la desestabilización o la degradación [Bayne *et al.*, 2005; Pazhouhandeh *et al.*, 2006; Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007, 2008; Chiu *et al.*, 2010]. Entre los supresores que siguen la última vía, se ha descrito la existencia de dominios tipo F-box, un motivo estructural que normalmente poseen factores celulares relacionados con la ubiquitinización y la degradación de proteínas. En estos casos, se ha planteado un mecanismo según el cual el supresor se une a AGO1 a través de F-box y promueve su degradación [Pazhouhandeh *et al.*, 2006; Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007, 2008]. Recientemente se ha propuesto un nuevo tipo de interacción con AGO1 a través de repeticiones aminoacídicas del tipo GW/GW presentes en supresores virales no relacionados. Este tipo de repeticiones son típicas de proteínas celulares que intervienen en el ensamblaje/funcionamiento de RISC en diversos organismos, y ciertos supresores virales que las contienen pueden, por competencia con las proteínas celulares, interferir en la formación *de novo* de RISC o en la actividad del complejo cuando se encuentra pre-cargado con vsiRNAs [Azevedo *et al.*, 2010; Giner *et al.*, 2010]. Aunque AGO1 es aparentemente la diana preferida de los supresores que actúan sobre algún componente proteico de RISC, los mecanismos virales de contra-defensa también podrían centrarse en otras proteínas AGO [Jaubert *et al.*, 2011; Scholthof *et al.*, 2011].

Finalmente, se conocen algunos supresores que actúan sobre enzimas RDR, o sobre proteínas asociadas necesarias para su función, impidiendo la formación de dsRNAs [Zrachya *et al.*, 2007; Glick *et al.*, 2008].



**Fig. 14:** Puntos de actuación de supresores codificados por virus de RNA de plantas a lo largo de la ruta de silenciamiento. Los supresores pueden unirse al dsRNA e impedir su procesamiento por parte de Dicer, o secuestrar/degradar siRNAs e impedir que la hebra guía se cargue en RISC. Algunos supresores pueden actuar sobre el componente principal de RISC (AGO1) desestabilizándolo o interactuando directamente con él e impidiendo su activación. Además pueden interferir indirectamente en la función de Dicer actuando sobre DRB4 (factor que asiste a DCL4), un mecanismo que ha sido representado en el esquema durante la etapa de amplificación de la señal. Finalmente, algunos supresores podrían inhibir el funcionamiento de las RDR celulares y por tanto la formación de dsRNAs.

**Otros mecanismos de supresión del silenciamiento.** Algunos supresores virales actúan modulando las rutas endógenas de la planta en beneficio del patógeno. Uno de estos casos corresponde a supresores de virus de DNA, como los pertenecientes a varios miembros de la familia *Geminiviridae*. Una parte de la respuesta defensiva contra estos

patógenos tiene lugar en el núcleo celular e implica la metilación del genoma viral, un proceso que impide la replicación posterior y donde interviene una enzima celular ADK (*Adenosine kinase*) [Wang *et al.*, 2003]. Pues bien, los supresores de ciertos geminivirus inhiben la enzima ADK e indirectamente consiguen bloquear el proceso de metilación [Wang *et al.*, 2005; Bisaro, 2006]. También dentro de esta familia se han descrito supresores capaces de inducir, entre otros, la expresión de reguladores negativos endógenos del silenciamiento, como la proteína WEL1 [Trinks *et al.*, 2005]. Otros ejemplos de reguladores negativos del silenciamiento que pueden ser manipulados por los supresores virales son: una proteína celular relacionada con la calmodulina (*rgs-CaM*) [Anandalakshmi *et al.*, 2000] y el factor transcripcional inducible por etileno (RAV2). Este último posiblemente constituye un punto de control importante pues es esencial para el funcionamiento de diversos supresores no relacionados [Endres *et al.*, 2010]. Finalmente, existe un curioso ejemplo de mecanismo de supresión, correspondiente a un dianthovirus, en el cual no participa directamente ninguna proteína viral. En este caso la propia replicación del patógeno podría hacer uso de componentes proteicos clave de la ruta del silenciamiento, propiciando su inhibición [Takeda *et al.*, 2005; Mine *et al.*, 2010a].

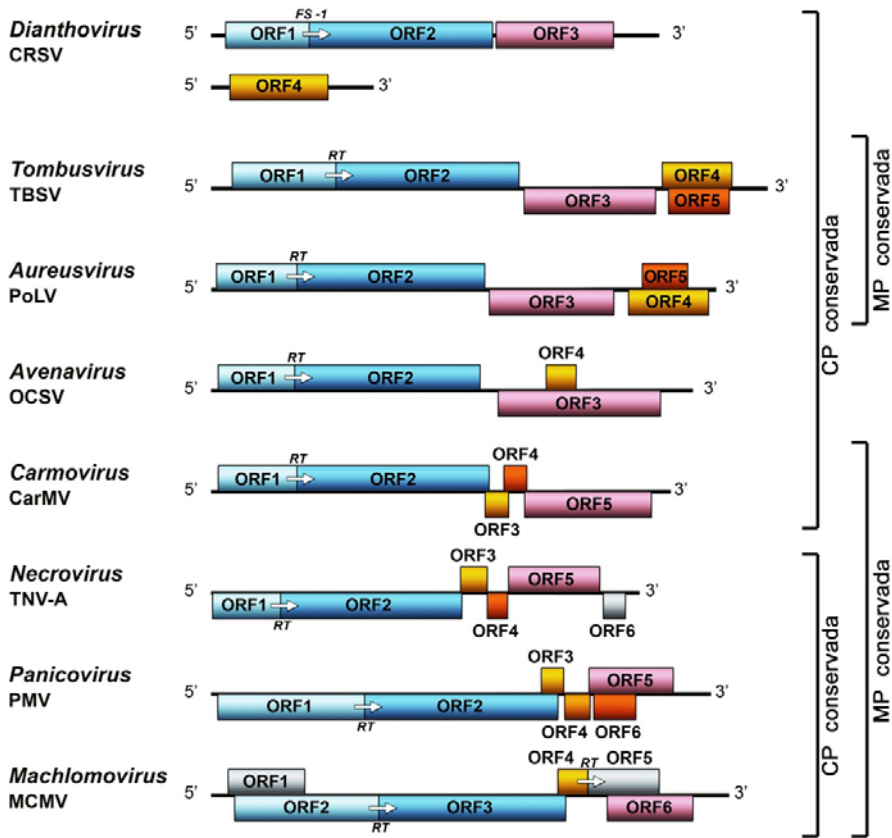
# Familia *Tombusviridae*

## 5.1. ASPECTOS GENERALES

La familia *Tombusviridae* está constituida por los géneros *Tombusvirus*, *Aureusvirus*, *Avenavirus*, *Machlomovirus*, *Necrovirus*, *Panicovirus*, *Dianthovirus* y *Carmovirus*, que agrupan en conjunto 51 especies definitivas y 18 especies provisionales de patógenos virales de plantas [Rochon *et al.*, 2011].

Los virus de esta familia se encuentran ampliamente distribuidos por todo el mundo, con una mayor incidencia en regiones templadas. Su gama de huéspedes naturales incluye especies monocotiledóneas y dicotiledóneas, pero no ambas a la vez. En todos los casos la transmisión ocurre por inoculación mecánica, propagación vegetativa y, dependiendo de la especie viral, también por contacto entre plantas, mediante semillas o polen y a través del suelo o el agua de riego. Los hongos del género *Olpidium* y ciertas especies de escarabajos pueden transmitir algunos de estos virus, pero en otros casos no se conocen vectores biológicos. Las infecciones por estos patógenos exhiben una sintomatología común caracterizada por hojas moteadas, arrugadas, deformes y necróticas, aunque también pueden ser asintomáticas bajo ciertas condiciones ambientales o dependiendo del aislado viral y la especie vegetal.

Excepto los miembros del género *Dianthovirus*, que poseen un genoma de RNA segmentado bipartido, el resto de virus de la familia tienen un genoma monopartido lineal de ssRNA(+) de entre 3.7 y 4.8 kb, que carece de estructura cap en el extremo 5' y de cola Poly(A) en 3' [Rochon *et al.*, 2011]. La organización genómica difiere entre los géneros de esta familia, pero en todos los casos se codifican dos proteínas esenciales para la replicación, al menos una MP y una CP (**Fig. 15**). La RdRp se encuentra muy conservada entre todos los miembros del grupo y es traducida a partir de una ORF que, con excepción del género *Dianthovirus*, está interrumpida por un codón de parada débil (normalmente UAG) que permite la lectura a través (RT). Los miembros del género *Dianthovirus* expresan la RdRp mediante un corrimiento de -1 nt (FS-1) en la pauta de lectura de los ribosomas que han empezado la traducción en el codón de inicio de la ORF 1. Los genomas de los virus pertenecientes a los géneros *Dianthovirus* y *Avenavirus* poseen cuatro ORF, mientras que el resto de los géneros de la familia contienen al menos cinco. Los géneros *Machlomovirus* y *Panicovirus* pueden extender uno de los genes de las MP por la presencia de un codón de terminación débil que permite un mecanismo de RT (*Machlomovirus*), o de un heptanucleótido que facilita un proceso de FS (*Panicovirus*), dando lugar a nuevas ORF. Con la excepción de la única especie reconocida dentro del género *Machlomovirus*, el virus del moteado clorótico del maíz (*Maize chlorotic mottle virus*, MCMV), los genes que codifican las replicasas



**Fig. 15:** Organización genómica de especies tipo de los distintos géneros de la familia *Tombusviridae*. Las diferentes ORF se representan como cajas coloreadas dependiendo de las funciones propuestas para cada proteína: implicadas en replicación (en azul), en movimiento (en naranja), proteína de cubierta (en rosa) y ORF de función desconocida (en gris) [adaptada de Rochon *et al.*, 2011].

están situados en posición 5' proximal y son expresados directamente a partir del gRNA. En cambio, los genes que codifican las MP y la CP presentan una localización interna o 3' proximal (**Fig. 15**) y son traducidos a partir de sgRNAs que se generan durante el ciclo infeccioso [Rochon *et al.*, 2011].

Los virus de la familia *Tombusviridae* por lo general producen una o dos proteínas de movimiento, que pueden dividirse en tres grupos de acuerdo a su origen filogenético: (1) en el primer grupo se incluyen los miembros de los géneros *Avenavirus*, *Carmovirus*, *Machlomovirus*, *Necrovirus* y *Panicovirus*, que codifican una proteína de entre 7-9 kDa que, a excepción de los avenavirus, participa en el movimiento junto a otra MP de entre 6-12 kDa; (2) el segundo grupo está constituido por los géneros



*Tombusvirus* y *Aureusvirus*, cuyos miembros producen dos MP, una de 22-27 kDa y otra adicional de 14-19 kDa, relacionada además con el aumento de la severidad de los síntomas y (3) el tercer grupo incluye las especies del género *Dianthovirus* que codifican en sus genomas una única MP de 35 kDa [Cañizares *et al.*, 2001; Rochon *et al.*, 2011].

Todos los miembros de la familia forman partículas con simetría icosaédrica (T=3), constituidas por 180 subunidades de la CP, de entre 25-48 kDa. De acuerdo a la morfología del virión se pueden establecer dos grupos filogenéticos distintos: el primero de ellos incluye los géneros *Aureusvirus*, *Avenavirus*, *Carmovirus*, *Dianthovirus* y *Tombusvirus*, que ensamblan partículas redondeadas, de superficie rugosa y de un diámetro entre 32 y 35 nm; el segundo, incluye los géneros *Machlomovirus*, *Necrovirus* y *Panicovirus*, que forman viriones no granulados de entre 30-32 nm de diámetro. En el primer grupo, cada subunidad proteica se pliega en tres dominios estructurales distintos: (1) un dominio “R”, N-t, relativamente básico, que se dispone hacia el interior de la cápsida e interacciona con el vRNA; (2) un dominio “S”, conectado mediante un brazo amino terminal con el dominio “R”, que adopta una conformación tipo lámina  $\beta$  que constituye la armazón o esqueleto superficial de la cápsida y (3) un dominio “P”, C-t, que se proyecta hacia al exterior de la cubierta viral y es responsable de la apariencia granular del virión. Los contactos entre dominios “S” se estabilizan con ayuda de dos sitios de unión a iones  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que los dominios “P” forman parejas que al interactuar favorecen el ensamblaje y aportan estabilidad a la estructura del virión. La carencia de este último dominio explica que los virus del segundo grupo formen partículas no granuladas [Rochon *et al.*, 2011].

Al igual que otros virus de ssRNA(+), las 3' UTR de los gRNAs de los miembros de esta familia contienen secuencias y/o estructuras que están implicadas en la replicación y en la traducción viral. En los géneros *Carmovirus* y *Tombusvirus*, los 19 últimos nucleótidos del extremo 3' del gRNA se pliegan adoptando una estructura de tipo horquilla flanqueada por una secuencia de simple cadena, CUGCCC en *carmovirus* [Simon & Howell, 1986; Song & Simon, 1995; Stupina & Simon, 1997; Carpenter & Simon, 1998] y CCC en *tombusvirus* [White & Nagy, 2004]. En ambos casos esta estructura constituye el promotor mínimo reconocido por la replicasa viral para sintetizar la cadena de polaridad negativa. De forma análoga, la RdRp debe reconocer secuencias y estructuras específicas contenidas en la región 3' UTR del ssRNA(-), que estará reflejada en la 5' UTR del ssRNA(+), para sintetizar las nuevas cadenas de polaridad positiva que constituirán la progenie viral [Panavas *et al.*, 2002a]. A este respecto, cabe señalar que se han detectado motivos comunes en los extremos 5' de los gRNA y los sgRNAs de varios *carmovirus*, particularmente el motivo (G<sub>2-3</sub> (A/U)<sub>3-7</sub>), que probablemente facilitan el reconocimiento por parte de la polimerasa viral para llevar a cabo la replicación y/o la transcripción [Guan *et al.*, 1997, 2000a, 2000b].

Asimismo, se han descrito elementos que regulan los niveles de síntesis de las cadenas (+) y (-), tales como estimuladores de la replicación que potencian la síntesis de cadenas positivas y represores de la replicación que disminuyen la producción de cadenas negativas [Ray & White, 1999; Nagy *et al.*, 1999, 2001; Pogany *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004a, 2004b; Panavas & Nagy, 2005; Na & White, 2006]. Además de los elementos implicados en la replicación, se ha descrito la presencia de reguladores traduccionales en la 3' UTR de distintos miembros de la familia *Tombusviridae* que parecen promover una traducción eficiente de los vRNA en ausencia de estructuras cap [Miller *et al.*, 2007; Stupina *et al.*, 2008; Truniger *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011b].

En varios miembros de la familia *Tombusviridae* se ha constatado la presencia de moléculas anexas, como los RNAs defectivos interferentes (*defective interfering RNA*, DI RNA), los virus satélites y los RNAs satélites (*satellite RNA*, satRNA) [revisado en Pelczyk *et al.*, 2006]. Estas moléculas pueden producir una atenuación o una intensificación de los síntomas inducidos por el patógeno del cual dependen, y su secuencia puede estar o no relacionada con la de éste [Simon *et al.*, 2004; Palukaitis *et al.*, 2008; Roux, 2008].

## 5.2. PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA REPLICACIÓN EN LA FAMILIA *TOMBUSVIRIDAE*

La información disponible actualmente acerca de las replicasas de los miembros de la familia *Tombusviridae* se ha obtenido fundamentalmente a partir de los trabajos realizados con varios miembros del género *Tombusvirus* [Bleve-Zacheo *et al.*, 1997; Oster *et al.*, 1998; Rubino *et al.*, 2001; Weber-Lotfi *et al.*, 2002; Panaviene *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2004; Panavas *et al.*, 2005a;] y con una especie del género *Dianthovirus* [Bates *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 2004; Takeda *et al.*, 2005; Okamoto *et al.*, 2008; Mine *et al.*, 2010b]. Estas investigaciones se han centrado en los requerimientos de secuencias y las actividades enzimáticas de la RdRp, en las propiedades de unión a ácidos nucleicos de ambas replicasas, su localización subcelular, la búsqueda de factores del huésped implicados en la replicación y en la interacción entre ambas proteínas.

Como se ha indicado anteriormente, las ORF 1 y 2 de la mayoría de los miembros de esta familia codifican dos proteínas que llevan a cabo la replicación: un producto de 27-48 kDa, sin dominios funcionales reconocibles, y la RdRp viral, perteneciente al Supergrupo 2, cuyo tamaño oscila entre 88 y 112 kDa. La indispensabilidad de ambos productos génicos en el proceso de multiplicación se ha demostrado formalmente para cinco especies del género *Tombusvirus*: el TBSV, el miembro tipo de este grupo [Scholthof *et al.*, 1995b], el CIRV [Russo *et al.*, 1994], el virus de las manchas anulares del *Cymbidium* (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) [Kollár & Burgyán, 1994], el virus de las manchas onduladas de la alcachofa (*Artichoke mottled crinkle virus*, AMCV) [Molinari *et al.*, 1998] y el CNV [Oster *et al.*, 1998; Panaviene *et al.*, 2003].

Este aspecto se ha confirmado también en otros componentes de la familia, como el virus del mosaico necrótico del trébol rojo (*Red clover necrotic ringspot virus*, RCNMV) (género *Dianthovirus*) [Bates *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 2005; Okamoto *et al.*, 2008], el virus del mosaico del *Panicum* (*Panicum mosaic virus*, PMV) (género *Panicovirus*) [Batten *et al.*, 2006], la cepa D del virus de la necrosis del tabaco (*Tobacco necrosis virus D*, TNV-D) (género *Necrovirus*) [Molnár *et al.*, 1997], en dos carmovirus, el virus del arrugamiento del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV) y el virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) [Hacker *et al.*, 1992; White *et al.*, 1995; Genovés *et al.*, 2006], y en el virus del arabesco del *Pelargonium* (*Pelargonium line pattern virus*, PLPV), propuesto como miembro de un nuevo género, *Pelarspovirus*, dentro de la familia *Tombusviridae* [Castaño *et al.*, 2009].

Las dos replicasas codificadas por los integrantes de esta familia se producen en cantidades muy diferentes como consecuencia del mecanismo de lectura a través de un codón de terminación débil o del corrimiento de la pauta de lectura que conduce a la traducción de la RdRp. Así, normalmente, esta última se acumula de 10 a 20 veces menos en tejido infectado, que el producto de la ORF 1 [Hacker *et al.*, 1992; Lupo *et al.*, 1994; White *et al.*, 1995; Scholthof *et al.*, 1995b; Panaviene *et al.*, 2004].

La actividad enzimática de polimerización asociada a la RdRp ha sido estudiada, tanto *in vitro* como *in vivo*, para la RdRp de distintos miembros de la familia incluyendo varios tombusvirus [Nagy & Pogany, 2000; Panavas *et al.*, 2002a; Panaviene *et al.*, 2004], un dianthovirus [Bates *et al.*, 1995] y un carmovirus [Rajendran *et al.*, 2002]. La relevancia del motivo GDD para esta actividad se ha corroborado en varios casos [Bates *et al.*, 1995; Molinari *et al.*, 1998; Boonrod *et al.*, 2005]. En cuanto a la replicasa de menor tamaño, su papel específico durante la replicación ha sido una incógnita durante mucho tiempo. En los últimos años, distintos trabajos con varias especies virales han puesto de manifiesto algunas funciones de este tipo de proteínas, que serán comentadas en los siguientes apartados.

### 5.2.1. Localización subcelular

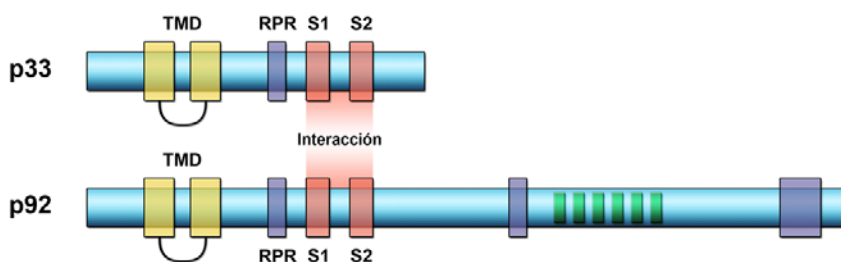
Como ocurre con otros virus de ssRNA(+), la replicación de los miembros de la familia *Tombusviridae* es citoplasmática y está asociada a estructuras membranosas. Los estudios iniciales de microscopía ya mostraban que las infecciones producidas por diversas especies del género *Tombusvirus* traían aparejadas alteraciones citopáticas caracterizadas por la formación de cuerpos multivesiculares generados como resultado de la proliferación de membranas peroxisomales [Russo *et al.*, 1983; Martelli *et al.*, 1988; McNew & Goodman, 1994] o mitocondriales [Di Franco *et al.*, 1984]. De la misma forma, se han observado modificaciones en la estructura de mitocondrias de células infectadas por distintos carmovirus [Russo & Martelli, 1982; Hatta *et al.*, 1983;

Di Franco & Martelli, 1987a, 1987b], lo que llevó a sugerir que la síntesis del vRNA podía tener lugar en estructuras derivadas de distintos orgánulos.

Un número creciente de datos recabados en los últimos años indica que la replicasa de menor tamaño, codificada por la ORF 1, contiene la información para dirigir el complejo replicativo hacia membranas subcelulares específicas que varían entre distintos miembros de la familia e incluso del mismo género, siendo en algunos casos responsable de las alteraciones en dichos orgánulos [Burgyán *et al.*, 1996]. Entre los miembros del género *Tombusvirus*, se ha descrito la asociación de la proteína p33 del TBSV, el CymRSV y el CNV a membranas peroxisomales [Navarro *et al.*, 2004; Panavas *et al.*, 2005a; McCartney *et al.*, 2005], mientras que la proteína homóloga del CIRV, p36, se localiza en mitocondrias [Rubino *et al.*, 2000, 2001]. Tanto la proteína p33 como la proteína p36 inducen la formación de múltiples vesículas esféricas u ovoides (MVB) resultado de la invaginación de la membrana externa del orgánulo con el que se asocian. Además, estudios bioquímicos han mostrado que tanto p33 como p36 se comportan como proteínas integrales de membrana [Rubino *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2004]. En este sentido, en el extremo N-t de ambas proteínas auxiliares de la replicación se han identificado dos segmentos hidrofóbicos separados por una porción hidrofílica que parecen mediar la inserción a membranas, dejando los extremos N-t y C-t expuestos al citoplasma y la región intermedia orientada hacia la matriz peroxisomal (p33) (**Fig. 16**) o hacia al espacio intermembrana mitocondrial (p36).

La localización subcelular de las replicasas también ha sido estudiada en otros integrantes de la familia, pero de forma menos detallada. En el género *Dianthovirus* se ha descrito que el producto de la ORF 1 (p27) del RCNMV, se asocia fuertemente al RE, induciendo restructuración y proliferación de las membranas de este orgánulo [Turner *et al.*, 2004]. En lo que respecta al género *Carmovirus*, la determinación de las características citopatológicas de células infectadas unida a la predicción de una putativa MTS en la región N-t de las replicasas del virus del mosaico de la Galinsoga (*Galinsoga mosaic virus*, GaMV), del MNSV y del TCV, permitió proponer que el complejo replicativo de estos virus probablemente se asocia a mitocondrias [Ciuffreda *et al.*, 1998]. Recientemente se ha demostrado que, efectivamente, el producto de la ORF 1 (p29) de uno de estos tres carmovirus, el MNSV, se localiza en mitocondrias, aunque la asociación con estos orgánulos no depende de la supuesta MTS sino de un dominio hidrofóbico interno [Mochizuki *et al.*, 2009].

Teniendo en cuenta que la RdRp y la proteína auxiliar de la replicación comparten la secuencia codificada por la ORF 1, es de esperar que las señales que dirigen la localización subcelular en uno y otro producto sean comunes. De hecho, en distintos casos se ha constatado la co-localización de las replicasas en los sitios donde tiene lugar la síntesis del vRNA. En el género *Tombusvirus*, las proteínas p36 y p95 del CIRV co-



**Fig. 16:** Dominios funcionales descritos en las replicasas del virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV). La secuencia común a la proteína auxiliar de la replicación (p33) y la RdRp (p92) contiene: dos dominios transmembrana (TMD) y una región hidrofóbica intermedia (cajas amarillas unidas por un lazo), dominios implicados en las interacciones p33:p33/p92 (cajas rojas, S1/S2) y el dominio "RPR" de unión a RNA (cajas violetas). La porción C-t de p92 contiene los motivos característicos de las RdRp (cajas verdes) y regiones adicionales de unión a RNA (cajas violetas) [adaptado de Stork *et al.*, 2011].

localizan en mitocondrias [Weber-Lotfi *et al.*, 2002; Pantaleo *et al.*, 2004] y sus homólogas, las proteínas p33 y p92 del CymRSV [Lupo *et al.*, 1994], del TBSV [McCartney *et al.*, 2005] y del CNV [Panavas *et al.*, 2005a], lo hacen en peroxisomas. Igualmente, en el género *Dianthovirus* se ha observado que ambas replicasas del RCNMV, p27 y p88, co-localizan en el RE [Turner *et al.*, 2004]. Es previsible, además, que ambos tipos de proteínas interactúen directamente durante el ciclo replicativo, una interacción que ha sido corroborada para al menos tres componentes de la familia *Tombusviridae*, el TBSV (Fig. 16), el CNV y el RCNMV, con la ayuda de diversos ensayos que han mostrado asociaciones de la proteína auxiliar consigo misma y también con la RdRp [Rajendran & Nagy, 2004; Panavas *et al.*, 2005a; Mine *et al.*, 2010a].

### 5.2.2. Propiedades de unión a RNA

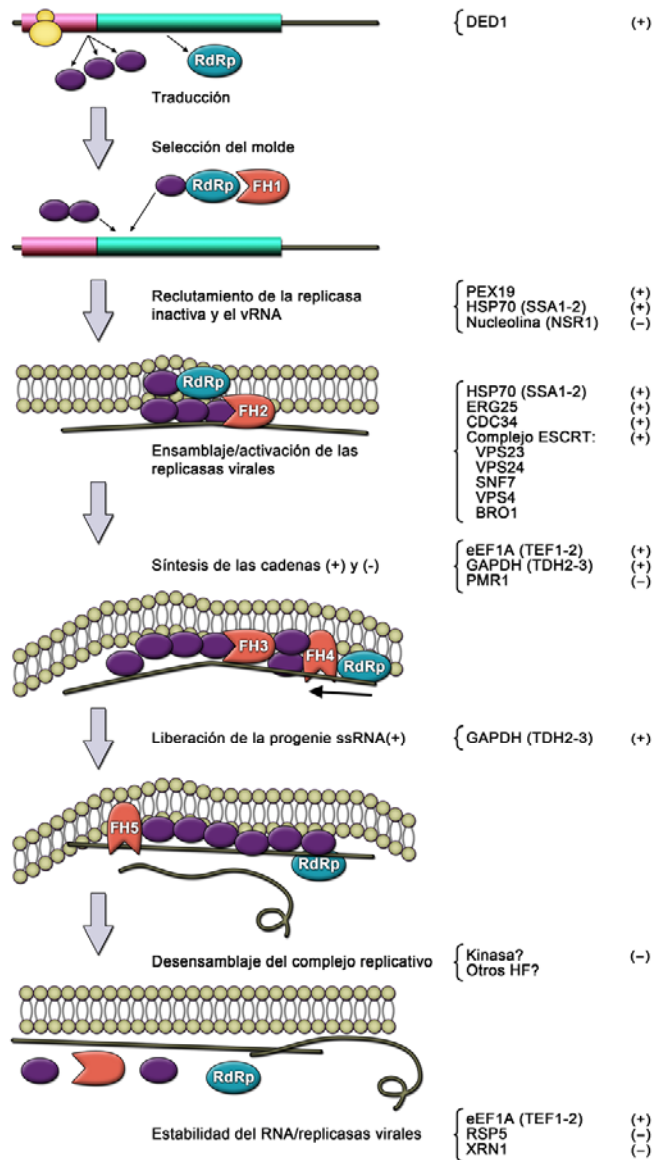
Como ocurre en otros virus de ssRNA(+), y como es de esperar teniendo en cuenta su función, se ha constatado que las RdRp de varias especies de la familia *Tombusviridae* son capaces de reconocer y unirse al RNA del patógeno para catalizar la síntesis de cadenas complementarias [O'Reilly & Kao, 1998; Nagy & Pogany, 2000; Rajendran *et al.*, 2002; Panavas *et al.*, 2002a, 2002b; Rajendran & Nagy, 2003; Panavas & Nagy, 2003a]. Esta capacidad de unir RNA se ha puesto de manifiesto también en los últimos años para el producto de la ORF 1 (p33) de un tombusvirus, concretamente el TBSV. Esta proteína une, siguiendo una cinética cooperativa, distintos tipos de ácidos nucleicos *in vitro*, con marcada preferencia por ssRNAs y, especialmente, por aquellos derivados del virus [Rajendran & Nagy, 2003]. Un segmento del genoma viral situado en la región codificante de la RdRp es reconocido de forma particularmente eficiente y se ha propuesto que este reconocimiento específico permitiría la selección y el

reclutamiento del molde hacia los complejos replicativos [Pogany *et al.*, 2005, Monkewich *et al.*, 2005]. El principal reponsable de las propiedades de unión a RNA de la proteína p33 es un motivo rico en residuos de Arg y Pro (RPRRRP), situado en la porción central de la molécula (motivo “RPR”, **Fig. 16**). Este motivo está conservado en las proteínas homólogas de la mayoría de los tombusvirus y de algunos carmovirus y, para al menos una de ellas, la del CNV, se ha confirmado también su papel crítico en la unión a ácidos nucleicos. Además, en este último virus se ha podido correlacionar la capacidad de la proteína de unir RNA *in vitro* con la replicación viral *in vivo* [Panaviene *et al.*, 2003].

El motivo “RPR” es compartido por las correspondientes RdRp (dado que contienen la secuencia del producto de la ORF 1 en su porción N-t) y se ha comprobado que contribuye de forma sustancial a las propiedades de unión a RNA de estas proteínas en el TBSV y el CNV [Rajendran & Nagy, 2003; Panaviene *et al.*, 2003]. Estas proteínas, no obstante, contienen regiones adicionales de unión a RNA situadas en la porción RT (**Fig. 16**) que podrían intervenir en el plegamiento de la proteína y en la generación de un “surco” de unión a RNA, como ocurre con otras RdRp virales [Rajendran & Nagy, 2003].

### 5.2.3. Factores celulares que intervienen en la replicación

En la familia *Tombusviridae*, el TBSV constituye con amplia diferencia la especie para la cual se ha abordado mejor el estudio de los factores del huésped que intervienen en la replicación gracias, en gran parte, a la puesta a punto de un sistema de replicación del virus en levadura, tal como se ha indicado en el Apartado 2.3.2. Este sistema, unido a la utilización de diversas aproximaciones genéticas y bioquímicas, y más recientemente de rastreos genómicos a gran escala y de otras estrategias globales basadas en *microarrays* de proteínas, están permitiendo identificar numerosas proteínas celulares que interaccionan con las replicasas del TBSV y/o con el vRNA, y que en última instancia intervienen en la replicación, estimulando o reprimiendo este proceso. Hasta el momento, el empleo combinado de los distintos abordajes ha permitido la identificación de unas 250 proteínas celulares que afectan la replicación del virus y que pertenecen a categorías funcionales muy diversas, lo que pone de manifiesto las complejas interacciones que se establecen entre el patógeno y la célula huésped [revisado en Nagy & Pogany, 2010]. Algunos de los factores mejor estudiados se recogen en la **Fig. 17**, donde también se indica la etapa del ciclo replicativo en la que pueden estar involucrados.



**Fig. 17:** Participación en distintas etapas de la replicación del TBSV de algunos de los factores del huésped (FH1-FH5), que actúan estimulando (+) o reprimiendo (-) el proceso. Los nombres entre paréntesis corresponden a genes ortólogos en levadura. DED1, factor con actividad helicasa; PEX19, receptor peroxisomal; HSP70, proteína de choque térmico; NSR1, proteína nucleolina; ERG25, enzima que participa en la síntesis de esteroides; CDC34, enzima que interviene en la unión de la ubiquitina a otras proteínas; VPS23/24, SNF7, VPS4 y BRO 1, diversas proteínas del complejo de transporte y distribución endosomal (ECRT); eEF1, factor de elongación de la traducción; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; PMR1, factor que controla el flujo de iones  $Ca^{+2}$  y  $Mn^{+2}$  desde el citosol a Golgi; RSP5, factor que interviene en la ubiquitinización; XRN1, ribonucleasa 5'→3' [adaptado de Nagy & Pogany, 2011].

### 5.3. PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL MOVIMIENTO EN LA FAMILIA *TOMBUSVIRIDAE*

Como se ha indicado anteriormente, las MP de la familia *Tombusviridae* pueden dividirse en tres grupos de acuerdo a su origen filogenético. En el primero de ellos, los estudios se han centrado en las MP organizadas como DGB y codificadas por las ORF 3 (DGBp1) y ORF 4 (DGBp2) de varias especies del género *Carmovirus*. El requerimiento de estas proteínas para el movimiento se ha demostrado para los productos p8 (DGBp1) y p9 (DGBp2) del TCV [Hacker *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 2000a] y para sus homólogos, las proteínas p7A (DGBp1) y p7B (DGBp2) del MNSV [Genovés *et al.*, 2006]. También se ha confirmado la implicación en el movimiento de las proteínas codificadas por la ORF 3 (p6K) y ORF 4 (p8K) de una especie del género *Necrovirus*, el virus 1 latente del olivo (*Olive latent virus 1*, OLV-1) [Pantaleo *et al.*, 1999], de sus homólogas p6.6 (ORF 3) y p8 (ORF 4) de un miembro del género *Panicovirus*, el PMV [Turina *et al.*, 2000], y de las proteínas p7 (ORF 3) y p9.7 (ORF 4) del PLPV, componente del nuevo género propuesto *Pelarspovirus* [Castaño *et al.*, 2009]. Como parte del segundo grupo de MP, se ha corroborado la participación en el movimiento de los productos de la ORF 4 (p22) y ORF 5 (p19) de varias especies del género *Tombusvirus*, entre ellas el CNV, el CymRSV y el TBSV [Rochon *et al.*, 1991; Dalmay *et al.*, 1993; Scholthof *et al.*, 1995a]. Cabe mencionar que en estos virus la implicación de la proteína p19 en el transporte posiblemente esté relacionada con su función como supresor del silenciamiento, lo que le convierte también en un determinante de patogenicidad [Voinnet *et al.* 1999; Qiu *et al.*, 2002; Qu & Morris, 2002; Scholthof, 2006]. Los datos existentes sugieren funciones similares para las proteínas equivalentes (p27 y p14) de un miembro del género *Aureusvirus*, el virus latente del Pothos (*Pothos latent virus*, PoLV) [Rubino & Russo, 1997; Mérai *et al.*, 2005]. Finalmente, como parte del tercer grupo de MP, se ha descrito que el único producto implicado en el movimiento viral de un dianthovirus, el RCNMV, corresponde a la proteína p35K, codificada por la ORF 4, que comparte similitudes estructurales y funcionales con las MP de la Superfamilia “30K”, de la cual forma parte [Osman *et al.*, 1991].

Entre las MP mejor caracterizadas desde un punto de vista estructural y funcional en la familia *Tombusviridae*, se encuentran algunas proteínas del DGB de especies del género *Carmovirus*. En el caso de las DGBp1, análisis comparativos de secuencia han definido la existencia de tres dominios estructurales: (1) uno N-t apenas estructurado, que se encuentra muy poco conservado entre proteínas homólogas, (2) otro C-t, plegado a modo de lámina- $\beta$  y altamente conservado en proteínas equivalentes y (3) una región central  $\alpha$ -helicoidal [Marcos *et al.*, 1999; Akgoz *et al.*, 2001; Vilar *et al.*, 2001, 2005; Navarro *et al.*, 2006]. En lo que respecta a las DGBp2, uno de los aspectos más destacables de su estructura es la presencia de una o dos regiones con un alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos que pueden comportarse como dominios TM; además, en



todos los casos se predicen plegamientos en forma de lámina- $\beta$  en el extremo C-t [Vilar *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2006]. A continuación se describirán algunas características funcionales de estas proteínas y, más brevemente, de otras de la familia, prestando especial atención a las propiedades de unión a RNA y a la localización subcelular de las mismas.

### 5.3.1. Localización subcelular

Distintos trabajos han abordado el estudio de la localización subcelular de las proteínas del DGB de distintas especies del género *Carmovirus*. Estudios iniciales con las proteínas p8 (DGBp1) y p9 (DGBp2) del TCV fusionadas a la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) mostraron una localización nuclear para la primera y citoplasmática para la segunda, en protoplastos y plantas de *A. thaliana* [Cohen *et al.*, 2000b]. El significado biológico de la localización nuclear de la proteína p8, que está mediado por dos motivos que no están presentes en proteínas homólogas, estaría por determinar, pero no parece ser estrictamente requerida para el movimiento célula a célula del virus [Cohen *et al.*, 2000b]. Trabajos posteriores llevados a cabo con las proteínas de la especie tipo del género, el virus del moteado del clavel (*Carnation mottle virus*, CarMV), mostraron resultados algo distintos. Mediante fraccionamientos subcelulares, la proteína p7 (DGBp1) del CarMV se detectó principalmente en el citosol de células infectadas, aunque en estadios tardíos de la infección se observó que se acumulaba progresivamente en la fracción correspondiente a la pared celular [García-Castillo *et al.*, 2003]. En lo que respecta a la proteína p9 (DGBp2) de este virus, experimentos *in vitro* mostraron su capacidad de unirse a membranas microsomales derivadas del RE [Vilar *et al.*, 2002]. Estos resultados eran consistentes con la presencia de dos regiones hidrofóbicas en la proteína que podían comportarse como dominios TM [Vilar *et al.*, 2002; Sauri *et al.*, 2005; Martínez-Gil *et al.*, 2010]. Resultados similares se han obtenido más recientemente con las proteínas de movimiento del MNSV. La proteína p7A (DGBp1) de este virus fusionada a GFP se ha observado *in vivo* en estructuras punteadas de la periferia celular, que probablemente corresponden a PD. Además, se ha propuesto que auto-interacciones p7A:p7A contribuyen a la formación de cuerpos de inclusión, que también han podido ser observados moviéndose en estrecha asociación con los MF de actina [Genovés *et al.*, 2009]. En lo que respecta a p7B (DGBp2), que presenta un posible dominio TM, ensayos *in vitro* ya mostraron que era capaz de unirse a membranas del RE [Martínez-Gil *et al.*, 2007], una asociación corroborada *in vivo* mediante fusiones con la GFP. Esta aproximación también ha puesto de manifiesto que a tiempos más tardíos la proteína se localiza en el aparato de Golgi y en PD [Genovés *et al.*, 2010]. Los ensayos utilizando drogas específicas e inhibidores de proteínas organelares han permitido proponer que la proteína utiliza vías dependientes de actina y de vesículas COP-II para acceder a los PD, poniendo de

manifiesto el papel de la ruta secretora del aparato de Golgi en el movimiento intracelular e intercelular del virus [Genovés *et al.*, 2010]. Por último señalar que, pese a que los datos iniciales sugerían que la proteína p9 del TCV se encontraba libre en el citosol [Cohen *et al.*, 2000b], resultados recientes indican que, como otras proteínas relacionadas, es capaz de unirse a membranas del RE [Martínez-Gil *et al.*, 2009].

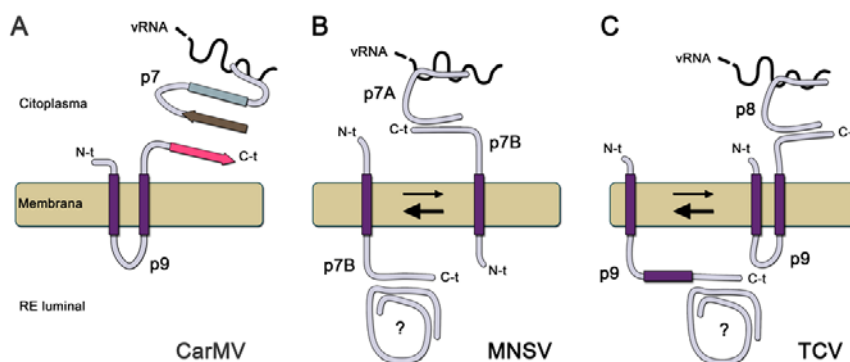
Los estudios acerca de la localización subcelular de las MP de otros miembros de la familia *Tombusviridae* son más escasos y, en cualquier caso, abundan en la localización de muchas de estas proteínas en estructuras membranosas o en fracciones enriquecidas en pared celular [Osman & Buck, 1991; Desvoyes *et al.*, 2002; Castellano *et al.*, 2005].

### 5.3.2. Propiedades de unión a RNA

Estudios iniciales con la proteína p8 del TCV mostraron que era capaz de unir ssRNAs [Wobbe *et al.*, 1998]. Propiedades similares de unión a ssRNAs, y en menor medida a otros ácidos nucleicos, fueron descritas posteriormente para la proteínas p7 del CarMV y p7A del MNSV [Marcos *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2006]. En los dos últimos casos se ha identificado la región responsable de esta característica, que corresponde al dominio central rico en aminoácidos básicos y que adopta un plegamiento en hélice- $\alpha$ , aunque en la proteína p7A del MNSV no se descarta la implicación de motivos adicionales situados fuera de este dominio [Vilar *et al.*, 2001, 2005; Navarro *et al.*, 2006]. Los datos obtenidos sugieren que los residuos cargados positivamente participan en la interacción directa con el ácido nucleico y que otros hidrofóbicos funcionan estabilizando los complejos RNA-proteína. Las constantes de disociación (Kd) estimadas para los complejos p7(CarMV)-ssRNA y p7A(MNSV)-ssRNA se aproximan a las de otras MPs y están dentro del orden  $\mu\text{M}$  [Marcos *et al.*, 1999; Vilar *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2006].

El hallazgo de propiedades de unión a ácidos nucleicos en algunas DGBp1 y de interacción con membranas en las DGBp2, llevó a proponer un modelo de reparto de funciones entre estas proteínas durante el movimiento viral. Según dicho modelo, la proteína DGBp2 se uniría a las membranas del RE a través de los dominios TM, dejando la región C-t, plegada como lámina- $\beta$ , expuesta al citosol. Por su parte, el producto soluble DGBp1 se asociaría con el vRNA, induciéndose en él un cambio conformación que permitiría descubrir su extremo C-t y favorecería la interacción con DGBp2 a través de la lámina- $\beta$  de esta última. Tras estas interacciones todo el complejo asociado al RE podría ser transportado a través del sistema de endomembranas y dirigirse hacia los PD [Vilar *et al.*, 2002; García-Castillo *et al.*, 2003]. A pesar de que este modelo se planteó para las proteínas del CarMV y, por sus semejanzas, podría ser extensible a las de otros carmovirus como el MNSV (p7A/p7B) y el TCV (p8/p9)

[Martínez-Gil *et al.*, 2007, 2010], cabe señalar que hasta el momento no se ha podido demostrar la existencia de interacción entre los productos del DGB ni *in vivo* ni *in vitro*. Además, los datos de topología de inserción obtenidos *in vitro* para algunas de las DGBp2 del género (p9-TCV y p7B-MNSV) no siempre son consistentes con la existencia de interacciones DGBp1:DGBp2 en la cara citosólica del RE. En este sentido, y para intentar armonizar ambas cuestiones, se han planteado algunas hipótesis que sugieren que ciertas DGBp2 podrían insertarse en las membranas del RE de forma dinámica o a través de distintas topologías [Martínez-Gil, 2009; Martínez-Gil *et al.*, 2010] (**Fig. 18**).



**Fig. 18:** Modelo topológico de inserción en membrana propuesto para DGBp2 y su interacción con DGBp1 en distintos carmovirus. **(A)** La DGBp2 (p9) del virus del moteado del clavel (CarMV) es una proteína integral de membrana con dos dominios hidrofóbicos (en violeta) que median la unión a RE dejando los extremos N-t y C-t orientados al citoplasma. A través de este último, p9 interacciona con su contraparte soluble, DGBp1 (p7), encargada de unir el vRNA [adaptado de Vilar *et al.*, 2002]. **(B)** y **(C)** Para las DGBp2 del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) (p7B) [Martínez-Gil *et al.*, 2007] y del virus del arrugamiento del nabo (TCV) (p9) [Martínez-Gil *et al.*, 2010] se han determinado topologías de inserción en las cuales el extremo C-t queda orientado hacia la cara luminal del RE, donde podría establecer interacciones con factores del huésped (?), cuando se llevan a cabo funciones como el aumento del SEL o la interacción con el citoesqueleto. Sin embargo, tampoco se descarta que estas moléculas puedan adoptar otra orientación que le permitiría interactuar en el citosol a través de su extremo C-t con las proteínas solubles DGBp1 (p7A/p8) que poseen a su vez propiedades de unión a RNA [Martínez-Gil, 2009].

La capacidad de unión a ácidos nucleicos se ha demostrado también para otras MP de la familia *Tombusviridae* incluyendo las proteínas p35K del RCNMV (género *Dianthovirus*), p22 del TBSV (género *Tombusvirus*) y p7A del virus de la necrosis del tabaco (*Tobacco necrosis virus*, TNV) (género *Necrovirus*). En todos los casos analizados, las MP se unen al RNA sin especificidad de secuencia, formando complejos que permanecen estables frente a concentraciones salinas moderadamente altas y siguiendo, por regla general, una cinética de unión de cooperatividad positiva [Osman *et*

*al.*, 1992, 1993; Giesman-Coomeyer & Lommel, 1993; Offei *et al.*, 1995; Wobbe *et al.*, 1998; Marcos *et al.*, 1999; Akgöz *et al.*, 2001; Desvoyes *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2006].

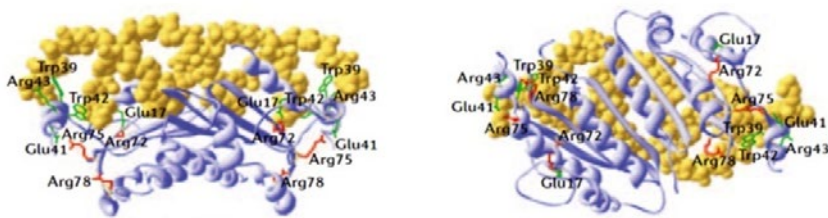
Por último, cabe mencionar que se han descrito un par de proteínas celulares que parecen interactuar con MP de la familia *Tombusviridae*. Una de ellas corresponde a un polipéptido con dos posibles hélices TM y varios sitios potenciales de fosforilación, y fue identificada mediante un sistema de doble híbrido utilizando la proteína p8 (DGBp1) del TCV como “cebo” para rastrear una biblioteca de cDNA de *A. thaliana* [Lin & Heaton, 2001]. En un ensayo similar se identificó una proteína de *Nicotiana tabacum* con un homeodominio de cremallera de leucina (*leucine zipper*, LZ) capaz de interactuar con la proteína p22 del TBSV, una interacción relevante para la función de esta MP [Desvoyes *et al.*, 2002].

#### 5.4. SUPRESORES DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO EN LA FAMILIA *TOMBUSVIRIDAE*

A pesar de la proximidad filogenética de los distintos miembros de la familia *Tombusviridae* y de la relativa conservación de secuencias entre proteínas implicadas en replicación o encapsidación, tanto la identidad de los productos génicos con función supresora como sus mecanismos de acción difieren sustancialmente de un género a otro.

Uno de los supresores mejor caracterizados dentro de la familia, y entre los virus de plantas en general, corresponde a la proteína p19 de tombusvirus [Silhavy & Burgyán, 2004; Zamore, 2004; Scholthof, 2006]. Este producto constituye un determinante de patogenicidad y además participa junto a la CP en el movimiento sistémico viral, funciones que parecen estar asociadas a su actividad supresora [Voinnet *et al.*, 1999; Silhavy *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2002; Qu & Morris, 2002; Havelda *et al.*, 2003]. La inhibición del silenciamiento mediada por p19 tiene lugar a través de la captura de vsRNAs, una función que ha podido ser correlacionada con la disminución en la degradación del vRNA y con la menor acumulación de siRNAs libres durante las infecciones [Lakatos *et al.*, 2004; Yamamura & Scholthof, 2005; Omarov *et al.*, 2006]. Las interacciones p19:siRNA han sido extensamente estudiadas y la estructura del complejo de unión que forman ambas moléculas ha podido ser determinada en varios tombusvirus [Vargason *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003; Baulcombe & Molnár, 2004]. Durante dicha interacción, p19 forma dímeros solubles que unen siRNAs con poca especificidad de secuencia y alta selectividad de tamaño, sin tener en cuenta si el sustrato se encuentran metilado o no [Lózsza *et al.*, 2008]. Aunque en principio este supresor se une preferentemente a siRNAs, la existencia de cierta afinidad hacia miRNAs no permite excluir interacciones con miRNAs endógenos [Cheng *et al.*, 2008]. Las uniones tienen lugar a través de interacciones electrostáticas entre residuos cargados del surco que forma el dímero y el esqueleto azúcar-fosfato del dúplex RNA [Vargason

*et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003; Baulcombe & Molnár, 2004; Xia *et al.*, 2009; Hsieh *et al.*, 2009] (**Fig. 19**). Para la p19 del CIRV se ha determinado que la afinidad de unión está en el rango nM, siendo óptima a pH entre 6.2 y 7.6 [Vargason *et al.*, 2003]. Desde el punto de vista de la cinética de unión, se ha constatado que el complejo p19:siRNA posee tres constantes de disociación diferentes cuyos valores coinciden con los pH a los cuales se ionizan uno o más residuos de His, Cys y Lys [Koukiekolo *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2007]. También se ha determinado que ciertos residuos de Cys son importantes para preservar la integridad estructural de p19, su termoestabilidad y regular su unión al dúplex de RNA [Cheng *et al.*, 2009b]. Recientemente se ha demostrado que durante las infecciones por tombusvirus, en paralelo a la inducción de AGO1 como parte de la reacción defensiva del huésped, tiene lugar un aumento en la acumulación de un regulador negativo, miR168, que controla los niveles del mRNA de AGO. A partir de esta observación, se ha propuesto que p19 podría modular los niveles endógenos de la proteína efectora AGO a través de dicho regulador [Várallyay *et al.*, 2010].



**Fig. 19:** Interacción entre el supresor del PTGS p19 y siRNAs. Dos unidades monoméricas de p19 (en violeta) se unen a un dúplex de siRNA helicoidal de 21 nt (doble hélice amarilla). Se muestran las posiciones de los aminoácidos importantes durante la interacción p19:RNA, así como los grupos laterales de los residuos centrales (en rojo) y periféricos (en verde) [adaptado de Scholthof, 2006].

Para varias especies del género *Carmovirus* se ha comprobado que el producto codificado por la ORF 3'-proximal, además de intervenir en la encapsidación, funciona como supresor del silenciamiento. La proteína p38 del TCV ha sido la más ampliamente estudiada y se ha visto que suprime el PTGS inducido localmente por RNA sentido, RNA antisentido y dsRNA, a la vez que previene el silenciamiento sistémico [Qu *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2004]. Este supresor es capaz de interactuar con ácidos nucleicos y con diversos componentes proteicos de la ruta del silenciamiento [Lakatos *et al.*, 2006; Mérai *et al.*, 2006]. Por un lado, p38 puede unirse a dsRNA largos y cortos, y también inhibir el funcionamiento de DCL4 interactuando con su factor asociado, DRB4 [Deleris *et al.*, 2006]. Por otro lado, interfiere en el ensamblaje de RISC al interactuar con AGO1 a través de los motivos GW/GW que contiene en su secuencia [Azevedo *et al.*, 2010], o al impedir la metilación de los siRNAs antes de que

la hebra guía se cargue sobre el complejo [Vogler *et al.*, 2007]. Recientemente se ha propuesto que p38 podría además inducir la producción de supresores endógenos de la ruta del PTGS [Endres *et al.*, 2010]. Asimismo, se ha descrito función supresora del silenciamiento para la proteína p38 del virus de las manchas cloróticas en anillo del Hibisco (*Hibiscus chlorotic ringspot virus*, HCRSV). En este caso se ha sugerido que la CP bloquea algún paso previo a la generación de los dsRNAs, aunque su mecanismo de acción específico está por determinar [Meng *et al.*, 2006, 2008]. Es interesante mencionar que pasajes seriados del HCRSV en un huésped de lesión local, *Chenopodium quinoa*, dan lugar a la acumulación de una serie de mutaciones en distintas partes de la proteína p38 que reducen drásticamente su actividad supresora, una disminución que conduce a la pérdida de virulencia del patógeno en su huésped natural, el hibisco [Liang *et al.*, 2002a; Meng *et al.*, 2006]. Por último, la proteína p42 del MNSV también tiene una función dual como CP y como supresor del silenciamiento, aunque este virus parece producir un inhibidor del silenciamiento adicional, la proteína de movimiento, p7B [Genovés *et al.*, 2006]. Tanto la proteína p42 como p7B exhiben una actividad supresora relativamente débil en ensayos de expresión transitoria y se desconocen por el momento las bases moleculares de esta actividad.

También existen datos sobre supresión del silenciamiento en el género *Dianthovirus*. Los trabajos se han llevado a cabo fundamentalmente con el RCNMV, para el que se ha propuesto que la supresión por RNA no está mediada por ningún componente proteico, sino que se trata de un proceso asociado a la propia replicación viral [Takeda *et al.*, 2005]. Un estudio posterior ha mostrado una estrecha correlación entre la interacción que se establece entre las dos replicasas virales (p27:p88) durante la formación del complejo replicativo y la supresión del silenciamiento, lo que sería consistente con la propuesta inicial [Mine *et al.*, 2010a]. Aunque el mecanismo que relaciona la supresión con la replicación no está claro, se ha planteado que podría estar basado en el reclutamiento de la proteína DCL1 y/o de alguno de sus homólogos, que podrían ser empleados como helicasas de RNA durante el proceso de síntesis viral, dejando así de estar disponibles para la ruta del silenciamiento por RNA [Takeda *et al.*, 2005]. Cabe mencionar que resultados paralelos, obtenidos utilizando un ensayo diferente al basado en la expresión transitoria de un gen delator, han permitido identificar a la proteína de movimiento del virus como un supresor secundario que funciona independientemente al mecanismo que involucra a la replicación viral [Powers *et al.*, 2008a].

La información disponible acerca de proteínas supresoras del silenciamiento en otros géneros de la familia *Tombusviridae* es bastante escasa o inexistente. Tan sólo en el caso del género *Aureusvirus*, en particular en el PoLV, se ha descrito actividad supresora para el producto de la ORF 5, la proteína p14, que es capaz de unirse a dsRNAs de diferentes tamaños [Mérari *et al.*, 2005].

### 5.5. GÉNERO *CARMOVIRUS*

El ICTV reconoció en 1991 el género *Carmovirus* como grupo taxonómico [Morris, 1991]. Actualmente, dentro de este género se encuentran adscritas 16 especies definitivas y 11 especies provisionales [Rochon *et al.*, 2011] (**Tabla 3**).

**Tabla 3:** Especies definitivas y provisionales asignadas al género *Carmovirus*

<i>Especies definitivas</i>	<i>Acrónimos</i>	<i>Referencias</i>
<b>Secuenciadas</b>		
Virus de la rotura del color de la flor de la <i>Angelonia</i>	(AFBV)	Adkins <i>et al.</i> , 2006
Virus del salpicado clorótico del cardamomo	(CCFV)	Skotnicki <i>et al.</i> , 1993
Virus del moteado del clavel	(CarMV)	Guilley <i>et al.</i> , 1985
Virus del moteado del chícharo	(CPMoV)	You <i>et al.</i> , 1995
Virus del mosaico de la <i>Galinsoga</i>	(GaMV)	Ciuffreda <i>et al.</i> , 1998
Virus de las manchas cloróticas en anillo del Hibisco	(HCRSV)	Huang <i>et al.</i> , 2000
Virus de los anillos necróticos del iris japonés	(JINRV)	Takemoto <i>et al.</i> , 2000
Virus de las manchas necróticas del melón	(MNSV)	Riviere & Rochon, 1990
Virus de la necrosis del tallo del guisante	(PSNV)	Suzuki <i>et al.</i> , 2002
Virus de la rotura del color de la flor del <i>Pelargonium</i>	(PFBV)	Rico & Hernández, 2004
Virus del cactus Saguaro	(SgCV)	Weng & Xiong, 1997
Virus del arrugamiento del nabo	(TCV)	Carrington <i>et al.</i> , 1989
<b>No secuenciadas</b>		
Virus del ajo transmitido por el agua	(AWBV)	
Virus del mosaico suave de la judía	(BMMV)	
Virus del pepino transmitido por el suelo	(CSBV)	
Virus de las malas hierbas transmitido por el agua	(WWBV)	
<b>Especies provisionales</b>		
<b>Secuenciadas</b>		
Virus del moteado de la <i>Calibrachoa</i>	(CMoV)	Gulati-Sakhuja & Liu, 2010
Virus del aclaramiento de las venas del lupino Nootka	(NLVCV)	Robertson <i>et al.</i> , 2007
Virus del patrón en anillos cloróticos del <i>Pelargonium</i>	(PCRPV)	Kinard & Jordan, 2002
Virus del moteado amarillo en mosaico de la soja	(SYMMV)	Nam <i>et al.</i> , 2009
<b>No secuenciadas</b>		
Virus del moteado del <i>Blackgram</i>	(BMoV)	
Virus latente de la baya del saúco	(EILDV)	
Virus del moteado de la glicina	(GMoV)	
Virus de la necrosis apical del narciso	(NTNV)	
Virus del plantain 6	(PIV-6)	
Virus de la necrosis de la calabaza	(SqNV)	
Virus asintomático de la tefrosia	(TeSV)	

Para los miembros individuales del género, la gama de huéspedes naturales es relativamente reducida y en todos los casos está restringida a especies dicotiledóneas. Los carmovirus son responsables de importantes pérdidas económicas en plantas de interés agrícola y ornamental, especialmente en regiones templadas, donde se han descrito casi todos los patógenos de la familia [Russo *et al.*, 1994]. Como se ha comentado anteriormente, en general estas especies no requieren un vector para transmitirse; sin embargo, en tres de ellas, el virus del pepino transmitido por el suelo (*Cucumber soil-borne virus*, CSBV), el virus de la necrosis de la calabaza (*Squash necrosis virus*, SqNV) y el MNSV, se ha constatado la propagación a través del hongo *Olpidium bornovanus* [Martelli, 1994; Rochon *et al.*, 2011]. Otros como el virus del moteado del chícharo (*Cowpea mottle virus*, CPMoV), el del mosaico suave de la judía (*Bean mild mosaic virus*, BMMV), el del moteado del *Blackgram* (*Blackgram mottle virus*, BMoV) y el TCV pueden transmitirse a través de escarabajos [van Regenmortel & Mahy, 2004].

Todos los carmovirus encapsidan un genoma de RNA de simple cadena y polaridad positiva de entre 3,879 y 4,450 nucleótidos. Hasta el momento se conoce con bastante detalle la estructura de los viriones formados por 5 miembros del género: el CarMV [Morgunova *et al.*, 1994], el CPMoV [Ke *et al.*, 2004], el HCRSV [Lee *et al.*, 2003; Doan *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2009a], el MNSV [Wada *et al.*, 2008] y el TCV [Hogle *et al.*, 1986]. Estos estudios han permitido conocer mejor la interrelación entre las distintas subunidades de la CP e inferir la forma en la que tiene lugar el ensamblaje de las partículas [Ke *et al.*, 2004].

### 5.5.1. Organización genómica

Actualmente se conoce la secuencia nucleotídica completa de 12 de las 16 especies definitivas y de 4 de las 11 especies provisionales del género *Carmovirus* (Tabla 3). Asimismo, se ha completado la secuencia de una especie propuesta como nueva dentro del género, el virus de las manchas anulares de la madreSelva (*Honeysuckle ringspot virus*, HnRSV) [Gulati-Sakhuja *et al.*, 2011].

En todos los carmovirus se han descrito como mínimo cinco ORF dispuestas de forma compacta, flanqueadas por UTR que no muestran homologías destacables de secuencia entre especies y cuya longitud varía entre 34-88 nt y 200-300 nt en los extremos 5' y 3', respectivamente.

Las ORF 1 y 2, situadas en posición 5' proximal, codifican dos proteínas implicadas en la replicación, que se traducen directamente a partir del gRNA. La ORF 1 codifica un producto de 26-28 kDa, cuya lectura a través permite la traducción de la ORF 2, dando lugar a una RdRp de entre 86 y 89 kDa [Hacker *et al.*, 1992; White *et al.*, 1995; Wang & Wong, 2004]. Todos los carmovirus secuenciados poseen dos pequeñas



ORF centrales (ORF 3 y 4), normalmente solapadas, que codifican una pareja de proteínas que, al menos en algunas especies virales, se ha confirmado que se complementan en *trans* durante el movimiento viral y cuyos tamaños oscilan entre 7 y 8 kDa, en el caso del péptido más pequeño, y de 8 a 12 kDa, en el de mayor tamaño. La ORF 5, cercana al extremo 3', codifica la CP, cuyo tamaño fluctúa entre 37 y 42 kDa. Esta proteína además de su papel estructural para la formación de viriones puede estar implicada en la modulación de la sintomatología, en la acumulación viral [Kong *et al.*, 1997; Wang & Simon, 2000], en la invasión local y/o sistémica del virus [Hacker *et al.*, 1992; Cohen *et al.*, 2000a] o en la supresión del PTGS [Qu *et al.*, 2003].

Los carmovirus transcriben dos sgRNAs co-terminales en su extremo 3' con el grNA, que han podido detectarse en varias especies del género, incluyendo el CarMV [Carrington & Morris, 1985], el TCV [Carrington *et al.*, 1989], el MNSV [Riviere & Rochon, 1990], el CPMoV [Kim & Bozarth, 1992], el virus del cactus Saguaro (*Saguaro cactus virus*, SgCV) [Weng & Xiong, 1997] o el HCRSV [Huang *et al.*, 2000]. El mayor de los sgRNAs (sgRNA1) tiene un tamaño aproximado de 1.7 kb, es bicistrónico y está implicado en la traducción de las dos MP desde las ORF centrales, probablemente mediante un proceso de escape al rastreo ribosomal (*leaky-scanning*) [Russo *et al.*, 1994]. El menor de los sgRNAs (sgRNA2) tiene un tamaño aproximado de 1.5 kb y sirve como mRNA para la traducción de la CP, siguiendo un mecanismo convencional de rastreo ribosomal [revisado en Rochon *et al.*, 2011].

A pesar de que la organización genómica de todos los carmovirus es bastante parecida, tanto el número de ORF como los mecanismos de expresión génica empleados por los distintos virus del género pueden variar sutilmente. Por ejemplo, en el HCRSV se predicen varias ORF adicionales: una cerca del extremo 5' del grNA, que codifica una proteína de 23 kDa (p23), y otra, en el extremo 3', que codifica una proteína de 27 kDa (p27), así como dos isoformas de esta última que comparten su extremo C-t y que poseen tamaños de 25 kDa (p25) y 22.5 kDa (p22.5) [Huang *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2002b]. La proteína p23, cuyo gen está incluido dentro de la ORF 1, parece ser indispensable para la replicación del virus en su huésped natural, presumiblemente porque es capaz de interactuar con el complejo replicativo o con factores específicos del huésped, o funcionar como un activador en *cis* o en *trans* para la regulación directa o indirecta de genes implicados en la replicación [Liang *et al.*, 2002b]. Por su parte, las proteínas p27 y p25 se han relacionado, respectivamente, con el aumento en la severidad de los síntomas y con el movimiento sistémico del patógeno [Zhou *et al.*, 2006a]. En otros carmovirus, como el CPMoV, también se ha predicho la existencia de una ORF adicional de función desconocida, situada hacia el extremo 3' proximal y dentro del gen de la CP [You *et al.*, 1995]. Asimismo, un codón de terminación débil situado tras la ORF 2 del CarMV podría permitir la lectura a través dando lugar a una proteína de 98 kDa que ha podido ser detectada en ensayos de traducción *in vitro*,

aunque su relevancia *in vivo* no ha sido demostrada [Harbison *et al.*, 1985]. Otro caso particular es el del MNSV donde, a diferencia del resto de carmovirus, las pequeñas ORF centrales (3 y 4), que codifican las proteínas de movimiento p7A y p7B, no están superpuestas y se conectan a través de un codón ámbar que podría permitir un mecanismo de RT para la traducción de una proteína de 14 kDa [Riviere & Rochon, 1990], aunque la producción de esta proteína no ha podido ser confirmada experimentalmente [Genovés *et al.*, 2006].

# El virus de la rotura del color de la flor del *Pelargonium*

## 6.1. VIROSIS DEL GERANIO. INCIDENCIA

El geranio (*Pelargonium* spp.) es una de las plantas de jardín con mayor importancia económica. Las numerosas formas hortícolas, utilizadas fundamentalmente para ornamentación, son muy apreciadas por su rusticidad, su buena floración o sus cualidades aromáticas. El nivel de aceptación de este cultivo depende fundamentalmente del color de las flores, que tras la forma de las hojas, es la variable que más influye en los compradores a la hora de adquirir las plantas [Behe *et al.*, 1999]. En el conjunto de la Comunidad Europea se producen casi 600 millones de plantas anuales, siendo Alemania y Francia los países consumidores más importantes, con un volumen de ventas de 250 y 200 millones de plantas, respectivamente. La industria floral española produce alrededor de 20 millones de plantas al año, donde el 60 % de las ventas corresponde al geranio común (*Pelargonium x hortorum*), un 35 % al geranio del tipo hiedra (*Pelargonium peltatum*), un 5 % al geranio de pensamiento (*Pelargonium grandiflorum*) y menos de un 1% a distintas especies de geranios de olor [Calvo Vergés, 2001].

Con frecuencia, la producción de geranio se ve afectada por distintos factores entre los que destacan los daños causados por diversos patógenos virales. El número de virus que pueden infectar al geranio de forma natural supera la decena y corresponden a miembros de al menos cinco familias diferentes, entre ellos: un tobamovirus, el TMV (familia *Virgaviridae*), dos miembros de la familia *Bromoviridae*, el CMV (género *Cucumovirus*) y el virus del punteado del geranio zonal (*Pelargonium zonale spot virus*, PZSV; género *Anulavirus*), dos miembros del género *Tospovirus* (familia *Bunyaviridae*), el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) y el virus de las manchas necróticas del *Impatiens* (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV), y dos del género *Nepovirus* (familia *Comoviridae*), el virus de las manchas anulares del tomate (*Tomato ringspot virus*, ToRSV) y el virus de las manchas anulares del tabaco (*Tobacco ringspot virus*, TRSV). Asimismo, son patógenos del geranio tres miembros de la familia *Tombusviridae*, el virus del rizado de la hoja del *Pelargonium* (*Pelargonium leaf curl virus*, PLCV) (género *Tombusvirus*), el PLPV (propuesto para el nuevo género *Pelarspovirus*) y el virus de la rotura del color de la flor del *Pelargonium* (*Pelargonium flower break virus*, PFBV) (género *Carmovirus*) [Stone, 1980; Bouwen & Maat, 1992; Franck & Loebenstein, 1994; Alonso & Borja, 2005]. Aunque estos patógenos normalmente no ocasionan la muerte de la planta, pueden reducir su crecimiento vegetativo y su capacidad de enraizamiento. Además, pueden afectar a sus

cualidades ornamentales, al inducir la aparición de manchas o patrones cloróticos/necróticos en las hojas, estrías y rotura del color en los pétalos y deformaciones en las inflorescencias [Stone, 1980; Nameth & Adkins, 1993; Alonso & Borja, 2005]. La presencia de los virus, además de actuar en detrimento de la calidad ornamental, restringe las posibilidades de exportación del material producido pues las normativas a este respecto son cada vez más estrictas. Todo ello hace que las virosis repercutan de forma muy negativa en la producción y comercialización del geranio y a menudo conduzcan a importantes pérdidas económicas.

## **6.2. EL VIRUS DE LA ROTURA DEL COLOR DE LA FLOR DEL *PELARGONIUM***

### **6.2.1. Propiedades biológicas y modo de transmisión del PFBV**

Entre los virus mencionados anteriormente que afectan al geranio, destaca el PFBV. En los últimos años se ha registrado un aumento progresivo de las infecciones causadas por este patógeno, con un porcentaje de incidencia superior al 80% en regiones de Europa occidental y en algunas áreas de España [Paludan & Begtrup, 1987; Bouwen & Maat, 1992; Franck & Loebenstein, 1994; Blystad *et al.*, 1995; Díez *et al.*, 1999; Alonso & Borja, 2005]. Es probable que el incremento de las infecciones por éste y otros patógenos virales esté propiciado por el empleo de la propagación vegetativa como forma habitual de multiplicación del material vegetal, pero también influye el hecho de que, en muchos casos, los síntomas de las infecciones no son evidentes, lo que aumenta el peligro de dispersión al evadir la inspección ocular.

La sintomatología que induce el PFBV depende en gran medida del aislado viral, de las condiciones ambientales donde se desarrolla la planta y de la especie vegetal y/o cultivar infectado. Las alteraciones más comunes aparecen sobre los pétalos y se manifiestan en forma de estrías blancas o rotura del color. Al variegado floral se añade un aspecto rugoso de los pétalos, cuyos bordes quedan ligeramente dentados. También son comunes síntomas foliares que se manifiestan como manchas cloróticas en el limbo (**Fig. 20**). Asimismo pueden surgir problemas en el desarrollo vegetativo y en la formación de raíces de la planta, aunque también son frecuentes las infecciones asintomáticas [Stone, 1974, 1980; Welvaert & Samyn, 1985; Paludan & Begtrup, 1987; Nameth & Adkins, 1993; Alonso & Borja, 2005].

Aunque la gama de huéspedes naturales del PFBV está restringida por el momento a especies del género *Pelargonium*, los huéspedes experimentales incluyen 16 especies vegetales distribuidas en 7 familias. Para el diagnóstico de este virus suelen emplearse como hospedadores plantas de *Gomphrena globosa*, *Nicotiana megalosiphon* o *Tetragonia tetragonoides*, aunque el más utilizado es el huésped de lesión local *C. quinoa*, donde la infección induce manchas cloróticas definidas que aparecen en las hojas de 6 a 8 días post-inoculación (dpi) [Brunt *et al.*, 1996].



**Fig. 20:** Síntomas inducidos por el virus de la rotura del color de la flor del *Pelargonium* (PFBV) en geranio. **(A)** Estrías blancas en flores. **(B)** y **(C)** Manchas cloróticas en hojas [imágenes tomadas por M. Borja (A), R. Wick (B) y B. Watt (C)].

El PFBV se transmite por propagación vegetativa a través de esquejes procedentes de plantas madre infectadas. Además, al tratarse de un virus muy estable (punto de inactivación térmica de 85 a 90 °C), también se transmite fácilmente por vía mecánica, por ejemplo, por la utilización de herramientas de corte infectadas, e incluso se ha descrito su transmisión a través de sistemas hidropónicos con recirculación de la solución nutritiva [Krczal *et al.*, 1995; Brunt *et al.*, 1996]. El trip californiano *Frankiniella occidentalis* se ha reseñado como vector del PFBV y su introducción reciente en Europa puede haber favorecido la dispersión del virus [Krczal *et al.*, 1995].

### 6.2.2. Organización genómica y regulación de la expresión génica

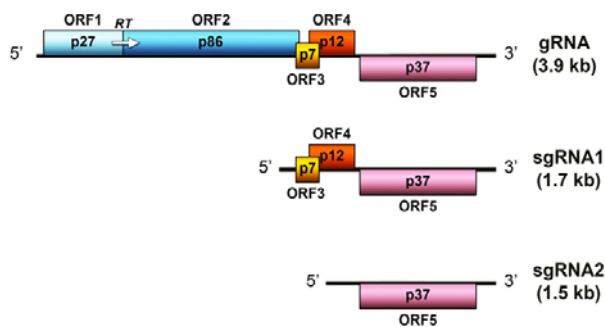
El PFBV posee un genoma monopartido de RNA simple cadena y polaridad positiva de 3,923 nt, que se encapsida en partículas de 30 nm de diámetro con simetría icosaédrica [Stone & Hollings, 1973; Morris & Carrington, 1988; Rico & Hernández, 2004].

La adscripción inicial del virus al género *Carmovirus* fue posible gracias a los primeros datos disponibles de la estructura primaria del gRNA, correspondientes a un pequeño fragmento del gen de la RdRp (408 nt) y a un segmento de 1,500 nt de la región 3' terminal que comprende el gen de la CP [Morris & Carrington, 1988; Morozov *et al.*, 1995; Berthomé *et al.*, 1998]. La determinación de la secuencia completa del virus permitió confirmar esta adscripción y puso de manifiesto que su organización genómica es similar a la del resto de carmovirus, con cinco ORF y UTR de 32 y 236 nt en los extremos 5' y 3', respectivamente [Rico & Hernández, 2004]. La ORF 1, situada en 5', codifica una proteína de 27 kDa (p27) que termina en un codón ámbar cuya lectura a través permite la traducción de la ORF 2, dando lugar a una proteína de 86 kDa (p86). Tanto la p27 como la p86 presentan gran homología con proteínas implicadas en replicación en otros carmovirus y, más aún, la p86 contiene los motivos de secuencia característicos de las RdRp [Koonin, 1991]. En la región central

del genoma se encuentran las ORF 3 y 4, que codifican dos pequeñas proteínas de 7 y 12 kDa (p7 y p12) presumiblemente implicadas en movimiento. Finalmente, la ORF 5 codifica la CP de 37 kDa (p37) (**Fig. 21**).

En plantas infectadas por el PFBV, además del gRNA, se han detectado y caracterizado dos sgRNAs 3' co-terminales con el gRNA, que se acumulan a concentraciones relativamente altas y que presentan tamaños de 1.7 kb y 1.5 kb, respectivamente [Rico & Hernández, 2009] (**Fig. 21**). Experimentos de traducción *in vitro* han confirmado que las proteínas p27 y p86 se producen a partir del gRNA, mientras que las proteínas p7, p12 y p37 lo hacen a partir de los sgRNAs [Fernández-Miragall & Hernández, 2011]. Además de estos RNAs, en tejido infectado por el PFBV se han detectado otras dos especies de vRNAs que son también 3' co-terminales con el gRNA y que poseen tamaños de 3.2 y 2.9 kb. Estos RNAs adicionales se acumulan a muy bajas concentraciones y se ha propuesto que podrían estar implicados en la traducción de la región RT de la RdRp, aunque su relevancia biológica está por determinar [Rico & Hernández, 2009]. Además, cabe destacar que recientemente se ha identificado un IRES en el PFBV que permite la traducción de la proteína p37 directamente desde el gRNA. Dicho IRES es funcional tanto *in vitro* como *in vivo*, y su actividad se ha podido correlacionar con la infectividad del virus [Fernández-Miragall & Hernández, 2011]. Un elemento de este tipo sólo ha sido identificado hasta el momento en otro carmovirus, el HCRSV [Koh *et al.*, 2003].

La obtención de un clon infeccioso del virus, creado tras fusionar un cDNA viral de longitud completa al promotor de la polimerasa del fago T7, ha permitido disponer



**Fig. 21:** Organización genómica del PFBV. Las distintas ORF se representan con cajas coloreadas de acuerdo a la función predicha para las proteínas que codifican. Las ORF 1 y 2 (en azul) codifican proteínas presuntamente implicadas en replicación (p27 y p86), expresadas a partir del gRNA. Las ORF 3 y 4 (en amarillo y naranja) codifican proteínas presuntamente implicadas en movimiento (p7 y p12) que se expresan desde el sgRNA1. La ORF 5 (en rosa) codifica la CP (p37), traducida a partir del sgRNA2 [adaptado de Rico & Hernández, 2004; 2009].

de transcritos de RNA capaces de infectar el huésped *C. quinoa* y el huésped natural *P. zonale*, induciendo infecciones locales y sistémicas, respectivamente [Rico & Hernández, 2006]. Esta herramienta ha posibilitado el estudio de las relaciones estructura-función en el PFBV mediante aproximaciones de genética reversa y a través del análisis de regiones genómicas y/o de productos génicos biológicamente activos. Algunas de estas aproximaciones quedarán reflejadas en el presente trabajo.

### 6.2.3. Proteínas codificadas por el PFBV. Antecedentes

El análisis comparativo de las secuencias de las distintas proteínas del PFBV y de los homólogos correspondientes en el resto de carmovirus ha mostrado que los mayores porcentajes de identidad se obtienen con productos del CarMV y del SgCV. Las proteínas codificadas por las ORF 2, 3 y 4 (p86, p7 y p12) están más relacionadas con las del CarMV, mientras que las proteínas codificadas por las ORF 1 y 5 (p27 y p37) muestran mayor similitud con los productos equivalentes del SgCV [Rico & Hernández, 2004]. Como cabía esperar, los mayores niveles de conservación se detectan en la porción RT de la proteína p86 (Tabla 4).

**Tabla 4:** Porcentajes de identidad de las distintas proteínas del PFBV respecto a las de otros miembros del género *Carmovirus*.

% de identidad de aminoácidos						
VIRUS	p27	p86	RT	p7	p12	p37
CarMV	40.8	57.3	65.6	48.5	38.0	38.6
TCV	28.8	42.3	49.0	34.7	26.1	29.3
MNSV	25.5	41.6	50.0	32.9	18.8	25.2
CCFV	28.0	41.7	48.2	36.8	26.1	30.3
CPMoV	26.1	41.1	48.3	31.0	21.7	26.1
SgCV	46.5	55.2	59.4	45.6	36.1	44.8
GaMV	23.4	36.0	41.7	34.7	19.4	27.9
HCRSV	28.8	43.1	49.7	37.0	23.6	32.5
JINRV	26.5	40.1	47.0	34.2	25.4	31.9

Las semejanzas de la proteína p7 con proteínas equivalentes de otros carmovirus permiten predecir en ella, los tres dominios estructurales previamente descritos en MP homólogas (Apartado 5.3.). En lo que respecta a la proteína p12, su identidad aminoacídica con proteínas relacionadas es relativamente baja pero, al igual que estas últimas, contiene un elevado porcentaje de residuos hidrofóbicos distribuidos en este caso en dos putativas hélices- $\alpha$  TM [Navarro *et al.*, 2006]. El alineamiento de la secuencia de la proteína p12 con otras DGBp2 del género ha puesto de manifiesto varias peculiaridades estructurales en el producto del PFBV. En primer lugar, la proteína p12

exhibe una ganancia de tamaño debida a la presencia de una extensión N-t rica en aminoácidos básicos [Rico & Hernández, 2004]. Hay que señalar a este respecto que, a excepción de la putativa DGBp2 del virus de los anillos necróticos del iris japonés (*Japanese iris necrotic ring virus*, JINRV) que posee un tamaño estimado cercano a 12 kDa [Takemoto *et al.*, 2000], el tamaño del resto de proteínas homólogas de carmovirus oscila entre los 7 y 9 kDa [Rochon *et al.*, 2011]. En segundo lugar, la proteína p12 presenta una repetición heptamérica de leucinas, que se ajustaría a un motivo tipo LZ y que no está presente en ninguna de las proteínas relacionadas [Rico & Hernández, 2004] (Fig. 22). La heterogeneidad natural encontrada entre diferentes aislados del PFBV apoya la posible relevancia funcional de este motivo, pues en esta región de la molécula sólo se han encontrado cambios conservativos y las leucinas en posición heptamérica se encuentran estrictamente conservadas, a pesar de la variabilidad nucleotídica detectada entre aislados en los codones que las codifican [Rico *et al.*, 2006].

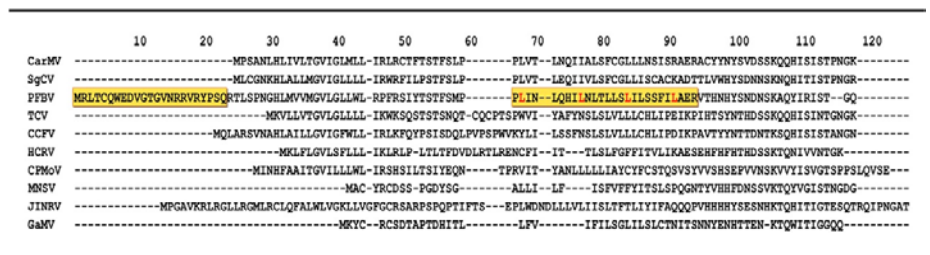


Fig. 22: Alineamientos de secuencias de distintas DGBp2 del género *Carmovirus*. La extensión N-t (enmarcada en amarillo) y una putativa cremallera de leucina (enmarcada en amarillo y con las leucinas en posición heptamérica en rojo) confieren peculiaridades estructurales a la p12 del PFBV, respecto a proteínas equivalentes [adaptado de Rico & Hernández, 2004].

En cuanto a la proteína p37, cabe señalar que en ella se pueden distinguir los tres dominios estructurales (“R”, “S”, “P”) descritos para las CP de otros miembros del género *Carmovirus* y de la familia *Tombusviridae* [Rochon *et al.*, 2011]. Entre los diversos aislados caracterizados del PFBV, el dominio “S” es el más conservado y el “P” el más variable. Una observación interesante respecto a esta proteína concierne a la acumulación de mutaciones en su secuencia aminoacídica tras pases seriados del virus en el huésped experimental *C. quinoa*. Estas mutaciones aparecen *de novo* en las poblaciones de las progenies y afectan fundamentalmente a cinco posiciones (aa39, 49, 248, 271 y 284) de las regiones “R” y “P” de la molécula que covarían de forma reproducible, una covariación que puede ser atribuida a una adaptación específica al nuevo huésped [Rico *et al.*, 2006].



# OBJETIVOS





Como se ha indicado en la Introducción, el PFBV es uno de los virus más frecuentes en geranio, una planta ornamental de gran interés para la industria floral. La determinación de su organización genómica en el laboratorio donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral, y la construcción posterior de un clon infeccioso, permitieron iniciar una serie de estudios encaminados al análisis de relaciones estructura-función en el gRNA y en las proteínas que codifica. En el presente trabajo se ha continuado con dichos estudios, centrando particularmente la atención en proteínas virales con características atípicas o cuya función no está del todo clara dentro del género *Carmovirus*. Con ello se ha pretendido aportar nuevos datos al conocimiento del patógeno y, en general, al del grupo al que pertenece.

Los objetivos concretos han sido los siguientes:

1. Análisis funcional de las proteínas del PFBV presuntamente implicadas en replicación (p27 y p86). Para la consecución de este objetivo, abordado en los Capítulos I y II, se ha planteado: (a) la confirmación del papel de estos productos génicos en la multiplicación del virus, (b) el estudio *in vivo* de su localización subcelular y de los determinantes de dicha localización, y, (c) la evaluación de posibles propiedades de unión a ácidos nucleicos de la proteína de menor tamaño y la delimitación de las regiones responsables.
2. Análisis funcional de las proteínas del PFBV presuntamente implicadas en movimiento (p7 y p12). El desarrollo de este objetivo, recogido en el Capítulo III, ha conllevado, en primer lugar, el examen del requerimiento *in vivo* de los dos pequeños polipéptidos virales para el transporte célula a célula. En segundo lugar, se ha pretendido valorar la relevancia biológica de determinados rasgos estructurales “atípicos” de la proteína p12, como son una extensión N-terminal rica en aminoácidos básicos y un motivo putativo de cremallera de leucina.
3. Identificación y caracterización de una posible actividad supresora del silenciamiento por RNA de las distintas proteínas codificadas por el virus, tal como queda expuesto en el Capítulo IV.



# CAPÍTULO I







## Analysis of the subcellular targeting of the smaller replicase protein of *Pelargonium flower break virus*

Sandra Martínez-Turiño, Carmen Hernández\*

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

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 October 2011

Received in revised form

13 December 2011

Accepted 16 December 2011

Available online 24 December 2011

#### Keywords:

*Carmovirus*

*Pelargonium flower break virus*

Viral replicase

Subcellular localization

Mitochondria

Membrane association

### ABSTRACT

Replication of all positive RNA viruses occurs in association with intracellular membranes. In many cases, the mechanism of membrane targeting is unknown and there appears to be no correlation between virus phylogeny and the membrane systems recruited for replication. *Pelargonium flower break virus* (PFBV, genus *Carmovirus*, family *Tombusviridae*) encodes two proteins, p27 and its read-through product p86 (the viral RNA dependent-RNA polymerase), that are essential for replication. Recent reports with other members of the family *Tombusviridae* have shown that the smaller replicase protein is targeted to specific intracellular membranes and it is assumed to determine the subcellular localization of the replication complex. Using *in vivo* expression of green fluorescent protein (GFP) fusions in plant and yeast cells, we show here that PFBV p27 localizes in mitochondria. The same localization pattern was found for p86 that contains the p27 sequence at its N-terminus. Cellular fractionation of p27GFP-expressing cells confirmed the confocal microscopy observations and biochemical treatments suggested a tight association of the protein to membranes. Analysis of deletion mutants allowed identification of two regions required for targeting of p27 to mitochondria. These regions mapped toward the N- and C-terminus of the protein, respectively, and could function independently though with distinct efficiency. In an attempt to search for putative cellular factors involved in p27 localization, the subcellular distribution of the protein was checked in a selected series of knockout yeast strains and the outcome of this approach is discussed.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The replication of all positive strand RNA viruses of eukaryotes takes place in membrane-associated complexes in the cytoplasm of infected cells. The reasons for membrane association of viral RNA synthesis are not well understood. It is generally believed that the membranes play a structural and/or organizational role during assembly of the replication machinery and permit to increase the local concentration of replicative enzymes and viral RNAs. In addition, the compartmentalization of the replication process may prevent double-stranded viral replication intermediates from being sensed by antiviral defence systems of the host cell [Denison, 2008; Mackenzie, 2005]. Membrane systems that can be compromised in viral replication include plasma membrane, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, vacuoles, chloroplasts, mitochondria, peroxisomes and endo/lysosomes [reviewed in Ahlquist *et al.*, 2003; Salonen *et al.*, 2005]. In many cases, the replication complexes also induce morphological alterations of the target membranes, which can interfere with their normal functions.

*Pelargonium flower break virus* is a member of the genus *Carmovirus* in the family *Tombusviridae*. Its genome consists of a monopartite, positive-sense RNA

of 3,923 nt which is neither capped nor polyadenylated and contains five open reading-frames (ORFs) [Rico & Hernández, 2004]. Proteins encoded by the internal and 3'-terminal ORFs are dispensable for PFBV multiplication and are rather involved in viral movement, encapsidation or suppression of RNA silencing [Martínez-Turiño & Hernández, 2009; 2011]. In contrast, the translation products of the ORFs located 5' proximal in the genomic RNA, ORFs 1 and 2, correspond to polypeptides of 27 and 86 kDa, respectively, that are strictly required for viral replication [Martínez-Turiño & Hernández, 2010]. The larger replicase protein (p86) is synthesized as a readthrough product of the shorter one (p27) and, due to the low frequency of the stop codon suppression even, the latter is synthesized at 10-20 fold higher amounts than the former [Fernández-Miragall & Hernández, 2011]. While p86 encloses the eight motifs conserved in the viral RNA dependent-RNA polymerases (RdRp) of supergroup II of the positive strand RNA viruses [Koonin, 1991; Koonin & Dolja, 1993], p27 has no obvious replication motifs as occurs with equivalent proteins in the family *Tombusviridae*.

The specific role of the smaller replicase protein of members of the family *Tombusviridae* has long been a subject of debate. Recent results with PFBV p27 and previous ones with the homologous product of *Tomato*

*bushy stunt virus* (TBSV), namely p33, have revealed that these proteins bind cognate viral ssRNAs with high affinity suggesting that play an essential role in selection and recruitment of replication templates [Martínez-Turiño & Hernández, 2010; Pogany *et al.*, 2005; Rajendran & Nagy, 2003]. Other roles, however, cannot be discarded. Indeed, a recent report indicates that TBSV p33 has RNA chaperone activity and likely facilitates proper folding of viral RNAs during replication [Stork *et al.*, 2011]. In addition, in the last years distinct studies with species of the genera *Tombusvirus*, *Dianthovirus* and *Panicovirus* have shown that the protein encoded by ORF1 is targeted to specific intracellular membranes and it is assumed to determine the subcellular localization of the replication complex. The specific membrane system recruited varies from one virus to another. Thus, the ORF1 products of *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV, genus *Dianthovirus*) and of *Panicum mosaic virus* (PMV, genus *Panicovirus*) associate to membranes of the endoplasmic reticulum [Batten *et al.*, 2006b; Turner *et al.*, 2004], whereas the ORF1 products of TBSV, *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) and *Cucumber necrosis virus* (CNV) in the genus *Tombusvirus*, are targeted to peroxisomes [McCartney *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2004; Panavas *et al.*, 2005]. Despite *Carnation Italian ringspot virus* (CIRV) belongs also to genus *Tombusvirus*, its ORF1 product (p36) is sorted to mitochondria [Weber-Lotfi *et al.*, 2002]. Most of these proteins induce organelle aggregation and/or proliferation of the membranes they associate with and seem to be truly integrated in the corresponding membranes. In many cases,  $\alpha$ -helices that function as transmembrane domains (TMs) play a critical role in both targeting and integration to specific membranes. That is the case of CIRV p36, that has been proposed to associate to the mitochondrial outer membrane through two TMs and multiple recognition signals present at the N-terminus that might function cooperatively as a so-called signal loop-anchor type mitochondrial targeting sequence [Weber-Lotfi *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2008].

Information on the membrane association of replication proteins from members of the genus *Carmovirus* is relatively scarce. Recently, the interaction of the ORF1 product (p29) of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) with mitochondrial membranes has been described and at least one TM has been found to be required for such interaction [Mochizuki *et al.*, 2009]. In addition, the presence of N-terminal, classical mitochondrial targeting signals (MTS), that consist of 15 to 40 amino acid (aa) residues and form positively charged amphipathic  $\alpha$ -helices [Chacinska *et al.*, 2009], was suggested for the ORF1 products of other carmoviruses [Ciuffreda *et al.*, 1998] but experimental approaches to study the

subcellular sorting of other carmoviral replicase proteins have not yet been made.

Here we show that PFBV p27 is able to target the green fluorescent protein (GFP) reporter to mitochondria *in vivo* upon transient expression of a fusion protein in plant and yeast cells. Similar results were obtained with the complete replicase p86, which contains the p27 sequence at its N-terminal region. Analysis of deletion mutants indicated that two regions toward the N- and C-terminus, respectively, of p27 contain signals for mitochondrial targeting. Biochemical fractionation experiments revealed that p27 sedimented mainly with mitochondrial enriched fractions, in agreement with the confocal microscopy observations, and that associates tightly to membranes. Finally, the subcellular distribution of the protein was checked in a selected series of knockout yeast strains in an attempt to search for putative cellular factors involved in p27 localization.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Generation of constructs

For protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*, the GFP gene was cut out from pBin19-*sgfp* [Peña *et al.*, 2003] with *Bam*HI/*Eco*RI digestion and subcloned into the *Bam*HI/*Eco*RI sites of plasmid pYES 2.0 (Invitrogen) containing the galactose-activated GAL1 promoter. The resulting recombinant plasmid was named pYES-GFP. In addition, the PFBV p27 coding sequence was amplified with Expand High Fidelity PCR System (Roche) using the PFBV infectious clone pSP18-IC [Rico & Hernández, 2006] as template, and primers CH67 and CH70 which harboured an *Nco*I restriction site at their 5' end (primers listed in **Supplemental Table 1**). After *Nco*I digestion, the PCR-generated fragment was cloned in the *Nco*I site, which precedes the start codon of the GFP gene in construct pYES-GFP to yield pYES-p27GFP that contained the p27 cDNA fused in frame to the GFP gene. A similar construct, signed as pYES-p86GFP, was prepared with the p86 gene which was PCR amplified with primers CH67 and CH182 (**Supplemental Table 1**) from plasmid p27<sub>tyr</sub>, a full-length PFBV clone in which the amber stop codon of ORF1 was mutated to a tyrosine codon [Martínez-Turiño & Hernández, 2010]. To study possible colocalization of p27 and p86, the GFP gene of plasmid pYES-p86GFP was replaced by the gene encoding the monomeric red fluorescent protein (mRFP) yielding construct pYES-p86mRFP. The complete expression cassette of this construct (the p86mRFP fusion gene flanked by the GAL1 promoter and the terminator sequence) was PCR amplified with primers CH222 and CH223, encompassing a *Spe*I restriction site at



their 5' end (**Supplementary Table 1**), subsequently digested with *SpeI* and ligated into plasmid pYES-p27GFP through the *SpeI* site present in the vector sequence. The resulting construct with two expression cassettes in tandem was named pYES-p27GFP/p86mRFP.

Different regions of the p27 gene were also PCR amplified with specific primers (**Table 1**) and fused in frame with the GFP gene of construct pYES-GFP using appropriate restriction sites (introduced by PCR into the p27 derived cDNAs). Following this approach, a total of thirteen p27 deletion mutant constructs were generated: pYES-p27(21-243)GFP (mutant 1, created with primers CH115 and CH70), pYES-p27(34-243)GFP (mutant 2, primers CH113/CH70), pYES-p27(73-243)GFP (mutant 3, primers CH162/CH70), pYES-p27(1-215)GFP (mutant 4, primers CH67/CH114), pYES-p27(1-180)GFP (mutant 5, primers CH150/CH215), pYES-p27(1-162)GFP (mutant 6, primers CH150/CH228), pYES-p27(1-155)GFP (mutant 7, primers CH150/CH163), pYES-p27(21-155)GFP (mutant 8, primers CH115/CH163), pYES-p27(73-155)GFP (mutant 9, primers CH162/CH163), pYES-p27(51-155)GFP (mutant 10, primers CH318/CH163), pYES-p27(34-155)GFP (mutant 11, primers CH113/CH163), pYES-p27(73-162)GFP (mutant 12, primers CH162/CH228), and pYES-p27(73-215)GFP (mutant 13, primers CH162/CH114).

For transient expression of proteins in *Nicotiana benthamiana* protoplasts, the GFP gene, the cDNA encoding the p27GFP fusion and GFP fusions with the p27 derivatives of mutants 3, 8, 10 and 13 were recovered from the corresponding yeast constructs with *BamHI/PstI* digestion and subcloned into the *BamHI/PstI* sites of a pBluescript KS+ derived-plasmid containing the *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter upstream of the *BamHI* site and the terminator sequence of the *Solanum tuberosum* proteinase inhibitor II gene downstream of the *PstI* site. All constructs were routinely sequenced to avoid unwanted modifications.

## 2.2. Expression of gene constructs in yeast and plant cells

For expression in yeast cells, the pYES 2.0 derived constructs were employed to transform *S. cerevisiae* strain W303-1A (*MAT $\alpha$* , *his3-11/15*, *leu2-3/112*, *trp1-1*, *ura3-1*, *ade2-1*, *can1-100*, Wallis *et al.*, 1989). The plasmid p36K-GFP, allowing expression of protein p36 of *Carnation Italian ringspot virus* [Rubino *et al.*, 2000], was also included for comparison purposes.

Transformation of plasmids was done with the lithium acetate-polyethylene glycol method [Ito *et al.*, 1983]. Transformed cells were spread on minimal selective medium (SD) plates containing 0.7 % yeast nitrogen base without amino acids, 2 % dextrose or galactose, histidine at 30  $\mu$ g/ml, leucine at 100  $\mu$ g/ml, tryptophan at 100  $\mu$ g/ml and 2 % agar, and incubated at 28 °C for two days. Samples were collected directly from the plates for inspection through confocal microscopy. To study potential involvement of host factors in p27 subcellular localization, a series of yeast knockout strains (see **Table 1**) coming from the EUROSCARF collection [Winzler *et al.*, 1999] was also transformed with construct pYES-p27GFP. In this case, the parental, wt strain corresponded to BY4741 (*MAT $\alpha$* ; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 0*; *met15 $\Delta$ 0*; *ura3 $\Delta$ 0*) and transformed cells were grown on SD/galactose plates supplemented with histidine at 30  $\mu$ g/ml, leucine at 100  $\mu$ g/ml, and methionine at 100  $\mu$ g/ml.

For transient expression in plant cells, *N. benthamiana* protoplasts were prepared. To this aim, *N. benthamiana* leaves were incubated at 25 °C for 3 h with 1.5 % cellulose and 0.4 % macerozyme (both enzymes from Duchefa Biochemie) in 0.6 M mannitol. The protoplasts were then filtered through a nylon membrane (35-75  $\mu$ m), collected through 1 min centrifugation at 100 x g, washed twice with solution W5 (154 mM NaCl, 125 nM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl and 2 mM HEPES, pH 5.7) and incubated for 30 min on ice. For plasmid delivery, the protoplasts were adjusted to 10<sup>6</sup>/ml in a medium containing 0.4 M mannitol, 15 mM MgCl<sub>2</sub> and 4 mM MES (pH 5.7). About 20  $\mu$ g of the corresponding plasmid was added to 10<sup>5</sup> protoplasts in a medium containing 0.1 M mannitol, 20 % PEG 4000 and CaCl<sub>2</sub> 50 mM. After 1 min incubation, 0.4 ml of solution W5 was added. The protoplasts were recovered by 1 min centrifugation at 100 x g, resuspended in 1 ml of solution W5 and incubated at 25 °C during 24 h with continuous light. Samples were then taken for fluorescence visualization.

Mitochondria were visualized in living cells with the mitochondrial specific MitoTracker Orange CMTMRos. Staining of cells with this dye was performed following manufacturer's recommendations (Molecular Probes). Briefly, pelleted cells were gently resuspended in a medium containing the dye at working concentration of 100 nM. Protoplasts were incubated at 25 °C for 15 min in W5 solution containing the dye. Similarly, a suspension of yeast cells in SD medium was incubated with the MitoTracker, at 28 °C in orbital shaker for 30 min.

**Table 1**  
List of yeast mutants checked for possible alterations in p27 subcellular localization pattern.

Gene name <sup>a</sup>	Function	Localization <sup>b</sup>
<b>TOM complex</b>		
<i>TOM70</i>	Acts as receptor for incoming precursor proteins	OM
<i>TOM7</i>	Promotes assembly and stability of the TOM complex	OM
<i>TOM6</i>	Promotes assembly and stability of the TOM complex	OM
<i>TOM5</i>	Involved in transfer of precursors from the Tom70 and Tom20 receptors to the Tom40 pore	OM
<i>TOM71</i> (alias <i>TOM72</i> )	Protein translocase 72-kDa with similarity to Tom70	OM
<b>SAM complex</b>		
<i>SAM37</i>	Binds precursors of $\beta$ -barrel proteins and facilitates their outer membrane insertion. Contributes to SAM complex stability	OM
<b>TIM complex</b>		
<i>TIM9</i>	Forms part of a chaperone complex involved in targeting of proteins to specific mitochondrial membranes	ITM
<b>ERMES complex</b>		
<i>MDM34</i>	Maintains wild-type mitochondrial morphology	OM
<i>MDM10</i>	Subunit of both the ERMES and SAM complex required for normal mitochondrial morphology and inheritance	OM
<i>MMM1</i>	Regulates mitochondrial shape/structure and participates in $\beta$ -barrel assembly pathway	OM/ERM
<b>NAC complex</b>		
<i>EGD1</i>	Beta subunit of the NAC complex involved in protein targeting	Undefined
<i>EGD2</i>	Alpha subunit of the NAC complex involved in protein sorting and translocation	Undefined
<b>Ubiquitin-proteasome</b>		
<i>UBX2</i> (Alias <i>SEL1</i> )	Ubiquitin-regulatory protein	OM/ERM
<i>UBP16</i>	Ubiquitin-specific protease	OM
<b>Porins</b>		
<i>POR1</i>	Maintenance of mitochondrial osmotic stability and mitochondrial membrane permeability	OM
<i>POR2</i>	Putative mitochondrial porin	OM
<b>Others</b>		
<i>MSP1</i>	Putative membrane-spanning ATPase involved in intramitochondrial sorting of proteins	OM
<i>MIR1</i>	Mitochondrial phosphate carrier	IM
<i>GEM1</i>	GTPase which regulates mitochondrial morphology	OM
<i>UGO1</i>	Component of the mitochondrial fusion machinery	OM
<i>OM45</i>	Major constituent of the mitochondrial outer membrane with unknown function	OM
<i>MMR1</i>	Phosphorylated protein that mediates mitochondrial distribution to buds	OM

<sup>a</sup> TOM, translocase of outer membrane; SAM, sorting and assembly machinery; TIM, translocase of the inner mitochondrial membrane; ERMES complex, ER-mitochondria encounter structure; NAC, nascent polypeptide-associated complex.

<sup>b</sup> OM, outer membrane; IM, inner membrane; ITM, intermembrane space; ERM, endoplasmic reticulum membrane.

### 2.3. Fluorescence monitoring

Fluorescence images were obtained with a Leica TCS SL confocal laser-scanning microscope employing an HCX PL APO  $\times 40/1.25-0.75$  oil CS objective. GFP derived fluorescence was monitored by excitation with a 488-nm argon laser line and emission was visualized with a 30 nm-width band-pass window centered at 515 nm. The mRFP-derived fluorescence was checked by excitation with a 543 nm green-neon laser line and fluorescence emission was collected at 610-630 nm. The MitoTracker Orange CMTMros fluorescence was checked by excitation with a 543 nm green-neon laser line with emission being gathered at 574-584 nm.

### 2.4. Protein extraction and Western blot analysis

A mitochondria-enriched fraction was obtained following essentially the protocol reported by Nakai *et al.* (1995). Briefly, yeast cells expressing GFP or p27GFP were grown to mid-logarithmic phase in a final volume of 20 ml and collected by centrifugation. After two washings with TSB (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.6 M sorbitol), the cells were resuspended in 0.5 ml of the same buffer, supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and, after adding 1 ml of glass beads (diameter of 0.45 to 0.5 mm). Cells were disrupted with the aid of a Mini BeadBeater programmed at maximum speed for 1 min five times with intervals of cooling on ice. Disrupted cell suspension was recovered with a pipette, avoiding

contamination of glass beads, and centrifuged at 3,500  $\times g$  for 5 min. The supernatant was centrifuged at 12,000  $\times g$  for 10 min. The pellet was carefully resuspended in TSB supplemented with 1 mM PMSF and recentrifuged at 3,500  $\times g$  for 5 min. The resulting supernatant was centrifuged at 12,000  $\times g$  for 10 min, and the final pellet was washed twice with TSB and resuspended in TSB supplemented with 1 mM PMSF. Aliquots of this mitochondria-enriched fraction and its accompanying supernatant were electrophoresed, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Roche) and immunoblotted with anti-GFP (Roche). Immunoreactive bands were revealed with chemiluminescence ECL Plus kit following supplier recommendations (GE Healthcare). In some experiments, the mitochondria-enriched fraction was incubated for 30 min on ice in the presence of one of the following reagents: 100 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 11.3), 4 M urea or 1 M KCl. After centrifugation at 30,000  $\times g$  for 30 min at 4°C, the pellet and supernatant were subjected to immunoblot analysis for GFP detection as indicated above.

### 2.5. In silico sequence analysis

Tools for protein subcellular localization prediction included CELLO v.2.5 [Yu *et al.*, 2006], SubLoc v.1.0 [Hua & Sun, 2001], Euk-mPLoc v.2.0 [Kuo-Chen & Hong-Bin, 2010]. The presence and location of potential signal peptide cleavage sites in amino acid sequence were predicted with TargetP v.1.1 [Emanuelsson *et al.*, 2000], SignalP v.3.0

[Bendtsen *et al.*, 2004], Protein Prowler Predictor v.1.2 [Hawkins & Bodén, 2006] and Phobius [Käll *et al.*, 2007]. Predictions of membrane-spanning regions were made with PHDhtm [Rost, 1996], TMPred [Hofmann & Stoffel, 1993], DAS [Cserző, *et al.*, 1997], Split v.4.0 [Juretić *et al.*, 2002], RHYTM [Rose *et al.*, 2009], SVMtm v.3.0 [Yuan *et al.*, 2004], OCTOPUS [Viklund & Elofsson 2008] and ConPredII [Arai *et al.*, 2004]. An algorithm (HHELIX) developed by Orgel (2004) was applied for distinguishing helical sequences that are parallel to or “horizontal” at the membrane bilayer/aqueous phase interface, from helices that are membrane-embedded or located in extra-membranous domains. Helices included in the analysis were obtained with NPSA software [Combet *et al.*, 2000], that provides a consensus secondary structure prediction, and the minimum helix size was set to four amino acids (for at least one complete turn of the  $\alpha$ -helix).

### 3. Results

#### 3.1. PFBV p27 shows mitochondrial localization in both yeast and plant cells

The study of the subcellular localization of p27 was firstly tackled in *S. cerevisiae*, a model system extensively used for structural and functional analysis of heterologous proteins [Galao *et al.*, 2007; Siggers & Lesser, 2008]. To this aim, the p27 coding sequence was fused in frame with the GFP gene and cloned in the yeast vector pYES 2.0 under control of the galactose-activated GAL1 promoter. A recombinant plasmid allowing expression of free GFP was also generated. Yeast cells transformed with the control GFP construct and grown on galactose-containing medium demonstrated diffuse green fluorescence throughout the cell (Fig. 1). This is due to the lack of targeting signals in GFP and its small size, which permits diffusion across the nuclear envelope. Conversely, p27 tagged with a carboxy-terminal GFP, p27GFP, localized to discrete cytoplasmic sites (Fig. 1). It was hypothesized that this cytoplasmic pattern represented localization of p27 to mitochondria, and to confirm this, the cells were stained with MitoTracker Orange, a molecular probe that specifically labels these organelle [Poot *et al.*, 1996]. It was apparent that the fluorescence derived from the p27GFP protein co-localized with the mitochondrial MitoTracker Orange signal (Fig. 1). To assess whether the larger PFBV p86 replicase protein had the same localization properties *in vivo*, the PFBV ORF2 cDNA, with the leaky stop codon of ORF1 replaced by a Tyr-encoding codon, was also fused in frame with the GFP gene and cloned into pYES 2.0 plasmid vector to allow expression of the fusion product in yeast. The p86

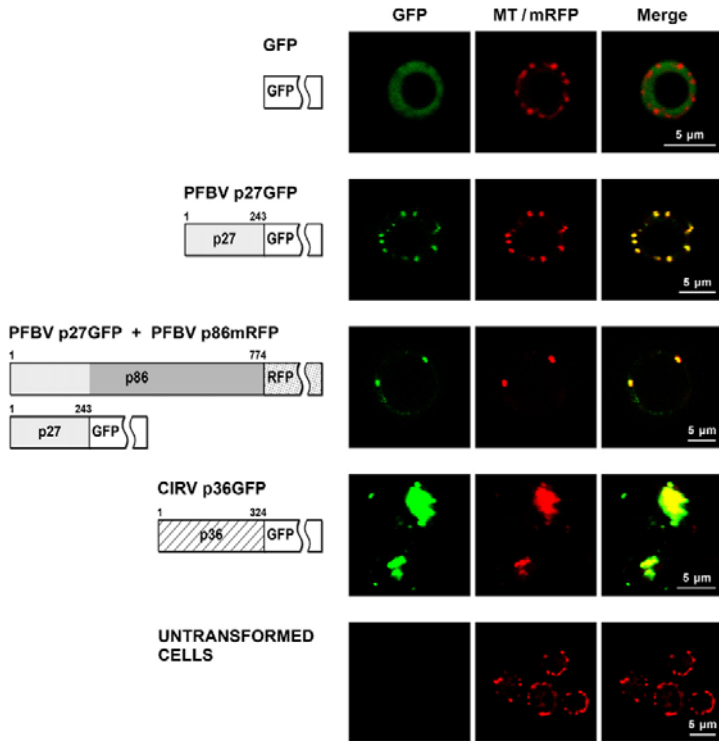
protein targeted GFP to organelles, which were easily identified as mitochondria by their size, their shape, and the positive reaction they exhibited with the specific dye MitoTracker, yielding fluorescence images similar to those obtained previously with the p27 protein (data not shown). This indicated that the signal(s) operating in the ORF1-derived product also operate in the context of the longer replicase protein, though the presence of additional targeting sequences in the latter one cannot be ruled out. A similar fluorescence profile was observed when p86 was fused to the monomeric red fluorescent protein (mRFP) (Fig. 1). Co-expression of p27GFP with p86mRFP in yeast cells revealed GFP- and mRFP-derived fluorescence at the same punctuate structures, indicating co-localization of the PFBV replicases (Fig. 1). In contrast with that observed for CIRV p36 [Weber-Lotfi *et al.*, 2002 and Fig. 1], the appearance of mitochondria in yeast cells expressing PFBV p27 was indistinguishable from that of non-transformed cells (Fig. 1). Aggregation of mitochondria or membrane proliferation was neither noticed in yeast cells co-expressing p27 and p86.

To corroborate the pattern of subcellular localization of p27 in plant cells, the fusion p27GFP was cloned under the control of the 35S promoter and the resulting recombinant plasmid was used for transient expression experiments in *N. benthamiana* protoplasts. An equivalent construct allowing expression of unfused GFP was included as a control. Unfused GFP was observed through the cytoplasm and was not excluded from cell nuclei (Fig. 2). In contrast, expression of p27GFP led to a pattern of fluorescence restricted to definite structures that corresponded to mitochondria as revealed by the MitoTracker Orange signal (Fig. 2). Collectively, the results showed a clear sorting of the PFBV ORF1-encoded product to specific cell organelles, mitochondria.

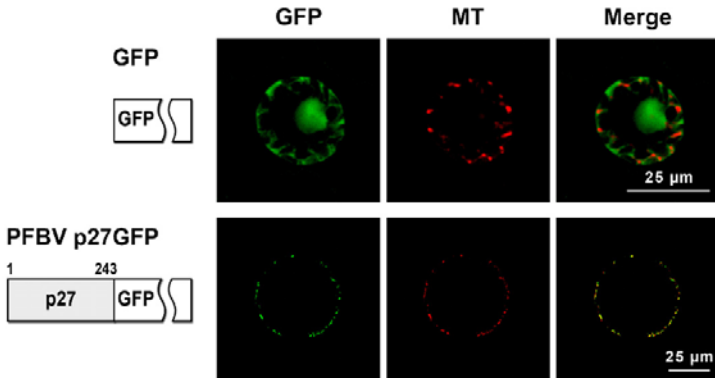
#### 3.2. PFBV p27 is tightly associated to mitochondrial membranes

The subcellular localization profiles of p27GFP indicated that it is associated with mitochondria, likely as a membrane (peripheral or integral) protein, according to that reported for other viral replicase proteins [Miller *et al.*, 2001; Weber-Lotfi *et al.*, 2002].

To confirm the attachment of p27 to mitochondrial membranes, a mitochondria-enriched fraction from p27GFP-expressing yeast cells was obtained. Yeast cells producing unfused GFP were used as negative control. Western blot analysis with a GFP specific antibody confirmed the presence of p27GFP in the mitochondrial fraction, in contrast with that observed



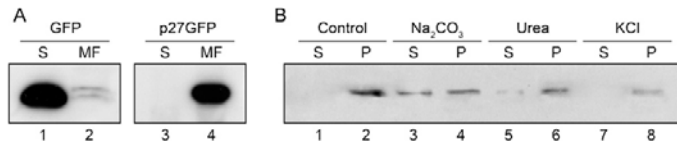
**Fig. 1.** Intracellular distribution of reporter-tagged viral replicases in yeast cells. Confocal laser scanning microscopy was used for observation of fluorescence in *S. cerevisiae* cells expressing unfused GFP, PFBV p27GFP, PFBV p27GFP plus p86mRFP and CIRV p36GFP. GFP fluorescence is shown in left micrographs, MitoTracker Orange (MT) or mRFP derived fluorescence is shown in middle micrographs, and an overlay of GFP and MT/mRFP signals (Merge) is shown in right micrographs. Untransformed yeast cells labeled with MitoTracker Orange alone, are also included to give an indication of mitochondrial appearance in cells that do not express any viral replicase.



**Fig. 2.** Confocal laser scanning micrographs of *N. benthamiana* protoplasts expressing unfused GFP or p27GFP. Cells were also stained with MitoTracker Orange (MT) to label the mitochondria, and an overlay of the GFP and MitoTracker signals is included (Merge).

for the unfused GFP that was detected in the corresponding supernatant (**Fig. 3A**). The mitochondrial fraction of p27GFP-expressing cells was further treated with buffers that may discriminate between peripheral and integral membrane proteins. The soluble contents were separated from the pellets

by ultracentrifugation and both, pellets and supernatants, were analyzed by immunoblot with the anti-GFP sera. Most peripheral membrane proteins are dissociated from membranes by high pH, high ionic strength, or chaotropic agents. After treatment with 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.3), 4 M urea or 1 M KCl,



**Fig. 3.** Western blot analyses of mitochondrial fractions from GFP- and p27GFP-expressing yeast cells. (A) Accumulation of non-fused GFP and p27GFP in the pellets corresponding to mitochondrial enriched-fractions and the accompanying supernatants. (B) Immunoblot analysis of mitochondrial extracts from cells expressing p27GFP either untreated (control) or treated with carbonate, urea and KCl and then separated by centrifugation into supernatant and pellet fractions.

p27GFP was detected mainly in the pellets though a non-negligible amount of the protein was also found in the supernatants with the first two treatments (**Fig. 3B**). These observations were similar to those reported for the smaller replicase proteins of MNSV and CIRV though such polypeptides were in general more resistant to membrane extraction through biochemical treatments [Mochizuki *et al.*, 2009; Rubino *et al.*, 2000]. We concluded from these results p27 was membrane associated through a mechanism that imparted significant stability to protein-membrane interactions though its nature as integral membrane protein could not be confirmed.

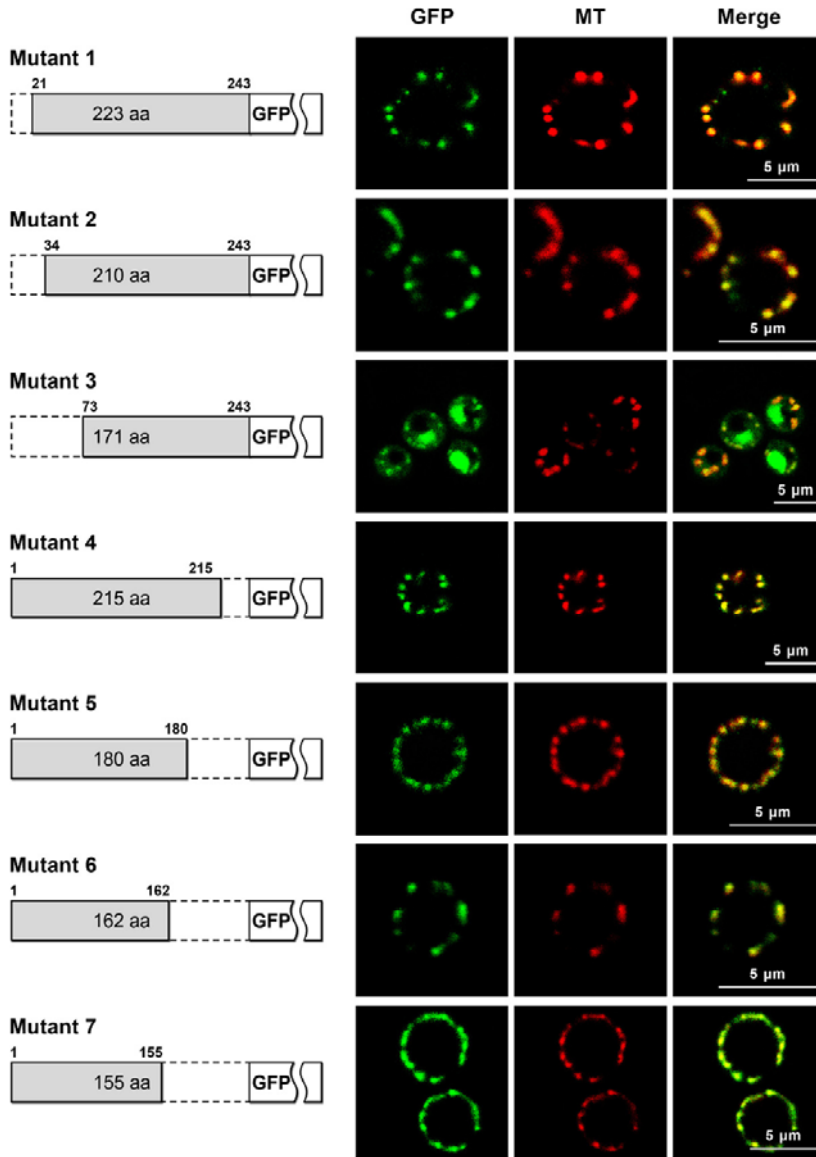
### 3.3. Mapping the regions responsible for mitochondrial localization of PFBV p27

Computer analysis of p27 with a broad set of programs designed to predict protein subcellular localization on the basis of different criteria (see Material and methods section), yielded no clear results. Though some of them anticipated the observed mitochondrial sorting of the protein (e.g., CELLO v.2.5, SubLoc v.1.0, Euk-mPLoc v.2.0), the reliability of such prediction was not very high and, moreover, no clear targeting signals could be identified. The outcome of some programs (e.g., TargetP v.1.1, Prowler v.1.2, Phobius and SignalP v.3.0) pointed to the presence of a putative signal peptide toward the N-terminus of p27 that could fit the requirements of an MTS (approximately at positions 1-23) though the accuracy of such prediction was also low. This was not surprising as a large number of mitochondrial proteins, especially from the outer membrane, are not synthesized with presequences but instead contain internal targeting information of diverse nature that is difficult to predict [Chacinska *et al.*, 2009]. We also searched for potential hydrophobic  $\alpha$ -helices that could act as TMs and function as signal-anchor sequences paralleling that proposed for CIRV p36 or MNSV p29 [Mochizuki *et al.*, 2009; Weber-Lotfi *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2006]. Distinct programs (PHDhtm, TMPred, DAS, Phobius, Split v.4.0, RHYTM, SVMtm, OCTOPUS, ConPredII) predicted with moderate probability that residues 8 to 28 contained a stretch of amino acids with sufficient hydrophobicity and length to span a lipid bilayer. No

other protein regions were highlighted with this approach.

As recognition of potential targeting signals in p27 through *in silico* methods was ambiguous, an initial set of seven deletion mutants was generated to evaluate the relative contributions of the different regions to mitochondrial localization. The corresponding cDNAs were fused in frame with the GFP reporter gene and placed under the control of the GAL1 promoter to study the subcellular distribution of the mutant proteins in yeast cells. These p27 derivatives carried truncations of different extents at the N- and/or C-terminus (**Fig. 4**). Confocal microscopy observations showed that removal of aa up to residue 34 did not affect the mitochondrial localization of the protein despite the putative TM predicted at the N-terminus of p27 was entirely eliminated with the larger deletion (mutants 1 and 2; **Fig. 4**). The localization pattern was maintained when a further deletion till residue 73 was made though in this case some segregation of the fluorescence among mitochondria, cytoplasm and nucleus was observed (mutant 3; **Fig. 4**).

On the other side, yeast cells expressing proteins harbouring deletions at the C-terminus up to residue 155 showed GFP confined to mitochondria, giving rise to targeting pictures that were essentially identical to those obtained with the wt p27 (mutants 4 to 7; **Fig. 4**). At this point, the results suggested the presence of either a targeting signal among residues 73-155 (common to all constructs) or two independent signals located toward the N- and C-termini of the protein. To discriminate between these two possibilities, another set of six mutants was analyzed (mutants 8 to 13; **Fig. 5**). A truncated protein retaining residues 21 to 155 showed the typical mitochondrial pattern (mutant 8; **Fig. 5**). However, an additional deletion at the N-terminus till residue 73 led to loss of the mitochondrial targeting with the fluorescence being distributed through in the cytosol and nucleus as observed in cells expressing unfused GFP (mutant 9; **Fig. 5**). These observations argued against the existence of a targeting signal among residues 73 and 155 and supported instead the presence of a relevant sequence at the N-terminus between residues 21 to 73. In order to map more precisely such signal sequence, a couple of intermediate deletions were performed. The

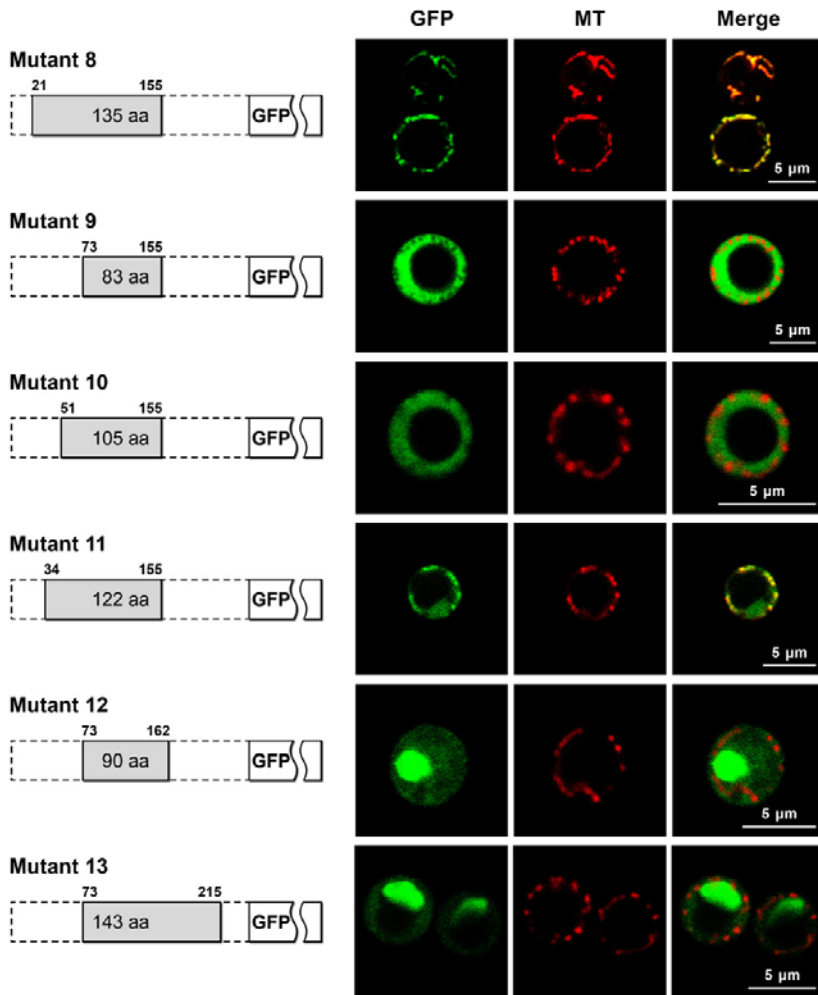


**Fig. 4.** Analysis of subcellular localization patterns of p27-deletion derivatives with a C-terminal GFP tag in yeast cells. Amino acid residues of p27 retained in mutants 1–7 are indicated. GFP (left micrographs) and MitoTracker Orange (MT; middle micrographs) fluorescence images are shown for the same cells and merged pictures are also provided (right micrographs). Other details as in Fig. 1.

fluorescence of a truncated protein harbouring residues 51 to 155 was observed in the cytoplasm and nucleus whereas another truncated protein encompassing residues 34–155 showed the fluorescence associated to mitochondria though part of it was also detected through the cytosol and nucleus (mutants 10 and 11, respectively; **Fig. 5**). These results suggested that the region responsible for

mitochondrial targeting was incomplete in the last construct and confine such region to residues 21–50.

Comparison of the localization patterns of mutants 3 (**Fig. 4**) and 9 (**Fig. 5**) together with the above results, hinted at the presence of another targeting signal among residues 155–243. Two additional truncated variants, mutants 12 and 13 (**Fig. 5**), were analyzed and the associated fluorescence was found to be scattered through cytoplasm and nucleus. As



**Fig. 5.** Analysis of subcellular localization patterns of p27-deletion derivatives with a C-terminal GFP tag in yeast cells. Amino acid residues of p27 retained in mutants 8–13 are indicated. GFP (left micrographs) and MitoTracker Orange (MT; middle micrographs) fluorescence images are shown for the same cells and merged pictures are also provided (right micrographs). Other details as in Fig. 1.

fluorescence of mutant 3 was observed to some extent, though not exclusively, associated to mitochondria, we can conclude that another sorting signal, presumably weaker than that found to the N-terminus, is present between residues 215–243.

To corroborate that the regions found to be responsible for targeting of p27 to mitochondria in yeast were also operative in plant cells, cDNAs of a set of informative p27 derivatives tagged with a carboxy-terminal GFP were cloned under the control of the 35S promoter and expressed in *N. benthamiana* protoplasts. As observed in yeast, fluorescence derived from mutant 10, encompassing residues 51–155, was uniformly distributed through the cytoplasm and nucleus but enlargement at the N-terminus up to

residue 21 in mutant 8, resulted in fluorescence restricted to defined structures that were identified as mitochondria by staining with the MitoTracker dye (Fig. 6). These observations confirmed the role of the region encompassing residues 21–50 in mitochondrial targeting. In addition, the pattern of fluorescence derived from mutant 13 was essentially identical to that of the unfused GFP whereas that of mutant 3 was found associated, at least partially, to mitochondria (Fig. 6). Thus, the results obtained in protoplasts paralleled those obtained in yeast and pointed to the presence of a targeting signal toward the N-terminus of p27 and another, weaker signal toward the C-terminus.

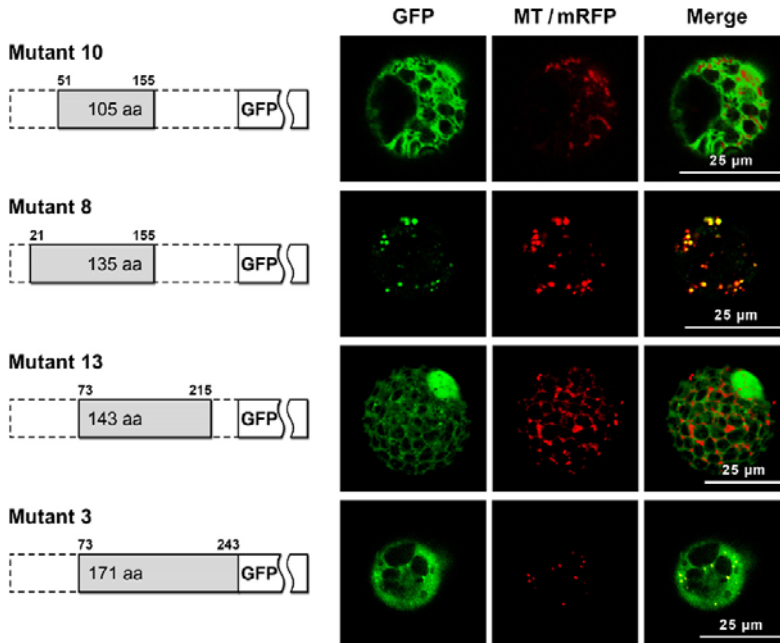


Fig. 6. Confocal laser scanning micrographs of *N. benthamiana* protoplasts expressing GFP-tagged deletion mutants of p27. Cells were also stained with MitoTracker Orange (MT) to label the mitochondria, and an overlay of the GFP and MitoTracker signals is included (Merge).

### 3.4. The mitochondrial localization of PFBV p27 in yeast is not affected in a selected series of knockout yeast strains

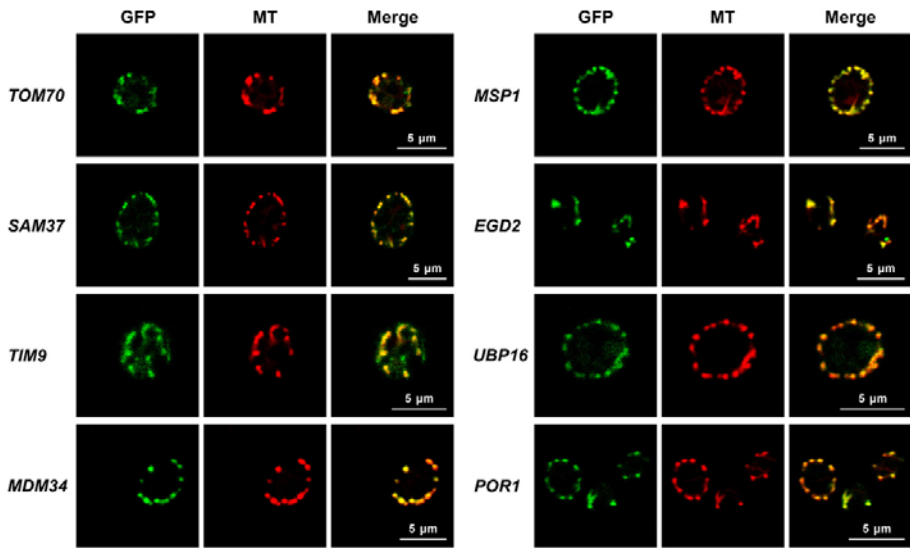
In order to approach the potential involvement of cellular factors in correct targeting of p27, the pattern of subcellular localization of the PFBV replicase protein was analyzed in yeast strains lacking some representative proteins either of the outer mitochondrial membrane or of other locations with putative or proven role in mitochondrial sorting. The twenty-two mutants checked are shown in **Table 1** and have been arranged on the basis of their functional annotations. One first group included components of the translocase outer membrane (TOM) and of the sorting and assembly machinery (SAM) (TOM70, TOM7, TOM6, TOM5, TOM72, SAM37). The TOM complex represents the general entry gate of the vast majority of mitochondrial proteins whereas the SAM complex plays a main role in insertion of  $\beta$ -barrel outer membrane proteins, a process in which TOM components are also involved [reviewed in Chacinska *et al.*, 2009]. Other cellular factors tested, included a chaperone involved in the transfer of precursor proteins to the carrier translocase of the inner membrane as well as in directing  $\beta$ -barrel proteins to the outer membrane (TIM9), components of the endoplasmic reticulum-mitochondrial encounter structure (ERMES) (MDM34, MDM10, MMM1),

subunits of the heteromeric nascent polypeptide-associated complex (NAC) implicated in protein sorting and translocation (EGD1, EGD2), elements of the ubiquitin pathway (SEL1, UBP16), mitochondrial porins (POR1, POR2), a membrane-spanning ATPase involved in sorting of proteins in the mitochondria (MSP1), a mitochondrial phosphate carrier (MIR1), factors that regulate mitochondrial fusion or morphology (GEM1, UGO1), and other proteins of uncertain function but that are major components of the mitochondrial outer membrane (OM45, MMR1). Competent cells of the distinct mutant strains were prepared and transformed with the construct that allows expression of the p27GFP. Fluorescence derived from the fusion polypeptide was analyzed in each mutant by confocal microscopy. In all cases, the pattern of the subcellular localization of p27GFP was indistinguishable from that observed in the wt strain (**Fig. 7** and data not shown) indicating that none of the factors whose expression was abolished has a significant role in the mitochondrial targeting of the protein.

## 4. Discussion

In this study, we have first investigated the intracellular localization, membrane association, and organelle-targeting signals of p27, the smaller replicase protein of PFBV. The experiments have been





**Fig. 7.** Subcellular localization patterns of p27 in knockout yeast strains. Construct pYES-p27GFP was transformed in the corresponding yeast mutant (see Table 1 for nomenclature) and GFP fluorescence was monitored through confocal laser scanning microscopy. Cells were also stained with MitoTracker Orange (MT) to label the mitochondria, and an overlay of the GFP and MitoTracker signals is included (Merge).

performed in both plant and yeast cells, as the latter represent a versatile model system that is being widely used to study specific aspects of plant/animal virus replication [Galao *et al.*, 2007; Nagy, 2008]. The results have shown a clear targeting of p27 to mitochondria, paralleling that reported for CIRV p36 and MNSV p29 which are related tombusviral and carmoviral replicases, respectively [Mochizuki *et al.*, 2009; Rubino *et al.*, 2001; Weber-Lotfi *et al.*, 2002]. The observation would be also consistent with the outcome of electronic microscopy studies showing that PFBV infection specifically affects mitochondria, hinting at this organelle as the sites of RNA synthesis [Lesemann & Adam, 1994].

Analysis of the subcellular localization of PFBV p86 has revealed that it also localizes in mitochondria. This was an expected result as the PFBV p86 RdRp protein includes the entire p27 sequence in its N-terminus, and thus contains the same mitochondrial targeting information. Confocal microscopy has also shown that PFBV p27 and p86 co-localize in yeast (Fig. 1), suggesting that both products function together to form a replication complex, likely establishing protein-protein interactions. Supporting this view, interactions among the small and the large replicase proteins have been reported for members of the genus *Tombusvirus* [Rajendran & Nagy, 2006] and similar interactions might occur in related viruses, including PFBV.

As the localization pattern of p27 was not modified when co-expressed with its allied replication protein p86, the study of the mitochondrial targeting

information of the protein when expressed on its own was esteemed appropriate. To facilitate dissection of putative mitochondrial signal(s), a battery of p27-deletion mutants were expressed initially in *S. cerevisiae* and its intracellular location was investigated by confocal microscopy. The results obtained in the yeast system were essentially reproduced in plant cells, substantiating the usefulness of the former system for elucidation of structural and functional properties of heterologous proteins of eukaryotic origin. The putative signal peptide predicted at the N-terminus was not needed for p27 localization in mitochondria, in line with the dispensability of putative MTSs at the N-terminus of MNSV p29 and CIRV p36 [Mochizuki *et al.*, 2009; Weber-Lotfi *et al.*, 2002]. Instead, a predominant role of a region contained among aa residues 21 and 50 was highlighted and a lesser, but significant contribution of the C-terminus (residues 216-243) could also be ascertained. In fact, the latter region seems to be operative by itself in directing the protein to mitochondria but the segregating localization pattern of the derivatives containing this segment but lacking the N-terminal region (see mutant 3 in Fig. 4 and Fig. 6), suggests it has limited targeting potential. *In silico* analysis of the protein did not revealed clear structural traits in the delineated regions. The unique TM predicted at the N-terminus, among positions 8-28, was not entirely required for perfect localization of the protein to mitochondria as mutant 8 (Fig. 5), with just eight residues of the predicted TM, showed the same localization pattern as the wt protein. On the

basis of this observation and of the lack of a putative TM in the C-terminal region, we considered the possibility of p27 being associated to membrane throughout surface (SM) helices, that are parallel to or “horizontal” at the membrane bilayer, rather than through TM helices. SM helices are difficult to characterize due to the problems in obtaining high-resolution structural data [reviewed by Orgel, 2004; 2006]. They have been proposed to play an ancillary role to TM helices though they might mediate binding to membranes in the absence of membrane-spanning helices [Garavito *et al.*, 1995; Lomize *et al.*, 2006]. We have applied a protocol developed by Orgel (2004, 2006) for distinguishing SM helical sequences from helices that are membrane-embedded or located in extra-membranous domains. Through this method, two SM helices could be predicted in p27 (Fig. 8). Remarkably, SM1 and SM2 would be enclosed, respectively, within the N- and the C-terminal stretches required for mitochondrial targeting, suggesting that they could be important for subcellular localization. Further investigation will help to establish whether this prediction fits the real situation.

In agreement with the subcellular distribution of p27 revealed by confocal microscopy, the protein co-fractionated with mitochondria isolated from transformed yeast cells. Biochemical analyses suggested a tight association of the replicase protein with membranes though it was partially displaced from mitochondrial fractions through carbonate or

urea treatments. Such displacement may further support the hypothesis that the association of the protein with the membranes occurs via surface helices that might promote strong association to membranes [Garavito *et al.*, 1995; Lomize *et al.*, 2006] but logically weaker than that provided by truly integration throughout TMs. We cannot, however, dismiss other scenarios with the present data including interaction of p27 with charged lipid head groups or with other membrane proteins. An example of the latter case is provided by the tobamovirus replicase proteins that are closely associated to membranes despite that they do not contain membrane-targeting signals or membrane-spanning regions, an association that seems to be mediated by interaction with a seven-pass transmembrane protein [reviewed by Ishibashi *et al.*, 2010].

No obvious similarities can be detected among the regions that direct mitochondrial targeting of PFBV p27 and of CIRV p36 or MNSV p29. Another striking distinction concerns to the absence of noticeable membrane proliferation or mitochondrial aggregation in PFBV p27-expressing cells in contrast with that observed in cells expressing CIRV p36 or MNSV p29 [Mochizuki *et al.*, 2009; Rubino *et al.*, 2000]. This observation was not surprising as mitochondrial membrane proliferation is absent in natural infections by PFBV and only dilation of mitochondrial cristae is observed [see Lesemann & Adam, 1994]. Therefore, no proliferation of the mitochondrial outer membrane should be expected upon expression of the p27 alone. These results suggest that related small replication proteins may differ in their “modus operandi” and expands the diversity found among this type of products in the family *Tombusviridae* that, despite their moderate-to-high sequence homology, are each selectively targeted to a specific organelle. Such organelle may be dissimilar among members of the same genus [McCartney *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2004; Panavas *et al.*, 2005] or even among isolates of the same virus [Koenig *et al.*, 2009].

Though no specific approaches to test it have been done, it is reasonable to assume that p27 associates with the outer membrane rather than with internal compartments of mitochondria, as proposed for other viral replicase proteins targeted to this organelle [Miller *et al.*, 2001; Weber-Lotfi *et al.*, 2002]. This localization may allow efficient multiplication of the viral genome excluding the need for a putative transmembrane transport of the genomic RNA to access the viral replication complex [Ciuffreda *et al.*, 1998]. Signals directing proteins to the outer mitochondrial membrane may be quite diverse but most of these proteins depend on surface-exposed import receptors for membrane attachment [Chacinska *et al.*, 2009]. In addition, other cellular factors,

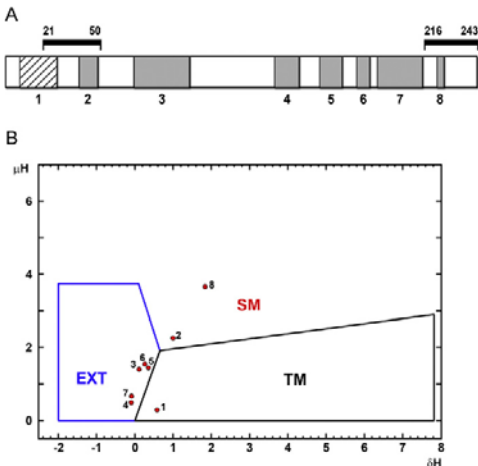


Fig. 8. (A) Schematic representation of  $\alpha$ -helices predicted in p27 sequence. Helix 1 (striped box), corresponding to the only TM region (8–28 aa) obtained from a set of softwares, is located at N-terminus extreme. Other helices (gray boxes) resulting from the use of NPSA, are distributed along the sequence: Helix 2 (39–49), Helix 3 (67–96), Helix 4 (139–152), Helix 5 (162–174), Helix 6 (181–188), Helix 7 (191–215) and Helix 8 (222–226). Regions involved in mitochondrial targeting (21–50 and 216–243) are showed on top as black bars. (B) Output plot from HHELIX applied to the predicted helices. Partitioning into surface helical (SM), membrane-spanning (TM) or located in extramembranous domains (EXT) is marked by boundary boxes.  $\mu\text{H}$  (Y-axis): hydrophobic moment with aromatic weight.  $\delta\text{H}$  (X-axis): average hydrophobicity with aromatic weight added.

including chaperones, may have a role in delivery of proteins to mitochondria [Beddoe & Lithgow, 2002; Chacinska *et al.*, 2009]. Assessment of the subcellular localization of GFP-tagged p27 in a selected series of knockout yeast strains has shown no noticeable effect of the suppressed genes in p27 mitochondrial targeting despite several components of the TOM or the SAM complexes (Table 1) were included. These results would be in line with those obtained by Weber-Lotfi *et al.* (2002) showing that insertion CIRV p36 in the outer mitochondrial membrane was independent on surface-accessible receptors. It should be noted, however, that a later study revealed, through bimolecular fluorescence complementation, an interaction of CIRV p36 with some proteins of the TOM complex [Hwang *et al.*, 2008], and thus a potential participation of import receptors in mitochondrial localization of the CIRV replicase cannot be completely ruled out. We can neither discard that elements of the TOM/SAM machinery that were not tested in the present work play a role in p27 sorting to mitochondria. In any case, no requirement of receptors for targeting to the outer mitochondrial membrane would not be exceptional as some cellular proteins have been reported to associate to this subcompartment without the aid of any cytosolic factor or TOM component [Kemper *et al.*, 2008; Setoguchi *et al.*, 2006] and it has been postulated that other proteins could also follow receptor-independent routes [Chacinska *et al.*, 2009]. An important element in these alternative routes could be the unique lipid composition of the mitochondrial outer membrane, which shows the lowest ergosterol content among all membranes facing the cytosol [Zinser *et al.*, 1993].

Finally, the finding of an association between PFBV p27 and mitochondrial membranes opens the possibility that the protein could modify mitochondrial functions during infection to favour viral replication. Such hypothesis has been raised for other plus strand RNA viruses though it has not been formally tested [Schwer *et al.*, 2004]. Further work is needed to explore this issue and to fully characterize the mode by which p27 is targeted to mitochondria.

### Acknowledgements

We are indebted to Luisa Rubino for plasmid p36K-GFP and to Amparo Pascual-Ahuir/Markus Proft lab, including Mar Martínez-Pastor, for advice with mitochondria fractions and yeast mutants. We also thank Dolores Arocas and Isabella Avellaneda for excellent technical assistance. This research was supported by grant BFU2006-11230 and BFU2009-11699 from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC, Spain) and by grants ACOM/2006/210 and

ACOMP/2009/040 (Generalitat Valenciana, GV) to C. H. S. M.-T. was the recipient of a predoctoral fellowship from GV and of a predoctoral contract from MEC.

### References

- Ahlquist, P., Noueiry, A.O., Lee, W.M., Kushner, D.B. & Dye, B.T. (2003). Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J. Virol.* **77**: 8181-8186.
- Arai, M., Mitsuke, H., Ikeda, M., Xia, J.X., Kikuchi, T., Satake, M. & Shimizu, T. (2004). ConPred II: a consensus prediction method for obtaining transmembrane topology models with high reliability. *Nucleic Acids Res.* **32**: W390-W393.
- Batten, J.S., Turina, M. & Scholthof, K.B. (2006). Panicovirus accumulation is governed by two membrane-associated proteins with a newly identified conserved motif that contributes to pathogenicity. *Virol. J.* **3**: 12.
- Beddoe, T. & Lithgow, T. (2002). Delivery of nascent polypeptides to the mitochondrial surface. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**: 35-39.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. & Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**: 783-795.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T. & Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**: 628-644.
- Ciuffreda, P., Rubino, L. & Russo, M. (1998). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of galinsoga mosaic virus genomic RNA. *Arch. Virol.* **143**: 173-180.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. & Deléage, G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 147-150.
- Cserző, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. & Elofsson, A. (1997). Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Prot. Eng.* **10**: 673-676.
- Denison, M.R. (2008). Seeking membranes: Positive-strand RNA virus replication complexes. *PLoS Biol.* **6**: e270.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. & von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**: 1005-1016.
- Fernández-Miragall, O. & Hernández, C. (2011). An internal ribosome entry site directs translation of

the 3'-gene from *Pelargonium flower break virus* genomic RNA: implications for infectivity. *PLoS One* **6**: e22617.

**Galao, R.P., Scheller, N., Alves-Rodríguez, I., Breinig, T., Meyerhans, A. & Díez, J.** (2007). *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile eukaryotic system in virology. *Microb. Cell Fact.* **6**: 32.

**Garavito, R.M., Picot, D. & Loll, P.J.** (1995). The 3.1 Å X-ray crystal structure of the integral membrane enzyme prostaglandin H2 synthase-1. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* **23**: 99-103.

**Hua, S. & Sun, Z.** (2001). Support vector machine approach for protein subcellular localization prediction. *Bioinformatics* **17**: 721-728.

**Hawkins, J. & Bodén, M.** (2006). Detecting and sorting targeting peptides with neural networks and support vector machines. *J. Bioinform. Comput. Biol.* **4**: 1-18.

**Hofmann, K. & Stoffel, W.** (1993). TMBASE - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**: 166-170.

**Hwang, Y.T., McCartney, A.W., Gidda, S.K. & Mullen, R.T.** (2008). Localization of the *Carnation Italian ringspot virus* replication protein p36 to the mitochondrial outer membrane is mediated by an internal targeting signal and the TOM complex. *BMC Cell Biol.* **9**: 54.

**Ishibashi, K., Nishikiori, M. & Ishikawa, M.** (2010). Interactions between tobamovirus replication proteins and cellular factors: their impacts on virus multiplication. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**: 1413-1419.

**Juretić, D., Zoranić, L. & Zucić, D.** (2002). Basic charge clusters and predictions of membrane protein topology. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **42**: 620-632.

**Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.

**Käll, L., Krogh, A. & Sonnhammer, E.L.** (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction-the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.* **35**: W429-W432.

**Kemper, C., Habib, S.J., Engl, G., Heckmeyer, P., Dimmer, K.S. & Rapaport, D.** (2008). Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. *J. Cell Sci.* **121**: 1990-1998.

**Koenig, R., Lesemann, D.E. & Pfeilstetter, E.** (2009). New isolates of *Carnation Italian ringspot virus* differ from the original one by having replication-associated proteins with a typical

tombusvirus-like N-terminus and by inducing peroxisome- rather than mitochondrion-derived multivesicular bodies. *Arch. Virol.* **154**: 1695-1698.

**Koonin, E.V.** (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **72**: 2197-2206.

**Koonin, E.V. & Dolja, V.V.** (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 375-430.

**Kuo-Chen, Ch. & Hong-Bin, S.** (2010). A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: Euk-mPLoc 2.0. *PLoS One* **5**: e9931.

**Lesemann, D.E. & Adam, G.** (1994). Electron microscopical and serological studies on four isometrical *Pelargonium* viruses. *Acta Hortic.* **377**: 41-54.

**Lomize, M.A., Lomize, A.L., Pogozheva, I.D. & Mosberg, H.I.** (2006). OPM: Orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics* **22**: 623-625.

**McCartney, A.W., Greenwood, J.S., Fabian, M.R., White, K.A. & Mullen, R.T.** (2005). Localization of the *Tomato bushy stunt virus* replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *Plant Cell* **17**: 3513-3531.

**Mackenzie, J.** (2005). Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic* **6**: 967-977.

**Martínez-Turiño, S. & Hernández, C.** (2009). Inhibition of RNA silencing by the coat protein of *Pelargonium flower break virus*: distinctions from closely related suppressors. *J. Gen. Virol.* **90**: 519-525.

**Martínez-Turiño, S. & Hernández, C.** (2010). Identification and characterization of RNA binding activity in the ORF1-encoded replicase protein of *Pelargonium flower break virus*. *J. Gen. Virol.* **91**: 3075-3084.

**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**: 310-319.

**Miller, D.J., Schwartz, M.D. & Ahlquist, P.** (2001). *Flock house virus* RNA replicates on outer mitochondrial membranes in *Drosophila* cells. *J. Virol.* **75**: 11664-11676.

**Mochizuki, T., Hirai, K., Kanda, A., Ohnishi, J., Ohki, T. & Tsuda, S.** (2009). Induction of necrosis via mitochondrial targeting of *Melon necrotic spot*

- virus replication protein p29 by its second transmembrane domain. *Virology* **390**: 239-249.
- Nagy, P.D.** (2008). Yeast as a model host to explore plant virus-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**: 217-242.
- Nakai, T., Yasuhara, T., Fujiki, Y. & Ohashi, A.** (1995). Multiple genes, including a member of the AAA family, are essential for degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome c oxidase in yeast mitochondria. *Mol. Cell Biol.* **15**: 4441-4452.
- Navarro, B., Rubino, L. & Russo, M.** (2004). Expression of the *Cymbidium ringspot virus* 33-kilodalton protein in *Saccharomyces cerevisiae* and molecular dissection of the peroxisomal targeting signal. *J. Virol.* **78**: 4744-4752.
- Orgel, J.P.** (2004). Sequence context and modified hydrophobic moment plots help identify 'horizontal' surface helices in transmembrane protein structure prediction. *J. Struct. Biol.* **148**: 51-65.
- Orgel, J.P.** (2006). Surface-active helices in transmembrane proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **7**: 553-560.
- Panavas, T., Hawkins, C.M., Panaviene, Z. & Nagy, P.D.** (2005). The role of the p33:p33/p92 interaction domain in RNA replication and intracellular localization of p33 and p92 proteins of Cucumber necrosis tomosvirus. *Virology* **338**: 81-95.
- Peña, L., Cervera, M., Ghorbel, R., Domínguez, A., Fagoaga, C., Juárez, J., Pina, J.A. & Navarro, L.** (2003). Transgenic citrus, in: Singh, I.R.P., Jaiwal, P.K. (Eds.), *Plant Genetic Engineering, Improvement of Commercial Plants* (Volume 3). SCI Tech Publishing LLC, Houston, TX, USA, pages 261-282.
- Pogany, J., White, K.A. & Nagy, P.D.** (2005). Specific binding of tomosvirus replication protein p33 to an internal replication element in the viral RNA is essential for replication. *J. Virol.* **79**: 4859-4869.
- Poot, M., Zhang, Y.Z., Krämer, J.A., Wells, K.S., Jones, L.J., Hanzel, D.K. Lugade, A.G., Singer, V.L. & Haugland, R.P.** (1996). Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J. Histochem. Cytochem.* **44**: 1363-1372.
- Rajendran, K.S. & Nagy, P.D.** (2003). Characterization of the RNA-binding domains in the replicase proteins of tomato bushy stunt virus. *J. Virol.* **77**: 9244-9258.
- Rajendran, K.S. & Nagy, P.D.** (2006). Kinetics and functional studies on interaction between the replicase proteins of *Tomato bushy stunt virus*: requirement of p33:p92 interaction for replicase assembly. *Virology* **345**: 270-279.
- Rico, P. & Hernández, C.** (2004). Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pelargonium flower break virus*. *Arch. Virol.* **149**: 641-651.
- Rico, P. & Hernández, C.** (2006). Infectivity of in vitro transcripts from a full-length cDNA clone of *Pelargonium flower break virus* in an experimental and a natural host. *J. Plant Path.* **88**: 103-106.
- Rose, A., Lorenzen, S., Goede, A., Gruening, B. & Hildebrand, P.W.** (2009). RHYTHM - a server to predict the orientation of transmembrane helices in channels and membrane-coils. *Nucleic Acids Res.* **37**: W575-W580.
- Rost B.** (1996). PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol.* **266**: 525-539.
- Rubino, L., Di Franco, A. & Russo, M.** (2000). Expression of a plant virus non-structural protein in *Saccharomyces cerevisiae* causes membrane proliferation and altered mitochondrial morphology. *J. Gen. Virol.* **81**: 279-286.
- Rubino, L., Weber-Lotfi, F., Dietrich, A., Stussi-Garaud, C. & Russo, M.** (2001). The open reading frame 1-encoded ("36K") protein of *Carnation Italian ringspot virus* localizes to mitochondria. *J. Gen. Virol.* **82**: 29-34.
- Salonen, A., Ahola, T. & Kääriäinen, L.** (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **285**: 139-173.
- Setoguchi, K., Otera, H. & Mihara, K.** (2006). Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO J.* **25**: 5635-5647.
- Siggers, K.A. & Lesser, C.F.** (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile model system for the identification and characterization of bacterial virulence proteins. *Cell Host and Microbe* **4**: 8-15.
- Stork, J., Kovalev, N., Sasvari, Z. & Nagy, P.D.** (2011). RNA chaperone activity of the tomosviral p33 replication protein facilitates initiation of RNA synthesis by the viral RdRp *in vitro*. *Virology* **409**: 338-347.
- Schwer, B., Ren, S., Pietschmann, T., Kartenbeck, J., Kaehlcke, K., Bartenschlager, R., Yen, T.S. & Ott, M.** (2004). Targeting of *Hepatitis C virus* core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *J. Virol.* **78**: 7958-7968.
- Turner, K.A., Sit, T.L., Callaway, A.S., Allen, N.S. & Lommel, S.A.** (2004). *Red clover necrotic mosaic virus* replication proteins accumulate at the endoplasmic reticulum. *Virology* **320**: 276-290.

Viklund, H. & Elofsson, A. (2008). OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar. *Bioinformatics* **24**: 1662-1668.

Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M. & Rothstein, R. (1989). A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* **58**: 409-419.

Weber-Lotfi, F., Dietrich, A., Russo, M. & Rubino, L. (2002). Mitochondrial targeting and membrane anchoring of a viral replicase in plant and yeast cells. *J. Virol.* **76**: 10485-10496.

Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D.J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N.,

Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J.L., Riles, L., Roberts, C.J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T.R., Wysocki, R., Yen, G.S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M. & Davis, R.W. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**: 901-906.

Yu, C.S., Chen, Y.C., Lu, C.H. & Hwang, J.K. (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins* **64**: 643-651.

Yuan, Z., Mattick, J.S. & Teasdale, R.D. (2004). SVMtm: support vector machines to predict transmembrane segments. *J. Comput. Chem.* **25**: 632-636.

Zinser, E., Paltauf, F. & Daum, G. (1993). Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *J. Bacteriol.* **175**: 2853-2858.

## Appendix A. Supplementary data

### Supplementary Table S1. List of primers used in this work

Primer	Position <sup>a</sup>	Sequence <sup>b</sup>	
CH67	32-58 (S)	5'-GGCCATGgTACGATTCGGATCTCAGTTAG-3'	(NcoI)
CH70	741-761 (AS)	5'-GTCCATGGcTTTGGTGAACCGACAGGCTC-3'	(NcoI)
CH113	132-151(S)	5'-CCAAGCTTATGGTAGTGGAATTC AACCTCCG-3'	(HindIII)
CH114	660-677 (AS)	5'-GGCCATGgCGCGGAGTAGCTCCTGCTG-3'	(NcoI)
CH115	93-110 (S)	5'-CCAAGCTTATGGTCGGGCTGGCAGGCCTG-3'	(HindIII)
CH150	32-51 (S)	5'-GGGGATCCATGCTACGATTCGGATCTC-3'	(BamHI)
CH162	248-267 (S)	5'-GGAAGCTTATGGAGGTGAGGAAGGACCTCG-3'	(HindIII)
CH163	477-498 (AS)	5'-GGCCATGGGCTCGCGCACTTACCCACGAG-3'	(NcoI)
CH182	2281-2300 (AS)	5'-GGCCATGgCCTTTAGAAGCCATTCAATTG-3'	(NcoI)
CH215	550-572 (AS)	5'-CCCCATGGgATGGTGGTCTGGGGTGAAAATAG-3'	(NcoI)
CH222	1-20 (S)	5'-CAACTAGTGGCCGCAAATTAAGCCTTC-3'	(SpeI)
CH223	842-867 (AS)	5'-GAACTAGTACGGATTAGAAGCCGCCGAG-3'	(SpeI)
CH228	502-518 (AS)	5'-CACCATGgGTGTGCTGCACCACTAAGC-3'	(NcoI)
CH318	183-201 (S)	5'-CCAAGCTTATGGACCCATTTAATGCCCTCC-3'	(HindIII)

a Positions of the PFBV genome or the pYES 2.0 plasmid vector (CH222 and CH223) covered by the primers. (S) and (AS): sense and antisense.

b Restriction sites introduced for cloning purposes are underlined and lowercase indicate nucleotide substitutions to PFBV wt sequence.

# CAPÍTULO II







## Identification and characterization of RNA-binding activity in the ORF1-encoded replicase protein of *Pelargonium* flower break virus

Sandra Martínez-Turiño and Carmen Hernández

Correspondence  
Carmen Hernández  
cahernan@ibmcp.upv.es

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

*Pelargonium flower break virus* (PFBV) belongs to the genus *Carmovirus* (family *Tombusviridae*) and, as with the remaining members of the group, possesses a monopartite genome of single-stranded, positive-sense RNA that contains five ORFs. The two 5'-proximal ORFs (ORFs 1 and 2) encode two polypeptides of 27 and 86 kDa (p27 and p86), respectively, that show homology with replication proteins. The p27 does not present any motif to explain its presumed involvement in replication, while p86 has the motifs conserved in RNA-dependent RNA polymerases. In this work, we have confirmed the necessity of p27 and p86 for PFBV replication. To gain insights into the function(s) of p27, we have expressed and purified the protein from *Escherichia coli* and tested its ability to bind RNA *in vitro*. The results have shown that p27 is able to bind ssRNA with high affinity and in a cooperative fashion and that it is also capable of binding other types of nucleic acids, though to a lesser extent. Additionally, competition experiments suggest that p27 has a preference for PFBV-derived ssRNAs. Using truncated forms of p27, it can be concluded that several regions of the protein contribute to its RNA-binding properties and that this contribution is additive. This study is the first to show nucleic acid-binding ability of the ORF1 product of a carmovirus and the data obtained suggest that this product plays an essential role in selection and recruitment of viral RNA replication templates.

Received 26 April 2010  
Accepted 3 September 2010

### INTRODUCTION

Multiplication of viral RNA genomes requires specific interaction between the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and its cognate RNAs. Despite this, only minimal detailed information is available for this type of interaction [reviewed by Kim & Kao, 2008]. Studies focused on analysing RNA-binding activity of auxiliary (virus- or host-encoded) replication proteins are yet scarcer, even though such proteins may be crucial in the selection and recruitment of viral RNA replication templates, the promotion of the hallmark asymmetrical (+) and (-) RNA synthesis or the switch from viral RNA translation to replication [Ahlquist *et al.*, 2003; Wang & Nagy, 2008].

*Pelargonium flower break virus* (PFBV) is a member of the genus *Carmovirus* and, as do most members of the family *Tombusviridae* [Lommel *et al.*, 2005], possesses a monopartite genome composed of a single-stranded (ss), positive-sense genomic RNA that harbours five ORFs [Rico & Hernández, 2004]. The translation products of the two 5'-proximal ORFs, ORFs 1 and 2, are proteins of 27 and 86 kDa (p27 and p86), respectively, and reverse genetics experiments with the homologous proteins of other carmoviruses have shown that both are indispensable for viral

replication [Genovés *et al.*, 2006; Hacker *et al.*, 1992]. Two internal ORFs encode small proteins that are probably involved in viral movement, and the 3'-proximal ORF encodes a polypeptide, which plays a dual role as capsid protein and as suppressor of RNA silencing [Martínez-Turiño & Hernández, 2009]. As occurs in most members of the *Tombusviridae*, ORF2 must be translated from the genomic RNA by readthrough of the leaky stop codon of ORF1 and, thus, p86 contains the sequence of p27 at the N terminus while its C-terminal portion presents the signature motifs of the RdRps [Koonin & Dolja, 1993]. Based on the presence of these motifs, the predicted function of p86 is to synthesize viral RNA progeny and subgenomic RNAs for expression of the internal and 3'-terminal genes. Conversely, p27 does not contain obvious motifs that explain its presumed involvement in viral replication [Habili & Symons, 1989].

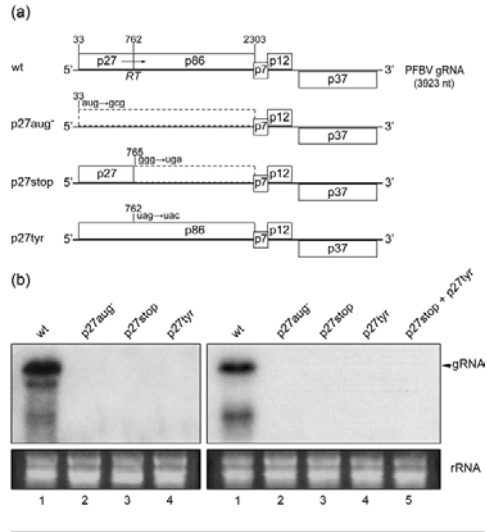
As a consequence of the translation strategy that gives rise to p86, p27 is produced at much higher amounts than p86. This suggests that p27, as proposed for equivalent proteins of the genus *Tombusvirus* [White & Nagy, 2004], may be a pivotal protein with diverse functions during the replication process. Our recent work indicates that specifically associates with mitochondrial membranes [S. Martínez-Turiño & C.

Hernández, unpublished results], paralleling the results obtained with the ORF1 products of other *Tombusviridae* that contain sorting signals for subcellular localization [Mochizuki *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2004; Panavas *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2004; Weber-Lotfi *et al.*, 2002]. Besides its potential to target the replicative complex to specific cellular membranes, it could recruit viral RNA templates and other protein (viral- or host-coded) components required for RNA synthesis. To gain insights into the function(s) of p27, we report experiments aimed at confirming its requirement for viral replication and at assessing its RNA binding properties. We present evidence showing that p27 is indeed essential for replication and interacts *in vitro* with RNA, which has not been previously reported for any member of the genus *Carmovirus*. In addition, we have analysed the contribution of different protein regions to RNA binding. The results indicate the presence of redundant information for RNA binding suggesting that the virus has evolved to ensure that a p27 key activity is preserved.

## RESULTS

### Both p27 and p86 are involved in PFBV replication

The requirement for the translation products of ORFs 1 and 2 for viral replication has so far been verified for two species of the genus *Carmovirus*, *Turnip crinkle virus* (TCV) and *Melon necrotic spot virus* [Genovés *et al.*, 2006; Hacker *et al.*, 1992], as well as for members of other genera of the family *Tombusviridae* [Castaño *et al.*, 2009; Molnár *et al.*, 1997; White & Nagy, 2004]. In order to confirm that p27 and p86 of PFBV play a similar role, three different mutants were generated using an infectious viral cDNA clone [pSP18-IC; Rico & Hernández, 2006] as the template: (i) p27aug<sup>-</sup>, which lacks the initiation codon of the first two ORFs (p27/p86); (ii) p27stop, bearing two stop codons in tandem that terminate ORF1; and (iii) p27tyr, in which the leaky stop codon of ORF1 has been replaced by a Tyr encoding triplet (Fig. 1a). Inoculation of *Chenopodium quinoa* plants with transcripts derived from the mutant constructs did not induce local lesions on the inoculated leaves, in contrast to inoculation with RNAs synthesized from the wild-type (wt) pSP18-IC clone (not shown). A Northern blot analysis confirmed the absence of PFBV in leaves inoculated with p27aug<sup>-</sup>, p27stop and p27tyr (Fig. 1b, left panel). Transfection of protoplasts with the latter mutants revealed that none of them accumulated at detectable levels, indicating that, as expected, replication is the step of the infectious cycle affected by the corresponding mutations (Fig. 1b,



**Fig. 1.** Bioassay of PFBV mutants. (a) Schematic representation of wt PFBV genomic RNA and derived mutants p27aug<sup>-</sup>, p27stop and p27tyr. Open boxes correspond to predicted ORFs. Numbers above ORFs 1 and 2, encoding proteins p27 and p86, respectively, indicate nucleotide positions of the codons that define each ORF. Nucleotide substitutions were introduced into the full-length cDNA clone pSP18-IC leading to triplet changes that are depicted for each mutant. In mutants, dashed boxes correspond to ORFs that are not expected to be translated. RT, Stop codon readthrough. (b) Northern blot analysis of total RNA from *C. quinoa* leaves (left panel) or protoplasts (right panel) inoculated with transcripts derived from the wt construct pSP18-IC (lane 1) and from the mutant constructs p27aug<sup>-</sup>, p27stop and p27tyr (lanes 2–4, respectively); a mixture of p27stop and p27tyr was also used for protoplast inoculation (lane 5 in the right panel). The band corresponding to the PFBV genomic RNA (gRNA) is indicated by an arrow; lower bands correspond to subgenomic RNAs. A loading control of cellular RNA is included at the bottom.

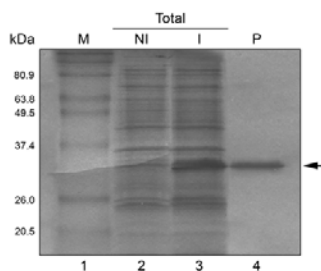
right panel) and thus confirming the involvement of p27 and p86 in replication. Remarkably, coinoculation of protoplasts with p27stop and p27tyr did not restore the defect of each individual mutant, as no viral RNAs could be detected in this type of assay (lane 5 in the right panel of Fig. 1b).

### *In vitro* RNA binding by recombinant p27

To obtain suitable amounts of p27 for *in vitro* studies, the p27 gene was PCR-amplified from the plasmid pSP18-IC and cloned into the *Escherichia coli* expression vector pET-23d(+), which allowed fusion of a hexa-His tag at the C terminus of p27. Chromatography on nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) columns of proteins from induced cultures expressing His-tagged p27 resulted in highly purified preparations of the recombinant protein, with an electrophoretic mobility consistent with that expected for its predicted molecular mass (28.8 kDa,

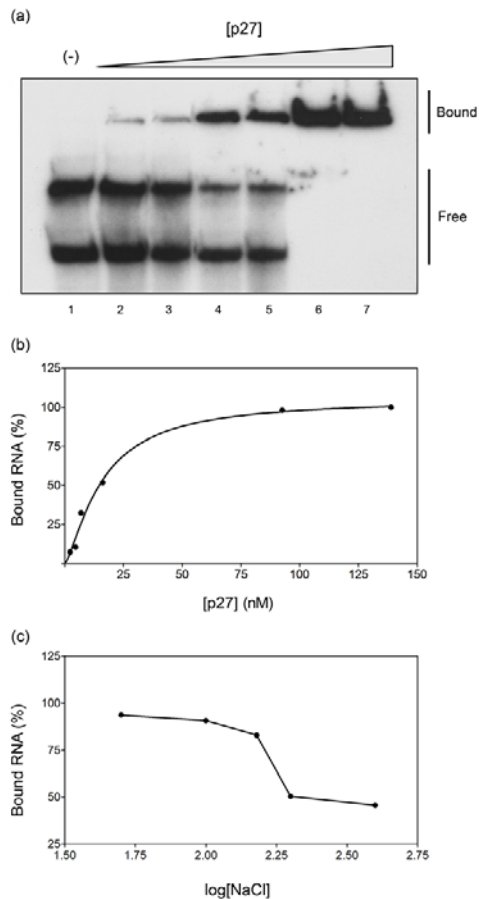
considering the size of the wt protein plus six additional amino acids resulting from the cloning procedure and the hexa-His tag at the C terminus) (Fig. 2). Western-blot analysis of a parallel gel confirmed that the prominent band in the purified preparations indeed corresponded to the full-length p27, because it reacted specifically with an anti-His6 antibody (not shown).

Possible nucleic acid-binding capability of p27 was studied by electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) using a  $^{32}\text{P}$ -labelled ssRNA probe (3'-PFBV, encompassing the 3'-terminal region of the PFBV genome) and increasing amounts of the recombinant His-tagged protein. This approach showed that p27 could bind RNA efficiently *in vitro*. The protein started to retard the probe at a concentration of 3 nM and retarded it completely at and above 93 nM (Fig. 3a). The RNA bound to the recombinant p27 essentially stayed in the well, probably due to the large size of the complex. Addition of BSA instead of p27 in control binding reactions did not lead to a change in RNA mobility (Supplementary Fig. S1, available in JGV Online), indicating that the RNA shift observed with p27 was not the result of non-specific protein-RNA interactions. The binding of distinct amounts of His-tagged p27 with a constant amount of the probe exhibited an 'all-or-none' behaviour, as no intermediately shifted bands (resulting from limited binding of the probe by p27) between the completely bound and free probe were detected in the EMSA. This observation is consistent with a cooperative binding of p27, in which most of the RNAs are either covered by p27 or are not bound to it at all [Citovsky *et al.*, 1990; Lohman *et al.*, 1986].



**Fig. 2.** Expression and purification of PFBV p27 in *E. coli*. Proteins were analysed by 15% SDS-PAGE and subjected to Coomassie blue staining. Lanes: 1, protein markers with their molecular masses (in kDa) indicated on the left; 2 and 3, total proteins from *E. coli* non-induced (NI) and induced (I) cultures transformed with construct pET-p27 which allowed expression of p27 fused to a His tag; 4, purified preparation (P) of His-tagged p27. The position of recombinant p27 is indicated by an arrow.

To analyse the binding data further, non-linear regression was applied (Fig. 3b).



**Fig. 3.** Analysis of RNA-binding properties of PFBV p27 *in vitro*. (a) Representative EMSA showing interactions between the recombinant p27 and ssRNA. The  $^{32}\text{P}$ -labelled 3'-PFBV ssRNA probe (at 33 pM) was incubated with no protein (lane 1) or with the His-tagged p27 at 3, 7, 17, 24, 93 or 139 nM (lanes 2–7, respectively). The unbound, free RNA probe and the shifted (bound) RNA complexes are marked on the right. The two bands observed for the free probe correspond to two different conformations of the RNA, as they migrated as a single band after heat treatment; moreover, their relative ratio did not change significantly after denaturing and snap-cooling assays with dilutions of the RNA, indicating that the upper band does not result from dimerization of the probe but rather from intramolecular folding (not shown). (b) Best-fit curve of the binding data determined by non-linear regression. The curve depicts the single experiment shown in (a), but the analysis was repeated at least three times with similar results. (c) Influence of NaCl concentration on the RNA-binding activity of PFBV p27. The fraction of bound ssRNA was plotted against  $\log[\text{NaCl}]$  (NaCl concentration in mM) to calculate the  $\text{IC}_{50}$ .

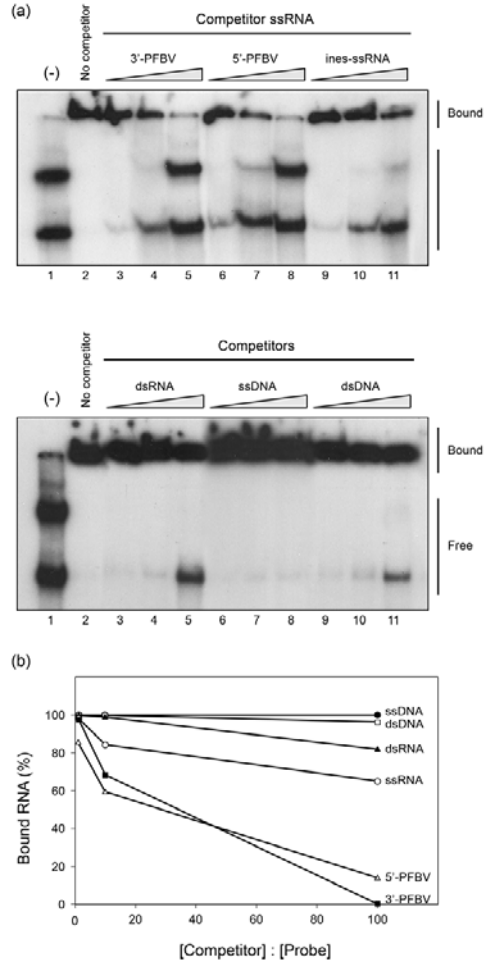
RNA–protein complex formation was measured as the disappearance of the band corresponding to the unbound RNA from the EMSA [Carey, 1991; Daròs & Carrington, 1997; Marcos *et al.*, 1999]. From the non-linear regression adjustment, an apparent  $K_d$  of 11 nM could be determined. In addition, the slope of the best-fit curve ( $h$  or Hill slope) was found to be 1.4, supporting the notion of p27 ssRNA binding being cooperative ( $h=1$  is indicative of no cooperativity, whereas values above 1 point to positive cooperativity).

EMSA were also conducted using different salt concentrations in the presence of an amount of p27 that was sufficient to bind all ssRNA molecules. The appearance of free RNA was quantified to evaluate complex dissociation and the NaCl concentration at which binding was reduced to 50% of maximal levels ( $IC_{50}$ ) was 390 mM (Fig. 3c). The stability of the p27–ssRNA complex at relatively high salt concentrations resembled that observed with other RNA-binding proteins from plant viruses [Herranz & Pallás, 2004; Li & Palukaitis, 1996; López *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2006; Richmond *et al.*, 1998; Wobbe *et al.*, 1998] and suggested that p27–RNA complex formation is not due solely to the electrostatic interactions between the nucleic acid and the protein.

**Differential affinities of p27 for distinct types of nucleic acids**

To assess the ability of p27 to discriminate among different types of nucleic acids, formation of the protein complex with the ssRNA substrate was challenged by titrating the binding reactions with unlabelled competitors. The mixtures included 0.1 ng  $^{32}$ P-labelled 3'-PFBV ssRNA, the recombinant p27 at a concentration (93 nM) that resulted in complete retardation of the ssRNA probe in the absence of competitors and increasing amounts of unlabelled nucleic acids (1-, 10- and 100-fold molar excess over the radiolabelled probe) corresponding to either PFBV-derived ssRNAs (3'-PFBV, same as the probe, and 5'-PFBV, encompassing the 5' region of the viral genome) or ssRNA, dsRNA, ssDNA and dsDNA molecules of heterologous origin. The effect of the inclusion of competitors was evaluated by EMSA (Fig. 4a). The competition data were analysed by a plot of the probe fraction bound to the protein in the presence of competitor vs the [competitor] : [probe] ratio (Fig. 4b). These experiments showed that the ssRNAs were the best competitors, whereas dsRNA, ssDNA and dsDNA templates were relatively poor competitors under the experimental conditions used. Comparison of results with ssRNA competitors of similar sizes corresponding to the 5'-region of the PFBV genome, to the 3'-region or to a non-specific

sequence suggested that p27 preferably binds PFBV-derived ssRNAs. Collectively, the data suggested that p27 is an ssRNA-binding protein, although it is also capable of binding other nucleic acids.



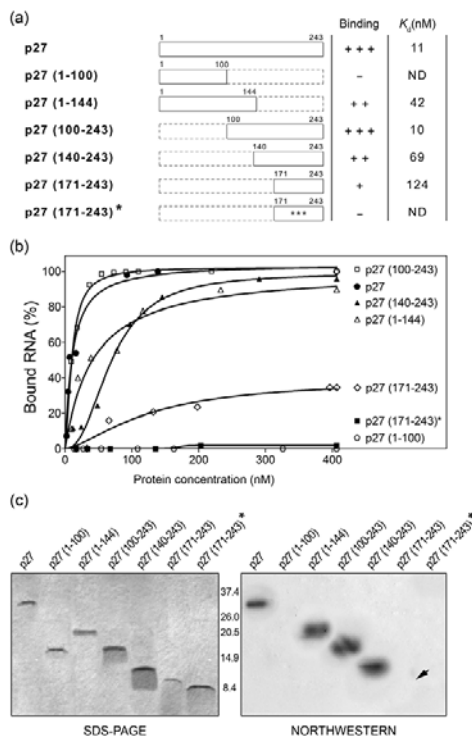
**Fig. 4.** Effect of competitors on the ssRNA binding of p27 determined by EMSA. (a) Standard binding assay, containing p27 (at 93 nM) and  $^{32}$ P-labelled 3'-PFBV ssRNA probe (at 33 pM), was performed in the absence (lane 2) or presence (lanes 3–11) of increasing amounts (1-, 10- and 100-fold molar excess) of unlabelled competitors as shown above the autoradiograms. Lanes 1, no protein. (b) Graphical representation of the EMSA results. The percentage of the RNA probe fraction bound to the protein in the presence of different competitors has been plotted against the competitor/probe molar ratio. The experiments were repeated twice with essentially identical results (data from one set of experiments are presented here).

### Identification of RNA-binding domain(s) of p27

In order to recognize the domain(s) of p27 responsible for its RNA-binding ability, we generated five truncated forms of the protein, p27(1–100), p27(1–144), p27(100–243), p27(140–243) and p27(171–243), or removing fragments of different sizes at its N- or C-terminal region (Fig. 5a). These p27 derivatives were fused to a hexa-His tag and purified in the same way as the wt p27. EMSAs with increasing amounts of the proteins were performed. Plots of the fraction of retarded probe at different protein concentrations showed that the truncated form p27(1–100) does not bind to RNA under the *in vitro* conditions, while p27(100–243) bound to the probe to an extent equivalent to that of the entire wt protein (Fig. 5a, b). Deletion of additional residues from the N terminus in the derivative p27(140–243) diminished RNA-binding affinity sixfold when compared with p27(100–243) ( $K_d=69$  nM vs 10 nM; Fig. 5). Further elimination of N-terminal residues in p27(171–243) did not abolish RNA-binding capability but this was reduced by about half with respect to the previous truncated p27(140–243) ( $K_d=124$  nM vs 69 nM). Additional assessment of the RNA-binding capacity of p27(171–243) was performed by replacing three arginines (positions 195–197 in the entire wt protein) by alanines, which yielded a protein, p27(171–243)\*, that was virtually inactive for RNA binding (Fig. 5b and Supplementary Fig. S2). Finally, the derivative p27(1–144) exhibited RNA-binding activity with an apparent  $K_d$  close to, though lower than, that estimated for p27(140–243) ( $K_d=42$  nM vs 69 nM), despite the fact that they do not share a significant common region (Fig. 5). Collectively, the results indicated that the central (residues 100–139) and C-terminal (residues 140–170 and 171–243) portions of p27 contribute to its RNA-binding activity and that this contribution seems to be additive as, according to the estimated  $K_d$  values, increasing RNA-binding affinities were found as segments of greater length were included [compare results for p27(100–243), p27(140–243) and p27(171–243) in Fig. 5].

To confirm that the retardation of the probe was actually the result of its interaction with the p27 derivatives and not with any contaminant *E. coli* protein(s) accompanying the purified preparations, a Northwestern assay was conducted. To this aim, the full-length p27 and deletion forms were resolved by SDS-PAGE and subsequently blotted on to a nitrocellulose membrane. Hybridization of the membrane with the  $^{32}$ P-labelled 3'-PFBV probe revealed signals in positions perfectly coincident with those corresponding to the full-length p27, p27(100–243), p27(140–243) and p27(1–144) (Fig. 5c). A weak

signal was also observed in a position coincident with p27(171–243) with longer exposures of the autoradiogram (not shown), whereas no signal could be detected in the portion of the membrane that contained p27(1–100) or p27(171–243)\*. Hence, the Northwestern results were consistent with those obtained by EMSA regarding the formation of complexes with RNA of p27 derivatives and confirmed that various regions of p27 are endowed with RNA binding properties.



**Fig. 5.** RNA-binding properties of p27 derivatives. (a) Schematic representation of p27 and deletion forms, with their ability to bind ssRNA and apparent  $K_d$  indicated on the right. Numbers in parentheses in the nomenclature of the deletion forms denote the amino acid residues of p27 retained in the corresponding truncated protein. Asterisks in mutant p27(171–243)\* symbolize replacement of three arginines by alanines. ND, Not determined. (b) RNA-binding curves of p27 derivatives and the wt protein included for comparison. The 3'-PFBV ssRNA probe (at 33 pM) was incubated with increasing amounts of the recombinant proteins and analysed by EMSA. The experiments were repeated three times with each protein with very similar results; a representative set of experiments is shown. (c) Northwestern analysis of p27 and deletion forms. Purified recombinant proteins were separated by 15% SDS-PAGE, as shown in the left panel after Coomassie blue staining, and transferred to a nitrocellulose membrane that was incubated with the  $^{32}$ P-labelled ssRNA probe (3'-PFBV) and autoradiographed, as shown in the right panel. The arrow marks a signal in the position of p27(171–243) that was detected with longer exposure.

## DISCUSSION

Through mutational analysis, in this work we have corroborated the involvement of the proteins p27 and p86, encoded by ORFs 1 and 2 of PFBV, in viral replication. These results are in agreement with those reported for other members of the family *Tombusviridae* which show that, besides the RdRp, the corresponding virus produces an additional, relatively small polypeptide that is indispensable for effective pathogen multiplication. The lack of complementation among p27stop and p27tyr mutants, which are impaired in p86 and p27 synthesis, respectively, suggests either a *cis*-preferential requirement for both viral replicase proteins and/or a coupling between translation and replication, as proposed for several members of the *Tombusviridae* [Okamoto *et al.*, 2008; Oster *et al.*, 1998; White *et al.*, 1995] and also other viral families [e.g. Lewandowski & Dawson, 2000; Neeleman & Bol, 1999]. It should nevertheless be noted that, within the family *Tombusviridae*, only the RdRp functioned in a *cis*-preferential manner in the case of *Red clover necrotic mosaic virus* (genus *Dianthovirus*) [Okamoto *et al.*, 2008], whereas the opposite situation (i.e. *cis*-preferential functioning of ORF1 product) was reported for TCV and *Tomato bushy stunt virus* (TBSV; genus *Tombusvirus*) [Oster *et al.*, 1998; White *et al.*, 1995]. Besides the probability that PFBV p27 and p86 do not function well *in trans*, the failure of p27- and p86-deficient PFBV mutants to accumulate in complementation assays might also be because (i) the tyrosine substitution introduced in p27tyr is not the best replacement for p86, (ii) the stoichiometry of p27 and p86 is suboptimal and/or (iii) the nucleotide changes introduced in each case lead to disruption of *cis*-acting elements. Concerning the last point, it is pertinent to mention that an RNA segment encompassing the readthrough portion of the RdRp coding region has been proposed to be involved in TBSV template recruitment into replication [Pogany *et al.*, 2005]. We cannot exclude that a similar internal recognition element was altered in p27stop and p27tyr mutants, which could account for the replication-incompetence of these viral RNAs.

As the virus-encoded RdRp is the catalytic subunit of the viral replicase, its interaction with RNA should exert a primary influence upon the different steps of viral RNA synthesis. However, the specific role that other essential, non-RdRp proteins (such as PFBV p27 and related products) play in replication is often uncertain. Our recent work shows that PFBV p27 contains signals for targeting to mitochondrial membranes [S. Martínez-Turiño and C. Hernández, unpublished results], which suggests that it might determine the subcellular localization of the

replication complex, in agreement with that reported for ORF1 products of other members of the *Tombusviridae* [Mochizuki *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2004; Panavas *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2004; Weber-Lotfi *et al.*, 2002]. It could also have additional functions during formation of the replication complex, such as recruitment of templates and other protein components. Consistent with this view, in this work we have shown that p27 is a nucleic acid-binding protein, with higher affinity for ssRNA than for dsRNA, ssDNA or dsDNA. In addition, the data suggest that p27 preferably binds to PFBV-derived ssRNAs, though more work is needed to confirm this point. Strikingly, p27 RNA binding seems to be sensitive not only to RNA sequence but also to RNA structure, as the conformation of the 3'- PFBV probe that migrated more slowly was bound preferentially in all assays (e.g. in Figs 3 and 4). The structural features that distinguish the two conformations of the ssRNA probe are not currently known, but it is probable that they are the result of the adoption of distinct higher-order structures similar to those described in the 3'- terminal region of other members of the *Tombusviridae* [McCormack *et al.*, 2008; Na & White, 2006; Pogany *et al.*, 2003; Wang & Wong, 2004] and also predicted in PFBV [Rico *et al.*, 2006].

Though RNA-binding properties have not been described so far for p27 homologues of other carmoviruses, the p27-binding capability parallels the results obtained with the equivalent replicase protein of TBSV, p33, the only related protein for which this question has been investigated [Rajendran & Nagy, 2003]. Moreover, preferences of p33 for different types of nucleic acids were reported to be similar to those found for PFBV p27, and both molecules exhibited cooperative ssRNA-binding behaviour. The lack of intermediate binding complexes in EMSAs performed with either p27 (this work) or p33 [Rajendran & Nagy, 2003] supports a cooperative view of the interaction, in which the first protein molecule binds and boosts subsequent protein binding, probably as a result of protein-protein interactions. Supporting this model, p33 has been shown to self-interact both *in vitro* and *in vivo* [Rajendran & Nagy, 2004]. The cooperative nature of RNA binding, probably mediated by protein-protein interactions, has been reported for other viral proteins involved in replication, for example the poliovirus and hepatitis C virus RdRps [Pata *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2002]. The functional significance of such cooperative binding is not clear, but it could increase the stability of the RNA-protein complex, resulting in protection of both viral template and replicase [Rajendran & Nagy, 2003]. Other advantages of cooperative binding to the viral templates, such as enhancement of RdRp

activity, have also been proposed [Hobson *et al.*, 2001].

The apparent  $K_d$  for the p27-ssRNA complex was estimated to be 11 nM, which is relatively low but in the range of those calculated for other viral RNA-binding proteins such as human immunodeficiency virus Rev and Tat [Burd & Dreyfuss, 1994], poliovirus polymerase [Oberste & Flanagan, 1988], vaccinia virus NP11 protein [Gross & Shuman, 1996] and citrus tristeza virus p23 [López *et al.*, 2000]. Most of these proteins, though not all, bind RNA in a sequence-specific fashion. As indicated above, the results of our competition assays suggest that PFBV p27 preferentially binds ssRNAs of viral origin, though non-viral ssRNAs also behaved as relatively good competitors and other types of nucleic acids partially competed for p27 ssRNA binding. On the other hand, the apparent  $K_d$  of 11 nM suggests a highly stable p27-ssRNA complex. This presumed stability was illustrated by experiments in which non-labelled competitors were added just after mixing the protein with the labelled probe. The results of these experiments suggested that the complex is formed rapidly and that, once constituted, hardly dissociates, as the bound labelled ssRNA could only be displaced to a limited extent even when a 100-fold excess of the homologous competitor was used (data not shown).

The assays of truncated forms of p27 revealed that neither N- nor C-terminal truncations abolish RNA-binding capability, though the affinity for RNA is affected by the removal of distinct protein segments (Fig. 5). As some of the truncated forms able to bind RNA did not share common regions, the results indicated that p27 contains various RNA-binding domains. Considering the negligible participation in RNA binding of the portion encompassing residues 1–100 and the high binding affinity of the truncated p27(1–144) (as witnessed by a  $K_d$  of 42 nM), the central region embracing residues 101–144 contains an important determinant for RNA binding, a conclusion also supported by comparison of  $K_d$  values of N-terminal truncated forms (Fig. 5). From the latter comparison, the region between residues 145 and 170 was also highlighted as relevant for RNA binding, and a contribution of the most C-terminal part (residues 171–243) could also be inferred. Despite being relatively low, the contribution of the C terminus was confirmed by mutation of three basic amino acids, which led to a protein unable to bind RNA. These results are consistent with the important role that positively charged amino acids play in nucleic acid-binding properties of numerous proteins [Genovés *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2001; Weiss & Narayana, 1998; Wobbe *et al.*, 1998]. Alignment of p27 with homologues from distinct carmoviruses did not reveal

a clear common sequence signature in any of the delineated regions. However, *in silico* analysis of these proteins with the program RNABindR [Terribilini *et al.*, 2006, 2007] allowed prediction of a central domain that was potentially involved in RNA binding in all of them, which would be positionally equivalent to that determined experimentally in PFBV p27 at residues 101–144 (Supplementary Fig. S3). This prediction suggests that RNA binding is a general trait of carmoviral ORF1 products. The finding of several regions in PFBV p27 endowed with RNA-binding ability contrasts with TBSV p33, for which an 8 aa segment, corresponding to an arginine- and proline-rich motif (called the RPR motif), has been identified as the primary RNA-binding site [Rajendran & Nagy, 2003].

It is reasonable to assume that, as the N-terminal portion of PFBV p86 overlaps with p27, p86 may also bind RNA, as expected for an RdRp. This point has been confirmed for p92, the RdRp of TBSV, which, besides the RPR motif that it shares with the preadthrough protein p33, has additional RNA-binding domains within its non-overlapping C-terminal region [Rajendran & Nagy, 2003]. Whether PFBV p86 contains more RNA-binding regions than those present in p27 remains to be explored.

In conclusion, the results presented here show that PFBV p27 binds ssRNA with high affinity and that it has several regions that contribute to its binding ability. This observation suggests that such capacity is an essential function of p27 and that the protein has evolved to potentiate and preserve it. In addition, p27 seems to have a preference for PFBV-derived ssRNAs. This may favour the selection of templates, preventing amplification of ssRNAs of heterologous origin, though the participation of other viral/host proteins in template recognition cannot be discounted. Despite the low apparent  $K_d$  of p27 binding, dissociation of the templates and/or products from the replication complex must occur to allow viral RNAs to move forward towards other steps of the infectious cycle (e.g. translation, intra- and intercellular movement, encapsidation). Such dissociation could be achieved by post-translational modifications of the protein that might reduce or abolish the RNA-binding properties. In line with this view, phosphorylation has been reported to diminish the RNA binding of TBSV p33 [Stork *et al.*, 2005] and of other RNA-binding proteins [e.g. Ohndorf *et al.*, 2001]. Other post-translational modifications such as methylation of arginines have been proposed to regulate the RNAbinding activity of some proteins [Bedford & Richard, 2005; Liu & Dreyfuss, 1995; Siebel & Guthrie, 1996]. Computer analysis of PFBV p27 predicts the existence of both phosphorylation and methylation sites in those regions

found to be particularly relevant for RNA binding (not shown). Further work is needed to assess whether these potential modifications play any role in modulating p27–nucleic acid interaction.

## METHODS

**Recombinant plasmids.** Plasmid pSP18-IC, which contains a wt full-length PFBV cDNA inserted into pUC18 downstream from a T7 RNA polymerase promoter, has been described previously [Rico & Hernández, 2006]. This plasmid was used as a template to generate mutant constructs p27aug<sup>+</sup>, p27stop and p27tyr (Fig. 1). Mutations were introduced with the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and appropriate primers (CH296/CH297 for p27aug<sup>+</sup>, CH298/CH299 for p27stop and CH117/CH118 for p27tyr).

For gene expression, the PFBV p27 gene was amplified from pSP18-IC with primers CH67/CH68 and the Expand High Fidelity PCR system (Roche). The amplification product, bearing appropriate restriction sites at the ends, was cloned into *E. coli* expression vector pET-23d(+) (Novagen). The resulting construct, named pET-p27, harboured the p27 gene fused to a sequence coding for a hexa-His tag. A similar approach was used to generate constructs corresponding to p27 deletion-mutant derivatives pET-p27(1–100) (primers CH67/CH306), pET-p27(1–144) (CH67/CH264), pET-p27(100–243) (CH261/CH68), pET-p27(140–243) (CH262/CH68) and pETp27(171–243) (CH307/CH68). An additional construct, pETp27(171–243)\*, identical to pET-p27(171–243) but with nucleotide substitutions that led to the replacement of three arginines by alanines (positions 195–197 in the entire protein), was generated by PCR with the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and CH321/CH322. Primers are listed in **Supplementary Table S1**. Each construct was verified by DNA sequencing with an ABI PRISM DNA sequencer 377 (Perkin-Elmer).

**Purification of p27 and derivative proteins from *E. coli*.** The pET23d(+)-based recombinant plasmids were used to transform *E. coli* Rosetta BL21(DE3)pLysS (Novagen). The His-tagged p27 protein and derivatives, whose expression was induced in the transformed bacteria with isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside at 0.4 mM for 4 h at 37 °C, were purified using Ni-NTA columns according to the supplier's instructions (Sigma). The purified recombinant proteins were analysed and quantified by 15% SDS-PAGE after Coomassie brilliant blue staining. Quantification was confirmed by using the

Bio-Rad protein assay, which is based on the Bradford method.

**Preparation of labelled and unlabelled nucleic acids.** Both labelled and unlabelled ssRNAs for gel-mobility shift and competition experiments were generated by *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase following the manufacturer's recommendations (Fermentas). Two distinct constructs were used as templates to synthesize PFBV-derived ssRNAs: (i) plasmid pSP18-IC, which, after digestion with *Eco*RI, allowed the production of an ssRNA probe (5'-PFBV) encompassing nt 1–141 of the PFBV genome; and (ii) plasmid pBS-3R, a pBluescript KS+ (Stratagene) derivative containing a PFBV cDNA which allowed generation of a ssRNA probe (3'-PFBV) embracing nt 3560–3923 of the viral genome. Production of nonspecific ssRNA and dsRNA from a cloned 400 bp fragment of the phage lambda DNA was performed as indicated by Carbonell *et al.* (2008). To synthesize the labelled probe, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (400 Ci mmol<sup>-1</sup>; Amersham) was included in the transcription reaction. In all cases, template DNA was eliminated by RNase-free DNase I treatment and the transcripts were extracted using phenol/chloroform and filtered through a Sephadex G-50 spin column to remove free nucleotides. The amount and integrity of RNA transcripts were determined by 5% PAGE.

A dsDNA, corresponding to a 678 bp fragment of the red fluorescent protein gene obtained by PCR amplification with primers CH204/CH201 (**Supplementary Table S1**), and an ssDNA, corresponding to an artificially synthesized oligonucleotide (CH61; **Supplementary Table S1**), were also used for competition experiments.

**EMSA.** <sup>32</sup>P-labelled 3'-PFBV ssRNA probe (0.1 ng) was mixed with different amounts of His-tagged p27 or derivatives in 25  $\mu$ l binding buffer [50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol and 2 U RNase inhibitor (Fermentas)] and incubated at 25 °C for 30 min. In competition experiments, different amounts of unlabelled nucleic acids were added simultaneously with the labelled ssRNA probe to the binding mixtures. When indicated, the NaCl concentration was modified. After the binding reaction, samples were analysed by non-denaturing PAGE (5 %) in TAE buffer (40 mM Tris/HCl, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.2). The gel was vacuum-dried and exposed for autoradiography or phosphorimage analysis. Non-linear regression curves for the binding data and apparent  $K_d$  values were calculated using GraphPad Prism software version 5.03. This software was also used to estimate the IC<sub>50</sub>.



**Northwestern assay.** Purified proteins (about 0.2 µg) were separated by 15% SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membranes (Scheicher & Schuell). The membranes were incubated overnight at room temperature in renaturation buffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.1% Triton X-100 and 1× Denhardt's reagent) supplemented with 10% BSA, with three changes of buffer during the incubation. The membranes were probed with <sup>32</sup>P-labelled 3'-PFBV ssRNA for 1 h, washed three times (15 min each) with the renaturation buffer, air dried and subjected to autoradiography.

**Inoculation of plants and protoplasts and analysis of viral infection.** *In vitro* synthesis of genomic PFBV transcripts, inoculation of plants and protoplasts and Northern blot analysis of the inoculated material were performed as described previously [Rico & Hernández, 2009].

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dolores Arocas and Isabella Avellaneda for excellent technical assistance. This research was supported by grants of the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Spain) (BFU2006-11230 and BFU2009-11699) and the Generalitat Valenciana (GV) (ACOM/2006/210 and ACOMP/2009/040) to C. H. S. M.-T. was the recipient of a predoctoral fellowship from GV and of a predoctoral contract from MICINN.

#### REFERENCES

- Ahlquist, P., Noueir, A.O., Lee, W.M., Kushner, D.B. & Dye, B.T. (2003). Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J. Virol.* **77**: 8181-8186.
- Bedford, M.T. & Richard, S. (2005). Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol. Cell* **18**: 263-272.
- Burd, C. & Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**: 615-621.
- Carbonell, A., Martínez de Alba, A.E., Flores, R. & Gago, S. (2008). Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families. *Virology* **371**: 44-53.
- Carey, J. (1991). Gel retardation. *Methods Enzymol.* **208**: 103-117.
- 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.
- Citovsky, V., Knorr, D., Schuster, G. & Zambryski, P. (1990). The P30 movement protein of *Tobacco mosaic virus* is a single strand nucleic acid binding protein. *Cell* **60**: 637-647.
- Daròs, J.A. & Carrington, J.C. (1997). RNA binding activity of NIa proteinase of tobacco etch potyvirus. *Virology* **237**: 327-336.
- Genovés, A., Navarro, J.A. & Pallás, V. (2006). Functional analysis of the five *Melon necrotic spot virus* genome-encoded proteins. *J. Gen. Virol.* **87**: 2371-2380.
- Genovés, A., Navarro, J.A. & Pallás, V. (2009). A self-interacting carmovirus movement protein plays a role in binding of viral RNA during the cell-to-cell movement and shows an actin cytoskeleton dependent location in cell periphery. *Virology* **395**: 133-142.
- Gross, C.H. & Shuman, S. (1996). The QRxGRxGRxxxG motif of the vaccinia virus DEXH box RNA helicase NPH-II is required for ATP hydrolysis and RNA unwinding but not for RNA binding. *J. Virol.* **70**: 1706-1713.
- Habili, N. & Symons, R.H. (1989). Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases. *Nucleic Acids Res.* **17**: 9543-9555.
- Hacker, D.L., Petty, I.T., Wei, N. & Morris, T.J. (1992). *Turnip crinkle virus* genes required for RNA replication and virus movement. *Virology* **186**: 1-8.
- Herranz, M.C. & Pallás, V. (2004). RNA-binding properties and mapping of the RNA-binding domain from the movement protein of *Prunus necrotic ringspot virus*. *J. Gen. Virol.* **85**: 761-768.
- Hobson, S.D., Rosenblum, E.S., Richards, O.C., Richmond, K., Kirkegaard, K., & Schultz, S.C. (2001). Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function. *EMBO J.* **20**: 1153-1163.
- Jones, S., Daley, D.T., Luscombe, N.M., Berman, H.M. & Thornton, J.M. (2001). Protein-RNA interactions: a structural analysis. *Nucleic Acids Res.* **29**: 943-954.
- Kim, Y.C. & Kao, C.C. (2008). Biochemical analyses of the interactions between viral polymerases and RNAs. *Methods Mol. Biol.* **451**: 185-200.
- Koonin, E.V. & Dolja, V.V. (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid

sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 375-430.

**Lewandowski, D.J. & Dawson, W.O.** (2000). Functions of the 126- and 183-kDa proteins of *Tobacco mosaic virus*. *Virology* **271**: 90-98.

**Li, Q. & Palukaitis, P.** (1996). Comparison of the nucleic acid- and NTP-binding properties of the movement protein of cucumber mosaic cucumovirus and tobacco mosaic tobamovirus. *Virology* **216**: 71-79.

**Liu, Q. & Dreyfuss, G.** (1995). *In vivo* and *in vitro* arginine methylation of RNA-binding proteins. *Mol. Cel Biol.* **15**: 2800-2808.

**Lohman, T.M., Overman, L.B. & Datta, S.** (1986). Salt-dependent changes in the DNA binding cooperativity of *Escherichia coli* single-strand binding protein. *J. Mol. Biol.* **187**: 603-615.

**Lommel, S.A., Martelli, G.P., Rubino, L. & Russo, M.** (2005). Family *Tombusviridae*. In *Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 907-936. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. San Diego, Academic Press.

**López, C., Navas-Castillo, J., Gowda, S., Moreno, P. & Flores, R.** (2000). The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of *Citrus tristeza virus* is an RNA-binding protein. *Virology* **269**: 462-470.

**Marcos, J.F., Vilar, M., Pérez-Payá, E. & Pallás, V.** (1999). *In vivo* detection, RNA-binding properties and characterization of the RNA-binding domain of the p7 putative movement protein from Carnation mottle carmovirus (CarMV). *Virology* **255**: 354-365.

**Martínez-Turiño, S. & Hernández, C.** (2009). Inhibition of RNA silencing by the coat protein of *Pelargonium flower break virus*: distinctions from closely related suppressors. *J. Gen. Virol.* **90**: 519-525.

**McCormack, J.C., Yuan, X., Yingling, Y.G., Kasprzak, W., Zamora, R.E., Shapiro, B.A. & Simon, A.E.** (2008). Structural domains within the 3' untranslated region of *Turnip crinkle virus*. *J. Virol.* **82**: 8706-8720.

**Mochizuki, T., Hirai, K., Kanda, A., Ohnishi, J., Ohki, T. & Tsuda, S.** (2009). Induction of necrosis via mitochondrial targeting of *Melon necrotic spot virus* replication protein p29 by its second transmembrane domain. *Virology* **390**: 239-249.

**Molnár, A., Havelda, Z., Dalmay, T., Szutorisz, H. & Burgyán, J.** (1997). Complete nucleotide sequence of *Tobacco necrosis virus* strain DH and genes required for RNA replication and virus movement. *J. Gen. Virol.* **78**: 1235-1239.

**Na, H. & White, K.A.** (2006). Structure and prevalence of replication silencer-3' terminus RNA interactions in *Tombusviridae*. *Virology* **345**: 305-316.

**Navarro, B., Rubino, L. & Russo, M.** (2004). Expression of the *Cymbidium ringspot virus* 33-kilodalton protein in *Saccharomyces cerevisiae* and molecular dissection of the peroxisomal targeting signal. *J. Virol.* **78**: 4744-4752.

**Navarro, J.A., Genovés, A., Climent, J., Saurí, A., Martínez-Gil, L., Mingarro, I. & Pallás, V.** (2006). RNA-binding properties and membrane insertion of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) double gene block movement proteins. *Virology* **356**: 57-67.

**Neeleman, L. & Bol, J.F.** (1999). *Cis*-acting functions of *Alfalfa mosaic virus* proteins involved in replication and encapsidation of viral RNA. *Virology* **254**: 324-333.

**Oberste, M.S. & Flanagan, J.B.** (1988). Measurement of poliovirus RNA polymerase binding to poliovirion and nonviral RNAs using a filter-binding assay. *Nucleic Acids Res.* **16**: 10339-10352.

**Ohndorf, U.M., Steegborn, C., Knijff, R. & Sondermann P.** (2001). Contributions of the individual domains in human La protein to its RNA 3'-end binding activity. *J. Biol. Chem.* **276**: 27188-27196.

**Okamoto, K., Nagano, H., Iwakawa, H., Mizumoto, H., Takeda, A., Kaido, M., Mise, K. & Okuno, T.** (2008). *Cis*-preferential requirement of a -1 frameshift product p88 for the replication of *Red clover necrotic mosaic virus* RNA1. *Virology* **375**: 205-212.

**Oster, S.K., Wu, B. & White, K.A.** (1998). Uncoupled expression of p33 and p92 permits amplification of *Tomato bushy stunt virus* RNAs. *J. Virol.* **72**: 5845-5851.

**Panavas, T., Hawkins, C.M., Panaviene, Z. & Nagy, P.D.** (2005). The role of the p33:p33/p92 interaction domain in RNA replication and intracellular localization of p33 and p92 proteins of cucumber necrosis tobravirus. *Virology* **338**: 81-95.

**Pata, J.D., Schultz, S.C. & Kirkegaard, K.** (1995). Functional oligomerization of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *RNA* **1**: 466-477.

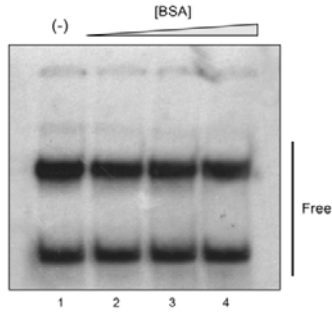
**Pogany, J., Fabian, M.R., White, K.A. & Nagy, P.D.** (2003). A replication silencer element in a plus-strand RNA virus. *EMBO J.* **22**: 5602-5611.

**Pogany, J., White, K.A. & Nagy, P.D.** (2005). Specific binding of tobravirus replication protein p33 to an internal replication element in the viral RNA is essential for replication. *J. Virol.* **79**: 4859-4869.

- Rajendran, K.S. & Nagy, P.D.** (2003). Characterization of the RNA-binding domains in the replicase proteins of *Tomato bushy stunt virus*. *J. Virol.* **77**: 9244-9258.
- Rajendran, K.S. & Nagy, P.D.** (2004). Interaction between the replicase proteins of *Tomato bushy stunt virus* *in vitro* and *in vivo*. *Virology* **326**: 250-261.
- Richmond, K.E., Chenault, K., Sherwood, J.L. & German, T.L.** (1998). Characterization of the nucleic acid binding properties of *Tomato spotted wilt virus* nucleocapsid protein. *Virology* **248**: 6-11.
- Rico, P. & Hernández, C.** (2004). Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pelargonium flower break virus*. *Arch. Virol.* **149**: 641-651.
- Rico, P. & Hernández, C.** (2006). Infectivity of *in vitro* transcripts from a full length cDNA clone of *Pelargonium flower break virus* in an experimental and a natural host. *J. Plant Pathol.* **88**: 103-106.
- Rico, P. & Hernández, C.** (2009). Characterization of the subgenomic RNAs produced by *Pelargonium flower break virus*: identification of two novel RNA species. *Virus Res.* **142**: 100-107.
- Rico, P., Ivars, P., Elena, S.F. & Hernández, C.** (2006). Insights on the selective pressures restricting *Pelargonium flower break virus* genome variability: evidence for host adaptation. *J. Virol.* **80**: 8124-8132.
- Siebel C.W. & Guthrie C.** (1996). The essential yeast RNA binding protein Npl3p is methylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 13641-13646.
- Stork, J., Panaviene, Z. & Nagy, P.D.** (2005). Inhibition of *in vitro* RNA binding and replicase activity by phosphorylation of the p33 replication protein of cucumber necrosis tobravirus. *Virology* **343**: 79-92.
- Terribilini, M., Lee, J.H., Yan, C., Jernigan, R.L., Honavar, V. & Dobbs D.** (2006). Prediction of RNA-binding sites in proteins from amino acid sequence. *RNA* **12**: 1450-1462.
- Terribilini, M., Sander, J.D., Lee, J.-H., Zaback, P., Jernigan, R.L., Honavar, V. & Dobbs, D.** (2007). RNABindR: a server for analyzing and predicting RNA-binding sites proteins. *Nucleic Acids Res.* **35**: W578-W584.
- Turner, K.A., Sit, T.L., Callaway, A.S., Allen, N.S. & Lommel, S.A.** (2004). *Red clover necrotic mosaic virus* replication proteins accumulate at the endoplasmic reticulum. *Virol. J.* **320**: 276-290.
- Wang, R.Y. & Nagy, P.D.** (2008). *Tomato bushy stunt virus* co-opts the RNA-binding function of a host metabolic enzyme for viral genomic RNA synthesis. *Cell Host Microbe* **3**: 178-187.
- Wang, H.H. & Wong, S.M.** (2004). Significance of the 3'-terminal region in minus strand RNA synthesis of *Hibiscus chlorotic ringspot virus*. *J. Gen. Virol.* **85**: 1763-1776.
- Wang, Q.M., Hockman, M.A., Staschke, K., Johnson, R.B., Case, K.A., Lu, J., Parsons, S., Zhang, F., Rathnachalam, R., Kirkegaard, K. & Colacino, J.M.** (2002). Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of *Hepatitis C virus* RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* **76**: 3865-3872.
- Weber-Lotfi, F., Dietrich, A., Russo, M. & Rubino, L.** (2002). Mitochondrial targeting and membrane anchoring of a viral replicase in plant and yeast cells. *J. Virol.* **76**: 10485-10496.
- Weiss, M.A. & Narayana, N.** (1998). RNA recognition by arginine-rich peptide motifs. *Biopolymers* **48**: 167-180.
- White, K.A. & Nagy, P.D.** (2004). Advances in the molecular biology of tombusviruses: gene expression, genome replication, and recombination. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **78**: 187-226.
- White, K.A., Skuzeski, J.M., Li, W., Wei, N. & Morris, T.J.** (1995). Immunodetection, expression strategy and complementation of *Turnip crinkle virus* p28 and p88 replication components. *Virology* **211**: 525-534.
- Wobbe, K.K., Akgoz, M., Dempsey, D.A. & Klessig, D.F.** (1998). A single amino acid change in *Turnip crinkle virus* movement protein p8 affects RNA binding and virulence on *Arabidopsis thaliana*. *J. Virol.* **72**: 6247-6250.

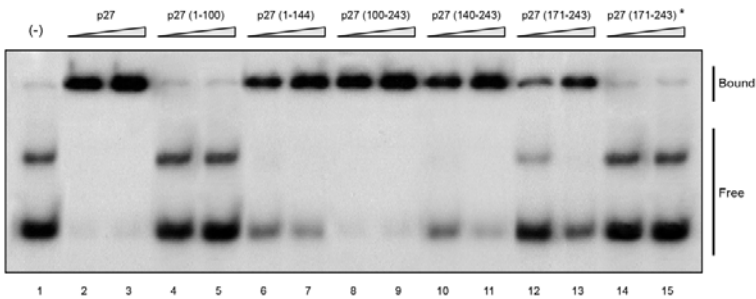
APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Fig. S1



**Fig.S1.** Control EMSA with distinct amounts of BSA. The  $^{32}\text{P}$ -labelled 3'-PFBV ssRNA probe (at 33 pM) was incubated with no protein (lane 1) or with increasing concentrations (50, 75 and 100 nM) of BSA (lanes 2–4, respectively). The unbound, free RNA probe is marked on the right; no shifted (bound) RNA complexes were detected.

Supplementary Fig. S2



**Fig.S2.** Illustrative EMSA with distinct amounts of recombinant proteins. The  $^{32}\text{P}$ -labelled 3'-PFBV ssRNA probe (at 33 pM) was incubated with no protein (lane 1) or with two concentrations (100 nM in lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 and 0.1  $\mu\text{M}$  in lanes 3, 5, 7, 9, 11, 13 and 15) of His-tagged p27 and derivatives. The unbound, free RNA probe and the shifted (bound) RNA complexes are marked on the right.

## Supplementary Fig. S3

<b>PFBV</b>	100	GKS <b>KVV</b> -- <b>RQRSTVNRHKKGRFVHRLV</b> CDGKNHFGGTPSASRANELA	144
<b>SCV</b>	95	GKT <b>KVV</b> -- <b>RTR-TTNRHARGSFLLR</b> LIAEAKCHFGGTPATRANELA	138
<b>CbMV</b>	102	GKVVV <b>KNVRTTLPNRHHTKGKFLKRLV</b> ADTKNHFGGTPPTDANRLA	148
<b>NLVCV</b>	106	GKMVVV <b>SRKRKV</b> -- <b>NRHQKQFVM</b> DVV <b>RKAKMH</b> FGCT <b>P</b> SPTRANELA	150
<b>CarMV</b>	101	GKEVVV <b>SKKRVV</b> -- <b>NRHLRQRFVRS</b> IAIEAKNHFGGDISPSKANYLS	145
<b>AnFBV</b>	101	GS <b>KVVRP</b> -- <b>ARAIIRRHARGKFSY</b> CLAMAAKNAFGGTPNTKANQMS	145
<b>TCV</b>	107	EAVGST <b>TADVPRRRVQ</b> -- <b>KGRFAMHAVNA</b> AKLHFCGVPKPTANRLA	151
<b>CCFV</b>	103	PASGDT <b>GDLPRRKIRR</b> -- <b>RGRFVAH</b> AVCAAKL <b>H</b> FSGCPTQTLANRLA	147
<b>HCRSV</b>	69	NISGT <b>TSSDKKVS</b> KIKRRHRGK <b>FALH</b> AAIAAKL <b>HFG</b> GTPPT <b>R</b> SNELA	115
<b>MNSV</b>	123	<b>IGIHTN</b> VNPE <b>VRAKRRHRSRPF</b> IKKIVNLT <b>TK</b> NHFGGCPDSSKSNVMA	169
<b>PSNV</b>	78	VKLPAPVTVKR <b>KPKAKHK</b> S <b>MP</b> FITKLINAAKVHFDGVPKPTESNHMA	149
<b>JINRV</b>	99	EVLVANEQVTKKRVN <b>RHARGT</b> FAAHAAMACKLHFGGLVPMNTRANLSV	145
<b>CPMoV</b>	87	ERPTREV <b>GKGKRVINRHAK</b> GYFLKEAVTACRLQFNGVPMSTNANLLG	127
<b>GaMV</b>	82	<b>GD</b> LAK <b>MP</b> VSRKRRIRNRKHGRFVSYLVNEAKAEYG-LPKPTEAYRLM	127

**Fig.S3.** RNA-binding predictions for PFBV p27 and related carmoviral proteins using the program RNABindR. Residues predicted to bind RNA (in 'optimal prediction mode') are indicated by grey boxes. Numbers denote positions of the amino acid residues in the corresponding full-length proteins. Sequences used for comparison were retrieved from the sequence databases and correspond to the following viruses: PFBV (*Pelargonium* flower break virus; GenBank accession no. AJ514833), SCV (*Saguaro cactus* virus; NC\_001780), CbMV (*Calibrachoa* mottle virus; GQ244431), NLVCV (*Nootka lupine vein-clearing* virus; EF207438), CarMV (*Carnation mottle* virus; X02986), AnFBV (*Angelonia* flower break virus; DQ219415), TCV (*Turnip crinkle* virus; M22445), CCFV (*Cardamine chlorotic fleck* virus; L16015), HCRSV (*Hibiscus chlorotic ringspot* virus; X86448), MNSV (*Melon necrotic spot* virus; M29671), PSNV (*Pea stem necrosis* virus; NC\_004995), JINRV (*Japanese iris necrotic ring* virus; NC\_002187), CPMoV (*Cowpea mottle* virus; U20976) and GaMV (*Galinsoga mosaic* virus; Y13463).

Supplementary Table S1

<b>Primer</b>	<b>Position</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>
CH61	NA (S)	GCAAGCTTGTAAACGACTCACTATAGGGAACAAAATGGCACACTATTTTGG ( <i>HindIII</i> )
CH67	32–67 (S)	GGCCATGGTACGATTCCGGATCTCAGTTAG ( <i>NcoI</i> )
CH68	743–762 (AS)	GGAAGCTTTTTGGTGAACCGACAGCG ( <i>HindIII</i> )
CH117	750–777 (S)	CGGTTACCAAATAcGGGGGTCTTTTC
CH118	750–777 (AS)	GAAAAGACCCCGTATTTGGTGAACCG
CH201	661–678 (AS)	GGCCATGGATCCGCATGCTTAGGCGCCGGTGGAGTG ( <i>SphI</i> )
CH204	1–18 (S)	CTCCATGGCCTCCTCCGAGGAC ( <i>NcoI</i> )
CH261	329–351 (S)	GCCCATGGGGAAGAGCAAGGTGGTTAGGC ( <i>NcoI</i> )
CH262	449–471 (S)	GGCCATGGCCAACGAGCTGGCCGTAATG ( <i>NcoI</i> )
CH264	445–464 (AS)	GGAAGCTTGGCCAGCTCGTTGGCCCGGC ( <i>HindIII</i> )
CH296	10–36 (S)	TCTGGTTCCAACgCGCTACGATTCGGA
CH297	10–36 (AS)	TCCGAATCGTAGCgGTTGGAACCAGA
CH298	752–779 (S)	GTTACCAAATAGtGaGGTCTTTTCTGC
CH299	752–779 (AS)	GCAGAAAAGACcCaCTATTTGGTGAAC
CH306	309–335 (AS)	GGAAGCTTCCCCTCCTCATCCACTCTTTTTC ( <i>HindIII</i> )
CH307	543–563 (S)	GGCCATGGCTGCTATTTTCACCCCA ( <i>NcoI</i> )
CH321	596–639 (S)	GAACAGCCACGCTGCCTACgCgCgGGTAGCTTTGCAGATG
CH322	596–639 (AS)	CATCTGCAAGAGCTACCgCgCgGTAGGCAGCGTGGCTGTTC

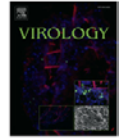
**Table.S1:** Primers used in this work. Positions refer to positions within the PFBV genome covered by the primers except for primers CH61 (a non-specific primer) and CH201 and CH204, for which positions in the RFP gene are indicated. NA, Not applicable; (S), sense; (AS), antisense. Restriction sites introduced for cloning purposes are underlined, and lower-case letters indicate nucleotide substitutions in the wt PFBV sequence.

# CAPÍTULO III









## A membrane-associated movement protein of *Pelargonium flower break virus* shows RNA-binding activity and contains a biologically relevant leucine zipper-like motif

Sandra Martínez-Turiño, 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

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 January 2011  
 Returned to author for revision  
 11 February 2011  
 Accepted 3 March 2011  
 Available online 27 March 2011

#### Keywords:

Carmovirus  
 PFBV  
 Movement proteins  
 RNA-binding domain  
 Leucine zipper-like motif  
 Membrane association  
 Subcellular localization

### ABSTRACT

Two small viral proteins (DGBp1 and DGBp2) have been proposed to act in a concerted manner to aid intra- and intercellular trafficking of carmoviruses though the distribution of functions and mode of action of each protein partner are not yet clear. Here we have confirmed the requirement of the DGBps of *Pelargonium flower break virus* (PFBV), p7 and p12, for pathogen movement. Studies focused on p12 have shown that it associates to cellular membranes, which is in accordance to its hydrophobic profile and to that reported for several homologs. However, peculiarities that distinguish p12 from other DGBps2 have been found. Firstly, it contains a leucine zipper-like motif which is essential for virus infectivity in plants. Secondly, it has an unusually long and basic N-terminal region that confers RNA binding activity. The results suggest that PFBV p12 may differ mechanistically from related proteins and possible roles of PFBV DGBps are discussed.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

To establish a productive infection, plant viruses need to move from their replication sites to and through plasmodesmata (PD), which are wall spanning co-axial membranous organelles that bridge the cytoplasm of contiguous cells [Benitez-Alfonso *et al.*, 2010]. Such intracellular and intercellular pathogen trafficking can take place in the form of viral particles or nucleoprotein complexes and depends on virus encoded polypeptides named movement proteins (MPs). Though there is considerable structural diversity among MPs of distinct virus taxa [Lucas, 2006], functional properties common to most of them can be outlined including nucleic acid binding capacity, interaction with viral and host factors and ability to increment the size exclusion limit of PD [Nelson & Citovsky, 2005; Waigmann *et al.*, 2004]. As viruses seem to hijack the cellular machinery of macromolecular transport to promote their own movement, MPs also often associate with host membrane or cytoskeletal elements [Harries *et al.*, 2010]. All these activities can be combined in a single MP or be allocated to several MPs that will assist virus spread in a concerted manner [Hull, 2002; Lucas, 2006].

*Pelargonium flower break virus* (PFBV) is a member of the genus *Carmovirus* in the family *Tombusviridae*. The monopartite single-stranded (ss)

RNA genome of PFBV contains five ORFs that encode polypeptides of 27 (p27), 86 (p86), 7 (p7), 12, (p12) and 37 (p37) kDa [Rico & Hernández, 2004]. Reverse genetics experiments have indicated that p27 and its readthrough product p86 (the RNA dependent-RNA polymerase), are essential for viral RNA replication while p37 plays a dual role as capsid protein and as suppressor of RNA silencing [Martínez-Turiño & Hernández, 2009, 2010]. According to the available data, cell-to-cell transport of carmo-like viruses in plants is aided by two small virus-encoded polypeptides referred to as the double gene block proteins [DGBps; Hull, 2002]. In the case of PFBV, DGBp1 and DGBp2 would correspond to p7 and p12, respectively, on the basis of their similarities with carmoviral proteins with assigned movement function [Genovés *et al.*, 2006; Hacker *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1998]. Structural and molecular studies performed with *Carnation mottle virus* (CarMV) and *Melon necrotic spot virus* (MNSV) have shown that their DGBps1 (CarMV p7 and MNSV p7A) present RNA binding properties mainly mediated by a basic central region that adopts an  $\alpha$ -helical conformation in the presence of secondary structure inducers [Marcos *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2006; Vilar *et al.*, 2001, 2005]. Conversely, DGBps2 of these viruses lack RNA binding activity and contain one (MNSV p7B) or two (CarMV p9) transmembrane domains (TMs) that are targeted and inserted *in vitro* into microsomal

membranes derived from the endoplasmic reticulum (ER) [Navarro *et al.*, 2006; Vilar *et al.*, 2002]. From these findings, a topological model was advanced in which the cytosolic faced-region (s) of the membrane-associated movement protein (DGBp2) would interact with the soluble partner (DGBp1) bound to the viral RNA through their C-terminal regions that might adopt similar  $\beta$ -sheet structures [Navarro *et al.*, 2006; Vilar *et al.*, 2002]. The resulting ribonucleotide complex would spread among cells with the aid of an internal membranous translocation system, paralleling that proposed for other MPs [Heinlein & Epel, 2004; Lucas, 2006; Melcher, 2000; Nelson & Citovsky, 2005]. As indicated above, this model was mainly based on the properties of DGBps of CarMV and MNSV but *in silico* analyses of the corresponding proteins of other carmoviruses revealed common features that led to the suggestion that the model could apply for most members of the genus [Navarro *et al.*, 2006]. Though this was an attractive and straightforward scheme, the mechanism for carmoviral movement is likely more complex and, moreover, virus-specific particularities cannot be discarded. Indeed, most recent results with the DGBps of MNSV have shown that MNSV p7B is targeted *in vivo* to the ER as expected, and delivered to PD via a route that involves the Golgi apparatus [Genovés *et al.*, 2010]. However, MNSV p7A is not only able to bind RNA but also to move intracellularly toward PD in the absence of other viral products through a route distinct from that followed by p7B [Genovés *et al.*, 2009]. This observation suggests that the distribution of functions among DGBp partners is different or not so well defined as initially proposed.

PFBV p12, like its counterparts in other carmoviruses, contains a high percentage of hydrophobic amino acids distributed along two predicted transmembrane  $\alpha$ -helices [Navarro *et al.*, 2006]. This trait probably causes the protein to become membrane embedded as described for the homologous CarMV and MNSV proteins and lately for that of *Turnip crinkle virus* (TCV) [Martínez-Gil *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 2006; Vilar *et al.*, 2002]. However, several structural peculiarities distinguish PFBV p12 from similar proteins. First, its size is bigger than those of equivalent carmoviral proteins that, with the only exception of the putative DGBp2 of *Japanese iris necrotic ring virus* [Takemoto *et al.*, 2000], range from 7 to 9 kDa [Lommel *et al.*, 2005]. Alignment of PFBV p12 with the latter ones indicates that this size gain is primarily due to an N-terminal extension which is rich in basic amino acids [Rico & Hernández, 2004]. In addition, p12 contains a seven residue leucine repeat motif, consistent with a leucine zipper, that is absent in related proteins and that is predicted to be four heptads in length [Rico &

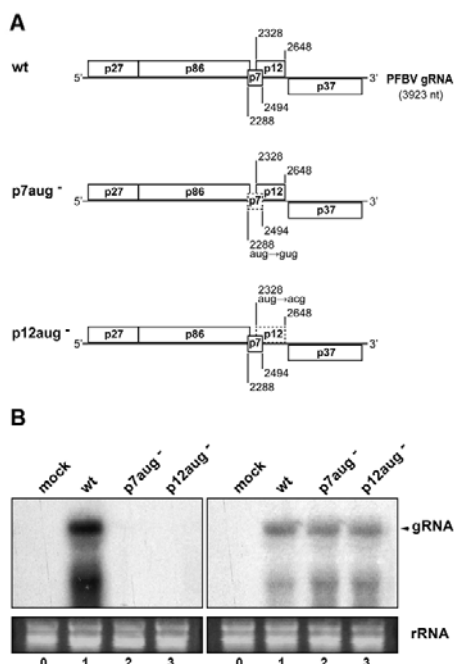
Hernández, 2004]. The natural heterogeneity found among different PFBV isolates argues in favor of the functional relevance of the motif. On one side, only conservative amino acid changes were detected in this region of the molecule and the key leucines of the heptads were strictly preserved despite the large nucleotide variation observed in the corresponding codons [Rico *et al.*, 2006]. In addition, an amino acid substitution observed in one isolate would extend the number of heptads of the motif from four to five [Rico *et al.*, 2006].

In order to get insights into the mode of action of PFBV p12, in this work we report experiments aimed at confirming its involvement, together with PFBV p7, in viral movement. We have also investigated the subcellular localization of the protein and the relevance *in vivo* of the putative leucine zipper. Moreover, we have tested whether p12 is endowed with RNA binding activity. Collectively, the results suggest that PFBV p12 may differ mechanistically from related proteins.

## Results

### *Both p7 and p12 are involved in PFBV cell to cell movement*

In order to assess whether the two small polypeptides encoded in the central region of PFBV genome, p7 and p12, are involved in viral movement as expected from their homologies with carmoviral proteins of known function [Genovés *et al.*, 2006; Hacker *et al.*, 1992], the start codons of their corresponding ORFs were altered by site-directed mutagenesis using the PFBV infectious clone pSP18F-IC [Rico & Hernández, 2006] as template (**Fig. 1A**). Run-off transcripts synthesized from the wild type (wt) and the mutated constructs, designated p7aug<sup>-</sup> and p12aug<sup>-</sup>, respectively, were used to inoculate *Chenopodium quinoa* leaves and protoplasts. Unlike that observed with the wt construct, no lesions were visible in leaves challenged with the mutant constructs even at 15 days post-inoculation (dpi) and, consistently, no viral-specific signals could be detected by Northern blot hybridization (**Fig. 1B**). In contrast to that found in plants, mutants p7aug<sup>-</sup> and p12aug<sup>-</sup> accumulated in *C. quinoa* protoplasts at levels similar to those of the wt RNA (**Fig. 1B**). Collectively, the results showed that abolishment of p7 or p12 expression does not affect viral replication but impairs viral spread in leaves supporting the anticipated role of these proteins in cell-to-cell movement.



**Fig. 1.** Blooassay of PFBV mutants. (A) Schematic representation of wt PFBV gRNA (top) and derived mutants p7aug<sup>-</sup> and p12aug<sup>-</sup> (bottom). Nucleotide positions of the initiation codons of ORFs p7 and p12 are indicated. Substitutions affecting these codons were introduced into the full-length cDNA clone pSP18-1C leading to triplet changes that are depicted for each mutant. The engineered mutations did not alter the amino acid sequences of overlapping ORFs. In mutants, dashed boxes correspond to ORFs that are not expected to be translated. (B) Northern blot hybridization of total RNA extracted from *C. quinoa* leaves (left panel) or protoplasts (right panel) inoculated with transcripts corresponding to the PFBV wt construct (lane 1) or to mutants p7aug<sup>-</sup> and p12aug<sup>-</sup> (lanes 2 and 3, respectively). Lanes 0 correspond to mock-inoculated negative controls. The arrow marks the position of the gRNA; lower bands correspond to subgenomic RNAs. Ethidium bromide staining of rRNA was used as a loading control.

#### Amino acid mutations in the leucine zipper-like motif of p12 render movement-defective viruses

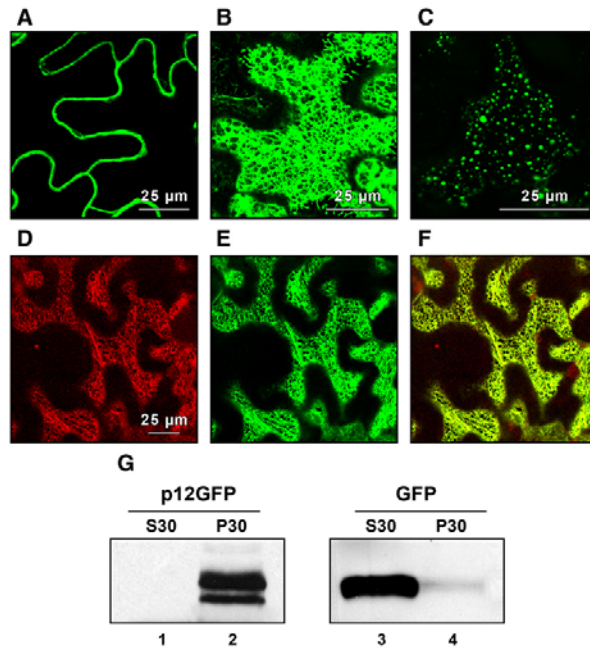
To investigate the *in vivo* relevance of the leucine zipper-like motif of p12, nucleotide substitutions leading to single or double replacements of heptadic leucine residues were engineered into the infectious clone pSP18-1C. The mutations affected either Leu67 (mutants LZM1 and LZM2 with the amino acid substitutions Leu67Ile and Leu67Ala, respectively), Leu81 (mutants LZM3 and LZM4 with the amino acid substitutions Leu81Arg and Leu81Ala, respectively), or both simultaneously (mutants LZM5, with changes Leu67Ile and Leu81Arg, and LZM6, with changes Leu67Ala and Leu81Ala) (Fig. 2A). The replacement Leu67 by Ile and Leu81 by Arg was based on the presence of such amino acid residues at equivalent positions of homologous proteins [Rico & Hernández, 2004]. On the other hand, Ala was chosen over other amino acids as a substituting residue of the heptadic leucine residues because of the fact that Ala has a strong propensity to form an  $\alpha$ -helix and its substitution has been documented to have minimal

disruptive effects on the alpha-helical structure characteristic of a leucine zipper domain [Lyu *et al.*, 1990; O'Neil & DeGrado, 1990; Zhang *et al.*, 1991]. In addition, Ala lacks the bulky hydrophobic side chain of a leucine residue, which is believed to be the major hydrophobic force for a leucine zipper domain to facilitate protein interaction [O'Shea *et al.*, 1989]. Thus, replacement of heptadic leucine residues by alanine would likely influence only the biological properties derived from the bulky hydrophobic side chain of a leucine residue while having minimal effects on the overall alpha-helical structure. Transcripts derived from the wt and mutant clones were used to inoculate *C. quinoa* plants. As opposed to wt RNA, none of the mutants induced appearance of chlorotic lesions on the inoculated leaves and a Northern blot analysis confirmed the absence of PFBV in this plant material (Fig. 2B, upper panel). Two control mutants were additionally generated, one with the putative leucine zipper extended in one heptad (change Ser53Leu) and the other harbouring an amino acid replacement outside of the leucine zipper-like motif (Gly14Glu) as found, respectively, in one and nineteen natural isolates of the virus [Rico *et al.*, 2006]. These mutants were fully infectious in *C. quinoa* (data not shown) denoting that the results observed through alteration of critical residues of the leucine zipper motif were sequence-specific and not a side effect of the mutagenesis. In order to eliminate the possibility that the nucleotide substitutions engineered in constructs LZM1 to LZM6 disrupted *cis*-acting elements essential for replication, these constructs were transfected in *C. quinoa* protoplasts. Northern blot analysis revealed that all assayed mutants accumulated to levels equivalent to those of the wt RNA (Fig. 2B, lower panel), indicating that their incapacity to establish effective infections in plants was due to a defect in movement rather than to a blockage in viral replication. Overall, the data support the conclusion that the leucine zipper-like motif is critical for the movement function of p12.

#### p12 mainly localizes to the ER and is recovered in membranous fractions

As indicated above, computer analysis of p12 sequence predicted that it is a membrane protein with two TMs that roughly span from residues 25 to 50 and 60 to 82, respectively (Fig. 2A). To investigate potential association of p12 to cellular membranes, this PFBV product was fused to the green fluorescent protein (GFP) and transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* leaves via agroinfiltration. Whereas expression of free GFP gave the typical diffuse green fluorescence evenly distributed through the cytoplasm and the nucleus, fluorescence derived from the fusion





**Fig. 3.** Studies on the subcellular localization of PFBV p12 in *N. benthamiana* leaves through transient expression. (A to C) Confocal scanning microscopy analysis of non-transgenic *N. benthamiana* leaves expressing unfused GFP (A, green channel) or the p12GFP fusion (B and C, green channel). (D to F) Confocal scanning microscopy analysis of leaves from transgenic 16c *N. benthamiana* plants expressing an ER-targeted GFP (Ruiz et al., 1998), after agroinfiltration with the construct that allows translation of the p12mRFP fusion. D and E display images through the red and green channel, respectively, and F corresponds to an overlay. (G) Immunoblot analysis, using anti-GFP antibody, of protein extracts from GFP- and p12GFP- expressing *N. benthamiana* leaves (right and left blots, respectively). S30 (lanes 1 and 3) and P30 (lanes 2 and 4), supernatant and pellet, respectively, following centrifugation at 30,000  $\times$  g.

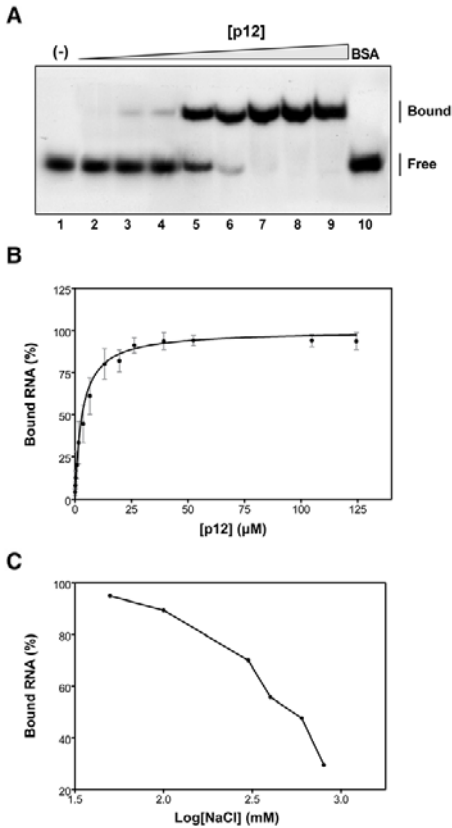
assays, no retardation of the probewas observed indicating that the association between p12 and the ssRNA was not an artefact of the specific experimental conditions employed (Fig. 4A, lane 10). Non-linear regression of the binding data (Fig. 4B) allowed estimating an apparent  $K_d$  of 3.14  $\mu$ M, which was in the range of those reported for distinct viral RNA binding proteins including several MPs [Daròs & Carrington, 1997; Herranz & Pallás, 2004; Marcos et al., 1999; Navarro et al., 2006; Skuzeski & Morris, 1995]. Only two forms of the probe were detectable in the EMSA assays, free RNA and completely retarded complex with no obvious intermediate shifted bands, which would suggest a cooperative binding of p12 to ssRNA [Citovsky et al., 1990]. However, the slope of the best-fit curve ( $h$  or Hill slope) for the binding data, calculated from three independent experiments, was found to be 1 lending little support to a cooperative view of the protein:RNA interaction ( $h=1$  is indicative of non-cooperative binding and  $h>1$  is an indication of positive cooperative binding). It is worth mentioning in this context that attempts to further concentrate our protein preparation without affecting stability were unsuccessful, which precluded more detailed characterization of the binding kinetics.

To investigate how the RNA-binding ability of p12 was dependent on electrostatic interactions, EMSAs

were performed using increasing NaCl concentrations in the incubation mixtures. An amount of protein that was sufficient to bind all RNA molecules was employed (40.0  $\mu$ M) and, thus, the appearance of free RNA was quantified to evaluate complex dissociation (Fig. 4C). The NaCl concentration at which binding was reduced to 50% of maximal levels ( $IC_{50}$ ) was 525 mM, a remarkable salt tolerance that, nevertheless, was in the range of those determined for other RNA-binding proteins of viral origin [Brantley & Hunt, 1993; López et al., 2000; Marcos et al., 1999; Martínez-Turiño & Hernández, 2010; Navarro et al., 2006; Richmond et al., 1998]. These results suggested that electrostatic interactions are not the only ones involved in binding of p12 to the RNA.

#### *p12 is a non-sequence specific ssRNA binding protein*

Competition experiments were performed to examine the binding selectivity of p12. For this purpose, unlabeled nucleic acids corresponding to either ssRNA, double-stranded (ds) RNA, ssDNA or dsDNA molecules were added to the binding mixtures at 1-, 10- and 100-fold molar excess over the radiolabeled probe. In the case of ssRNA, two distinct competitors were used, one derived from the 3'-terminal region of the PFBV genome (3'PFBV-



**Fig. 4.** Analysis of RNA-binding properties of PFBV p12 *in vitro*. (A) Representative EMSA showing interactions between the recombinant p12 and ssRNA. The  $^{32}\text{P}$ -labeled 5'-PFBV ssRNA probe (at 97 pM) was incubated with no protein (lane 1) or with His-tagged p12 at 0.10, 0.21, 0.33, 3.70, 6.55, 13.10, 26.20 and 52.41  $\mu\text{M}$  (lanes 2 to 9, respectively). The unbound, free RNA probe and the shifted (bound) RNA complexes are marked on the right. (B) Best-fit curve of the binding data from three independent experiments determined by non-linear regression. (C) Effect of NaCl concentration on the RNA binding activity of PFBV p12. The fraction of bound ssRNA was plotted against the  $\log[\text{NaCl}]$  (in mM) to estimate the  $\text{IC}_{50}$  value.

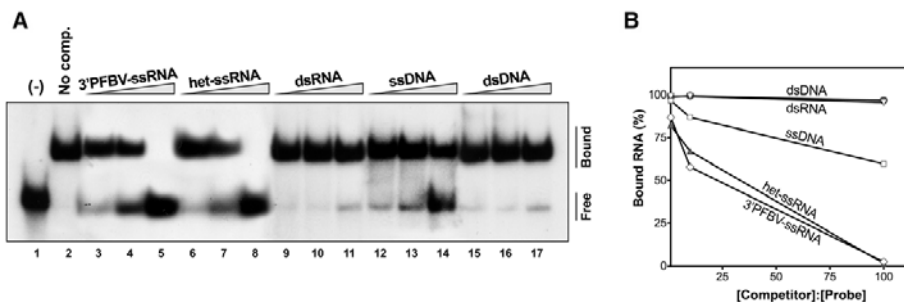
ssRNA) and the other from a heterologous source (het-ssRNA). Fixed amounts of His-tagged p12 (32.75  $\mu\text{M}$ ) and  $^{32}\text{P}$ -labeled 5'-PFBV probe (97.0 pM), that resulted in more than 99% of the ssRNA bound to the protein, were used in the binding reactions. EMSAs revealed that dsRNA and dsDNA were poor competitors because a major fraction of the probe remained bound to p12 even at a 100 molar excess (Fig. 5). At the same molar excess, the ssDNA behaved as moderately good competitor as the binding of p12 to the probe was significantly affected (Fig. 5). However, ssRNAs were undoubtedly the best competitors irrespectively of their origin, as they completely prevented formation of the p12:probe complex when added at the greatest concentration (Fig. 5). Overall, the data indicated that p12 is a single-stranded nucleic acid-binding protein with the highest preference toward any ssRNA.

#### *p12* RNA binding is attributable to its basic N-terminal domain

In order to map the region of p12 responsible of its binding activity, the N- or C-terminal region of the molecule was removed to create two truncated forms of the protein, p12(26–106) and p12(1–59). In addition, several mutated versions of p12(1–59) were generated by consecutively replacing Arg residues of the N-terminal region by Ala. The mutants were designated as p12(1–59)m2R (carrying substitutions Arg16Ala and Arg17Ala), p12(1–59)m3R (carrying substitutions Arg16Ala, Arg17Ala and Arg19Ala) and p12(1–59)m4R (carrying substitutions Arg16Ala, Arg17Ala, Arg19Ala and Arg24Ala) (Fig. 6A). All p12 derivatives were expressed in *E. coli* as His-tagged fusions, purified by chromatography on Ni-NTA columns and subjected to Northwestern assay to evaluate RNA-binding capability. To this aim, equivalent amounts of the purified proteins were separated, together with the wt p12, by SDS-PAGE and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane. After a renaturation step, the membrane was incubated with  $^{32}\text{P}$ -labeled 5'-PFBV ssRNA probe. A signal was detected in the position corresponding to the full-length protein (Fig. 6B) which was in accordance with the EMSA results and ruled out the possibility that any contaminating protein(s) from *E. coli* could account for the observed RNA binding activity. Remarkably, a similar, or even stronger, signal was noticed in the position of p12(1–59) whereas no signal was present in the portion of the membrane that contained p12(26–106). These results strongly suggested that the RNA binding properties of p12 could be provided by its N-terminal basic extension. Consistent with this possibility, double replacement of Arg by Ala in this domain strongly diminished the binding capability of p12(1–59) (protein p12[1–59]m2R; Fig. 6B) which was reduced to negligible levels when one or two additional Arg residues were mutated (proteins p12[1–59]m3R and p12[1–59]m4R, respectively; Fig. 6B). These results confirmed the involvement of the N-terminal region in the binding activity of p12 and, moreover, highlighted the contribution of positively charged amino acids to such activity.

#### Discussion

Here, we have corroborated the requirement of the two small, centrally encoded PFBV proteins, p7 and p12, for virus movement. Computer analyses suggest that PFBV p7 structure fits well with the general scheme proposed for carmoviral DGBp1 that distinguishes three different structural domains: an

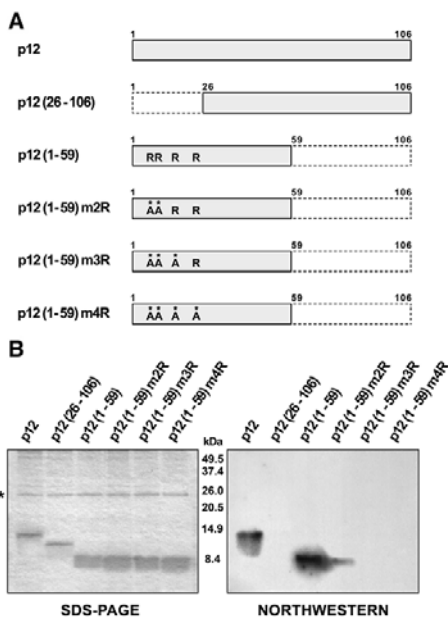


**Fig. 5.** Competition assays to evaluate binding specificity of p12. (A) EMSAs performed after incubation of His-tagged p12 (32.75 μM) and <sup>32</sup>P-labeled, 5'-PFBV ssRNA probe (at 97.0 pM) in the absence (lane 2) or the presence (lanes 3 to 17) of increasing amounts (1, 10- and 100-fold molar excess) of unlabeled competitors as shown at the top of the autoradiograms. Lanes 1, no protein. (B) Graphical representation of the EMSA results. The percentage of free probe has been plotted against competitor/probe molar ratio. The experiments were repeated twice with essentially identical results (data of one set of experiments are presented here).

unordered N-terminus, an α-helical central region and a C-terminus with potential β-sheet folding [Akgoz *et al.*, 2001; Marcos *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2006; Vilar *et al.*, 2001, 2005]. The central region is rich in positively charged amino acids and is expected to endow the protein with RNA binding properties as it has been demonstrated for CarMV and MNSV DGBp1 [Marcos *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2006] as well as the corresponding product of Turnip crinkle virus [Wobbe *et al.*, 1998]. According to *in silico* evaluations, PFBV p12 shares also main features with related products including a C-terminal region with

likely β-sheet folding and the presence of two transmembrane domains. Consistent with the latter prediction, the protein was recovered in membranous fractions and it was found to localize mainly to the ER, paralleling that reported for homologous and non-homologous MPs [Genovés *et al.*, 2010; Heinlein *et al.*, 1998; Ju *et al.*, 2005; Peremylov *et al.*, 2004; Schepetilnikov *et al.*, 2008]. Nevertheless, as PD is most probably the final target of p12, interaction of the protein with other components of the cellular macromolecular transport system at different stages of infection cannot be ruled out. This possibility was indeed suggested by some localization patterns of p12 (Fig. 3, panel C and data not shown) and, if confirmed, it would be in line with that reported for MNSV p7B and for distinct MPs [Genovés *et al.*, 2010; Haupt *et al.*, 2005; Heinlein *et al.*, 1998]. Despite the above similarities, PFBV p12 differs from other carmoviral DGBps2 in having a basic N-terminal extension and a leucine zipper-like motif. This prompted us to investigate potential functional implications of these PFBV p12-particular traits.

Leucine zippers are known to engage in protein-protein interactions and are composed of a heptad repeat of amino acids [Busch & Sassone-Corsi, 1990; Landschulz *et al.*, 1998]. This type of motifs adjust frequently to the “abcdefg rule” that holds that positions “a” and “d” of the heptad are occupied by hydrophobic amino acids while positions “e” and “g” are occupied by charged amino acids. Though this rule is usually met by “classical” leucine zippers that show lax adherence to the rule but preserve their function as intermolecular clamps have been described [e.g. Chevalier *et al.*, 2008; Fry *et al.*, 1999]. In many cases, however, the presence of leucine residues at positions “d” has been found to be critical [Bornberg-Bauer *et al.*, 1998; Moitra *et al.*, 1997]. The putative leucine zipper of PFBV p12 deviates to some extent from the classical structure (Fig. 2) but the strict conservation of the motif and, particularly, of the key



**Fig. 6.** Mapping the RNA binding domain of p12. (A) Schematic representation of p12 and its mutant forms, p12(26-106), p12(1-59), p12(1-59)m2R, p12(1-59)m3R, p12(1-59)m4R. Dashed lines indicate deleted regions in the truncated forms. In mutant versions, replacement of arginine residues by alanines are indicated. (B) Northwestern analysis of p12 and mutant forms. The purified recombinant proteins were separated by SDS-15% PAGE as shown in the left panel after Coomassie blue staining, and transferred to a nitrocellulose membrane that was incubated with the <sup>32</sup>P-labeled ssRNA probe (5'-PFBV) and autoradiographed as shown in the right panel. The asterisk in the left panel marks the position of a non-specific protein band.

leucines in all isolates of the virus characterized so far [Rico *et al.*, 2006] suggested it could be relevant for the functionality of the protein. Supporting this view, single and double alterations of pivotal leucines rendered p12 mutants unable to aid viral movement. Most likely, the engineered amino acid substitutions precluded essential association(s) of p12 with itself and/or with proteins of distinct nature. The involvement of leucine zipper motifs in homo and/or heterodimerization has been reported in both animal and plant viruses. Examples of the latter ones include the interaction between the aphid transmission factor and the virion-associated protein of *Cauliflower mosaic virus* [Leh *et al.*, 2001], or the self-interaction of the ORF II-encoded product of *Soybean chlorotic mottle virus* [Takemoto & Hibi, 2005]. We have tried to search for p12 interacting proteins through the split-ubiquitin membrane two-hybrid assay [Fetchko & Stagljar, 2004] but our attempts have been unsuccessful as p12 used as bait caused activation of the reporter in the absence of prey proteins. Assessment of potential p12 homodimerization through bimolecular fluorescence complementation (BiFC) has neither yielded clear results (data not shown). Other approaches will be needed to investigate formation of hydrophobic bonds among the leucine zipper of p12 and other leucine zipper partners. Interestingly, a host homeodomain leucine zipper protein has been found to interact with the MP of a related virus, *Tomato bushy stunt virus* (genus *Tombusvirus*, family *Tombusviridae*), an interaction that correlated with the movement activity of the protein [Desvoyes *et al.*, 2002]. Whether this factor and/or different ones are recruited by p12 for directing viral transport remains to be seen. It is also worth mentioning that leucine zippers have been implicated in some instances in regulation of post-translational modification(s) rather than in promotion of protein-protein interactions [Long *et al.*, 2008; Pagano *et al.*, 2009]. Such type of modifications might play an important role in MP activity [Kawakami *et al.*, 2003]. Several phosphorylation and glycosylation sites are predicted in p12 (data not shown). We can thus not exclude that mutations introduced in its leucine zipper-like motif have not a direct effect on association of the protein with specific viral/host factors but instead provoke conformational changes that prevent post-translational modifications required for modulation of its activity.

The other peculiarity of PFBV DGBp2 concerns to its size increment when compared with homologous proteins, an increment that results from the presence of an N-terminal extension. Abolishment of the initiation codon of ORF p12 in mutant p12aug<sup>+</sup> might still allow translation from the downstream <sup>2424</sup>AUG which would lead to production of a truncated protein

with a predicted size (8.5 kDa) resembling more those of other DGBps2 [Navarro *et al.*, 2006]. The lack of infectivity of this mutant in plants supports that the N-terminus of p12 is absolutely required during the virus life cycle. Outstandingly, we have shown that, unlike related proteins, PFBV p12 possesses RNA binding activity and, moreover, that this activity is provided by its N-terminal region. Basic residues of this region have been shown to play an essential role in RNA binding as mutation of just two arginine residues strongly reduced the capability of the protein to interact with the RNA and this capability was virtually abolished by mutation of further arginines (Fig. 6). These results are in agreement with those reporting the main participation of positively charged amino acids in RNA binding activity of diverse viral proteins [Ansel-McKinney *et al.*, 1996; Genovés *et al.*, 2009; Herranz & Pallás, 2004; Martínez-Turiño & Hernández, 2010; Rao & Grantham, 1996; Wobbe *et al.*, 1998]. In addition, the *in vitro* studies have revealed that PFBV p12, as other MPs [Brill *et al.*, 2000; Herranz & Pallás, 2004; Navarro *et al.*, 2006], has a preference for singlestranded nucleic acids, particularly to ssRNA that apparently binds in a sequence non-specific manner. Sequence specificity *in vivo* is likely afforded through other viral- and/or host-coded proteins. Alternatively, compartmentalization of viral components could preclude the protein from association to and movement of cellular RNAs. It is also noteworthy that, according to the estimated  $K_d$  (3.14  $\mu$ M), the affinity of p12 for ssRNA is similar to that determined for carmoviral DGBps1 like CarMV p7 and MNSV p7A [1.1  $\mu$ M and 25.7  $\mu$ M, respectively; Marcos *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2006], suggesting that this p12 activity is not marginal or secondary but relevant during the infectious process.

To conclude, we have proven the requirement of the leucine zipper-like motif and of the N-terminal extension of PFBV p12 for effective viral infection. We do not know at this stage which particular conditions have driven the evolution of such specific traits. We can speculate that the answer to this issue is related with the adaptation of the virus to its narrow host range as PFBV is restricted to *Pelargonium* spp. in nature. Significant examples of carmovirus adaptation, including PFBV, to a particular host have been described [Liang *et al.*, 2002a; Rico *et al.*, 2006]. Remarkable in this context is the finding that *Hibiscus chlorotic ringspot virus* encodes a protein (p23) that has no homologs in other carmoviruses and that confers host specificity. Curiously, such a protein, as PFBV p12, contains a putative leucine zipper though the biological significance of the motif has yet to be explored [Liang *et al.*, 2002b]. On the other hand, the present study raises new questions on the role(s) of the DGBp partners during virus movement. As mentioned



in the Introduction section, recent results suggest that MNSV DGBp1 cannot only bind the viral genome but probably has also the capacity to transport it toward PD following a route different from that used by MNSV DGBp2 [Genovés *et al.*, 2009, 2010]. The role of the latter protein would then be uncertain but it could be related with PD gating rather than with the intracellular movement of the DGBp1-genome complex as initially proposed. In the case of PFBV, the RNA binding ability of DGBp2 and, most likely, of DGBp1 could provide an additional advantage to the virus by potentially increasing the number of viral genomes that can reach and pass through the intercellular connections, thus facilitating the spread of the pathogen. Additional work might provide further clues on this attracting possibility.

## Materials and methods

### Generation of constructs

Site-directed mutations affecting ORFs p7 and p12 were introduced into the PFBV infectious clone pSP18-IC [Rico & Hernández, 2006] by PCR using with the Quick Change Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) and proper oligonucleotide pairs. The mutations altered the presumed start codons of each ORF or led to amino acid replacements in selected regions of p12.

Binary constructs for transient expression in plants were generated as follows. ORF p12 was PCR amplified from the infectious clone pSP18-IC using specific primer pairs and the Expand High Fidelity PCR System (Roche). The amplification product, bearing proper restriction sites at the ends, was fused in frame to the 5' end of the GFP or monomeric (m) RFP genes by standard cloning procedures [Sambrook *et al.*, 2007]. The unfused GFP gene and the DNA fusions p12GFP and p12mRFP were inserted between 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 vector pMOG800 [Knoester *et al.*, 1998] to yield constructs pMOG-GFP, pMOG-p12GFP and pMOG-p12mRFP, respectively.

A similar approach was followed to obtain constructs for protein expression in *E. coli*. Full-length and truncated forms of ORF p12 were PCR amplified and cloned into the pET-23d(+) vector (Novagen) through its *Nco*I and *Hind*III restriction sites. The resulting recombinant plasmids, named pET-p12, pET-p12(1–59) and pET-p12(26–106), contained the corresponding version of the PFBV gene fused to a sequence coding for a hexa-histidine tag. Three additional constructs, pET-p12(1–59)m2R, pET-

p12(1–59)m3R and pET-p12(1–59)m4R, identical to pET-p12(1–59) but with nucleotide substitutions that led to the replacement of two, three and four arginine residues by alanines, respectively, in the corresponding proteins were generated by PCR with the Quick Change Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). All constructs were routinely sequenced with an ABI PRISM DNA sequencer 377 (Perkin-Elmer) to avoid unwanted modifications. The primers used to generate the distinct plasmids are listed in Table 1. Representation of the type and specific position of the modifications introduced in each mutant construct is shown in the corresponding figures.

### Inoculation of plants and protoplasts

Transcripts were synthesized *in vitro* from wt clone pSP18-IC and derived mutant constructs with T7 RNA polymerase (Fermentas) following digestion of plasmids with *Xba*I. Protoplasts ( $0.5 \times 10^6$ ), prepared from *C. quinoa* leaves [Hans *et al.*, 1992], were inoculated with 10  $\mu$ g of PFBV genomic transcripts by using polyethylene glycol. The same type of transcripts was used to mechanically inoculate *C. quinoa* plants (three leaves per plant employing approximately 2  $\mu$ g of transcript per leaf). Plants were maintained under greenhouse conditions (16 h days at 24 °C, 8 h nights at 20 °C) and monitored for lesion appearance from 7 to 15 dpi.

### RNA extraction and Northern blot hybridization

Total RNA preparations from *C. quinoa* leaves were obtained by phenol extraction and lithium precipitation [Verwoerd *et al.*, 1989]. In addition, total RNA was extracted from protoplast samples using TRI Reagent according the manufacturers instructions (SIGMA). Northern blot analysis was performed with a  $^{32}$ P-radioactive DNA probe, derived from the 3' region of PFBV genome, as previously described [Rico & Hernández, 2009].

### *Agrobacterium-mediated transient expression, subcellular fractionation and immunoblotting.*

For transient expression in plants, constructs pMOG-GFP, pMOGp12GFP and pMOG-p12mRFP were used to transform *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 (pCH32). Transformed bacteria were grown overnight in proper conditions and subsequently collected by slow-speed centrifugation and adjusted to the required final OD<sub>600</sub> (0.5) value with 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES, pH 5.6 and 150  $\mu$ M acetosyringone. After 2 h incubation, the suspensions were infiltrated with a 5 ml needleless syringe on the abaxial side of leaves from 3- week-old *N.*

**Table 1**  
List of primers used in this work.

Primer	Position <sup>a</sup>	Sequence <sup>b</sup>	Construct
CH349	2276-2303 (S)	5' CCACACAATTGAGTGGCTTCTAAAGTGA-3'	p7aug-
CH350	2276-2303 (AS)	5' -TCACTTTAGAAGCCACCAATTTGTGTGG-3'	
CH79	2317-2342 (S)	5' -GGGTAGTGATAACGAGATTGACGTGC-3'	p12aug-
CH80	2317-2342 (AS)	5' -GCAGTCAATCTCTGTTACTACTCC-3'	
CH81	2516-2540 (S)	5' -CCACACATAAATGAACTTACTCTTG-3'	LZM1
CH82	2516-2540 (AS)	5' -CAAGTAAAGATTgAlTATGTGTGG-3'	LZM5
CH83	2514-2537 (S)	5' -CTCCACACATAgCGAATCTTACC-3'	LZM2
CH84	2514-2537 (AS)	5' -GTTAGATTGcgtATGTGTGGAG-3'	LZM6
CH85	2557-2580 (S)	5' -TTCTTTCATCcgGGCAGAGAG-3'	LZM3
CH86	2557-2580 (AS)	5' -CTCTCTGCGCcgGATGAAGAAC-3'	LZM5
CH87	2557-2580 (S)	5' -GTTCTTTCATCcgGGCAGAGAG-3'	LZM4
CH88	2557-2580 (AS)	5' -CTCTCTGCGCcgGATGAAGAAC-3'	LZM6
CH39	2328-2347 (S)	5' -GGGGATCCATGAGATTGACGTGCAGTG-3'	(BamHI)
CH38	2626-2645 (AS)	5' -GGAAGTTAGGATCCCTGCCCAGTTGAGATCCGTA-3'	(BamHI)
DH5P12	2328-2351 (S)	5' -GCCATGGGATTGACGTGTCAGTGGGAG-3'	(NcoI)
CH69	2625-2645 (AS)	5' -CCAGCTTTTCCCGATTGAGATCCGAT-3'	(HindIII)
DH5P12	2328-2351 (S)	5' -GCCATGGGATTGACGTGTCAGTGGGAG-3'	(NcoI)
CH96	2482-2504 (AS)	5' -CCAGCTTAGGGGGCATACTAAAGTTGAAG-3'	(HindIII)
CH265	2401-2423 (S)	5' -GCCATGGGCGCTCTCCAAAGCCATCTC-3'	(NcoI)
CH69	2625-2645 (AS)	5' -CCAGCTTTTCCCGATTGAGATCCGAT-3'	(HindIII)
CH300	2359-2391 (S)	5' -GAAATAGGGGGAAACgAgCGTAAAGATATCCGT-3'	pET-p12(1-59)m2R
CH301	2359-2391 (AS)	5' -ACCGATATCTTACGcgtTgCGTTCCCGCTATTCC-3'	
CH302	2370-2396 (S)	5' -ACGcAgcGGTAgcATATCCGTCGGA-3'	pET-p12(1-59)m3R
CH303	2370-2396 (AS)	5' -TTCCGACGGATATgctACCGcTgCGTT-3'	
CH304	2385-2411 (S)	5' -TATCCGTGCGAAgCGAGCGTCTCCCA-3'	pET-p12(1-59)m4R
CH305	2385-2411 (AS)	5' -TGGAGACAGCGTgctTTCGACGGATA-3'	

<sup>a</sup> Positions of the PFBV genome covered by the primers. (S) and (AS): sense and antisense.

<sup>b</sup> Restriction sites introduced for cloning purposes are underlined and lowercase indicate nucleotide substitutions to PFBV wt sequence.

*benthamiana* plants as previously described [Martínez-Turiño & Hernández, 2009].

To prepare soluble and insoluble fractions from GFP and p12GFP-expressing plant tissue, *N. benthamiana* leaves were collected 5 days after agroinfiltration with the corresponding construct and ground with a mortar and pestle with 5 ml of extraction buffer (50 mM Tris-acetate, pH 7.4, 10 mM potassium acetate, 1 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) per g of fresh weight. After extraction, the homogenates were centrifuged at 3,000×g for 10 min to remove large cellular debris and the resulting supernatant was ultracentrifuged at 30,000×g for 1 h to generate the soluble (S30) and the microsomal (P30) fractions. Then, the P30 fraction was resuspended in 500 µl of extraction buffer. The S30 and P30 fractions were electrophoresed, transferred to polyvinylidene fluoride membranes (PVDF) membranes (Roche) and immunoblotted with anti-GFP (Roche). Immunoreactive bands were revealed with chemiluminescence ECL Plus kit following supplier recommendations (GE Healthcare).

#### Fluorescence microscopy

A Leica TCS SL confocal microscope was used to obtain images employing an HCX PL APO×40/1.25-0.75 oil CS objective. GFP fluorescence was monitored by excitation with 488 nm argon laser line with emission being collected through band-pass filter from 505 to 550 nm. In the case of mRFP, excitation was performed by means of a 543-nm green-neon laser line, and fluorescence emission was collected at 610 to 630 nm. Observation of fluorescence in

agroinfiltrated *N. benthamiana* leaves was done at 48–72 h post-infiltration.

#### Expression and purification of PFBV p12 and derivatives

The pET-23d(+)-based constructs were used to transform *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS (Novagen). Expression of the His-tagged p12 protein and derivatives was induced in the transformed bacteria with isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 0.4 mM for 4 h at 37 °C. Purification of the proteins was performed by metal affinity chromatography in denaturing conditions using nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) columns and following manufacturer recommendations (Sigma). His-tagged proteins were finally eluted from the columns in a buffer containing 500 mM imidazole, 300 mM NaCl and 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8.0. Purified preparations were dialysed at 4 °C for 24 h against PBS 1x (136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 3.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5) supplemented with Arg and Glu at 50 mM in order to favour the stability of the proteins [Golovanov *et al.*, 2004]. The purified recombinant proteins were analyzed and quantified by SDS-15% PAGE after Coomassie brilliant blue staining.

#### EMSA

A <sup>32</sup>P-labeled ssRNA probe named 5'-PFBV and embracing the 5'-terminal 141 nt of PFBV genome was used for EMSA. The <sup>32</sup>P-labeled RNA probe (at 97 pM) was mixed with p12 and derivatives at different ratios in 25 µl of binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10%

glycerol and 2 U of RNase inhibitor [Fermentas]) and incubated at 25 °C for 30 min. When indicated, the NaCl concentration was modified. After the binding reaction, samples were analyzed by non-denaturing PAGE (5%) in TAE buffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.2). The gel was vacuum dried and exposed for autoradiography or phosphorimage analysis. In competition experiments, different amounts of unlabelled nucleic acids were added simultaneously with the labeled ssRNA probe to the binding mixtures. Competitors corresponded to two distinct ssRNAs, namely 3'-PFBV (encompassing nt 3560–3923 of the PFBV genome) and het-ssRNA (non-PFBV ssRNA), and to heterologous dsRNA, ssDNA and dsDNA molecules. Synthesis of the labelled probe and of the different competitors was performed as previously described [Martínez-Turiño & Hernández, 2010]. GraphPad Prism software version 5.03 was employed for non-linear regression analysis of the binding data and for estimation of  $K_d$  and  $IC_{50}$  values.

#### Northwestern assay

Recombinant proteins pET-p12(1–59), pET-p12(26–106), pETp12(1–59)m2R, pET-p12(1–59)m3R and pET-p12(1–59)m4R were electrophoresed through 15% SDS-polyacrylamide gels and electroblotted to nitrocellulose membranes (Scheicher and Schuell) in the presence of transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine and 20% methanol). The membrane attached proteins were renatured overnight at room temperature in renaturation buffer (10 mM Tris–HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.1% Triton X-100 and 1× Denhardt's reagent) supplemented with 1% BSA. The membranes were then probed with  $^{32}$ P-labelled 3'-PFBV ssRNA, washed three times with the renaturation buffer, air dried and subjected to autoradiography.

#### Sequence analyses

A consensus secondary structure of PFBV p12 was drawn from data obtained by means of SYMPRED server (<http://www.ibi.vu.nl/programs/sympredwww>) [Simossis & Heringa, 2004], that was run using a combination of different programs (JNet, PSIPred PHDpsi, SSPro2.01, YASPIN and PREDATOR). Hydrophobic regions with potential membrane insertion were determined through programs SOUSI, TMPRED, DAS, TMHMM2 HMMTop 2.0 and TopPred2 available at the ExPASy Proteomics server (<http://expasy.org/tools/#proteome>) [Gasteiger *et al.*, 2003]. Softwares NetPhos 2.0 and YinOYang 1.2 were used from the same server for prediction of

potential phosphorylation and glycosylation sites in the protein.

#### Acknowledgements

We gratefully thank Dr. Vicente Pallás for critical reading of the manuscript and Dolores Arocas and Isabella Avellaneda for their technical assistance. This research was supported by grant BFU2006- 11230 and BFU2009-11699 from the Ministerio Ciencia e Innovación (MICINN, Spain) and by grants ACOM/2006/210 and ACOMP/2009/ 040 (Generalitat Valenciana, GV) to C. H. S. M.-T. was the recipient of a predoctoral fellowship from GV and of a predoctoral contract from MICINN.

#### References

- Akgoz, M., Nguyen, Q.N., Talmadge, A.E., Drainville, K.E. & Wobbe, K.K. (2001). Mutational analysis of Turnip crinkle virus movement protein p8. *Mol. Plant Pathol.* **2**: 37-48.
- Ansel-McKinney, P., Scott, S.W., Swanson, M., Ge, X. & Gehrke, L. (1996). A plant viral coat protein RNA binding consensus sequence contains a crucial arginine. *EMBO J.* **15**: 5077-5084.
- Benitez-Alfonso, Y., Faulkner, C., Ritzenthaler, C. & Maule, A. (2010). Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**: 1403-1412.
- Bornberg-Bauer, E., Rivals, E. & Vingron, M. (1998). Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic Acids Res.* **26**: 2740-2746.
- Brantley, J.D. & Hunt, A.G. (1993). The N-terminal protein of the polyprotein encoded by the potyvirus *Tobacco vein mottling virus* is an RNA-binding protein. *J. Gen. Virol.* **74**: 1157-1162.
- Brill, L.M., Nunn, R.S., Kahn, T.W., Yeager, M. & Beachy, R.N. (2000). Recombinant *Tobacco mosaic virus* movement protein is an RNA-binding, alpha-helical membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 7112-7117.
- Busch, S.J. & Sassone-Corsi, P. (1990). Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *Trends Genet.* **6**: 36-40.
- Chen, Y. & Varani, G. (2005). Protein families and RNA recognition. *FEBS J.* **272**: 2088-2097.
- Chevalier, F., Perazza, D., Laporte, F., Le Hénanff, G., Hornitschek, P., Bonneville, J.M., Herzog, M. & Vachon, G. (2008). GeBP and GeBP-like proteins are noncanonical leucine-zipper transcription factors that

- regulate cytokinin response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **146**: 1142-1154.
- Citovsky, V., Knorr, D., Schuster, G. & Zambryski, P.** (1990). The P30 movement protein of *Tobacco mosaic virus* is a single strand nucleic acid binding protein. *Cell* **60**: 637-647.
- Daròs, J.A. & Carrington, J.C.** (1997). RNA binding activity of NIa proteinase of *Tobacco etch potyvirus*. *Virology* **237**: 327-336.
- Desvoyes, B., Faure-Rabasse, S., Chen, M.H., Park, J.W. & Scholthof, H.B.** (2002). A novel plant homeodomain protein interacts in a functionally relevant manner with a virus movement protein. *Plant Physiol.* **129**: 1521-1532.
- Fetchko, M. & Stagljar, I.** (2004). Application of the split-ubiquitin membrane yeast twohybrid system to investigate membrane protein interactions. *Methods* **32**: 349-362.
- Fry, A.M., Arnaud, L. & Nigg, E.A.** (1999). Activity of the human centrosomal kinase, Nek2, depends on an unusual leucine zipper dimerization motif. *J. Biol. Chem.* **274**: 16304-16310.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. & Bairoch, A.** (2003). ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3784-3788.
- Genovés, A., Navarro, J.A. & Pallás, V.** (2006). Functional analysis of the five *Melon necrotic spot virus* genome-encoded proteins. *J. Gen. Virol.* **87**: 2371-2380.
- Genovés, A., Navarro, J.A. & Pallás, V.** (2009). A self-interacting carmovirus movement protein plays a role in binding of viral RNA during the cell-to-cell movement and shows an actin cytoskeleton dependent location in cell periphery. *Virology* **395**: 133-142.
- Genovés, A., Navarro, J.A. & Pallás, V.** (2010). The intra- and intercellular movement of Melon necrotic spot virus (MNSV) depends on an active secretory pathway. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**: 263-272.
- Golovanov, A.P., Hautbergue, G.M., Wilson, S.A. & Lian, L.Y.** (2004). A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 8933-8939.
- Hacker, D.L., Petty, I.T., Wei, N. & Morris, T.J.** (1992). Turnip crinkle virus genes required for RNA replication and virus movement. *Virology* **186**: 1-8.
- Hans, F., Fuchs, M. & Pinck, L.** (1992). Replication of *Grapevine fanleaf virus* satellite RNA transcripts in *Chenopodium quinoa* protoplasts. *J. Gen. Virol.* **73**: 2517-2523.
- Harries, P.A., Schoelz, J.E. & Nelson, R.S.** (2010). Intracellular transport of viruses and their components: utilizing the cytoskeleton and membrane highways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**: 1381-1393.
- Haupt, S., Cowan, G.H., Ziegler, A., Roberts, A.G., Oparka, K.J. & Torrance, L.** (2005). Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic recycling pathway. *Plant Cell* **17**: 164-181.
- Heinlein, M. & Epel, B.L.** (2004). Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata. *Int. Rev. Cytol.* **235**: 93-164.
- Heinlein, M., Padgett, H.S., Gens, J.S., Pickard, B.G., Casper, S.J., Epel, B.L. & Beachy, R.N.** (1998). Changing patterns of localization of the *Tobacco mosaic virus* movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell* **10**: 1107-1120.
- Herranz, M.C. & Pallás, V.** (2004). RNA-binding properties and mapping of the RNA-binding domain from the movement protein of *Prunus necrotic ringspot virus*. *J. Gen. Virol.* **85**: 761-768.
- Hull, R.** (2002). Virus movement through the plant and effects on plant metabolism, Matthews' plant virology, 4th Ed. Academic Press, San Diego, pp. 373-436.
- Ju, H.J., Samuels, T.D., Wang, Y.S., Blancaflor, E., Payton, M., Mitra, R., Krishnamurthy, K., Nelson, R.S. & Verchot-Lubicz, J.** (2005). The *Potato virus X* TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum-derived vesicles during virus infection. *Plant Physiol.* **138**: 1877-1895.
- Kawakami, S., Hori, K., Hosokawa, D., Okada, Y. & Watanabe, Y.** (2003). Defective tobamovirus movement protein lacking wild-type phosphorylation sites can be complemented by substitutions found in revertants. *J. Virol.* **77**: 1452-1461.
- Knoester, M., van Loon, L.C., van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J.F. & Linthorst, H.J.M.** (1998). Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 1933-1937.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. & McKnight, S.L.** (1998). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**: 1759-1764.
- Leh, V., Jacquot, E., Geldreich, A., Haas, M., Blanc, S., Keller, M. & Yot, P.** (2001). Interaction between the open reading frame III product and the coat protein is required for transmission of *Cauliflower mosaic virus* by aphids. *J. Virol.* **75**: 100-106.

- Li, W.Z., Qu, F. & Morris, T.J.** (1998). Cell-to-cell movement of *Turnip crinkle virus* is controlled by two small open reading frames that function *in trans*. *Virology* **244**: 405-416.
- Liang, X.Z., Lee, B.T.K. & Wong, S.M.** (2002a). Covariation in the capsid protein of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* induced by serial passaging in a host that restricts movement leads to avirulence in its systemic host. *J. Virol.* **76**: 12320-12324.
- Liang, X.Z., Lucy, A.P., Ding, S.W. & Wong, S.M.** (2002b). The p23 protein of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* is indispensable for host-specific replication. *J. Virol.* **76**: 12312-12319.
- Lommel, S.A., Martelli, G.P., Rubino, L. & Russo, M.** (2005). Family *Tombusviridae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, USA, pp. 907-936.
- Long, G., Pan, X. & Vlak, J.M.** (2008). Conserved leucines in N-terminal heptad repeat HR1 of envelope fusion protein F of group II nucleopolyhedroviruses are important for correct processing and essential for fusogenicity. *J. Virol.* **82**: 2437-2447.
- López, C., Navas-Castillo, J., Gowda, S., Moreno, P. & Flores, R.** (2000). The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of *Citrus tristeza virus* is an RNA-binding protein. *Virology* **269**: 462-470.
- Luan, C.H., Qiu, S., Finley, J.B., Carson, M., Gray, R.J., Huang, W., Johnson, D., Tsao, J., Reboul, J., Vaglio, P., Hill, D.E., Vidal, M., Delucas, L.J. & Luo, M.** (2004). High-throughput expression of *C. elegans* proteins. *Genome Res.* **14**: 2102-2110.
- Lucas, W.J.** (2006). Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* **344**: 169-184.
- Lyu, P.C., Liff, M.I., Marky, L.A. & Kallenbach, N.R.** (1990). Side chain contributions to the stability of alpha-helical structure in peptides. *Science* **250**: 669-673.
- Marcos, J.F., Vilar, M., Pérez-Payá, E. & Pallás, V.** (1999). *In vivo* detection, RNA-binding properties and characterization of the RNA-binding domain of the p7 putative movement protein from carnation mottle carmovirus (CarMV). *Virology* **255**: 354-365.
- Martínez-Gil, L., Johnson, A.E. & Mingarro, I.** (2010). Membrane insertion and biogenesis of the *Turnip crinkle virus* p9 movement protein. *J. Virol.* **84**: 5520-5527.
- Martínez-Turiño, S. & Hernández, C.** (2009). Inhibition of RNA silencing by the coat protein of *Pelargonium flower break virus*: distinctions from closely related suppressors. *J. Gen. Virol.* **90**: 519-525.
- Martínez-Turiño, S. & Hernández, C.** (2010). Identification and characterization of RNA binding activity in the ORF1-encoded replicase protein of *Pelargonium flower break virus*. *J. Gen. Virol.* **91**: 3075-3084.
- Melcher, U.** (2000). The '30K' superfamily of viral movement proteins. *J. Gen. Virol.* **81**: 257-266.
- Moitra, J., Szilák, L., Krylov, D. & Vinson, C.** (1997). Leucine is the most stabilizing aliphatic amino acid in the d position of a dimeric leucine zipper coiled coil. *Biochemistry* **36**: 12567-12573.
- Navarro, J.A., Genovés, A., Climent, J., Sauri, A., Martínez-Gil, L., Mingarro, I. & Pallás, V.** (2006). RNA-binding properties and membrane insertion of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) double gene block movement proteins. *Virology* **356**: 57-67.
- Nelson, R.S. & Citovsky, V.** (2005). Plant viruses. Invaders of cells and pirates of cellular pathways. *Plant Physiol.* **138**: 1809-1814.
- O'Neil, K.T. & DeGrado, W.F.** (1990). A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science* **250**: 646-651.
- O'Shea, E.K., Rutkowski, R. & Kim, P.S.** (1989). Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* **243**: 538-542.
- Pagano, M., Clynes, M.A., Masada, N., Ciruela, A., Ayling, L.J., Wachten, S. & Cooper, D.M.** (2009). Insights into the residence in lipid rafts of adenylyl cyclase AC8 and its regulation by capacitative calcium entry. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**: C607-C619.
- Peremyslov, V.V., Pan, Y.W. & Dolja, V.V.** (2004). Movement protein of a closterovirus is a type III integral transmembrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **78**: 3704-3709.
- Rao, A.L. & Grantham, G.L.** (1996). Molecular studies on bromovirus capsid protein. II. Functional analysis of the amino-terminal arginine-rich motif and its role in encapsidation, movement, and pathology. *Virology* **226**: 294-305.
- Richmond, K.E., Chenault, K., Sherwood, J.L. & German, T.L.** (1998). Characterization of the nucleic acid binding properties of *Tomato spotted wilt virus* nucleocapsid protein. *Virology* **248**: 6-11.
- Rico, P. & Hernández, C.** (2004). Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pelargonium flower break virus*. *Arch. Virol.* **149**: 641-651.

- Rico, P. & Hernández, C.** (2006). Infectivity of *in vitro* transcripts from a full length cDNA clone of *Pelargonium flower break virus* in an experimental and a natural host. *J. Plant Pathol.* **88**: 103-106.
- Rico, P. & Hernández, C.** (2009). Characterization of the subgenomic RNAs produced by *Pelargonium flower break virus*: identification of two novel RNA species. *Virus Res.* **142**: 100-107.
- Rico, P., Ivars, P., Elena, S.F. & Hernández, C.** (2006). Insights on the selective pressures restricting *Pelargonium flower break virus* genome variability: evidence for host adaptation. *J. Virol.* **80**: 8124-8132.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O. & Baulcombe, D.C.** (1998). Initiation and maintenance of virus induced gene silencing. *Plant Cell* **10**: 937-946.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (2007). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
- Saurí, A., Saksena, S., Salgado, J., Johnson, A.E. & Mingarro, I.** (2005). Double-spanning plant viral movement protein integration into the endoplasmic reticulum membrane is signal recognition particle-dependent, translocon-mediated, and concerted. *J. Biol. Chem.* **280**: 25907-25912.
- Schepetilnikov, M.V., Solovyev, A.G., Gorshkova, E.N., Schiemann, J., Prokhnevsky, A.I., Dolja, V.V. & Morozov, S.Y.** (2008). Intracellular targeting of a hordeiviral membranespanning movement protein: sequence requirements and involvement of an unconventional mechanism. *J. Virol.* **82**: 1284-1293.
- Simossis, V.A. & Heringa, J.** (2004). Optimally segmented consensus secondary structure prediction SYMPRED server at URL: <http://ibivu.cs.vu.nl/programs/sympred> www/2004.
- Skuzeski, J.M. & Morris, T.J.** (1995). Quantitative analysis of the binding of *Turnip crinkle virus* coat protein to RNA fails to demonstrate binding specificity but reveals a highly cooperative assembly interaction. *Virology* **210**: 82-90.
- Takemoto, Y. & Hibi, T.** (2005). Self-interaction of ORF II protein through the leucine zipper is essential for *Soybean chlorotic mottle virus* infectivity. *Virology* **332**: 199-205.
- Takemoto, Y., Kanehira, T., Shinohara, M., Yamashita, S. & Hibi, T.** (2000). The nucleotide sequence and genome organization of *Japanese iris necrotic ring virus*, a new species in the genus *Carmovirus*. *Arch. Virol.* **145**: 651-657.
- Verwoerd, T.C., Dekker, B.M.M. & Hoekema, A.** (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* **17**: 2362.
- Vilar, M., Esteve, V., Pallás, V., Marcos, J.F. & Pérez-Payá, E.** (2001). Structural properties of *Carnation mottle virus* p7 movement protein and its RNA-binding domain. *J. Biol. Chem.* **276**: 18122-18129.
- Vilar, M., Saurí, A., Monné, M., Marcos, J.F., von Heijne, G., Pérez-Payá, E. & Mingarro, I.** (2002). Insertion and topology of a plant viral movement protein in the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **277**: 23447-23452.
- Vilar, M., Saurí, A., Marcos, J.F., Mingarro, I. & Pérez-Payá, E.** (2005). Transient structural ordering of the RNA-binding domain of *Carnation mottle virus* p7 movement protein modulates nucleic acid binding. *Chembiochem* **6**: 1391-1396.
- Wagmann, E., Ueki, S., Trutnyeva, K. & Citovsky, V.** (2004). The ins and outs of non-destructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. *Crit. Rev. Plant Sci.* **23**: 195-250.
- Weiss, M.A. & Narayana, N.** (1998). RNA recognition by arginine-rich peptide motifs. *Biopolymers* **48**: 167-180.
- Wobbe, K.K., Akgoz, M., Dempsey, D.A. & Klessig, D.F.** (1998). A single amino acid change in *Turnip crinkle virus* movement protein p8 affects RNA binding and virulence on *Arabidopsis thaliana*. *J. Virol.* **72**: 6247-6250.
- Zhang, X.J., Baase, W.A. & Matthews, B.W.** (1991). Toward a simplification of the protein folding problem: a stabilizing polyalanine alpha-helix engineered in T4 lysozyme. *Biochemistry* **30**: 2012-2017.

# CAPÍTULO IV







Short  
CommunicationCorrespondence  
Carmen Hernández  
cahernan@ibmcp.upv.esInhibition of RNA silencing by the coat protein of  
*Pelargonium* flower break virus: distinctions from  
closely related suppressors

Sandra Martínez-Turiño and Carmen Hernández

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas-UPV), Avenida de los Naranjos, 46022 Valencia, SpainReceived 31 July 2008  
Accepted 21 October 2008

Viral-derived double-stranded RNAs (dsRNAs) activate RNA silencing, generating small interfering RNAs (siRNAs) which are incorporated into an RNA-induced silencing complex (RISC) that promotes homology-dependent degradation of cognate RNAs. To counteract this, plant viruses express RNA silencing suppressors. Here, we show that the coat protein (CP) of *Pelargonium* flower break virus (PFBV), a member of the genus *Carmovirus*, is able to efficiently inhibit RNA silencing. Interestingly, PFBV CP blocked both sense RNA- and dsRNA-triggered RNA silencing and did not preclude generation of siRNAs, which is in contrast with the abilities that have been reported for other carmoviral CPs. We have also found that PFBV CP can bind siRNAs and that this ability correlates with silencing suppression activity and enhancement of potato virus X pathogenicity. Collectively, the results indicate that PFBV CP inhibits RNA silencing by sequestering siRNAs and preventing their incorporation into a RISC, thus behaving similarly to unrelated viral suppressors but dissimilarly to orthologous ones.

RNA silencing is a eukaryotic mechanism for RNA-based gene regulation that plays essential roles in diverse biological processes. Though RNA silencing may operate through different pathways, the triggers in all cases are double-stranded RNA (dsRNA) or highly structured single-stranded RNA molecules, the former originated via an RNA-dependent RNA polymerase (RdRP), which is processed by RNase III-type Dicer enzymes into small RNA duplexes of 21–25 nt [Bernstein *et al.*, 2001; Hamilton & Baulcombe, 1999; Zamore *et al.*, 2000]. One class of these small duplexes, termed small interfering RNAs (siRNAs), mediate an RNA silencing pathway that takes place in the cytoplasm, which is involved in antiviral defence in different eukaryotes [Ding & Voinnet, 2007; Waterhouse *et al.*, 2001]. After their generation, these siRNAs are denatured and one strand is incorporated into a multisubunit endonuclease known as RNA-induced silencing complex (RISC) [Baumberger & Baulcombe, 2005; Liu *et al.*, 2004]. Within the activated RISC, single-stranded siRNAs act as guides to bring the complex into contact with complementary mRNAs and thereby cause their degradation [Baulcombe, 2005; Hammond *et al.*, 2001]. The associated siRNAs also seem to provide sequence specificity for a cellular RdRP that generates new dsRNAs upstream of the initial trigger, leading to secondary siRNA accumulation and thus amplifying silencing [Lipardi *et al.*, 2001; Sijen *et al.*, 2001].

To counteract RNA silencing-mediated host defences, many plant and some animal viruses have evolved RNA silencing suppressor proteins [Qu & Morris, 2005; Voinnet, 2005]. These proteins do not share any

obvious sequence or structural similarity across viral groups and might interfere with the RNA silencing pathway at different stages [Roth *et al.*, 2004]. So far, the best characterized of the viral suppressors is the p19 protein of tombusviruses. Detailed studies have demonstrated that this binds siRNAs, thus making them unavailable for RISC [Lakatos *et al.*, 2004; Silhavy *et al.*, 2002; Vargason *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003]. Recent results demonstrate that distinct unrelated viral suppressors also inhibit silencing by sequestering siRNAs [Lakatos *et al.*, 2006; Mérai *et al.*, 2006], while others might inactivate silencing by binding dsRNAs without obvious size selection, which could interfere with Dicer activity [Chao *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005; Mérai *et al.*, 2005, 2006]. Viral suppressors that apparently exert their action by different mechanisms have also been described [Baumberger *et al.*, 2007; Trinks *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006].

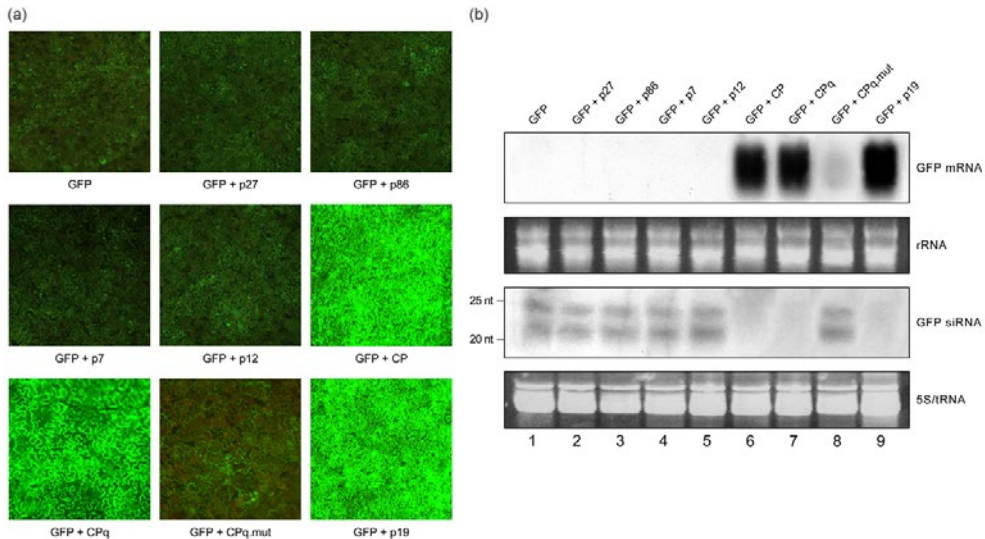
*Pelargonium* flower break virus (PFBV), genus *Carmovirus*, family *Tombusviridae*, has a single-stranded positive-sense genomic RNA that encodes two proteins involved in replication, p27 and its read-through product p86 (the viral RdRP), two movement proteins, p7 and p12, and the coat protein (CP) p37 [Rico & Hernández, 2004]. Studies on turnip crinkle virus (TCV) and hibiscus chlorotic ringspot virus (HCRSV), both carmoviruses, have shown that their CPs are strong suppressors of RNA silencing [Meng *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2003]. In the case of melon necrotic spot virus, the third member of the genus for which RNA silencing has been investigated, CP exhibited an apparently weaker

suppressor activity and a weak suppressor function was also reported for the movement protein p7b [Genovés *et al.*, 2006]. Whereas TCV CP has been proposed to interfere with the processing of dsRNA mediated by a Dicer enzyme [Deleris *et al.*, 2006; Mérai *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2004; Qu *et al.*, 2003], HCRSV CP action was determined to occur at or before the dsRNA generation step [Meng *et al.*, 2006], suggesting that homologous proteins may block silencing by different mechanisms. To explore this issue further here, we have identified and characterized suppressor activity from PFBV. These results highlight a considerable diversification in the molecular basis of the suppressor activity of closely related proteins.

To identify potential RNA silencing suppressors of PFBV, individual PFBV ORFs were amplified from the infectious clone pSP18-IC [Rico & Hernández, 2006] with the Expand High Fidelity PCR system (Roche) and subsequently inserted under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter into the binary vector pMOG800. *Agrobacterium tumefaciens* was transformed with the resulting plasmids or with equivalent binary constructs (**Supplementary Fig. S1**, available in JGV Online) harbouring the green fluorescent protein (GFP) [Herranz *et al.*, 2005] or the tombusviral p19 [Voynet *et al.*, 2003] gene and these were used to infiltrate leaves from GFP-transgenic *Nicotiana benthamiana*

plants (line 16c) [Ruiz *et al.*, 1998] as described previously [Qu *et al.*, 2003; Voynet *et al.*, 2000].

Leaf patches expressing GFP alone or together with any of the replication or movement proteins showed high levels of GFP expression at 2 days post-infiltration (p.i.) (data not shown) which was almost completely silenced at 5 days p.i. as assessed by observations of GFP fluorescence (**Fig. 1a**). However, co-expression of the PFBV CP with GFP resulted in a sustained, very bright green fluorescence which was comparable in intensity and persistency to that visualized in parallel assays with the tombusviral p19, used as a positive control of suppressor activity (**Fig. 1a**). Northern blot hybridization, performed as previously described [Castaño & Hernández, 2005], confirmed that the fluorescence patterns reflected changes in the steady-state levels of GFP mRNA since, at 5 days p.i., GFP mRNA accumulation was very low in infiltration patches expressing GFP alone or in combination with p27, p86, p7 or p12, whereas co-expression of GFP and CP gave rise to GFP mRNA levels equivalent to those observed from expression of GFP plus p19 (**Fig. 1b**). As indicated above, RNA silencing is always associated with accumulation of siRNAs. Analysis of siRNAs, as reported by Martínez de Alba *et al.* (2002), showed that the levels of GFP siRNAs were strongly diminished in tissues co-expressing GFP and PFBV CP, which correlated with the high amount of GFP mRNA detected in these



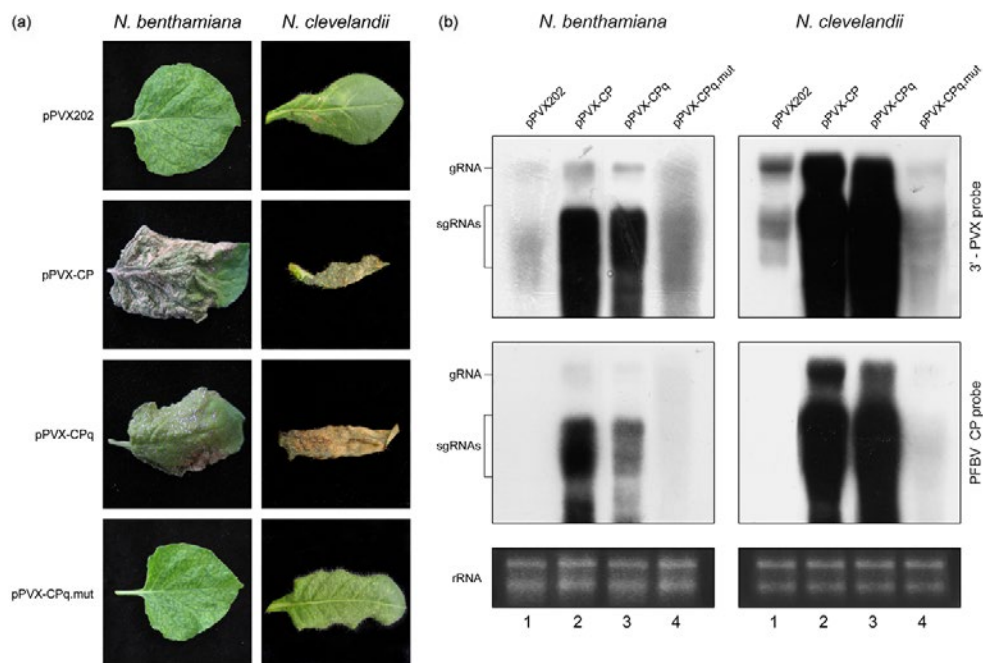
**Fig. 1.** *In planta* assay for RNA silencing suppression. *N. benthamiana* 16c plants were agroinfiltrated with constructs for expression of GFP either alone or in combination with p27, p86, p7, p12, CP, CPq, CPq.mut or p19. (a) GFP fluorescence at 5 days p.i. in infiltrated leaf patches. (b) Northern blot hybridization for detection of the GFP mRNA or derived siRNAs. Ethidium bromide staining of RNA is shown as a loading control.

tissues (Fig. 1b). Co-expression of GFP and p19 also gave rise to an apparent reduction in siRNA accumulation (Fig. 1b) in agreement with previous observations [Dunoyer *et al.*, 2004; Voinnet *et al.*, 2003]. Altogether, the results demonstrated that PFBV CP is able to block sense RNA-induced RNA silencing as efficiently as p19, a potent viral suppressor.

The CP of PFBV can be divided into an internal RNA-binding domain (R), a shell-forming domain (S) and a protruding domain (P) [Lommel *et al.*, 2005]. Previous work has shown that adaptation of PFBV to *Chenopodium quinoa* results in a 5 aa covariation that affects specific positions within the R and P domains [Rico *et al.*, 2006]. This *C. quinoa*-selected CP variant (CPq) was also cloned into pMOG800 and co-expressed with GFP in agroinfiltration assays, to assess whether serial transfer through the local host causes a reduction in the ability of the protein to block RNA silencing, as reported for HCRSV CP [Meng *et al.*, 2006]. The GFP fluorescence at 5 days p.i. was indistinguishable from that observed in leaf patches expressing GFP plus CP. As expected, Northern blot

analysis showed a high increase in the levels of GFP mRNA which correlated with a low accumulation of GFP-specific siRNAs (Fig. 1). These results indicate that the antisilencing activity of PFBV CP is not affected by the amino acid substitutions fixed in *C. quinoa*, and suggested that the local host does not necessarily impose restrictions on viruses that diminish their suppressor function as a strategy to limit the spread of infection. Interestingly, during amplification of the CPq gene, a nucleotide substitution, which resulted in an amino acid change (P323L) in the P domain, was accidentally introduced into one of the clones. Co-expression of this protein variant, named CPq.mut with GFP showed that the single amino acid substitution was sufficient to abolish the silencing suppressor function of the PFBV protein (Fig. 1).

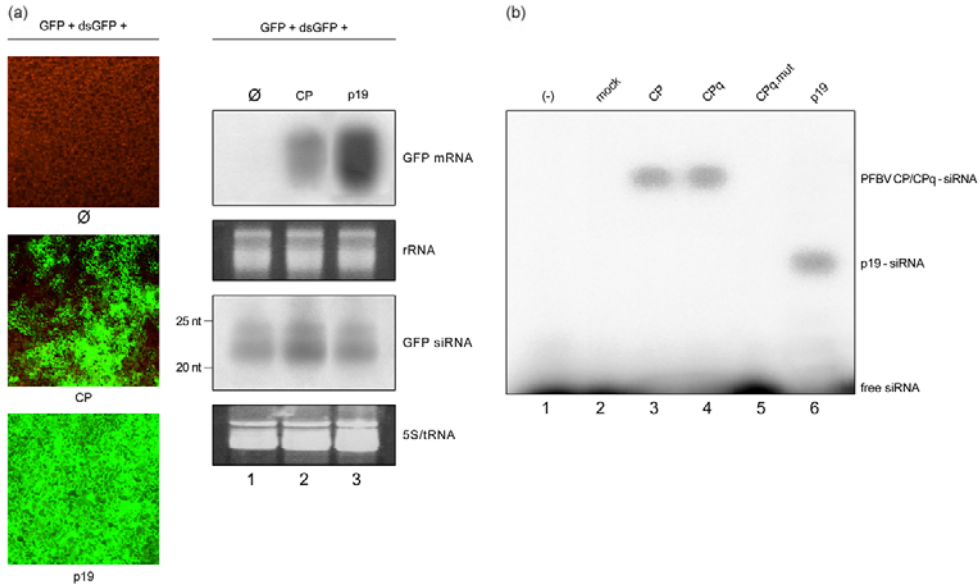
Silencing suppressors are commonly involved in enhancement of viral pathogenicity and accumulation of viruses [Voinnet *et al.*, 1999], thus many of them have been shown to accentuate symptoms when expressed by a heterologous virus [Pruss *et al.*, 1997;



**Fig. 2.** Effects of the expression of PFBV CP variants from a PVX vector on symptom severity and viral accumulation. (a) Symptoms in systemic *N. benthamiana* and *N. clevelandii* leaves 15 days after inoculation with a PVX vector containing no insert (pPVX202) or containing the PFBV CP gene (pPVX-CP), the gene of the *C. quinoa*-selected CP (pPVX-CPq) or the latter one with a mutation leading to the change P323L (pPVX-CPq.mut). The probes that were employed are indicated on the right and the positions of the PVX genomic (gRNA) and subgenomic (sgRNAs) RNAs are marked on the left.

Valli *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2006]. To investigate this, the PFBV CP gene was cloned in a PVX vector [pPVX202; Sablowski *et al.*, 1995] and the resulting construct (pPVX-CP) was used to mechanically inoculate *N. benthamiana* and *Nicotiana glauca* plants. Constructs with the CPq (pPVX-CPq) and CPq.mut (pPVX-CPq.mut) genes inserted were also tested. In both hosts, heterologous CP or CPq expression induced stunting and necrosis at 8–10 days post-inoculation, in contrast with the vein clearing and mild chlorotic mosaic elicited by wild-type PVX202 (Fig. 2a). The necrosis of systemic leaves and stems was followed by death of the plants, showing that expression of CP (or CPq) markedly accentuates pathogenicity of the unrelated PVX. Remarkably, symptoms induced by pPVX-CPq.mut were indistinguishable from those observed with pPVX202 (Fig. 2a). Northern blot analysis revealed that CP and CPq, but not CPq.mut, greatly enhanced PVX accumulation, even though the corresponding inserts were retained to similar extents in the recombinant viruses (Fig. 2b). The results showed that increasing pathogenicity and RNA silencing suppression activities of PFBV CP are intimately connected.

To obtain further insight into the mechanism of PFBV CP suppression of RNA silencing, we examined whether PFBV CP was blocking conversion of sense GFP to dsRNA or inhibiting silencing downstream of dsRNA generation. To address this, PFBV CP was co-expressed in *N. benthamiana* leaves with GFP and double-stranded GFP (dsGFP), the latter was transcribed from a binary construct that harbours both sense and antisense sequences of GFP separated by an intron and thus generating GFP dsRNA [Takeda *et al.*, 2002]. Combinations of GFP plus dsGFP, either alone or with p19, were also included as controls. The fluorescence in patches expressing GFP plus dsGFP dropped to undetectable levels at 5 days p.i., but patches co-expressing PFBV CP showed considerable fluorescence, which increased in subsequent days, and a strong fluorescence was detected in p19-expressing patches (Fig. 3a). Consistent with the fluorescence patterns, accumulation of GFP mRNA in the PFBV CP-expressing patches was notably higher than in those expressing just GFP and dsGFP, indicating that PFBV CP was able to interfere with dsRNA-triggered RNA silencing (Fig. 3a). GFP mRNA accumulation was greatly enhanced by p19 expression, in agreement



**Fig. 3.** Exploration of the molecular basis of silencing suppression by PFBV CP. (a) Inhibition of dsRNA-triggered RNA silencing. Leaves of *N. benthamiana* 16c were agroinfiltrated with construct combinations for expression of GFP plus dsGFP alone (Ø) or together with CP or p19. GFP fluorescence at 5 days p.i. in infiltrated patches is shown on the left and Northern blot detection of GFP mRNA or siRNAs extracted from the same patches is shown on the right. (b) Gel mobility shift assay. <sup>32</sup>P-labelled double-stranded siRNAs were incubated alone (-) or with crude extracts from mock-agroinfiltrated (Mock) leaves or agroinfiltrated leaves expressing PFBV CP, CPq, CPq.mut or p19. All binding reactions were performed using 22 µl of extract, except p19 for which 5 µl was used. The positions of free siRNA and of protein-siRNA complexes are indicated on the right.

with previous reports [Csorba *et al.*, 2007]. A large amount of siRNA accumulated in tissues co-expressing GFP and dsGFP alone or together with p19 (Fig. 3a). This was expected, since the tombusviral suppressor specifically binds siRNAs and, therefore, does not inhibit Dicer activity, in contrast with other suppressors that bind to long dsRNAs and compromise their Dicer-mediated processing, as seen with TCV CP [Chao *et al.*, 2005; Lingel *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005; Mérai *et al.*, 2005, 2006]. Remarkably, cleavage of dsGFP to siRNAs was inhibited neither by PFBV CP, which allowed siRNAs to accumulate at levels similar to those observed in the presence of p19, nor in the absence of suppressor proteins (Fig. 3a). These results strongly suggested that PFBV CP does not interfere with Dicer activity and targets the silencing machinery downstream of siRNA generation, thus differing from the CPs of TCV and HC-RSV.

The results above indicated that the mechanism for silencing inhibition of PFBV CP could involve sequestering of siRNAs, as reported for different suppressors including p19. To explore this possibility, *N. benthamiana* leaves were separately agroinfiltrated with constructs for expression of CP, CPq and CPq.mut. In addition, mock-infiltrated leaves and infiltrated leaves expressing p19 were used as negative and positive controls, respectively. Crude extracts were prepared 3 days p.i. and incubated with <sup>32</sup>P-labelled synthetic siRNAs according to the protocol described by Mérai *et al.* (2006), and the resulting products were resolved on SDS-PAGE gels (Fig. 3b). As expected, p19 extracts caused a shift in siRNA mobility, whereas no shifts were observed with mock extracts. Interestingly, extracts containing PFBV CP or CPq, both functional in silencing suppression, also showed siRNA binding activity, giving rise to a complex that migrated more slowly than that generated by p19 extracts. In contrast, those containing CPq.mut, which had no detectable suppressor function, failed to form complexes with siRNAs, even when the amount of extract was increased in the binding mixtures (Fig. 3b and data not shown). Collectively, the results presented here strongly indicate that the silencing inhibition activity of PFBV CP relies on the ability of the protein to sequester siRNAs, as has been shown for phylogenetically unrelated suppressors but not for orthologous ones. In addition, our results might imply that TCV CP and PFBV CP have diverged in their dsRNA-binding properties, with PFBV CP acquiring size-selection separately from the size-independent dsRNA-binding of TCV CP. It has been suggested that selection of siRNAs for binding may reduce host damage, as the corresponding suppressor will not interfere with endogenous long dsRNAs or long

structured RNAs [Baulcombe & Molnár, 2004; Vargason *et al.*, 2003]. It has also been suggested that the expression of size-independent silencing suppressors might be down-regulated by the virus [Mérai *et al.*, 2006]. In the case of TCV CP, this down-regulation is probably accomplished by capsid formation which reduces available suppressor levels [Zhang & Simon, 2003]. In this scenario, it is tempting to speculate that capsid formation plus selective binding to siRNAs by PFBV CP might account for the low viral accumulation and the frequent absence of symptoms in PFBV-infected plants.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Vicente Pallás and Kazuyuki Mise for generously providing us with binary plasmids for GFP and dsGFP expression, respectively, and to David Baulcombe for *N. benthamiana* 16c and binary plasmid for p19 expression. We gratefully thank Jose Antonio Navarro for his valuable advice on agroinfiltration assays and to Dolores Arocas for excellent technical assistance. This research was supported by grants AGL2003-04249 (MCyT) and BFU2006-11230 (MEC) and by grant ACOM06/210 (GV). S. M.-T. was the recipient of a predoctoral fellowship from the Generalitat Valenciana.

## REFERENCES

- Baulcombe, D. (2005). RNA silencing. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 290-293.
- Baulcombe, D.C. & Molnár, A. (2004). Crystal structure of p19 – a universal suppressor of RNA silencing. *Trends Biochem. Sci.* **29**: 279-281.
- Baumberger, N. & Baulcombe, D.C. (2005). *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 11928-11933.
- Baumberger, N., Tsai, C.H., Lie, M., Havecker, E. & Baulcombe, D.C. (2007). The Ploverovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr. Biol.* **17**: 1609-1614.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. & Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366.
- 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.

**Chao, J.A., Lee, J.H., Chapados, B.R., Debler, E.W., Schneemann, A. & Williamson, J.R.** (2005). Dual modes of RNA-silencing suppression by *Flock house virus* protein B2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 952-957.

**Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T. & Burgyán, J.** (2007). The p122 subunit of *Tobacco mosaic virus* replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J. Virol.* **81**: 11768-11780.

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

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

**Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C. & Voinnet, O.** (2004). Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* **16**: 1235-1250.

**Genovés, A., Navarro, J.A. & Pallás, V.** (2006). Functional analysis of the five melon necrotic spot virus genome-encoded proteins. *J. Gen. Virol.* **87**: 2371-2380.

**Hamilton, A.J. & Baulcombe, D.C.** (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-952.

**Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. & Hannon, G.J.** (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**: 1146-1150.

**Herranz, M.C., Sánchez-Navarro, J.A., Saurí, A., Mingarro, I. & Pallás, V.** (2005). Mutational analysis of the RNA-binding domain of the *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) movement protein reveals its requirement for cell-to-cell movement. *Virology* **339**: 31-41.

**Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D. & Burgyán, J.** (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J.* **23**: 876-884.

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

**Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. & Sattler, M.** (2005). The structure of the *Flock house virus* B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *EMBO Rep.* **6**: 1149-1155.

**Lipardi, C., Wei, Q. & Paterson, B.M.** (2001). RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* **107**: 297-307.

**Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. & Hannon, G.J.** (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**: 1437-1441.

**Lommel, S.A., Martelli, G.P., Rubino, L. & Russo, M.** (2005). Family *Tombusviridae*. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 907-936. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. San Diego: Elsevier.

**Lu, R., Maduro, M., Li, F., Li, H.W., Broitman-Maduro, G., Li, W.X. & Ding, S.W.** (2005). Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **436**: 1040-1043.

**Martínez de Alba, A.E., Flores, R. & Hernández, C.** (2002). Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with post-transcriptional gene silencing. *J. Virol.* **76**: 13094-13096.

**Meng, C., Chen, J., Peng, J. & Wong, S.M.** (2006). Host-induced avirulence of hibiscus chlorotic ringspot virus mutant correlates with reduced gene-silencing suppression activity. *J. Gen. Virol.* **87**: 451-459.

**Mérai, Z., Kerényi, Z., Molnár, A., Barta, E., Válóczy, A., Bisztray, G., Havelda, Z., Burgyán, J. & Silhavy, D.** (2005). Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J. Virol.* **79**: 7217-7226.

**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.

**Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C. & Vance, V.B.** (1997). Synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**: 859-868.

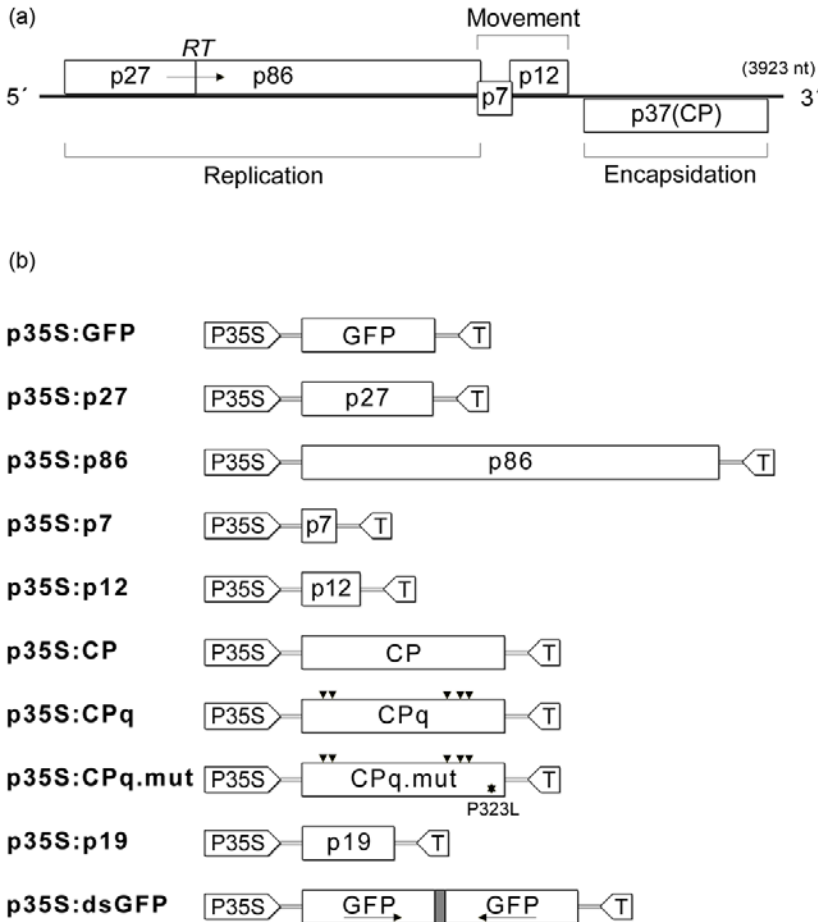
**Qi, Y., Zhong, X., Itaya, A. & Ding, B.** (2004). Dissecting RNA silencing in protoplasts uncovers novel effects of viral suppressors on the silencing

- pathway at the cellular level. *Nucleic Acids Res.* **32**: e179.
- Qu, F. & Morris, T.J.** (2005). Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *FEBS Lett* **579**: 5958-5964.
- Qu, F., Ren, T. & Morris, T.J.** (2003). The coat protein of *Turnip crinkle virus* suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J. Virol.* **77**: 511-522.
- Rico, P. & Hernández, C.** (2004). Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pelargonium flower break virus*. *Arch. Virol.* **149**: 641-651.
- Rico, P. & Hernández, C.** (2006). Infectivity of *in vitro* transcripts from a full length cDNA clone of *Pelargonium flower break virus* in an experimental and a natural host. *J. Plant Pathol.* **88**: 103-106.
- Rico, P., Ivars, P., Elena, S.F. & Hernández, C.** (2006). Insights into the selective pressures restricting *Pelargonium flower break virus* genome variability: evidence for host adaptation. *J. Virol.* **80**: 8124-8132.
- Roth, B.M., Pruss, G.J. & Vance, V.B.** (2004). Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res.* **102**: 97-108.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O. & Baulcombe, D.C.** (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**: 937-946.
- Sablowski, R.W.M., Baulcombe, D.C. & Bevan, M.** (1995). Expression of a flower-specific Myb protein in leaf cells using a viral vector causes ectopic activation of a target promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6901-6905.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H. & Fire, A.** (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**: 465-476.
- Silhavy, D., Molnár, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M. & Burgyán, J.** (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* **21**: 3070-3080.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S. & Okuno, T.** (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Lett.* **532**: 75-79.
- Thomas, C.L., Leh, V., Lederer, C. & Maule, A.J.** (2003). *Turnip crinkle virus* coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* **306**: 33-41.
- Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Akbergenov, R., Oakeley, E.J., Veluthambi, K., Hohn, T. & Pooggin, M.M.** (2005). Suppression of silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J. Virol.* **79**: 2517-2527.
- Valli, A., Dujovny, G. & García, J.A.** (2008). Protease activity, self interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor P1b from *Cucumber vein yellowing ipomovirus*. *J. Virol.* **82**: 974-986.
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyán, J. & Hall, T.M.** (2003). Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* **115**: 799-811.
- Voinnet, O.** (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet* **6**: 206-220.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M. & Baulcombe, D.C.** (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**: 14147-14152.
- Voinnet, O., Lederer, C. & Baulcombe, D.C.** (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**: 157-167.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. & Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of *Tomato bushy stunt virus*. *Plant J.* **33**: 949-956.
- Wang, H., Buckley, K.J., Yang, X.J., Buchmann, R.C. & Bisaro, D.M.** (2005). Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J. Virol.* **79**: 7410-7418.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B. & Lough, T.** (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**: 834-842.
- Ye, K., Malinina, L. & Patel, D.J.** (2003). Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* **426**: 874-878.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. & Bartel, D.P.** (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21- to 23-nucleotide intervals. *Cell* **101**: 25-33.
- Zhang, F. & Simon, A.E.** (2003). Enhanced viral pathogenesis associated with a virulent mutant virus or a virulent satellite RNA correlates with reduced virion accumulation and abundance of free coat protein. *Virology* **312**: 8-13.

Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J. & Chua, N.H. (2006). *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* **20**: 3255-3268.

Zhou, Z.S., Dell'Orco, M., Saldarelli, P., Turturo, C., Minafra, A. & Martelli, G.P. (2006). Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of *Grapevine virus A*. *J. Gen. Virol.* **87**: 2387-2395.

**APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA**



**Supplementary Fig. S1.** (a) Schematic representation of the PFBV genome. Open reading frames are shown as boxes and the predicted roles of the encoded proteins are indicated. The dotted line represents the leaky stop codon that allows read-through (RT) synthesis of p86. (b) Binary constructs used for the RNA silencing assays. In p35S:p86, the leaky stop codon was mutagenized to a Tyr-encoding codon. The intron that separates sense and antisense sequences of GFP in p35S:dsGFP is indicated by a grey box. Arrowheads in p35S:CPq mark the positions of the amino acid substitutions fixed in PFBV CP after *C. quinoa* propagation; the mutation engineered in p35S-CPq.mut is indicated by \*. P35S, Cauliflower mosaic virus 35S promoter; T, terminator sequence.



# **DISCUSIÓN GENERAL**





El PFBV (género *Carmovirus* / familia *Tombusviridae*) es uno de los patógenos virales de mayor prevalencia en especies de *Pelargonium* [Alonso & Borja, 2005; Gallard *et al.*, 2011]. Trabajos previos con este agente infeccioso habían permitido conocer su organización genómica, disponer de un clon infeccioso y obtener datos acerca de las presiones selectivas a las que se encuentra sometido su genoma y/o sus productos génicos. Los resultados presentados a lo largo de esta memoria han aportado información acerca de las etapas del ciclo infeccioso en las se encuentran involucradas las distintas proteínas del PFBV y, además, han permitido establecer relaciones estructura-función en dichas proteínas, con especial atención sobre ciertos rasgos atípicos o propiedades escasamente caracterizadas en virus relacionados.

***El producto codificado por la ORF 1 del PFBV es una proteína multifuncional presumiblemente implicada en distintas etapas del ciclo replicativo.***

La generación de diferentes mutantes a partir de un clon infeccioso del PFBV y su posterior inoculación en plantas y protoplastos, permitió confirmar que los productos de las ORF 1 y 2 (p27 y p86) son necesarios para la replicación viral. Estos resultados son similares a los obtenidos con otros miembros del género *Carmovirus* [Hacker *et al.*, 1992; White *et al.*, 1995; Genovés *et al.*, 2006] y con otras especies de la familia *Tombusviridae* [Russo *et al.*, 1994; Kollár & Burgyán, 1994; Bates *et al.*, 1995; Scholthof *et al.*, 1995b; Molnár *et al.*, 1997; Molinari *et al.*, 1998; Oster *et al.*, 1998; Panaviene *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2005; Batten *et al.*, 2006; Okamoto *et al.*, 2008], que muestran que en la replicación intervienen como mínimo dos proteínas virales: la RdRp, y un polipéptido adicional de menor tamaño con funciones auxiliares al proceso de síntesis de RNA.

La RdRp es la enzima encargada de generar los intermediarios replicativos y, en última instancia, los genomas de la progenie viral, mientras que la falta de motivos reconocibles en la replicasa más pequeña impide anticipar sus funciones concretas. Estudios previos con algunos miembros de la familia *Tombusviridae* indicaban que una de las funciones llevadas a cabo por este tipo de proteínas es probablemente la de dirigir y/o facilitar el ensamblaje del complejo replicativo en membranas celulares específicas [Weber-Lotfi *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2004; Panavas *et al.*, 2005a; Mochizuki *et al.*, 2009]. Por otra parte, para la proteína auxiliar de la replicación, p33, de un par de tombusvirus, el TBSV y el CNV, se habían descrito propiedades de unión a ssRNAs que eran consistentes con la posible implicación de este producto en el reclutamiento del molde hacia los sitios de síntesis del vRNA [Rajendran & Nagy, 2003; Panaviene *et al.*, 2003, 2005; Pogany *et al.*, 2005; Panavas *et al.*, 2005a]. Los resultados obtenidos en esta Tesis proporcionan datos en ambas direcciones para la proteína p27 del PFBV, lo que sugiere que estas funciones están conservadas en las

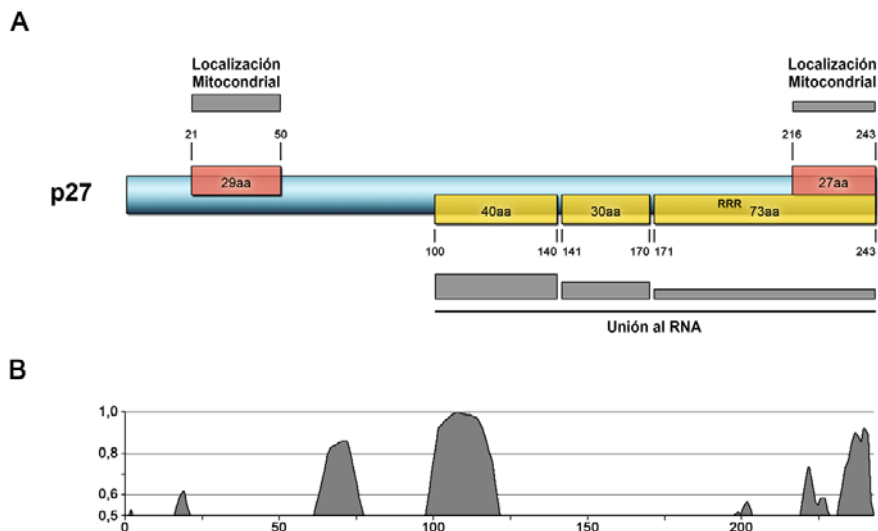
proteínas auxiliares de la replicación de los distintos componentes de la familia. Abundando en esta posibilidad, recientemente se ha puesto de manifiesto la capacidad de unir RNA del producto de la ORF 1 de un dianthovirus, el RCMNV, que además se asocia a membranas particulares [Turner *et al.*, 2004; Mine *et al.*, 2010a, 2010b; Hyodo *et al.*, 2011].

Los estudios de localización subcelular de la proteína p27 indican que esta molécula es dirigida a mitocondrias por dos dominios situados hacia la porción N-t y C-t, respectivamente. Cómo median estos dominios la asociación a estos orgánulos es aún una incógnita, pero una posibilidad apuntada en este trabajo es que formen hélices anfipáticas paralelas a las membranas (*surface membrane*, SM), lo que diversifica potencialmente los modos de unión de las replicasas virales a las estructuras membranosas. Las peculiaridades de esta asociación están también ilustradas por la ausencia de proliferación/agregación de las membranas involucradas y por la aparente dispensabilidad de receptores externos de mitocondrias y de otros factores celulares analizados. El requerimiento de receptores para la asociación a membranas mitocondriales es dudoso también en el caso de la proteína p36 del CIRV, la única replicasa de la familia *Tombusviridae* para la que esta cuestión ha sido investigada [Weber-Lotfi *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2008], y en otras replicasas virales no relacionadas, como la del virus del escarabajo neozelandés (*Flock house virus*, FHV) [Stapleford *et al.*, 2009]. Esto sugiere que los patógenos virales han desarrollado vías alternativas a las que utilizan las proteínas celulares para asociar sus propios productos a las mitocondrias, en cuyo caso evitarían problemas de competición o efectos deletéreos innecesarios. También puede ocurrir que los productos virales empleen vías de importación/asociación ya existentes, pero escasamente exploradas. Esta última posibilidad esta sustentada por trabajos recientes que indican que algunas proteínas celulares se dirigen e insertan en la MOM utilizando mecanismos no definidos e independientes de receptores [Meineke *et al.*, 2008; Walther & Rapaport, 2009]. La intervención de lípidos de membrana en estos procesos de asociación es más que probable. En este contexto es interesante señalar que un estudio reciente indica que la replicasa del FHV (proteína a) es capaz de unirse con alta afinidad a fosfolípidos aniónicos específicos, en particular a la cardiolipina [Stapleford *et al.*, 2009], un compuesto encontrado en abundancia y casi exclusivamente en las membranas mitocondriales [Zinser & Daum, 1995; van Meer *et al.*, 2008; Joshi *et al.*, 2009]. Curiosamente, el análisis de la secuencia y las predicciones de estructura secundaria de esta proteína han revelado la presencia en ella de putativas hélices- $\alpha$  anfipáticas que podrían estar involucradas en las interacciones con los fosfolípidos aniónicos [Stapleford & Miller, 2010]. Algo similar había sido sugerido anteriormente para la replicasa del virus del bosque Semliki (*Semliki Forest virus*, SFV) (nsP1), capaz de interactuar a través de una hélice- $\alpha$  anfipática con compuestos lipídicos,

probablemente como un paso previo al ensamblaje del complejo replicativo en membranas endosomales y lisosomales [Ahola *et al.*, 1999; Spuul *et al.*, 2007]. Estos precedentes sugieren que las interacciones entre replicasas virales y ciertos lípidos de membrana podrían determinar, en gran parte, la especificidad en la localización subcelular de distintos complejos replicativos de virus de ssRNA(+) y, de acuerdo con los datos recabados, este podría ser el caso del PFBV.

Aunque existen algunos trabajos que indican que la localización natural del complejo replicativo de algunos virus puede alterarse artificialmente sin afectar a su capacidad de replicación [Miller *et al.*, 2003; Panavas *et al.*, 2005a; Rubino *et al.*, 2007; Jonczyk *et al.*, 2007], la asociación de estos complejos a mitocondrias, inferida para el PFBV y para otros virus, es sugerente y podría estar relacionada con la capacidad que poseen algunos patógenos para reprogramar el metabolismo celular como parte de sus estrategias de replicación, un tema central en Virología. Estudios recientes han mostrado que durante la replicación se inducen alteraciones metabólicas que permiten, al menos durante un tiempo, mantener la homeostasis y viabilidad celular ante la elevada demanda energética que supone la síntesis del vRNA [revisado en Heaton & Randall, 2011]. Gran parte de estos cambios en el metabolismo celular involucran directamente a las mitocondrias e incluyen entre otros, un incremento de metabolitos relacionados con el ciclo del ácido cítrico [Munger *et al.*, 2006; Sánchez & Dong, 2010], la inhibición de la fosforilación oxidativa y la exacerbación de la glucólisis aeróbica [Delgado *et al.*, 2010]. Durante las infecciones virales también se ha constatado un cambio en el patrón de biosíntesis y transporte de lípidos intracelulares [Munger *et al.*, 2008; Blackham *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011], algunos de los cuales como los fosfolípidos, las esfingomielinas y los esteroides son importantes para la replicación viral [Waris *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009; Diamond *et al.*, 2010]. Asimismo, se ha comprobado que las infecciones promueven la degradación lipídica movilizando triglicéridos y ácidos grasos desde depósitos intracelulares hacia las mitocondrias donde son sometidos a  $\beta$ -oxidación para generar mayores cantidades de ATP [Heaton & Randall, 2010]. Todas estas observaciones sugieren que la asociación a mitocondrias de la replicación viral podría conferir ciertas ventajas al patógeno respecto a la asociación del proceso a otros orgánulos, un punto atractivo que necesita ser investigado con mayor profundidad.

Además de los dominios implicados en el direccionamiento a membranas específicas, hemos determinado que la proteína p27 del PFBV posee también dominios de unión a RNA. Aunque estos últimos no han sido delimitados de forma precisa, parecen no solapar (o hacerlo muy parcialmente en la porción C-t) con los primeros, lo que sugiere una distribución modular de dominios funcionales en la proteína (**Fig. D1**). La redundancia de funciones observada en distintas partes de p27 puede darle mayor versatilidad a la molécula en procesos evolutivos y mayor tolerancia a cambios mutacionales que anulen o reduzcan la actividad de una determinada región. La



**Fig. D1:** (A) Regiones de la proteína p27 del PFBV implicadas en la localización mitocondrial (cajas rojas) y en las propiedades de unión al RNA (cajas amarillas). Se indican las posiciones de los residuos que limitan las distintas regiones. La mayor o menor contribución de un segmento a cada función se representa con cajas grises paralelas más o menos gruesas. La escasa, pero significativa contribución de la región 171-243 a la unión a RNA, parece estar condicionada por la presencia de 3 residuos continuos de Arg (RRR). (B) Probabilidad de desorden (eje Y) a lo largo de la secuencia de p27 (eje X), según la predicción del programa PONDR VL-XT [Bracken *et al.*, 2004].

presencia de varios dominios de unión a RNA contrasta con el único motivo (“RPR”) identificado en la proteína homóloga de tombusvirus, p33 [Rajendran & Nagy, 2003; Panaviene *et al.*, 2003], y se asemeja a lo descrito recientemente para la proteína p27 del RCNMV (género *Dianthovirus*) [Hyodo *et al.*, 2011]. La presencia de diferentes módulos de unión a RNA se ha descrito en otras proteínas no relacionadas y parece fomentar interacciones de elevada especificidad, afinidad y cooperatividad [revisado en Lunde *et al.*, 2007]. En ellas podría ser importante el establecimiento de numerosas interacciones no iónicas, que permitirían un desensamblado más fácil de los complejos RNA:proteína en caso necesario. La estabilidad que exhiben los complejos p27:ssRNA en presencia de concentraciones salinas elevadas ( $IC_{50}=390$  mM) sería consistente con esta posibilidad ya que sugiere la existencia de uniones hidrofóbicas entre la proteína y el ácido nucleico.

La proteína p27 del PFBV muestra una alta afinidad por ácidos nucleicos, particularmente por ssRNAs ( $K_d = 11$  nM), con aparente predilección por aquellos derivados del virus. Aunque no hemos realizado un análisis sistemático de distintas regiones del genoma viral para determinar a cuál de ellas se une la proteína con mayor eficiencia, es probable que exista algún elemento reconocido de forma preferente, de

modo similar a lo descrito para las proteínas equivalentes del TBSV y del RCNMV [Monkewich *et al.*, 2005; Pogany *et al.*, 2005; Iwakawa *et al.*, 2011]. Esta selectividad proporcionaría especificidad al proceso de replicación al permitir la amplificación exclusiva de vRNAs. Otra cuestión de especial interés concierne a cómo se produce o se facilita la disociación de complejos tan estables como el formado por la proteína p27 y el ssRNA. Como se ha mencionado anteriormente, las interacciones no iónicas entre la proteína y el ácido nucleico podrían favorecer dicha disociación además de modificaciones post-traduccionales que, como se ha apuntado en el Capítulo II, pueden modular la actividad de p27. Alternativa o complementariamente, otras proteínas virales que se sintetizan posteriormente y que también poseen propiedades de unión al RNA, como la(s) MP o la CP, podrían competir con la replicasa por la unión al ácido nucleico, lo que podría además facilitar el paso de etapas tempranas (replicación) a etapas tardías (movimiento/encapsidación) del ciclo infeccioso.

Aunque el trabajo realizado en esta Tesis con la proteína p27 del PFBV se ha centrado en el análisis de su direccionamiento subcelular y de sus propiedades de unión a RNA, no se puede descartar que este producto viral esté dotado de actividades adicionales. De hecho, recientemente se ha descrito que la proteína p33 del TBSV, además de su posible papel en el reclutamiento del vRNA y en la asociación del complejo replicativo a membranas subcelulares, puede funcionar como chaperona de RNA [Stork *et al.*, 2011]. Se ha propuesto que, durante la replicación, este tipo de actividad facilitaría la iniciación de la síntesis de cadenas complementarias haciendo el promotor más accesible a la RdRp del virus [Stork *et al.*, 2011]. Esta propiedad parece estar ligada por una parte, a la capacidad de la proteína de interactuar con ssRNAs y dsRNAs, y por otra, a la cooperatividad positiva durante las uniones al ácido nucleico [Rajendran & Nagy, 2003; Stork *et al.*, 2011]. Adicionalmente, se ha propuesto que la presencia de regiones estructuralmente desordenadas son importante para la función chaperona de la proteína de toombusvirus, ya que dichas regiones pueden experimentar transiciones estructurales (desorden → orden) al unirse al RNA, disociándose a continuación del mismo y permitiéndole la adopción de nuevas conformaciones [Stork *et al.*, 2011]. Todas estas características son compartidas por la proteína p27 del PFBV (Fig. D1, panel B) por lo que es razonable avanzar una función similar para este producto viral.

### ***La proteína p12 del PFBV: una DGBp2 con características atípicas***

La mutación de los codones de inicio de las dos pequeñas ORF centrales del PFBV, ORF 3 y ORF 4, ha permitido confirmar el requerimiento de los dos polipéptidos que codifican, p7 (DGBp1) y p12 (DGBp2), para el movimiento del virus. Esta función había sido anticipada para ambos productos del PFBV [Rico & Hernández, 2004] y

previamente demostrada para las proteínas homólogas de otros miembros del género *Carmovirus* [Hacker *et al.*, 1992; Genovés *et al.*, 2006].

El análisis *in silico* de las dos MP del PFBV sugirió que p7 se ajusta al patrón estructural definido para las DGBp1 de otros carmovirus [Marcos *et al.*, 1999; Akgoz *et al.*, 2001; Vilar *et al.*, 2001, 2002, 2005; Navarro *et al.*, 2006], con una región central plegada en hélice- $\alpha$  y rica en residuos cargados positivamente que muy probablemente confiere a la proteína propiedades de unión a RNA, como ya se ha demostrado en algunos homólogos [Wobbe *et al.*, 1998; Marcos *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2006]. Un análisis similar de la proteína p12 mostró que este producto también comparte las principales características de MP relacionadas, que incluyen la presencia de una región C-t con potencial para plegarse en forma de lámina- $\beta$  y uno o dos dominios TM que mediarían la unión de la proteína a membranas [Navarro *et al.*, 2006]. La detección de p12 en RE es consistente con esta predicción y con resultados previos obtenidos con otras DGBp2 de varios miembros del género *Carmovirus* [Vilar *et al.*, 2002; Saurí *et al.*, 2005; Martínez-Gil *et al.*, 2007, 2010]. Más globalmente, la localización en RE se ha constatado para una enorme variedad de MP [Heinlein *et al.*, 1998a; Peremyslov *et al.*, 2004; Ju *et al.*, 2005; Schepetilnikov *et al.*, 2008], poniendo de manifiesto que este orgánulo constituye la principal estructura membranosa a la que se unen las proteínas virales que asisten el movimiento intra- e intercelular [Heinlein & Epel, 2004; Nelson & Citovsky, 2005; Lucas, 2006].

Como es previsible que los PD sean el destino final de p12, no podemos descartar que, además de la asociación con el RE, la proteína establezca interacciones adicionales con otras proteínas o componentes del sistema de transporte de macromoléculas de la célula. También es probable que la localización subcelular de la MP sufra variaciones en diferentes estadios de la infección, una situación que podría reproducirse cuando la DGBp2 se expresa de forma independiente. Algunos de los patrones de localización observados para p12 apuntan en esta dirección, ya que muestran a la proteína en estructuras punteadas distribuidas en el citoplasma (**Fig. 3 panel C**, en Capítulo III). El producto homólogo del MNSV (p7B) y otras MP han sido detectados en estructuras similares que han sido identificadas como cuerpos móviles donde se sitúan las proteínas virales en asociación con el aparato de Golgi [Heinlein *et al.*, 1998a; Haupt *et al.*, 2005; Genovés *et al.*, 2010]. De hecho, el transporte intracelular de la DGBp2 del MNSV parece depender en gran medida de la ruta secretora RE→Golgi, que probablemente sea utilizada por la proteína para alcanzar los PD [Genovés *et al.*, 2010]. Pese a las similitudes encontradas en los patrones de distribución, dada la gran diversidad de rutas involucradas en el tráfico intracelular, serán necesarios ensayos específicos con el producto del PFBV para comprobar si utiliza las mismas vías que las propuestas para la proteína p7B del MNSV.



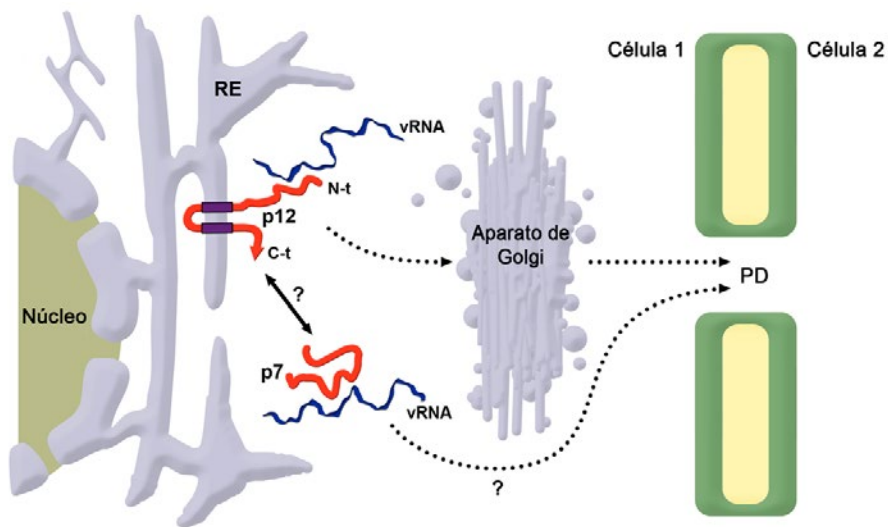
A pesar de las características que la proteína p12 comparte con productos homólogos, la presencia en ella de rasgos atípicos como un putativo motivo tipo LZ y una extensión N-t básica, sugerían que podía presentar particularidades en su modo de acción. Los efectos drásticos que la mutación del LZ provocan sobre la infectividad del virus en plantas, incluso en el caso de cambios sinónimos (Leu x Ile), confirman la relevancia funcional de este motivo y el escaso margen de variación que permite, un resultado congruente con los datos disponibles de heterogeneidad molecular del PFBV [Rico *et al.*, 2006]. Aunque no hemos podido determinar si el LZ se encuentra involucrado en auto-interacciones o en interacciones con otras proteínas virales/celulares, es muy probable que así sea, dada la frecuente implicación de este tipo de motivos en tales asociaciones [Takemoto & Hibi, 2005; Chen *et al.*, 2008]. Respecto a posibles interacciones con factores del huésped, es sugerente el hallazgo de una homeoproteína de plantas con un LZ (Hfi22) que interacciona con la MP del TBSV [Desvoves *et al.*, 2002], tal como se ha indicado en el Capítulo III, o, más recientemente, de una proteína bZIP (bZIP60), también portadora de un LZ, que es necesaria para promover la acumulación e infección del PVX a nivel local y sistémico, aunque en este caso no se han definido interacciones entre la MP (u otras proteínas virales) y el factor celular [Ye *et al.*, 2011].

Aunque con frecuencia las funciones de los LZ se asocian a estados en los cuales estos motivos se encuentran en forma soluble, también se conocen casos en los que los motivos LZ pueden mediar, en sí mismos o formando dímeros estables, las uniones a distintas membranas celulares [Köhler *et al.*, 2005; Noordeen *et al.*, 2006]. Esta cuestión permite plantear la posibilidad de que el LZ de p12 pueda propiciar la dimerización en un entorno membranoso, como se ha descrito recientemente para la proteína NS4B del virus de la hepatitis C (*Hepatitis C virus*, HCV), cuyo LZ interviene a la vez en las homodimerizaciones NS4B:NS4B y en la asociación a membranas [Welker *et al.*, 2010]. En general., los procesos de dimerización parecen ser importantes para las asociaciones de muchas MP al RE; por ejemplo, se ha propuesto que dos subunidades de la MP del TMV (p30) pueden establecer interacciones entre las regiones ácidas y básicas de los extremos C-t extra-membranosos, permitiendo la formación de dímeros [Brill *et al.*, 2004]. Asimismo, el direccionamiento a membranas de TGBp2 y TGBp3 está ligado a interacciones TGBp2:TGBp3 [Cowan *et al.*, 2002; Samuels *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2008]. Entre los carmovirus, se ha apuntado que residuos de Cys situados en los extremos N-t de algunas DGBp2 podrían permitir la formación de puentes disulfuro, estabilizando uniones intermoleculares DGBp2:DGBp2 [Navarro *et al.*, 2006]. Estas dimerizaciones podrían tener lugar tras la unión de la MP a las membranas del RE e implicarían la participación de una enzima (disulfuro isomerasa) situada en el lumen del orgánulo [Genovés, 2008]. Puesto que el motivo LZ de p12 coincide con uno de los dos dominios TM, su función podría estar relacionada con la

asociación al RE observada para la proteína. Un análisis preliminar de la localización subcelular de variantes de la proteína p12 portadoras de sustituciones dobles en las leucinas claves del LZ (mutantes LZM5 y LZM6 en Capítulo III), mostró que eran capaces de dirigirse al RE (datos no mostrados). Sin embargo, sería interesante explorar qué influencia podrían tener estas mutaciones en otras localizaciones intracelulares de la MP que, como se ha indicado antes, también parece asociarse al complejo de Golgi y presumiblemente debe alcanzar los PD celulares. Como se ha indicado en el Capítulo III, tampoco pueden ser descartadas otras posibles funciones del motivo LZ, como la regulación de modificaciones post-traduccionales que podrían desempeñar un papel importante en la actividad de la proteína [Kawakami *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2008; Pagano *et al.*, 2009].

La otra peculiaridad estructural de la proteína p12 corresponde a la presencia de una extensión N-t rica en aminoácidos básicos que está ausente en otras proteínas homólogas [Rico & Hernández, 2004]. Mediante distintos ensayos *in vitro*, se ha podido demostrar que dicha región confiere a la proteína propiedades de unión a ácidos nucleicos, lo que marca una diferencia fundamental con otras DGBp2 ensayadas [Saurí *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2006]. Como otras MP [Citovsky *et al.*, 1990; Wobbe *et al.*, 1998; Marcos *et al.*, 1999; Akgoz *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2006], p12 muestra preferencia por ssRNAs, a los que se une de una forma independiente de su secuencia, lo que sugiere que la especificidad es proporcionada *in vivo* por otras proteínas virales/celulares o por la compartimentalización del proceso. Un análisis mutacional ha mostrado que los residuos cargados positivamente de la región N-t son los principales responsables de la asociación de la proteína al RNA, aunque la marcada tolerancia a sales del complejo p12:RNA sugiere que las interacciones electrostáticas no son las únicas involucradas en la unión al ácido nucleico. Tanto la implicación de aminoácidos cargados positivamente como una buena resistencia a concentraciones salinas elevadas son compartidas por otras MP [Offei *et al.*, 1995; Marcos *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2006]. Es interesante también recordar que el valor de la Kd estimada para los complejos ssRNA:p12 (3.14  $\mu\text{M}$ ) es relativamente bajo e incluso similar al estimado para las DGBp1 de algunos carmovirus [Marcos *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2006], de modo que la capacidad de unir RNA de la DGBp2 del PFBV no se puede considerar marginal o secundaria, sino que probablemente es relevante durante el proceso infeccioso del patógeno.

Puesto que la proteína p12 del PFBV no sólo se asocia a membranas subcelulares, como otras DGBp2 relacionadas, sino que además está dotada de propiedades de unión a RNA, hemos planteado la posibilidad de que esta última característica le confiera una ventaja adicional al virus, ya que en este caso los genomas virales podrían moverse asociados no sólo a DGBp1, sino también a DGBp2 (**Fig. D2**). Esto puede incrementar potencialmente el número de genomas que alcanzan y atraviesan las conexiones



**Fig. D2:** Representación del proceso de movimiento del PFBV. La DGBp2 (p12) se une a las membranas del RE, presumiblemente a través de los dos dominios TM que se predicen en su secuencia, dejando el extremo N-t expuesto al citoplasma y apto para unir el vRNA. Esta proteína alcanza el aparato de Golgi, y probablemente los PD, utilizando alguno de los sistemas de transporte de macromoléculas de la célula. La proteína DGBp1 (p7), para la que se anticipan también propiedades de unión al RNA, podría guiar el vRNA hasta los PD asociada a la proteína p12 o siguiendo una ruta independiente.

intercelulares, facilitando así la propagación del patógeno. Desafortunadamente, no hemos podido contrastar experimentalmente esta hipótesis ya que la naturaleza solapante de las ORF 3 y 4, nos impedían mutar esta última (por ejemplo alterando los residuos de Arg que hemos encontrado esenciales para la unión de p12 al RNA) sin afectar la secuencia de la proteína p7. En cualquier caso, los resultados obtenidos en éste y en otros trabajos previos [Genovés *et al.*, 2009, 2010] sugieren en su conjunto que el modelo de transporte mediado por DGBp puede ser más complejo que el inicialmente planteado [Vilar *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2006] y con adaptaciones particulares en distintos carmovirus. Si estas adaptaciones están condicionadas por la gama de huéspedes o por otros factores, aún está por determinar.

### ***Supresión del PTGS por la proteína p37 del PFBV***

La evaluación de la capacidad supresora del PTGS de todas las proteínas codificadas por el PFBV, utilizando el método de agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana* [Johansen & Carrington, 2001], ha mostrado que la proteína p37 es capaz de inhibir de forma muy eficiente el silenciamiento inducido por mRNA. Aunque no podemos excluir totalmente que alguno de los otros productos génicos del virus pueda

presentar actividad supresora no detectable mediante el ensayo que hemos empleado [Powers *et al.*, 2008b], los resultados concuerdan con los obtenidos con varios carmovirus, que indican que el gen situado en posición 3'-proximal codifica un polipéptido con una función dual como CP y como inhibidor del PTGS [Qu *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2003; Meng *et al.*, 2006; Genovés *et al.*, 2006]. Al igual que otros supresores relacionados o no filogenéticamente [Voinnet *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2003; Te *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006b], la proteína p37 del PFBV es capaz de acentuar dramáticamente los síntomas de una infección viral, como se ha comprobado mediante su expresión a partir de un vector derivado de PVX. Esta intensificación de la sintomatología recuerda las interacciones sinérgicas que se establecen cuando dos virus distintos co-infectan la misma planta, una intensificación que se ha asociado con un reforzamiento de la inhibición del silenciamiento por RNA y con un aumento del título viral [Pruss *et al.*, 1997].

Aunque no se ha realizado un análisis detallado acerca de las regiones de la proteína p37 que son relevantes para su función supresora, la eliminación del dominio "P", "R" o "S"/"P" anulan dicha función (datos no mostrados), lo que sugiere que la molécula íntegra es requerida para bloquear eficientemente el silenciamiento, tal como se ha propuesto para las proteínas homólogas del TCV [Choi *et al.*, 2004] y del HCRSV [Meng *et al.*, 2006]. No obstante, a diferencia de lo observado con esta última, la función de la proteína del PFBV no está afectada por las mutaciones fijadas tras pases seriados en *C. quinoa*, lo que sugiere que la adaptación a un huésped local no necesariamente impone restricciones en los virus que se traduzcan en una disminución de su actividad supresora como una estrategia de la planta para limitar la diseminación de la infección.

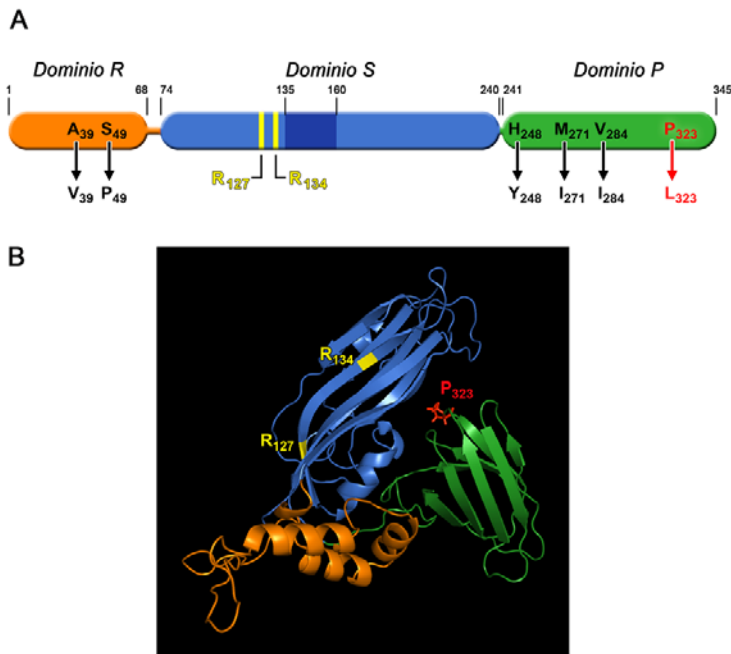
Además de inhibir el silenciamiento inducido por mRNA, hemos comprobado que la proteína p37 es capaz de contrarrestar el silenciamiento inducido por dsRNAs, lo que sitúa su diana tras la etapa de producción de este tipo de moléculas. La detección de siRNAs generados a partir del dsRNA sugirió que el supresor no compromete el procesamiento por parte de Dicer de los dúplex que disparan el proceso, sino algún evento posterior. De forma consistente con esta predicción, hemos determinado que la proteína p37 es capaz de unir siRNAs *in vitro*, una capacidad que se correlaciona con su actividad supresora *in vivo*. Como se ha indicado en el Capítulo IV, estos resultados contrastan con lo que se ha descrito para los productos homólogos del TCV y del HCRSV [Mérai *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2006, 2008], poniendo de manifiesto que existe una diversificación considerable en las bases moleculares de la actividad supresora de proteínas estrechamente relacionadas.

El comportamiento de la proteína p37 del PFBV es similar al que exhiben otros VSR que actúan secuestrando siRNAs y evitando que se carguen en RISC, un

componente central de la ruta del silenciamiento cuya actividad antiviral ha podido ser probada en plantas infectadas por virus de RNA [Omarov *et al.*, 2007; Ciomperlik *et al.*, 2011]. La inhibición del silenciamiento por unión a siRNAs constituye una estrategia recurrente que ha evolucionado independientemente en una amplia variedad de proteínas virales que no exhiben homología de secuencia y que no se relacionan entre sí desde un punto de vista estructural o filogenético [Méraï *et al.*, 2005; Lakatos *et al.*, 2006; Csorba *et al.*, 2007; Hemmes *et al.*, 2007; Goto *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008]. Aunque se trata de un mecanismo muy generalizado, la afinidad por siRNAs puede diferir notablemente entre VSR [Lakatos *et al.*, 2006]. En este sentido se ha sugerido que algunos supresores pueden bloquear el silenciamiento de una manera cuantitativa, inhibiéndolo sólo parcialmente cuando los niveles de siRNAs son elevados [Csorba *et al.*, 2007]. En este punto cabe mencionar que, en nuestros ensayos, la dinámica de la supresión del silenciamiento inducido por dsRNAs difirió sensiblemente entre la proteína p37 del PFBV y la proteína p19 de tombusvirus, ya que mientras que la actividad de esta última fue muy evidente a los 5 días tras la infiltración, al cabo de ese mismo tiempo la supresión mediada por la primera fue relativamente ineficiente (**Fig. 3 panel (a)**, en Capítulo IV). Esta observación sugiere que la proteína del PFBV une siRNAs con menor afinidad que p19, para la que se ha estimado una Kd aparente muy baja, de alrededor de 0.17 nM [Vargason *et al.*, 2003]. El resultado de los ensayos de retardo en gel podría ser consistente con esta posibilidad, ya que pequeñas cantidades del extracto de p19 fueron suficientes para permitir la formación de complejos p19:siRNA, mientras que para la detección de los complejos p37:siRNA fue necesario utilizar cantidades más elevadas del extracto correspondiente. No obstante, la ausencia casi total de siRNAs cuando p37 inhibe el silenciamiento inducido por mRNA-GFP (**Fig. 1 panel (b)**, en Capítulo IV) indica que la proteína del PFBV es capaz de acomplejar eficientemente los siRNAs que se generan en este caso (a partir de un dsRNA que deberá ser sintetizado por una RDR celular) y que son presumiblemente requeridos para la amplificación del proceso de silenciamiento [Mlostshwa *et al.*, 2008].

No conocemos porqué la sustitución simple P323L en la proteína p37 ejerce un efecto negativo tan marcado en su capacidad de unir siRNAs *in vitro* y, por ende, en su función como supresor *in vivo*. Esta mutación se localiza en el dominio “P” de la molécula y, por tanto, no afecta directamente el dominio “R” de unión al RNA, aunque quizás el efecto de la mutación sobre este dominio sea indirecto. Sin embargo, no podemos excluir otras posibilidades. Una de ellas es que el dominio responsable de las uniones a siRNAs difiera de aquel involucrado en la unión al vRNA durante la encapsidación. En relación a esto, un estudio reciente con la CP (p38) del TCV ha permitido identificar dos residuos próximos de Arg (R130, R137) que resultan esenciales para las propiedades de unión a dsRNA de esta proteína, propiedades que constituyen una de las bases de su función supresora [Cao *et al.*, 2010]. Dichos residuos

se sitúan en la región más conservada de la proteína, el dominio “S”, y se ha propuesto que también podrían ser responsables de la unión a dsRNAs en proteínas homólogas de algunos carmovirus para las cuales se ha descrito o sugerido actividad supresora [Cao *et al.*, 2010]. Los mismos aminoácidos están presentes en la proteína p37 del PFBV (**Fig. D3**), de modo que es probable que estén implicados en la capacidad de unir siRNAs observada *in vitro*. En cualquier caso, el cambio P323L podría alterar la conformación o estabilidad de la región responsable de unir siRNAs, se sitúe esta en el dominio “S” o en cualquier otra parte de la molécula. Otra posibilidad es que la proteína requiera formar dímeros para unir siRNAs, tal como se ha demostrado o sugerido para otros supresores



**Fig. D3:** (A) Representación de la CP (p37) del PFBV, mostrando los tres dominios estructurales “R”, “S” y “P”. En el dominio “S” se indica la región (135-160) que contiene el patrón consenso [FYW]-x-[PSTA]-x(7)-G-x-[LIVM]-x-[LIVM]-x-[FYWI]-x(2)-D-x(5)-P] predicho para las CP de virus icosaédricos de plantas, según el ScanProsite [De Castro *et al.*, 2006]. Las co-variaciones fijadas en la CP tras pases seriados en el huésped experimental *C. quinoa* (en negro) no ejercen ningún efecto sobre la actividad supresora de p37. Sin embargo, una sustitución simple (P323L) en un residuo de Pro (en rojo), situado en el dominio “P” incapacita a la proteína para unirse a siRNAs *in vitro* y actuar como supresor del silenciamiento *in vivo*. También se han etiquetado en amarillo dos residuos de Arg (R127 y R134) conservados en varias CP de carmovirus con actividad supresora e identificados en la CP homóloga del TCV (p38) como esenciales para la unión a dsRNAs [Cao *et al.*, 2010]. (B) Modelo de p37 obtenido con ayuda del programa Rosetta [Rohl *et al.*, 2004], validado empleando las herramientas QMEAN [Benkert *et al.*, 2009] y ModFOLD v.3.0. [McGuffin & Roche, 2010] y visualizado con el PyMOL v.1.5 [DeLano, 2002].

[Vargason *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003; Bragg & Jackson, 2004; Lingel *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Rashid *et al.*, 2008; Valli *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011], y que la mutación P323L afecte este supuesto proceso de dimerización. Si bien esta cuestión no ha sido abordada experimentalmente en este trabajo, se ha descrito que las CP de carmovirus dimerizan antes de ensamblarse al RNA y se ha sugerido que el estado dimerizado constituye la forma estable de la proteína en la célula [Sorger *et al.*, 1986]. A partir de algunos estudios estructurales con este tipo de proteínas, se ha propuesto que la dimerización estaría mediada por residuos del dominio “P” [Ke *et al.*, 2004], que es precisamente donde se sitúa la mutación P323L. Serán necesarios ensayos específicos para determinar si la auto-interacción de la proteína p37 del PFBV es necesaria para su función supresora y si el residuo P323 está implicado en tal asociación. En este contexto merece la pena señalar que los ensayos de retardo en gel parecen indicar que efectivamente esta proteína se une a los siRNAs en forma de dímero, ya que el complejo p37:siRNA presentó una migración electroforética considerablemente más lenta que el complejo p19:siRNA (**Fig. 3 panel (b)**, en Capítulo IV), y está bien establecido que el supresor de tombusvirus dimeriza para formar este tipo de complejos [Baulcombe & Molnár, 2004; Scholthof, 2006; Xia *et al.*, 2009].

Aunque los resultados obtenidos indican que la inhibición del PTGS por parte de la CP del PFBV está basada muy probablemente en el secuestro de siRNAs, no podemos descartar que la proteína afecte a otros componentes de la ruta de silenciamiento. De hecho, cada vez más trabajos están poniendo de manifiesto que un mismo supresor puede tener múltiples puntos de acción [Díaz-Pendón & Ding 2008; Burguán, 2008]. En este sentido, las proteínas AGO se perfilan como una de las dianas proteicas más habituales. Así, se ha descrito la unión e inhibición de AGO1 o AGO4 a través de la interacción con su dominio PAZ [Zhang *et al.*, 2006; Hamera *et al.*, 2012], el empleo de motivos F-box para actuar sobre proteínas AGO1 no cargadas y mediar su degradación [Pazhouhandeh *et al.*, 2006; Baumberger *et al.*, 2007; Csorba *et al.*, 2009] y el uso de motivos GW para interactuar con AGO1 e inhibir su funcionamiento [Giner *et al.*, 2010]. Recientemente, se ha determinado que la CP del TCV puede unirse a AGO1 a través de dos dominios GW situados, respectivamente, en la región N-t y C-t de la proteína [Azevedo *et al.*, 2010]. En este caso, se ha postulado que la formación de homodímeros o multímeros permitiría al producto viral “imitar” a factores del huésped que contienen residuos de GW y que se unen directa y específicamente a AGO1 [He *et al.*, 2009]. La inhibición de este componente de la ruta del silenciamiento también puede tener importantes consecuencias en la homeostasis de los miRNAs endógenos e impactar profundamente en la disponibilidad celular de las cuatro enzimas Dicer, descubriendo que existe una red homeostática dependiente de AGO1 que conecta todos estos factores [Azevedo *et al.*, 2010]. A la vista de estos resultados se han reinterpretado observaciones anteriores que sugerían que DCL4 es una diana de la proteína p38 del

TCV [Deleris *et al.*, 2006], pues la aparente inhibición de esta enzima podría, probablemente, tratarse de un efecto indirecto de la inhibición de AGO1 [Azevedo *et al.*, 2010]. El motivo GW situado en la región N-t de la CP del TCV se encuentra conservado y presente en las proteínas homólogas de todos los carmovirus, mientras que el segundo motivo GW en C-t está presente exclusivamente en la proteína de este patógeno. Esta observación, unida al hecho de que la CP del PFBV no impide la generación de siRNAs a partir del dsRNA, indica que es poco probable que la proteína del PFBV pueda llevar a cabo la supresión del silenciamiento interaccionando con AGO1, aunque con los datos disponibles no podemos descartar totalmente esta posibilidad.

Recientemente se han obtenido datos que indican que el genoma del PFBV contiene un IRES que dirige la expresión de la proteína p37 a partir del gRNA. La correlación observada entre la actividad de este elemento y la infectividad del virus sugiere que el supresor es requerido en etapas tempranas de la infección para contrarrestar de forma efectiva la respuesta defensiva de la planta basada en el silenciamiento por RNA [Fernández-Miragall & Hernández, 2011]. La presencia de p37 en estos estadios iniciales permitiría mantener la integridad del vRNA desde el cual se traducirían las replicasas que median la multiplicación del patógeno. Los resultados del presente trabajo han permitido determinar algunas propiedades relevantes de estas replicasas, así como de las MP que asisten al virus en el proceso de transporte e invasión de nuevas células. Estudios futuros podrán ayudar a comprender cómo se coordinan las distintas actividades de estas proteínas y qué factores/rutas celulares facilitan la progresión de la infección, aspectos fundamentales de cualquier interacción virus-huésped.



# CONCLUSIONES





1. Los productos codificados por las ORF 1 y 2 del PFBV (p27 y p86) son necesarios para la replicación del virus. Ambas replicasas se dirigen de forma independiente a las mitocondrias, donde co-localizan sin inducir alteraciones visibles en la morfología o distribución de estos orgánulos.
2. La replicasa de menor tamaño, p27, contiene dos regiones de 29 y 27 residuos aminoacídicos implicadas en su localización mitocondrial. Dichas regiones están situadas, respectivamente, hacia el extremo N-t y C-t de la proteína y un análisis *in silico* apunta a la presencia de hélices- $\alpha$  anfipáticas en las mismas que podrían mediar la asociación de p27 a las membranas mitocondriales. El direccionamiento de p27 a las mitocondrias parece ser además independiente de diversos factores celulares que participan directa o indirectamente en la importación de proteínas a este tipo de orgánulo.
3. La proteína p27 puede unirse *in vitro* al RNA, con elevada afinidad, siguiendo una cinética de cooperatividad positiva y formando complejos que se mantienen estables frente a concentraciones salinas elevadas. Los ensayos de competición sugieren que la proteína se une preferentemente a ssRNAs, en particular a aquellos derivados del genoma viral, aunque también puede unir otros tipos de ácidos nucleicos (dsRNAs, ssDNAs, dsDNAs) con menor eficiencia. Se han identificado tres regiones en la proteína de 40, 30 y 70 residuos aminoacídicos, respectivamente, que contribuyen de forma diferencial y aditiva a la unión al ácido nucleico.
4. Tanto la localización mitocondrial como las propiedades de unión a RNA observadas para la replicasa de menor tamaño del PFBV sugieren que ésta desempeña un papel importante durante la replicación del patógeno, probablemente reclutando el molde de RNA y dirigiendo todo el complejo replicativo hacia las mitocondrias, donde presumiblemente tiene lugar la síntesis del RNA del virus.

5. Los productos codificados por las ORF 3 y 4 del PFBV (p7 y p12) son necesarias para el movimiento del virus. Asimismo, el mayor de estos productos se une a membranas subcelulares, fundamentalmente del retículo endoplásmico, en concordancia con su perfil hidrofóbico y con lo observado para otras proteínas de movimiento, incluyendo las del género *Carmovirus*.
6. El estudio de algunos rasgos estructurales atípicos de la proteína p12 ha mostrado que un putativo motivo tipo cremallera de leucina es necesario para el transporte célula a célula del virus, mientras que una extensión N-terminal en residuos básicos confiere a la proteína propiedades de unión a RNA que están mediadas por residuos cargados positivamente. Estas características no son compartidas por proteínas homólogas, sugiriendo que el movimiento del PFBV puede diferir significativamente respecto al de virus relacionados.
7. La proteína p37 del PFBV se comporta durante los ensayos de expresión transitoria como un fuerte supresor del silenciamiento inducido por RNA, en línea con lo descrito previamente para las CP de al menos dos miembros del género *Carmovirus*. Esta proteína es capaz de unirse *in vitro* a siRNAs, una capacidad que se correlaciona *in vivo* con la actividad supresora del silenciamiento y con el aumento de la patogenicidad de un virus heterólogo. En conjunto, estos resultados sugieren que p37 inhibe el silenciamiento por RNA secuestrando siRNAs y previniendo su incorporación al complejo de silenciamiento inducido por RNA, un mecanismo también utilizado por supresores no homólogos.

# **BIBLIOGRAFÍA**





- Adkins, S., Hammond, J., Gera, A., Maroon-Lango, C.J., Sobolev, I., Harness, A., Zeidan, M. & Spiegel, S. (2006). Biological and molecular characterization of a novel carmovirus isolated from angelonia. *Phytopathol.* **96**: 460-467.
- Ahlquist, P. (2006). Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 371-382.
- Ahlquist, P., Noueiry, A.O., Lee, W.M., Kushner, D.B. & Dye, B.T. (2003). Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J. Virol.* **77**: 8181-8186.
- Ahlquist, P., Schwartz, M., Chen, J., Kushner, D., Hao, L. & Dye, B.T. (2005). Viral and host determinants of RNA virus vector replication and expression. *Vaccine* **23**: 1784-1787.
- Ahola, T. & Ahlquist, P. (1999). Putative RNA capping activities encoded by *Brome mosaic virus*: methylation and covalent binding of guanylate by replicase protein 1a. *J. Virol.* **73**: 10061-10069.
- Ahola, T., Lampio, A., Auvinen, P. & Kääriäinen, L. (1999). *Semliki Forest virus* mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *EMBO J.* **18**: 3164-3172.
- Akgoz, M., Nguyen, Q.N., Talmadge, A.E., Drainville, K.E. & Wobbe, K.K. (2001). Mutational analysis of *Turnip crinkle virus* movement protein p8. *Mol. Plant Pathol.* **2**: 37-48.
- 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.
- Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J.M. Jr, Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L. & Vance, V.B. (2000). A calmodulin-related protein that suppresses post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* **290**: 142-144.
- Ashby, J., Boutant, E., Seemanpillai, M., Groner, A., Sambade, A., Ritzenthaler, C. & Heinlein, M. (2006). *Tobacco mosaic virus* movement protein functions as a structural microtubule-associated protein. *J. Virol.* **80**: 8329-8344.
- Atabekov, J.G. & Taliansky, M.E. (1990). Expression of a plant virus-coded transport function by different viral genomes. *Adv. Virus Res.* **38**: 201-248.
- Azevedo, J., García, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., García, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M.A., 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.
- Ball, L.A. (2007). Virus Replication Strategies. En: Knipe, D. & Howley, P. (eds.), *Fields Virology*. 5<sup>th</sup>, Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 120-140.
- Bamunusinghe, D., Hemenway, C.L., Nelson, R.S., Sanderfoot, A.A., Ye, C.M., Silva, M.A., Payton, M. & Verchot-Lubicz, J. (2009). Analysis of *Potato virus X* replicase and TGBp3 subcellular locations. *Virology* **393**: 272-285.
- Bamunusinghe, D., Seo, J.K. & Rao, A.L. (2011). Subcellular localization and rearrangement of endoplasmic reticulum by *Brome mosaic virus* capsid protein. *J. Virol.* **85**: 2953-2963.
- Banci, L., Bertini, I., Cefaro, C., Ciofi-Baffoni, S., Gallo, A., Martinelli, M., Sideris, D.P., Katrakili, N. & Tokatlidis, K. (2009). MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**: 198-206.
- Bates, H.J., Farjah, M., Osman, T.A. & Buck, K.W. (1995). Isolation and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase from *Nicotiana clelandii* plants infected with *Red clover necrotic mosaic dianthovirus*. *J. Gen. Virol.* **76**: 1483-1491.
- Batten, J.S., Turina, M. & Scholthof, K.B. (2006). Panicovirus accumulation is governed by two membrane-associated proteins with a newly identified conserved motif that contributes to pathogenicity. *Virol. J.* **3**: 1-12.
- Baulcombe, D.C. & Molnár, A. (2004). Crystal structure of p19- a universal suppressor of RNA silencing. *Trends Biochem. Sci.* **29**: 279-281.

- Baulcombe, D.C.** (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. USA* **102**: 11928-11933.
- Baumberger, N., Tsai, C.H., Lie, M., Havecker, E. & Baulcombe, D.C.** (2007). The polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr. Biol.* **17**: 1609-1614.
- Bayne, E.H., Rakitina, D.V., Morozov, S.Y. & Baulcombe, D.C.** (2005). Cell-to-cell movement of potato potyvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J.* **44**: 471-482.
- Behe, B., Nelson, R., Barton, S., Hall, C., Safley, C.D. & Turner, S.** (1999). Consumer preferences for geranium flower colour, leaf variegation, and price. *Am. Soc. Hort. Sci.* **34**: 740-742.
- Benítez-Alfonso, Y., Faulkner, C., Ritzenthaler, C. & Maule, A.J.** (2010). Plasmodesmata: Gateways to local and systemic virus infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**: 1403-1412.
- Benkert, P., Künzli, M. & Schwede, T.** (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res.* **37**: W510-W514.
- Berna, A., Gafny, R., Wolf, S., Lucas, W.J., Holt, C.A. & Beachy, R.N.** (1991). The TMV movement protein: role of the C-terminal 73 amino acids in subcellular localization and function. *Virology* **182**: 682-689.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. & Hannon, G.J.** (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366.
- Berthomé, R., Kusiak, C., Renou, J.P., Albouy, J., Freire, M.A. & Dinant, S.** (1998). Relationship of the *Pelargonium flower break carmovirus* (PFBV) coat protein gene with that other carmovirus. *Arch. Virol.* **143**: 1823-1829.
- Bisaro, D.M.** (2006). Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology* **344**: 158-168.
- Blackham, S., Baillie, A., Al-Hababi, F., Remlinger, K., You, S., Hamatake, R. & McGarvey, M.J.** (2010). Gene expression profiling indicates the roles of host oxidative stress, apoptosis, lipid metabolism, and intracellular transport genes in the replication of *Hepatitis C virus*. *J. Virol.* **84**: 5404-5414.
- Bleve-Zacheo, T., Rubino, L., Melillo, M.T. & Russo M.** (1997). The 33K protein encoded by *Cymbidium ringspot virus* localizes to peroxisomes of infected cells and of uninfected transgenic plants. *J. Plant Pathol.* **79**: 197-202.
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.S., Vázquez, F., Robertson, D., Meins, F. Jr., Hohn, T. & Pooggin, M.M.** (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res.* **34**: 6233-6246.
- Bleykasten, C., Gilmer, D., Guilley, H., Richards, K.E. & Jonard G.** (1996). *Beet necrotic yellow vein virus* 42 kDa triple gene block protein binds nucleic acid *in vitro*. *Gen. Virol.* **77**: 889-897.
- Blystad, D.D., Naess, V. & Haugslie, S.** (1995). Optimizing immunoabsorbent electron microscopy for detection of *Pelargonium flower break carmovirus* in *Pelargonium*. *EPPO Bull.* **25**: 239-245.
- Boevink, P. & Oparka, K.J.** (2005). Virus-host interactions during movement processes. *Plant Physiol.* **138**: 1815-1821.
- Boonrod, K., Chotewutmontri, S., Galetzka, D. & Krczal, G.** (2005). Analysis of tombusvirus revertants to identify essential amino acid residues within RNA-dependent RNA polymerase motifs. *J. Gen. Virol.* **86**: 823-826.
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M. & Ziegler-Graff, V.** (2008). Viral suppression of RNA silencing by destabilisation of ARGONAUTE 1. *Plant Signal. Behav.* **3**: 657-659.
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P. & Ziegler-Graff, V.** (2007). The polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr. Biol.* **17**: 1615-1621.



- Boutet, S., Vázquez, F., Liu, J., Beclin, C., Fagard, M., Gratias, A., Morel, J.B., Crete, P., Chen, X. & Vaucheret, H. (2003). Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Curr. Biol.* **13**: 843-848.
- Bouwen, I. & Maat, D. (1992). *Pelargonium flower break* and *Pelargonium line pattern* viruses in the Netherlands: purification, antiserum preparation, serological identification and detection in *Pelargonium* by ELISA. *Neth. J. Plant Pathol.* **98**: 141-156.
- Boyko, V., Ferralli, J. & Heinlein, M. (2000a). Cell-to-cell movement of TMV RNA is temperature-dependent and corresponds to the association of movement protein with microtubules. *Plant J.* **22**: 315-325.
- Boyko, V., Ferralli, J., Ashby, J., Schellenbaum, P. & Heinlein, M. (2000b). Function of microtubules in intercellular transport of plant virus RNA. *Nat. Cell Biol.* **2**: 826-832.
- Boyko, V., van der Laak, J., Ferralli, J., Suslova, E., Kwon, M.O. & Heinlein, M. (2000c). Cellular targets of functional and dysfunctional mutants of *Tobacco mosaic virus* movement protein fused to green fluorescent protein. *J. Virol.* **74**: 11339-11346.
- Bozarth, C.S., Weiland, J.J. & Dreher, T.W. (1992). Expression of ORF-69 of *Turnip yellow mosaic-virus* is necessary for viral spread in plants. *Virology* **187**: 124-130.
- Bracken, C., Iakoucheva, L.M., Romero, P.R. & Dunker, A.K. (2004). Combining prediction, computation and experiment for the characterization of protein disorder. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**: 570-576.
- Bragg, J.N. & Jackson, A.O. (2004). The C-terminal region of the *Barley stripe mosaic virus* Yb protein participates in homologous interactions and is required for suppression of RNA silencing. *Mol. Plant Pathol.* **5**: 465-481.
- Brantley, J.D. & Hunt, A.G. (1993). The N-terminal protein of the polyprotein encoded by the potyvirus *Tobacco vein mottling virus* is an RNA-binding protein. *J. Gen. Virol.* **74**: 1157-1162.
- Brill, L.M., Dechongkit, S., DeLaBarre, B., Stroebel, J., Beachy, R.N. & Yeager, M. (2004). Dimerization of recombinant *Tobacco mosaic virus* movement protein. *J. Virol.* **78**: 3372-3377.
- Brill, L.M., Nunn, R.S., Kahn, T.W., Yeager, M. & Beachy, R.N. (2000). Recombinant *Tobacco mosaic virus* movement protein is an RNA-binding, alpha-helical membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 7112-7117.
- 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. USA* **104**: 14741-14746.
- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. & Zurcher, E.J. (eds.) (1996). *Pelargonium flower break virus* and *Pelargonium line pattern virus*. En: *Plant viruses online: Descriptions and lists from the VIDE Database. Version: 16<sup>th</sup>*, January 1997.
- Bucher, E., Sijen, T., de Haan, P., Goldbach, R. & Prins, M. (2003). Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J. Virol.* **77**: 1329-1336.
- Buck, K.W. (1996). Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Adv. Virus Res.* **47**: 159-251.
- Buck, K.W. (1999). Replication of *Tobacco mosaic virus* RNA. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **354**: 613-627.
- Burckhardt, C.J. & Greber, U.F. (2009). Virus movements on the plasma membrane support infection and transmission between cells. *PLoS Pathog.* **5**: e1000621.
- Burgyán, J. & Havelda, Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* **16**: 265-272.
- Burgyán, J. (2008). Role of silencing suppressor proteins. *Methods Mol. Biol.* **451**: 69-79.
- Burgyán, J., Rubino, L. & Russo, M. (1996). The 5'-terminal region of a tombusvirus genome determines the origin of multivesicular bodies. *J. Gen. Virol.* **77**: 1967-1974.

- Calvo Vergés, I. (2001). Geranio. En: Nuez, F., Llacer, G. (eds.), *La Horticultura Española*. Ed. SECH, Madrid, pp. 422-423.
- Cañizares, M.C., Marcos, J.F. & Pallás V. (2001). Molecular variability of twenty-one geographically distinct isolates of *Carnation mottle virus* (CarMV) and phylogenetic relationships within the *Tombusviridae* family. *Arch. Virol.* **146**: 2039-2051.
- Cañizares, M.C., Taylor, K.M. & Lomonossoff, G.P. (2004). Surface-exposed C-terminal amino acids of the small coat protein of *Cowpea mosaic virus* are required for suppression of silencing. *J. Gen. Virol.* **85**: 3431-3435.
- Cao, M., Ye, X., Willie, K., Lin, J., Zhang, X., Redinbaugh, M.G., Simon, A.E., Morris, T.J. & Qu, F. (2010). The capsid protein of *Turnip crinkle virus* overcomes two separate defense barriers to facilitate systemic movement of the virus in *Arabidopsis*. *J. Virol.* **84**: 7793-7802.
- Cao, X., Zhou, P., Zhang, X., Zhu, S., Zhong, X., Xiao, Q., Ding, B. & Li, Y. (2005). Identification of an RNA silencing suppressor from a plant double-stranded RNA virus. *J. Virol.* **79**: 13018-13027.
- Carette, J.E., van Lent, J., MacFarlane, S.A., Wellink, J. & van Kammen, A. (2002). *Cowpea mosaic virus* 32- and 60-kilodalton replication proteins target and change the morphology of endoplasmic reticulum membranes. *J. Virol.* **76**: 6293-6301.
- Carpenter, C.D. & Simon, A.E. (1998). Analysis of sequences and predicted structures required for viral satellite RNA accumulation by *in vivo* genetic selection. *Nucleic Acids Res.* **26**: 2426-2432.
- Carrington, J.C. & Morris, T.J. (1985). Characterization of the cell-free translation products of *Carnation mottle virus* genomic and subgenomic RNAs. *Virology* **144**: 1-10.
- Carrington, J.C., Heaton, L.A., Zuidema, D., Hillman, B.I. & Morris, T.J. (1989). The genome structure of *Turnip crinkle virus*. *Virology* **170**: 219-226.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K. & Schaad, M.C. (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *The Plant Cell* **8**: 1669-1681.
- Carvalho, C.M., Wellink, J., Ribeiro, S.G., Goldbach, R.W. & Van Lent, J.W. (2003). The C-terminal region of the movement protein of *Cowpea mosaic virus* is involved in binding to the large but not to the small coat protein. *J. Gen. Virol.* **84**: 2271-2277.
- 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.
- Castellano, M.A., Loconsole, G., Grieco, F., Di Sansebastiano, G.P. & Martelli, G.P. (2005). Subcellular localization and immunodetection of movement proteins of *Olive latent virus 1*. *Arch. Virol.* **150**: 1369-1381.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T. & Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**: 628-644.
- Chan, N.C & Lithgow, T. (2008). The peripheral membrane subunits of the SAM complex function codependently in mitochondrial outer membrane biogenesis. *Mol. Biol. Cell* **19**: 126-136.
- Chao, J.A., Lee, J.H., Chapados, B.R., Debler, E.W., Schneemann, A. & Williamson, J.R. (2005). Dual modes of RNA-silencing suppression by *Flock house virus* protein B2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 952-957.
- Chellappan, P., Vanitharani, R., & Fauquet, C.M. (2005). MicroRNA-binding viral protein interferes with *Arabidopsis* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 10381-10386.
- Chen, Ch., Zhang, Y., Zhu, L. & Yuan, M. (2010). The actin cytoskeleton is involved in the regulation of the plasmodesmal size exclusion limit. *Plant Signal. Behav.* **5**: 1663-1665.
- Chen, H.Y., Yang, J., Lin, C. & Yuan, Y.A. (2008). Structural basis for RNAsilencing suppression by *Tomato aspermy virus* protein 2b. *EMBO Rep.* **9**: 754-760.
- Chen, J. & Ahlquist, P. (2000). *Brome mosaic virus* polymerase-like protein 2a is directed to the endoplasmic reticulum by helicase-like viral protein 1a. *J. Virol.* **74**: 4310-4318.

- Chen, J., Li, W.X., Xie, D., Peng, J.R. & Ding, S.W. (2004). Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell* **16**: 1302-1313.
- Chen, M.H., Sheng, J., Hind, G., Handa, A.K. & Citovsky, V. (2000). Interaction between the *Tobacco mosaic virus* movement protein and host cell pectin methylsterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J.* **19**: 913-920.
- Chen, M.H., Tian, G.W., Gafni, Y. & Citovsky, V. (2005). Effects of calreticulin on viral cell-to-cell movement. *Plant Physiol.* **138**: 1866-1876.
- Cheng, A., Speir, J.A., Yuan, Y.A., Johnson, J.E. & Wong, S.M. (2009a). Preliminary X-ray data analysis of crystalline *Hibiscus chlorotic ringspot virus*. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **65**: 589-593.
- Cheng, J., Koukikolo, R., Kieliszewicz, K., Sagan, S.M. & Pezacki, J.P. (2009b). Cysteine residues of *Carnation Italian ringspot virus* p19 suppressor of RNA silencing maintain global structural integrity and stability for siRNA binding. *Biochim. Biophys. Acta* **1794**: 1197-1203.
- Cheng, J., Sagan, S.M., Assem, N., Koukikolo, R., Goto, N.K. & Pezacki, J.P. (2007). Stabilized recombinant suppressors of RNA silencing: functional effects of linking monomers of *Carnation Italian ringspot virus* p19. *Biochim. Biophys. Acta* **1774**: 1528-1535.
- Cheng, J., Sagan, S.M., Jakubek, Z.J. & Pezacki, J.P. (2008). Studies of the interaction of the viral suppressor of RNA silencing protein p19 with small RNAs using fluorescence polarization. *Biochemistry* **47**: 8130-8138.
- Chiba, M., Reed, J.C., Prokhnevsky, A.I., Chapman, E.J., Mawassi, M., Koonin, E.V., Carrington, J.C. & Dolja, V.V. (2006). Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* **346**: 7-14.
- Chicas, A. & Macino, G. (2001). Characteristics of post-transcriptional gene silencing. *EMBO Rep.* **11**: 992-996.
- Chitwood, D.H. & Timmermans, M.C.P. (2010). Small RNAs are on the move. *Nature* **467**: 415-419.
- Chiu, M.H., Chen, I.H., Baulcombe, D.C. & Tsai, C.H. (2010). The silencing suppressor P25 of *Potato virus X* interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol. Plant Pathol.* **11**: 641-649.
- Choi, C.W., Qu, F., Ren, T., Ye, X. & Morris, T.J. (2004). RNA silencing-suppressor function of *Turnip crinkle virus* coat protein cannot be attributed to its interaction with the *Arabidopsis* protein TIP. *J. Gen. Virol.* **85**: 3415-3420.
- Christensen, N., Tilsner, J., Bell, K., Hammann, P., Parton, R., Lacomme, C., & Oparka, K. (2009). The 5' cap of *Tobacco mosaic virus* (TMV) is required for virion attachment to the actin/ER network during early infection. *Traffic* **10**: 536-551.
- Cillo, F., Roberts, I.M. & Palukaitis, P. (2002). *In situ* localization and tissue distribution of the replication-associated proteins of *Cucumber mosaic virus* in tobacco and cucumber. *J. Virol.* **76**: 10654-10664.
- Ciomperlik, J.J., Omarov, R.T. & Scholthof, H.B. (2011). An antiviral RISC isolated from *Tobacco rattle virus*-infected plants. *Virology* **412**: 117-124.
- Citovsky, V., Knorr, D. & Zambryski, P.C. (1991). Gene I, a potential movement locus of CaMV, encodes an RNA binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2476-2480.
- Citovsky, V., Knorr, D., Schuster, G. & Zambryski, P. (1990). The P30 movement protein of *Tobacco mosaic virus* is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* **60**: 637-647.
- Citovsky, V., Mclean, B.G., Zupan, J.R. & Zambryski, P. (1993). Phosphorylation of *Tobacco mosaic virus* cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Genes Dev.* **7**: 904-910.
- Citovsky, V., Wong, M.L., Shaw, A.L., Prasad, B.V. & Zambryski, P. (1992). Visualization and characterization of *Tobacco mosaic virus* movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell* **4**: 397-411.

- Ciuffreda, P., Rubino, L. & Russo, M.** (1998). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of *Galinsoga mosaic virus* genomic RNA. *Arch. Virol.* **143**: 173-180.
- Cohen, Y., Gisel, A. & Zambryski, P.C.** (2000a). Cell-to-cell and systemic movement of recombinant green fluorescent protein-tagged turnip crinkle viruses. *Virology* **273**: 258-266.
- Cohen, Y., Qu, F., Gisel, A., Morris, T.J. & Zambryski, P.C.** (2000b). Nuclear localization of *Turnip crinkle virus* movement protein p8. *Virology* **273**: 276-285.
- Cowan, G.H., Lioliopoulou, F., Ziegler, A. & Torrance, L.** (2002). Subcellular localisation, protein interactions, and RNA binding of *Potato mop-top virus* triple gene block proteins. *Virology* **298**: 106-115.
- Crawford, K.M. & Zambryski, P.C.** (2001). Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiol.* **125**: 1802-1812.
- Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T. & Burgyán, J.** (2007). The p122 subunit of *Tobacco mosaic virus* replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J. Virol.* **81**: 11768-11780.
- Csorba, T., Pantaleo, V. & Burgyán, J.** (2009). RNA silencing: an antiviral mechanism. *Adv. Virus Res.* **75**: 35-71.
- Cuellar, W.J., Kreuze, J.F., Rajamaki, M.L., Cruzado, K.R., Untiveros, M. & Valkonen, J.P.** (2009). Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 10354-10358.
- Cui, X., Wei, T., Chowda-Reddy, R.V., Sun, G. & Wang, A.** (2010). The *Tobacco etch virus* P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. *Virology* **397**: 56-63.
- 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, D.C.** (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**: 543-553.
- Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H. & Baulcombe, D.C.** (2001). SDE3 encodes an RNA helicase required for posttranscriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **20**: 2069-2078.
- Dalmay, T., Rubino, L., Burgyán, J., Kollár, A. & Russo, M.** (1993). Functional analysis of *Cymbidium ringspot virus* genome. *Virology* **194**: 697-704.
- De Castro, E., Sigrist, C.J.A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P.S., Gasteiger, E., Bairoch, A. & Hulo, N.** (2006). ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.* **34**: W362-W365.
- DeLano, W.L.** (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- Deleris, A., Gallego-Bartolomé, J., Bao, J.S., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. & Voinnet, O.** (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* **313**: 68-71.
- Delgado, T., Carroll, P.A., Punjabi, A.S., Margineantu, D., Hockenbery, D.M. & Lagunoff, M.** (2010). Induction of the Warburg effect by Kaposi's sarcoma herpesvirus is required for the maintenance of latently infected endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 10696-10701.
- den Boon, J.A. & Ahlquist, P.** (2010). Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**: 241-256.
- Denison, M.R.** (2008). Seeking membranes: positive-strand RNA virus replication complexes. *PLoS Biol.* **6**: e270.

- Deom, C.M., Quan, S. & He, X.Z. (1997). Replicase proteins as determinants of phloem-dependent long-distance movement of tobamoviruses in tobacco. *Protoplasma* **199**:1-8.
- Desvoyes, B., Faure-Rabasse, S., Chen, M.H., Park, J.W. & Scholthof, H.B. (2002). A novel plant homeodomain protein interacts in a functionally relevant manner with a virus movement protein. *Plant Physiol.* **129**: 1521-1532.
- Di Franco, A. & Martelli, G.P. (1987a). Some observations on the ultrastructure of *Galinsoga mosaic virus* infections. *Phytopathol. Medit.* **26**: 54-56.
- Di Franco, A. & Martelli, G.P. (1987b). Comparative ultrastructural investigations on four soil-borne cucurbit viruses. *J. Submicr. Cytol. Pathol.* **19**: 605-613.
- Di Franco, A., Russo, M & Martelli, G.P. (1984). Ultrastructure and origin of multivesicular bodies induced by *Carnation Italian ringspot virus*. *J. Gen. Virol.* **65**: 123-1237.
- Diamond, D.L., Syder, A.J., Jacobs, J.M., Sorensen, C.M., Walters, K.A., Proll, S.C., McDermott, J.E., Gritsenko, M.A., Zhang, Q., Zhao, R., Metz, T.O., Camp, D.G. 2nd, Waters, K.M., Smith, R.D., Rice, C.M. & Katze, M.G. (2010). Temporal proteome and lipidome profiles reveal *Hepatitis C virus*-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS Pathog.* **6**: e1000719.
- Díaz-Pendón, J.A. & Ding, S.W. (2008). Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**: 303-326.
- Díaz-Pendón, J.A., Li, F., Li, W.X. & Ding, S.W. (2007). Suppression of antiviral silencing by *Cucumber mosaic virus* 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* **19**: 2053-2063.
- Díez, J., Marcos, J.F. & Pallás, V. (1999). Characterization and *in vitro* translation analysis of *Pelargonium flower break virus*. *Arch. Virol.* **144**: 1627-1637.
- Ding, S.W. & Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**: 413-426.
- Ding, S.W., Li, W.X. & Symons, R.H. (1995). A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO J.* **14**: 5762-5772.
- Ding, X., Shintaku, M.H., Carter, S.A. & Nelson, R.S. (1996). Invasion of minor veins of tobacco leaves inoculated with *Tobacco mosaic virus* mutants defective in phloem-dependent movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 11155-11160.
- Doan, D.N., Lee, K.C., Laurinmaki, P., Butcher, S., Wong, S.M. & Dokland, T. (2003). Three-dimensional reconstruction of *Hibiscus chlorotic ringspot virus*. *J. Struct. Biol.* **144**: 253-261.
- Dohi, K., Mori, M., Furusawa, I., Mise, K. & Okuno, T. (2001). *Brome mosaic virus* replicase proteins localize with the movement protein at infection-specific cytoplasmic inclusions in infected barley leaf cells. *Arch. Virol.* **146**: 1607-1615.
- Dolja, V.V., Kreuze, J.F. & Valkonen, J.P. (2006). Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res.* **117**: 38-51.
- 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, K.F., Aranda, M.A. & Llave, C. (2009). Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology* **392**: 203-214.
- Donald, R.G., Lawrence, D.M. & Jackson, A.O. (1997). The *Barley stripe mosaic virus* 58-kilodaltons beta (b) protein is a multifunctional RNA binding protein. *J. Virol.* **71**: 1538-1546.
- Dreher, T.W. & Miller, W.A. (2006). Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology* **344**: 185-197.
- Dreher, T.W. (1999). Functions of the 3'-untranslated regions of positive strand RNA viral genomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**: 151-174.

- Dreher, T.W. (2009). Role of tRNA-like structures in controlling plant virus replication. *Virus Res.* **139**: 217-229.
- Drugeon, G. & Jupin, I. (2002). Stability in vitro of the 69K movement protein of *Turnip yellow mosaic virus* is regulated by the ubiquitin-mediated proteasome pathway. *J. Gen. Virol.* **83**: 3187-3197.
- Drugeon, G., Urcuqui-Inchina, S., Milner, M., Kadare, G., Valle, R.P.C., Voyatzakis, A., Haenni, A.L. & Schiraswski, J. (1999). The strategies of plant virus gene expression: models of economy. *Plant Sci.* **148**: 77-88.
- Dukanovic, J. & Rapaport, D. (2011). Multiple pathways in the integration of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**: 971-980.
- Dunoyer, P., Brosnan, C.A., Schott, G., Wang, Y., Jay, F., Alioua, A., Himber, C. & Voinnet, O. (2010). An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO J.* **29**: 1699-1712.
- Dunoyer, P., Himber, C. & Voinnet, O. (2005). DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat. Genet.* **37**: 1356-1360.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C. & Voinnet, O. (2004). Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* **16**: 1235-1250.
- Dunoyer, P., Pfeffer, S., Fritsch, C., Hemmer, O., Voinnet, O. & Richards, K.E. (2002a). Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by *Peanut clump virus*. *Plant J.* **29**: 555-567.
- Dunoyer, P., Ritzenthaler, C., Hemmer, O., Michler, P. & Fritsch, C. (2002b). Intracellular localization of the *Peanut clump virus* replication complex in tobacco BY-2 protoplasts containing green fluorescent protein-labelled endoplasmic reticulum or Golgi apparatus. *J. Virol.* **76**: 865-874.
- Eamens, A., Wang, M.B., Smith, N.A. & Waterhouse, P.M. (2008). RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol.* **147**: 456-468.
- Ebhardt, H.A., Thi, E.P., Wang, M.B. & Unrau, P.J. (2005). Extensive 3' modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 13398-13403.
- Eckerle, L.D. & Ball, L.A. (2002). Replication of the RNA segments of a bipartite viral genome is coordinated by a transactivating subgenomic RNA. *Virology* **296**: 165-176.
- Ellgaard, L. & Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 181-191.
- Endres, M.W., Gregory, B.D., Gao, Z., Foreman, A.W., Mlotshwa, S., Ge, X., Pruss, G.J., Ecker, J.R., Bowman, L.H. & Vance, V. (2010). Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathog.* **6**: e1000729.
- Epel, B.L. (2009). Plant viruses spread by diffusion on ER-associated movement-protein-rafts through plasmodesmata gated by viral induced host  $\beta$ -1,3-glucanases. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**: 1074-1081.
- Erhardt, M., Dunoyer, P., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G. & Bouzoubaa, S. (2001). *Beet necrotic yellow vein virus* particles localize to mitochondria during infection. *Virology* **286**: 256-262.
- Erhardt, M., Stussi-Garaud, C., Guilley, H., Richards, K.E., Jonard, G. & Bouzoubaa, S. (1999). The first triple gene block protein of *Peanut clump virus* localizes to the plasmodesmata during virus infection. *Virology* **264**: 220-229.
- Erhardt, M., Vetter, G., Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Richards, K., Jonard, G. & Guilley, H. (2005). Subcellular localization of the triple gene block movement proteins of *Beet necrotic yellow vein virus* by electron microscopy. *Virology* **340**: 155-166.

- Fabian, M.R., Na, H., Ray, D. & White, K.A.** (2003). 3'-Terminal RNA secondary structures are important for accumulation of *Tomato bushy stunt virus* DI RNAs. *Virology* **13**: 567-580.
- Fan, A.C. & Young, J.C.** (2011). Function of cytosolic chaperones in Tom70-mediated mitochondrial import. *Protein Pept. Lett.* **18**: 122-131.
- Faulkner, C., Jackson, K., Jeffree, C. & Oparka, K.J.** (2008). Peeking into pit fields - a multiple twinning model of secondary plasmodesmata formation in tobacco. *Plant Cell* **20**: 1504-1518.
- Fernández-Miragall, O. & Hernández, C.** (2011). An internal ribosome entry site directs translation of the 3'-gene from *Pelargonium flower break virus* genomic RNA: implications for infectivity. *PLoS One* **6**: e22617.
- Fink, A.L.** (2005). Natively unfolded proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**: 35-41.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Franck, A. & Loebenstein, G.** (1994). Virus and virus-like diseases of *Pelargonium* in Israel. *Acta Hort.* **377**: 31-39.
- Frizzi, A. & Huang, S.** (2010). Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology. *Plant Biotechnol. J.* **8**: 655-677.
- Fujiki, M., Kawakami, S., Kim, R.W. & Beachy, R.N.** (2006). Domains of *Tobacco mosaic virus* movement protein essential for its membrane association. *J. Gen. Virol.* **87**: 2699-2707.
- Fujita, M., Mise, K., Kajikura, Y., Dohi, K. & Furusawa, I.** (1998). Nucleic acid-binding properties and subcellular localization of the 3a protein of *Brome mosaic bromovirus*. *J. Gen. Virology* **79**: 1273-1280.
- Fukunaga, R. & Doudna, J.A.** (2009). dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *EMBO J.* **28**: 545-555.
- Gafny, R., Lapidot, M., Berna, A., Holt, C.A., Deom, C.M. & Beachy, R.N.** (1992). Effects of terminal deletion mutations on function of the movement protein of *Tobacco mosaic virus*. *Virology* **187**: 499-507.
- Gakh, O., Cavadini, P. & Isaya, G.** (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**: 63-77.
- Gallard, A., Mallet, R., Chevalier, M. & Grapin, A.** (2011). Limited elimination of two viruses by cryotherapy of *Pelargonium* apices related to virus distribution. *Cryo Lett.* **32**: 111-122.
- Gamarnik, A.V. & Andino, R.** (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* **12**: 2293-2304.
- García-Castillo, S., Sánchez-Pina, M.A. & Pallás, V.** (2003). Spatio-temporal analysis of the RNAs, coat and movement (p7) proteins of *Carnation mottle virus* in *Chenopodium quinoa* plant. *J. Gen. Virol.* **84**: 745-749.
- García-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Bremmelis, K.J. & Carrington, J.C.** (2010). *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and Dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during *Turnip mosaic virus* infection. *Plant Cell* **22**: 481-496.
- Genovés, A., Navarro, J.A. & Pallás, V.** (2006). Functional analysis of the five *Melon necrotic spot virus* genome-encoded proteins. *J. Gen. Virol.* **87**: 2371-2380.
- Genovés, A.** (2008). Tesis Doctoral "Análisis funcional y localización subcelular de las proteínas implicadas en el movimiento intra e intercelular del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV)". Universidad Politécnica de Valencia.
- Genovés, A., Navarro, J.A. & Pallás, V.** (2009). A self-interacting carmovirus movement protein plays a role in binding of viral RNA during the cell-to-cell movement and shows an actin cytoskeleton dependent location in cell periphery. *Virology* **395**: 133-142.

- Genovés, A., Navarro, J.A. & Pallás, V. (2010). The intra- and intercellular movement of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) depends on an active secretory pathway. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**: 263-272.
- Ghildiyal, M. & Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 94-108.
- Giesman-Cookmeyer, D. & Lommel, S.A. (1993). Alanine scanning mutagenesis of a plant virus movement protein identifies three functional domains. *Plant Cell* **5**: 973-982.
- Gillespie, T., Boevink, P., Haupt, S., Roberts, A.G., Toth, R., Valentine, T., Chapman, S. & Oparka, K.J. (2002). Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of *Tobacco mosaic virus*. *Plant Cell* **14**: 1207-1222.
- Giner, A., Lakatos, L., García-Chapa, M., López-Moya, J.J. & Burgyán, J. (2010). Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathog.* **6**: e1000996.
- Glazov, E., Phillips, K., Budziszewski, G.J., Schob, H., Meins Jr, F. & Levin, J.Z. (2003). A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for post-transcriptional silencing in *Arabidopsis*. *Plant J.* **35**: 342-349.
- Glick, B.S., Brandt, A., Cunningham, K., Müller, S., Hallberg, R.L. & Schatz, G. (1992). Cytochromes *c1* and *b2* are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* **69**: 809-822.
- 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. USA* **105**: 157-161.
- Goregaoker, S.P. & Culver, J.N. (2003). Oligomerization and activity of the helicase domain of the *Tobacco mosaic virus* 126- and 183-kilodalton replicase proteins. *J. Virol.* **77**: 3549-3556.
- Goregaoker, S.P., Lewandowski, D.J. & Culver, J.N. (2001). Identification and functional analysis of an interaction between domains of the 126/183-kDa replicase-associated proteins of *Tobacco mosaic virus*. *Virology* **282**: 320-328.
- Gorshkova, E.N., Erokhina, T.N., Stroganova, T.A., Yelina, N.E., Zamyatnin, A.A., Kalinina, N.O., Schiemann, J., Solov'yev, A.G. & Morosov, S.Y. (2003). Immunodetection and fluorescent microscopy of transgenically expressed hordeivirus TGBp3 movement protein reveals its association with endoplasmic reticulum elements in close proximity to plasmodesmata. *J. Gen. Virol.* **84**: 985-994.
- Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T. & Masuta, C. (2007). Characterization of silencing suppressor 2b of *Cucumber mosaic virus* based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol.* **48**: 1050-1060.
- Grdzlishvili, V.Z., García-Ruiz, H., Watanabe, T. & Ahlquist, P. (2005). Mutual interference between genomic RNA replication and subgenomic mRNA transcription in *Brome mosaic virus*. *J. Virol.* **79**: 1438-1451.
- Guan, H.C., Carpenter, C.D. & Simon, A.E. (2000a). Analysis of cis-acting sequences involved in plus-strand synthesis of a *Turnip crinkle virus*-associated satellite RNA identifies a new carmovirus replication element. *Virology* **268**: 345-354.
- Guan, H.C., Carpenter, C.D. & Simon, A.E. (2000b). Requirement of a 5'-proximal linear sequence on a minus strands for a plus-strand synthesis of a satellite RNA associated with *Turnip crinkle virus*-associated satellite RNA identifies a new carmovirus replication element. *Virology* **268**: 355-363.
- Guan, H.C., Song, C.Z. & Simon, A.E. (1997). RNA promoters located on (-) strands of a subviral RNA associated with *Turnip crinkle virus*. *RNA* **3**: 1401-1412.
- Guenoune-Gelbart, D., Elbaum, M., Sagi, G., Levy, A. & Epel, B.L. (2008). *Tobacco mosaic virus* (TMV) replicase and movement protein function synergistically in facilitating TMV spread by



- lateral diffusion in the plasmodesmal desmotubule of *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**: 335-345.
- Guilley, H., Carrington, J.C., Balázs, E., Jonard, G., Richards, K. & Morris, T.J.** (1985). Nucleotide sequence and genome organization of *Carnation mottle virus*. *Nucleic Acids Res.* **13**: 6663-6677.
- Gulati-Sakhuja, A. & Liu, H.Y.** (2010). Complete nucleotide sequence and genome organization of *Calibrachoa mottle virus* (CbMV) - a new species in the genus *Carmovirus* of the family *Tombusviridae*. *Virus Res.* **147**: 216-223.
- Gulati-Sakhuja, A., Rains, L., Tian, T. & Liu, H.Y.** (2011). The complete nucleotide sequence and genome organization of a novel carmovirus - *Honeysuckle ringspot virus* isolated from honeysuckle. *Arch. Virol.* **156**: 1635-1640.
- Haas, G., Azevedo, J., Moissiard, G., Geldreich, A., Himber, C., Bureau, M., Fukuhara, T., Keller, M. & Voinnet, O.** (2008). Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J.* **27**: 2102-2112.
- Hacker, D.L., Petty, I.T., Wei, N. & Morris, T.J.** (1992). *Turnip crinkle virus* genes required for RNA replication and virus movement. *Virology* **186**: 1-8.
- Hagiwara, Y., Komoda, K., Yamanaka, T., Tamai, A., Meshi, T., Funada, R., Tsuchiya, T., Naito, S. & Ishikawa, M.** (2003). Subcellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication. *EMBO J.* **22**: 344-353.
- Haley, A., Hunter, T., Kiberstis, P. & Zimmern, D.** (1995). Multiple serine phosphorylation sites on the 30 kDa TMV cell-to-cell movement protein synthesized in tobacco protoplasts. *Plant J.* **8**: 715-724.
- Hamera, S., Song, X., Su, L., Chen, X. & Fang, R.** (2012). *Cucumber mosaic virus* suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J.* **69**: 104-115.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. & Baulcombe, D.** (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* **21**: 4671-4679.
- Hamilton, A.J. & Baulcombe, D.C.** (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-952.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G.J.** (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296.
- Hanton, S.L., Matheson, L.A., Chatre, L., Rossi, M. & Brandizzi, F.** (2007). Post-Golgi protein traffic in the plant secretory pathway. *Plant Cell Rep.* **26**: 1431-1438.
- Harbison, S.A., Davies, J.W. & Wilson, T.M.A.** (1985). Expression of high-molecular-weight polypeptides by *Carnation mottle virus*-RNA. *J. Gen. Virol.* **66**: 2597-2604.
- Harries, P. & Ding, B.** (2011). Cellular factors in plant virus movement: at the leading edge of macromolecular trafficking in plants. *Virology* **411**: 237-243.
- Harries, P.A., Palanichelvam, K., Bhat, S. & Nelson, R.S.** (2008). *Tobacco mosaic virus* 126-kDa protein increases the susceptibility of *Nicotiana tabacum* to other viruses and its dosage affects virus-induced gene silencing. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**: 1539-1548.
- Harries, P.A., Park, J.W., Nobumitsu, S., Ballard, K.D., Maule, A.J. & Nelson, R.S.** (2009). Differing requirements for actin and myosin by plant viruses for intercellular movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 17594-17599.
- Harries, P.A., Schoelz, J.E. & Nelson, R.S.** (2010). Intracellular transport of viruses and their components: utilizing the cytoskeleton and membrane highways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**: 1381-1393.
- Harrison, B.D. & Roberts, I.M.** (1968). Association of *Tobacco rattle virus* with mitochondria. *J. Gen. Virol.* **3**: 121-124.
- Harvey, J.J.W., Lewsey, M.G., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J.P. & Baulcombe, D.C.** (2011). An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS ONE* **6**: e14639.

- Hatta, T. & Francki, R.I.B. (1981). Cytopathic structures associated with tonoplasts of plant cells infected with *Cucumber mosaic* and *Tomato aspermy viruses*. *J. Gen. Virol.* **53**: 343-346.
- Hatta, T., Francki R. & Grinvell, C.J. (1983). Particle morphology and cytopathology of *Galinsoga mosaiv virus*. *J. Gen. Virol.* **64**: 687-692.
- Hatta, T., Nakamoto, T., Tagaki, Y. & Ushiyama, R. (1971). Cytological abnormalities of mitochondria induced by infection with *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Virology* **45**: 292-297.
- Haupt, S., Cowan, G.H., Ziegler, A., Roberts, A.G., Oparka, K.J. & Torrance, L. (2005). Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic recycling pathway. *Plant Cell* **17**: 164-181.
- Havelda, Z., Hornyik, C., Crescenzi, A. & Burgyán, J. (2003). *In situ* characterization of *Cymbidium ringspot tobusvirus* infection-induced posttranscriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J. Virol.* **77**: 6082-6086.
- He, X.J., Hsu, Y.F., Zhu, S., Wierzbicki, A.T., Pontes, O., Pikaard, C.S., Liu, H.L., Wang, C.S., Jin, H. & Zhu, J.K. (2009). An effector of RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis* is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell* **137**: 498-508.
- Heaton, N.S. & Randall, G. (2010). Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* **8**: 422-432.
- Heaton, N.S. & Randall, G. (2011). Multifaceted roles for lipids in viral infection. *Trends Microbiol.* **19**: 368-375.
- Heinlein, M. & Epel, B.L. (2004) Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata. *Int. Rev. Cytol.* **235**: 93-164.
- Heinlein, M. (2009). Plant virus movement and the impact of RNA silencing. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Heinlein, M., Padgett, H.S., Gens, J.S., Pickard, B.G., Casper, S.J., Epel, B.L. & Beachy, R.N. (1998a). Changing patterns of localization of the *Tobacco mosaic virus* movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell* **7**: 1107-1120.
- Heinlein, M., Wood, M.R., Thiel, T. & Beachy, R.N. (1998b). Targeting and modification of prokaryotic cell-cell junctions by *Tobacco mosaic virus* cell-to-cell movement protein. *Plant J.* **14**: 345-351.
- Hemmes, H., Kaaij, L., Lohuis, D., Prins, M., Goldbach, R. & Schnettler, E. (2009). Binding of small interfering RNA molecules is crucial for RNA interference suppressor activity of *Rice hoja blanca virus* NS3 in plants. *J. Gen. Virol.* **90**: 1762-1766.
- Hemmes, H., Lakatos, L., Goldbach, R., Burgyán, J. & Prins, M. (2007). The NS3 protein of *Rice hoja blanca tenuivirus* suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *RNA* **13**: 1079-1089.
- Hericourt, F., Blanc, S., Redeker, V. & Jupin, I. (2000). Evidence for phosphorylation and ubiquitinylation of the *Turnip yellow mosaic virus* RNA-dependent RNA polymerase domain expressed in a baculovirus-insect cell system. *Biochem. J.* **349**: 417-425.
- Herranz, M.C. & Pallás, V. (2004). RNA-binding properties and mapping of the RNA-binding domain from the movement protein of *Prunus necrotic ringspot virus*. *J. Gen. Virol.* **85**: 761-768.
- 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.
- Hirashima, K. & Watanabe, Y. (2003). RNA helicase domain of tobamovirus replicase executes cell-to-cell movement possibly through collaboration with its nonconserved region. *J. Virol.* **77**: 12357-12362.

- Hofmann, C., Niehl, A., Sambade, A., Steinmetz, A. & Heinlein, M. (2009). Inhibition of *Tobacco mosaic virus* movement by expression of an actin-binding protein. *Plant Physiol.* **149**: 1810-1823.
- Hogle, J.M., Maeda, A. & Harrison, S.C. (1986). Structure and assembly of *Turnip crinkle virus*. I. X-ray crystallographic structure analysis at 3.2-Å resolution. *J. Mol. Biol.* **191**: 625-638.
- Hope, D.A., Diamond, S.E. & Kirkegaard, K. (1997). Genetic dissection of interaction between poliovirus 3D polymerase and viral protein 3AB. *J. Virol.* **71**: 9490-9498.
- Hsieh, Y.C., Omarov, R.T. & Scholthof, H.B. (2009). Diverse and newly recognized effects associated with short interfering RNA binding site modifications on the *Tomato bushy stunt virus* p19 silencing suppressor. *J. Virol.* **83**: 2188-2200.
- Hsu, H., Chou, Y.L., Tseng, Y.H., Lin, Y.H., Lin, T.M., Lin, N.S., Hsu, Y.H. & Chang, B.Y. (2008). Topological properties of the triple gene block protein 2 of *Bamboo mosaic virus*. *Virology* **379**: 1-9.
- Huang, M., Koh, D.C., Weng, L.J., Chang, M.L., Yap, Y.K., Zhang, L. & Wong, S.M. (2000). Complete nucleotide sequence and genome organization of *Hibiscus chlorotic ringspot virus*, a new member of the genus *Carmovirus*: evidence for the presence and expression of two novel open reading frames. *J. Virol.* **74**: 3149-3155.
- Hull, R. (2009). *Comparative Plant Virus Virology*. 2<sup>nd</sup> Ed. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.
- Hutvagner, G. & Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 22-32.
- Hwang, Y.T., McCartney, A.W., Gidda, S.K. & Mullen, R.T. (2008). Localization of the *Carnation Italian ringspot virus* replication protein p36 to the mitochondrial outer membrane is mediated by an internal targeting signal and the TOM complex. *BMC Cell Biol.* **9**: 54.
- Hyodo, K., Mine, A., Iwakawa, H.O., Kaido, M., Mise, K. & Okuno, T. (2011). Identification of amino acids in auxiliary replicase protein p27 critical for its RNA-binding activity and the assembly of the replicase complex in *Red clover necrotic mosaic virus*. *Virology* **413**: 300-309.
- Ishibashi, K., Nishikiori, M. & Ishikawa M. (2010). Interactions between tobamovirus replication proteins and cellular factors: their impacts on virus multiplication. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**: 1413-1419.
- Iwakawa, H.O., Mine, A., Hyodo, K., An, M., Kaido, M., Mise, K. & Okuno, T. (2011). Template recognition mechanisms by replicase proteins differ between bipartite positive-strand genomic RNAs of a plant virus. *J. Virol.* **85**: 497-509.
- Jackson, A.O., Lim, H.S., Bragg, J., Ganesan, U. & Lee, M.Y. (2009). Hordeivirus replication, movement, and pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47**: 385-422.
- Jakubiec, A. & Jupin, I. (2007). Regulation of positive-strand RNA virus replication: the emerging role of phosphorylation. *Virus Res.* **129**: 73-79.
- Jakubiec, A., Notaise, J., Tournier, V., Héricourt, F., Block, M.A., Drugeon, G., van Aelst, L. & Jupin, I. (2004). Assembly of *Turnip yellow mosaic virus* replication complexes: interaction between the proteinase and polymerase domains of the replication proteins. *J. Virol.* **78**: 7945-7957.
- Jakubiec, A., Tournier, V., Drugeon, G., Pflieger, S., Camborde, L., Vinh, J., Héricourt, F., Redeker, V. & Jupin, I. (2006). Phosphorylation of viral RNA-dependent RNA polymerase and its role in replication of a plus-strand RNA virus. *J. Biol. Chem.* **281**: 21236-21249.
- Janda, M. & Ahlquist, P. (1993). RNA-dependent replication, transcription, and persistence of *Brome mosaic virus* RNA replicons in *S. cerevisiae*. *Cell* **72**: 961-970.
- Jansen, K.A.J., Wolfs, C.J.A.M., Lohuis, H., Goldbach, R. & Verduin, B.J.M. (1998). Characterization of the *Brome mosaic virus* movement protein expressed in *E. coli*. *Virology* **242**: 387-394.

- Jaubert, M., Bhattacharjee, S., Mello, A.F., Perry, K.L. & Moffett, P. (2011). ARGONAUTE2 mediates RNA silencing anti-viral defenses against *Potato virus X* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **156**: 1556-1564.
- Ji, X., Qian, D., Wei, Ch., Ye, G., Zhang, Z., Wu, Z., Xie, L. & Li, Y. (2011). Movement protein Pns6 of *Rice dwarf phytoreovirus* has both ATPase and RNA binding activities. *PLoS One* **6**: e24986.
- Jiang, Y., Serviène, E., Gal, J., Panavas, T. & Nagy, P.D. (2006). Identification of essential host factors affecting tombusvirus RNA replication based on the yeast Tet promoters Hughes Collection. *J. Virol.* **80**: 7394-7404.
- Jiwan, S.D. & White, K.A. (2011). Subgenomic mRNA transcription in *Tombusviridae*. *RNA Biol.* **8**: 287-294.
- Johansen, L.K. & Carrington, J.C. (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* **126**: 930-938.
- Jonczyk, M., Pathak, K.B., Sharma, M. & Nagy, P.D. (2007). Exploiting alternative subcellular location for replication: tombusvirus replication switches to the endoplasmic reticulum in the absence of peroxisomes. *Virology* **362**: 320-330.
- Joshi, A.S., Zhou, J., Gohil, V.M., Chen, S. & Greenberg, M.L. (2009). Cellular functions of cardiolipin in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**: 212-218.
- Ju, H.J., Brown, J.E., Ye, C.M. & Verchot-Lubicz, J. (2007). Mutations in the central domain of *Potato virus X* TGBp2 eliminate granular vesicles and virus cell-to-cell trafficking. *J. Virol.* **81**: 1899-1911.
- Ju, H.J., Samuels, T.D., Wang, Y.S., Blancaflor, E., Payton, M., Mitra, R., Krishnamurthy, K., Nelson, R.S. & Verchot-Lubicz, J. (2005). The *Potato virus X* TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum-derived vesicles during virus infection. *Plant Physiol.* **138**: 1877-1895.
- Kahn, T.W., Lapidot, M., Heinlein, M., Reichel, C., Cooper, B., Gafny, R. & Beachy, R.N. (1998). Domains of the TMV movement protein involved in subcellular localization. *Plant J.* **15**: 15-25.
- Kalinina, N.O., Fedorkin, O.N., Samuilova, O.V., Maiss, E., Korpela, T., Morosov, S.Y. & Atabekov, J.G. (1996). Expression and biochemical analyses of the recombinant *Potato virus X* 25K movement protein. *FEBS Lett.* **397**: 75-78.
- Kalinina, N.O., Rakitina, D.A., Yelina, N.E., Zamyatnin, A.A. Jr, Stroganova, T.A., Klinov, D.V., Prokhorov, V.V., Ustinova, S.V., Chernov, B.K., Schiemann, J., Solovyev, A.G. & Morozov, S.Y. (2001). RNA-binding properties of the 63 kDa protein encoded by the triple gene block of *Poa semilatent hordeivirus*. *J. Gen. Virol.* **82**: 2569-2578.
- Kalinina, N.O., Rakitina, D.V., Solovyev, A.G., Schiemann, J. & Morosov, S.Y. (2002). RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the triple gene block. *Virology* **296**: 321-329.
- Kao, C.C. & Ahlquist, P. (1992). Identification of the domains required for direct interaction of the helicase-like and polymerase-like RNA replication proteins of *Brome mosaic virus*. *J. Virol.* **66**: 7293-7302.
- Kao, C.C., Singh, P. & Ecker, D.J. (2001). *De novo* initiation of viral RNA-dependent RNA synthesis. *Virology* **287**: 251-260.
- Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowski, D.J. & Dawson, W.O. (1995). Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology* **208**: 511-520.
- Karger, E.M., Frolova, O.Y., Fedorova, N.V., Baratova, L.A., Ovchinnikova, T.V., Susi, P., Makinen, K., Ronnstrand, L., Dorokhov, Y.L. & Atabekov, J.G. (2003). Dysfunctionality of a *Tobacco mosaic virus* movement protein mutant mimicking threonine 104 phosphorylation. *J. Gen. Virol.* **84**: 727-732.

- Kasschau, K.D. & Carrington, J.C.** (2001). Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* **285**: 71-81.
- Kasschau, K.D. & Carrington, J.C.** (1998). A counter-defensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* **95**: 461-470.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A. & Carrington, J.C.** (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev. Cell* **4**: 205-217.
- Kasteel, D., Wellink, J., Verver, J., van Lent, J., Goldbach, R. & van Kammen, A.** (1993). The involvement of *Cowpea mosaic virus* M RNA-encoded proteins in tubule formation. *J. Gen. Virol.* **74**: 1721-1724.
- Kawakami, S., Hori, K., Hosokawa, D., Okada, Y. & Watanabe, Y.** (2003). Defective tobamovirus movement protein lacking wild-type phosphorylation sites can be complemented by substitutions found in revertants. *J. Virol.* **77**: 1452-1461.
- Kawakami, S., Padgett, H.S., Hosokawa, D., Okada, Y., Beachy, R.N. & Watanabe, Y.** (1999). Phosphorylation and/or presence of serine 37 in the movement protein of *Tomato mosaic tobamovirus* is essential for intracellular localization and stability *in vivo*. *J. Virol.* **73**: 6831-6840.
- Kawakami, S., Watanabe, Y. & Beachy, R.N.** (2004). *Tobacco mosaic virus* infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 6291-6296.
- Ke, J., Schmidt, T., Chase, E., Bozarth, R.F. & Smith, T.J.** (2004). Structure of *Cowpea mottle virus*: a consensus in the genus *Carmovirus*. *Virology* **321**: 349-358.
- Kehr, J. & Buhtz, A.** (2008). Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J. Exp. Bot.* **59**: 85-92.
- Kelly, L., Gerlach, W.L. & Waterhouse, P.M.** (1994). Characterization of the subgenomic RNAs of an Australian isolate of *Barley yellow dwarf luteovirus*. *Virology* **202**: 565-573.
- Kemper, C., Habib, S.J., Engl, G., Heckmeyer, P., Dimmer, K.S. & Rapaport, D.** (2008). Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. *J. Cell Sci.* **121**: 1990-1998.
- Kim, J.W. & Bozarth, R.F.** (1992). Mapping and sequence analysis of the capsid protein gene of *Cowpea mottle virus*. *Intervirology* **33**: 135-147.
- Kim, K.H. & Hemenway, C.L.** (1999). Long-distance RNA-RNA interactions and conserved sequence elements affect *Potato virus X* plus-strand RNA accumulation. *RNA* **5**: 636-645.
- Kim, M.J., Zhong, W., Hong, Z. & Kao, C.C.** (2000). Template nucleotide moieties required for *de novo* initiation of RNA synthesis by a recombinant viral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* **74**: 10312-10322.
- Kim, S.H., MacFarlane, S., Kalinina, N.O., Rakitina, D.V., Ryabov, E.V., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J.W.S. & Taliansky, M.** (2007a). Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *PNAS* **104**: 11115-11120.
- Kim, S.H., Palukaitis, P. & Park, Y.I.** (2002). Phosphorylation of *Cucumber mosaic virus* RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex. *EMBO J.* **21**: 2292-2300.
- Kim, S.H., Ryabov, E.V., Kalinina, N.O., Rakitina, D.V., Gillespie, T., MacFarlane, S., Haupt, S., Brown, J.W.S. & Taliansky, M.** (2007b). Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J.* **26**: 2169-2179.
- Kinard, G.R. & Jordan, R.** (2002). Genome organization of *Pelargonium chlorotic ring pattern virus*: further implications for *Tombusviridae* taxonomy. *Acta Hort.* **568**: 17-27.
- Koh, D.C., Wong, S.M. & Liu, D.X.** (2003). Synergism of the 3'-untranslated region and an internal ribosome entry site differentially enhances the translation of a plant virus coat protein. *J. Biol. Chem.* **278**: 20565-20573.

- Köhler, F., Storch, B., Kulathu, Y., Herzog, S., Kuppig, S., Reth, M. & Jumaa, H.** (2005). A leucine zipper in the N terminus confers membrane association to SLP-65. *Nat. Immunol.* **6**: 204-210.
- Kollár, A., & Burgyán, J.** (1994). Evidence that ORF 1 and 2 are the only virus-encoded replicase genes of *Cymbidium ringspot tobamovirus*. *Virology* **201**: 169-172.
- Kong, F., Sivakumaran, K. & Kao, C.** (1999). The N-terminal half of the *Brome mosaic virus* 1a protein has RNA capping-associated activities: specificity for GTP and S-adenosylmethionine. *Virology* **259**: 200-210.
- Kong, Q., Oh, J.W., Carpenter, C.D. & Simon, A.E.** (1997). The coat protein of *Turnip crinkle virus* is involved in subviral RNA-mediated symptom modulation and accumulation. *Virology* **238**: 478-485.
- Koonin, E.V. & Dolja, V.V.** (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 375-430.
- Koonin, E.V.** (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **72**: 2197-2206.
- Koonin, E.V., Mushegian, A.R., Ryabov, E.V. & Dolja, V.V.** (1991). Diverse groups of plant RNA and DNA viruses share related movement proteins that may possess chaperone-like activity. *J. Gen. Virol.* **72**: 2895-2903.
- Kopek, B.G., Perkins, G., Miller, D.J., Ellisman, M.H. & Ahlquist, P.** (2007). Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biol.* **5**: e220.
- Kornmann, B. & Walter, P.** (2010). ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J. Cell Sci.* **123**: 1389-1393.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S. & Walter P.** (2009). An ER-Mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* **325**: 477-481.
- Kotlizky, G., Katz, A., van der Laak, J., Boyko, V., Lapidot, M., Beachy, R.N., Heinlein, M. & Epel, B.L.** (2001). A dysfunctional movement protein of *Tobacco mosaic virus* interferes with targeting of wild-type movement protein to microtubules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 895-904.
- Koukiekolo, R., Sagan, S.M. & Pezacki, J.P.** (2007). Effects of pH and salt concentration on the siRNA binding activity of the RNA silencing suppressor protein p19. *FEBS Lett.* **581**: 3051-3056.
- Kragler, F., Curin, M., Trutnyeva, K., Gansch, A. & Waigmann, E.** (2003). MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of *Tobacco mosaic virus* movement protein. *Plant Physiol.* **132**: 1870-1883.
- Krayl, M., Lim, J.H., Martin, F., Guiard, B. & Voos, W.** (2007). A cooperative action of the ATP-dependent import motor complex and the inner membrane potential drives mitochondrial preprotein import. *Mol. Cell Biol.* **27**: 411-425.
- Krczal, G., Albouy, J., Damy, I., Kusiak, C., Deogratias, J.M, Moreau, J.P., Berkelmann, B. & Wohanka, W.** (1995). Transmission of *Pelargonium flower break virus* by irrigation systems and by thrips. *Plant Dis.* **79**: 163-166.
- Kreuze, J.F., Savenkov, E.I., Cuellar, W., Li, X. & Valkonen, J.P.T.** (2005). Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *J. Virol.* **79**: 7227-7238.
- Krishnamurthy, K., Heppler, M., Mitra, R., Blancaflor, E., Payton, M., Nelson, R.S. & Verchot-Lubicz, J.** (2003). The *Potato virus X* TGBp3 protein associates with the ER network for virus cell-to-cell movement. *Virology* **309**: 135-151.
- Kubota, K., Tsuda, S., Tamai, A. & Meshi, T.** (2003). *Tomato mosaic virus* replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* **77**: 11016-11026.

- Kushner, D.B., Lindenbach, B.D., Grdzlishvili, V.Z., Noueir, A.O., Paul, S.M. & Ahlquist, P. (2003). Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 15764-15769.
- Kutik, S., Stojanovski, D., Becker, L., Becker, T., Meinecke, M., Krüger, V., Prinz, C., Meisinger, C., Guiard, B., Wagner, R., Pfanner, N. & Wiedemann, N. (2008). Dissecting membrane insertion of mitochondrial  $\beta$ -barrel proteins. *Cell* **132**: 1011-1024.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y.P., Dolja, V.V., Calvino, L.F., López-Moya, J.J. & Burgyán, J. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* **25**: 2768-2780.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D. & Burgyán, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J.* **23**: 876-884.
- Lee, J.Y., Taoka, K., Yoo, B.C., Ben-Nissan, G., Kim, D.J. & Lucas, W.J. (2005). Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and *Arabidopsis* recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *Plant Cell* **17**: 2817-2831.
- Lee, K.C., Lim, D., Wong, S.M. & Doklan, T. (2003). Purification, crystallization and X-ray analysis of *Hibiscus chlorotic ringspot virus*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **59**: 1481-1483.
- Lee, S.C., Wu, C.H. & Wang, C.W. (2010). Traffic of a viral movement protein complex to the highly curved tubules of the cortical endoplasmic reticulum. *Traffic* **11**: 912-930.
- Lekkerkerker, A., Wellink, J., Yuan, P., van Lent, J., Goldbach, R. & van Kammen, A.B. (1996). Distinct functional domains in the *Cowpea mosaic virus* movement protein. *J. Virol.* **70**: 5658-5661.
- Leshchiner, A.D., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y. & Kalinina, N.O. (2006). A minimal region in the NTPase/helicase domain of the TGBp1 plant virus movement protein is responsible for ATPase activity and cooperative RNA binding. *J. Gen. Virol.* **87**: 3087-3095.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J. & Chen, X. (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **15**: 1501-1507.
- Li, Q. & Palukaitis, P. (1996). Comparison of the nucleic acid- and NTP-binding properties of the movement protein of cucumber mosaic cucumovirus and tobacco mosaic tobamovirus. *Virology* **216**: 71-79.
- Li, W.Z., Qu, F. & Morris, T.J. (1998). Cell-to-cell movement of *Turnip crinkle virus* is controlled by two small open reading frames that function in *trans*. *Virology* **244**: 405-416.
- Li, Z., Pogany, J., Panavas, T., Xu, K., Esposito, A.M., Kinzy, T.G. & Nagy, P.D. (2009). Translation elongation factor 1A is a component of the tombusvirus replicase complex and affects the stability of the p33 replication cofactor. *Virology* **385**: 245-260.
- Liang, X.Z., Lee, B.T.K. & Wong, S. M (2002a). 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**: 12320-12324.
- Liang, X.Z., Lucy, A.P., Ding, S.W. & Wong, S.M. (2002b). The p23 protein of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* is indispensable for host-specific replication. *J. Virol.* **76**: 12312-12319.
- Lim, H.S., Bragg, J.N., Ganesan, U., Lawrence, D.M., Yu, J.L., Isogai, M., Hammond, J. & Jackson, A.O. (2008). Triple gene block protein interactions involved in movement of *Barley stripe mosaic virus*. *J. Virol.* **82**: 4991-5006.
- Lin, B. & Heaton, L.A. (2001). An *Arabidopsis thaliana* protein interacts with a movement protein of *Turnip crinkle virus* in yeast cells and *in vitro*. *J. Gen. Virol.* **82**: 1245-1251.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. & Sattler, M. (2005). The structure of the *Flock house virus* B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *EMBO Rep.* **6**: 1149-1155.
- Lister, R., Hulet, J.M., Lithgow, T. & Whelan, J. (2005). Protein import into mitochondria: origins and functions today. *Mol. Membr. Biol.* **22**: 87-100.

- Liu, J.Z., Blancaflor, E.B. & Nelson, R.S. (2005). The Tobacco mosaic virus 126-kilodalton protein, a constituent of the virus replication complex, alone or within the complex aligns with and traffics along microfilaments. *Plant Physiol.* **138**: 1853-1865.
- Liu, L., Grainger, J., Cañizares, M.C., Angell, S.M. & Lomonossoff, G.P. (2004). Cowpea mosaic virus RNA-1 acts as an amplicon whose effects can be counteracted by a RNA-2-encoded suppressor of silencing. *Virology* **323**: 37-48.
- Liu, Y., Wimmer, E. & Paul, A.V. (2009). Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. *Biochim. Biophys. Acta* **1789**: 495-517.
- Llave, C. (2010). Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Cell* **15**: 701-707.
- Long, G., Pan, X. & Vlak, J.M. (2008). Conserved leucines in N-terminal heptad repeat HR1 of envelope fusion protein F of group II nucleopolyhedroviruses are important for correct processing and essential for fusogenicity. *J. Virol.* **82**: 2437-2447.
- López, C., Navas-Castillo, J., Gowda, S., Moreno, P. & Flores, R. (2000). The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of *Citrus tristeza virus* is an RNA-binding protein. *Virology* **269**: 462-470.
- Lough, T.J., Shash, K., Xoconostle-Cázares, B., Hofstra, K.R., Beck, D.L., Balmori, E., Forster, R.L.S. & Lucas, W.J. (1998). Molecular dissection of the mechanism by which potexvirus triple gene block proteins mediate cell-to-cell transport of infectious RNA. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 801-814.
- Love, A.J., Laird, J., Holt, J., Hamilton, A.J., Sadanandom, A. & Milner, J.J. (2007). Cauliflower mosaic virus protein P6 is a suppressor of RNA silencing. *J. Gen. Virol.* **88**: 3439-3444.
- Lózsá, R., Csorba, T., Lakatos, L. & Burgyán, J. (2008). Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. *Nucleic Acids Res.* **36**: 4099-4107.
- Lu, R., Folomonov, A., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O. & Ding, S.W. (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 15742-15747.
- Lucas, W.J. & Lee, J.Y. (2004). Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 712-726.
- Lucas, W.J. (2006). Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* **344**: 169-184.
- Lunde, B.M., Moore, C. & Varani, G. (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 479-490.
- Lupo, R., Rubino, L. & Russo, M. (1994). Immunodetection of the 33K/92K polymerase proteins in *Cymbidium ringspot virus*-infected and in transgenic plant tissue extracts. *Arch. Virol.* **138**: 135-142.
- Lyle, J.M., Bullitt, E., Bienz, K. & Kirkegaard, K. (2002). Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* **296**: 2218-2222.
- Mackenzie, J. (2005). Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic* **6**: 967-977.
- MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A., Cande, W., Adams, P. & Doudna, J. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* **311**: 195-198.
- Makarov, V., Rybakova, E., Efimov, A., Dobrov, E., Serebryakova, M., Solovyev, A., Yaminsky, I., Taliansky, M., Morozov, S. & Kalinina, N. (2009). Domain organization of the N-terminal portion of hordeivirus movement protein TGBp1. *J. Gen. Virol.* **90**: 3022-3032.
- Marcos, J.F., Vilar, M., Pérez-Payá, E. & Pallás, V. (1999). *In vivo* detection, RNA-binding properties and characterization of the RNA-binding domain of the p7 putative movement protein from *Carnation mottle virus* (CarMV). *Virology* **255**: 354-365.



- Margis, R., Fusaro, A.F., Smith, N.A., Curtin, S.J., Watson, J.M., Finnegan, E.J. & Waterhouse, P.M.** (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Lett.* **580**: 2442-2450.
- Martelli, G.P.** (1994). Epidemiology and management of plant virus diseases. En: Maden, M., Raccach, B. & Tresh, J. (eds.), Springer-Verlag, Berlín.
- Martelli, G.P., Gallitelli, D. & Russo, M.** (1988). Tombusviruses. En: Koenig, R. (ed.), *The plant viruses, vol. 3. Polyhedral virions with monopartite RNA genomes*. Plenum Press, New York, pp. 13-72.
- Martínez-Gil, L.** (2009). Tesis doctoral "Estudio estructural y funcional de proteínas de movimiento viral de virus de plantas". Universidad de Valencia.
- Martínez-Gil, L., Johnson, A.E. & Mingarro, I.** (2010). Membrane insertion and biogenesis of the Turnip crinkle virus p9 movement protein. *J. Virol.* **84**: 5520-5527.
- Martínez-Gil, L., Sánchez-Navarro, J.A., Cruz, A., Pallás, V., Pérez-Gil, J. & Mingarro, I.** (2009). Plant virus cell-to-cell movement is not dependent on the transmembrane disposition of its movement protein. *J. Virol.* **83**: 5535-5543.
- Martínez-Gil, L., Saurí, A., Vilar, M., Pallás, V. & Mingarro, I.** (2007). Membrane insertion and topology of the p7B movement protein of Melon necrotic spot virus (MNSV). *Virology* **367**: 348-357.
- Más, P. & Beachy, R.N.** (1999). Replication of Tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *J. Cell Biol.* **147**: 945-958.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. & Zamore, P.** (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**: 607-620.
- Matzke, M.A., Matzke, A.J., Pruss, G.J. & Vance, V.B.** (2001). RNA-based silencing strategies in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**: 221-227.
- Maule, A.J.** (2008). Plasmodesmata: structure, function and biogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 680-686.
- McCartney, A.W., Greenwood, J.S., Fabian, M.R., White, K.A. & Mullen, R.T.** (2005). Localization of the Tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *Plant Cell* **17**: 3513-3531.
- McCormack, J.C. & Simon, A.E.** (2004). Biased hypermutagenesis associated with mutations in an untranslated hairpin of an RNA virus. *J. Virol.* **78**: 7813-7817.
- McGeachy, K.D. & Barker, H.** (2000). Potato mop-top virus RNA can move long-distance in the absence of coat protein: Evidence from resistant, transgenic plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 125-128.
- McGuffin, L.J. & Roche, D.B.** (2010). Rapid model quality assessment for protein structure predictions using the comparison of multiple models without structural alignments. *Bioinformatics* **26**: 182-188.
- McLean, B.G., Zupan, J. & Zambryski, P.C.** (1995). Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell* **7**: 2101-2114.
- McNew, J.A. & Goodman, J.M.** (1994). An oligomeric protein is imported into peroxisomes *in vivo*. *J. Cell Biol.* **127**: 1245-1257.
- Meineke, B., Engl, G., Kemper, C., Vasiljev-Neumeyer, A., Paulitschke, H. & Rapaport, D.** (2008). The outer membrane form of the mitochondrial protein Mcr1 follows a TOM-independent membrane insertion pathway. *FEBS Lett.* **582**: 855-860.
- Meisinger, C., Rissler, M., Chacinska, A., Szklarz, L.K., Milenkovic, D., Kozjak, V., Schonfisch, B., Lohaus, C., Meyer, H.E., Yaffe, M.P., Guiard, B., Wiedemann, N. & Pfanner, N.** (2004). The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev. Cell* **7**: 61-71.

- Meisinger, C., Wiedemann, N., Rissler, M., Strub, A., Milenkovic, D., Schönfisch, B., Müller, H., Kozjak, V. & Pfanner, N. (2006). Mitochondrial protein sorting: differentiation of  $\beta$ -barrel assembly by Tom7-mediated segregation of Mdm10. *J. Biol. Chem.* **281**: 22819-22826.
- Melcher, U. (1990). Similarities between putative transport proteins of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **71**: 1009-1018.
- Melcher, U. (2000). The '30K' superfamily of viral movement proteins. *J. Gen. Virol.* **81**: 257-266.
- Melnyk, C.W., Molnár A. & Baulcombe, D.C. (2011). Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.* **30**: 3553-3563.
- Meng, C., Chen, J., Ding, S.W., Peng, J. & Wong, S.M. (2008). *Hibiscus chlorotic ringspot virus* coat protein inhibits *trans*-acting small interfering RNA biogenesis in *Arabidopsis*. *J. Gen. Virol.* **89**: 2349-2358.
- Meng, C., Chen, J., Peng, J. & Wong, S.M. (2006). Host-induced avirulence of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* mutant correlates with reduced gene-silencing suppression activity. *J. Gen. Virol.* **87**: 451-459.
- 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.
- Mérai, Z., Kerényi, Z., Molnár, A., Barta, E., Válóczy, A., Bisztray, G., Havelda, Z., Burgyán, J. & Silhavy, D. (2005). Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J. Virol.* **79**: 7217-7226.
- Merits, A., Kettunen, R., Makinen, K., Lampio, A., Auvinen, P., Kaariainen, L. & Ahola, T. (1999). Virus-specific capping of *Tobacco mosaic virus* RNA: methylation of GTP prior to formation of covalent complex p126-m7GMP. *FEBS Lett.* **455**: 45-48.
- Mezéth, K., Nylund, S., Hendriksen, H., Patel, S., Nerland, A.H. & Szilvay, A.M. (2007). RNA-dependent RNA polymerase from Atlantic Halibut nodavirus contains two signals for localization to the mitochondria. *Virus Res.* **130**: 43-52.
- Milenkovic, D., Ramming, T., Müller, J.M., Wenz, L.S., Gebert, N., Schulze-Specking, A., Stojanovski, D., Rospert, S. & Chacinska, A. (2009). Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria. *Mol. Biol. Cell* **20**: 2530-2539.
- Miller, D.J. & Ahlquist, P. (2002). *Flock house virus* RNA polymerase is a transmembrane protein with amino-terminal sequences sufficient for mitochondrial localization and membrane insertion. *J. Virol.* **76**: 9856-9867.
- Miller, D.J., Schwartz, M.D., Dye, B.T. & Ahlquist, P. (2003). Engineered retargeting of viral RNA replication complexes to an alternative intracellular membrane. *J. Virol.* **77**: 12193-12202.
- Miller, W.A. & Koev, G. (2000). Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology* **273**: 1-8.
- Miller, W.A., 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**: 1629-1633.
- Mine, A., Hyodo, K., Takeda, A., Kaido, M., Mise, K. & Okuno T. (2010a). Interactions between p27 and p88 replicase proteins of *Red clover necrotic mosaic virus* play an essential role in viral RNA replication and suppression of RNA silencing via the 480-kDa viral replicase complex assembly. *Virology* **407**: 213-224.
- Mine, A., Takeda, A., Taniguchi, T., Taniguchi, H., Kaido, M., Mise, K. & Okuno, T. (2010b). Identification and characterization of the 480-kilodalton template-specific RNA-dependent RNA polymerase complex of *Red clover necrotic mosaic virus*. *J. Virol.* **84**: 6070-6081.
- Mlotshwa S., Pruss, G.J. & Vance, V. (2008). Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends Plant Sci.* **13**: 375-382.

- Mochizuki, T., Hirai, K., Kanda, A., Ohnishi, J., Ohki, T. & Tsuda, S. (2009). Induction of necrosis via mitochondrial targeting of *Melon necrotic spot virus* replication protein p29 by its second transmembrane domain. *Virology* **390**: 239-249.
- Model, K., Meisinger, C. & Kühlbrandt, W. (2008). Cryo-electron microscopy structure of a yeast mitochondrial preprotein translocase. *J. Mol. Biol.* **383**: 1049-1057.
- Módena, N.A., Zelada, A.M., Conte, F. & Mentaberry, A. (2008). Phosphorylation of the TGBp1 movement protein of *Potato virus X* by a *Nicotiana tabacum* CK2-like activity. *Virus Res.* **137**: 16-23.
- 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. USA* **103**: 19593-19598.
- Molinari, P., Marusic, C. Luciola, A., Tavazza, R. & Tavazza, M. (1998). Identification of *Artichoke mottled crinkle virus* (AMCV) proteins required for virus replication: complementation of AMCV p33 and p92 replication-defective mutants. *J. Gen. Virol.* **79**: 639-647.
- Molnár, A., Csorba, T., Lakatos, L., Varallyay, E., Lacomme, C. & Burgyán, J. (2005). Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol.* **79**: 7812-7818.
- Molnár, A., Havelda, Z., Dalmay, T., Szutorisz, H. & Burgyán, J. (1997). Complete nucleotide sequence of *Tobacco necrosis virus* strain DH and genes required for RNA replication and virus movement. *J. Gen. Virol.* **78**: 1235-1239.
- Molnár, A., Melynk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R. & Baulcombe, D.C. (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* **328**: 872-875.
- Monkewich, S., Lin, H.X., Fabian, M.R., Xu, W., Na, H., Ray, D., Chernysheva, O.A., Nagy, P.D. & White, K.A. (2005). The p92 polymerase coding region contains an internal RNA element required at an early step in Tombusvirus genome replication. *J. Virol.* **79**: 4848-4858.
- Moreau, P., Brandizzi, F., Hanton, S., Chatre, L., Melsner, S., Hawes, C., & Satiat-Jeuemaitre, B. (2007). The plant ER-Golgi interface: A highly structured and dynamic membrane complex. *J. Exp. Bot.* **58**: 49-64.
- Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, 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.
- Morgunova, E.Y., Dauter, Z., Stuart, D.I., Stel'Mashchuk, V.Y., Mikhailov, A.M., Wilson, K.S. & Vainshtein, B.K. (1994). The atomic structure of *Carnation mottle virus* capsid protein. *FEBS Lett.* **338**: 267-271.
- Morosov, S.Y. & Solovyev, A.G. (2003). Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *J. Gen. Virol.* **84**: 1351-1366.
- Morozov, S., Ryabov, E., Leiser, R. & Zavriev, S. (1995). Use of highly conserved motifs in plant virus polymerases as the tags for specific detection of carmovirus-related RNA-dependent RNA-polymerase genes. *Virology* **207**: 312-315.
- Morris, T.J. & Carrington, J. (1988). *Carnation mottle virus* and viruses with similar properties. En: Koenig, R. (ed.), *The plant viruses, vol. 3. Polyhedral virions with monopartite RNA genomes*. Plenum Press, New York, pp. 73-112.
- Morris, T.J. (1991). Classification and Nomenclature of Viruses. En: Francki, R., Fauquet, C., Knudson, D. & Brown, F. (eds.). *5<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. *Arch. Virol. Suppl.* **2**, Springer-Verlag, Vienna, pp. 303-305.
- Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacomme, A.M., Nikic, S., Picault, N., Rémoúé, K., Sanial, M., Vo, T.A. & Vaucheret, H. (2000).

- Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**: 533-542.
- Munger, J., Bajad, S.U., Collier, H.A., Shenk, T. & Rabinowitz, J.D. (2006). Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog.* **2**: e132.
- Munger, J., Bennett, B.D., Parikh, A., Feng, X.J., McArdle, J., Rabitz, H.A., Shenk, T. & Rabinowitz, J.D. (2008). Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. *Nat. Biotechnol.* **26**: 1179-1186.
- Mushegian, A.R. & Koonin, E.V. (1993). Cell-to-cell movement of plant viruses. Insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analogies with cellular transport systems. *Arch. Virol.* **133**: 239-257.
- Mushegian, A.R. (1994). The putative movement domain encoded by nepovirus RNA-2 is conserved in all sequenced nepoviruses. *Arch. Virol.* **135**: 437-441.
- Na, H. & White, K.A. (2006). Structure and prevalence of replication silencer-3' terminus RNA interactions in *Tombusviridae*. *Virology* **345**: 305-316.
- Nagy, P.D. & Pogany, J. (2000). Partial purification and characterization of *Cucumber necrosis virus* and *Tomato bushy stunt virus* RNA-dependent RNA polymerases: similarities and differences in template usage between tombusvirus and carmovirus RNA-dependent RNA polymerases. *Virology* **276**: 279-288.
- Nagy, P.D. & Pogany, J. (2006). Yeast as a model host to dissect functions of viral and host factors in tombusvirus replication. *Virology* **344**: 211-220.
- Nagy, P.D. & Pogany, J. (2008). Multiple roles of viral replication proteins in plant RNA virus replication. *Methods Mol. Biol.* **451**: 55-68.
- Nagy, P.D. & Pogany, J. (2010). Global genomics and proteomics approaches to identify host factors as targets to induce resistance against *Tomato bushy stunt virus*. *Adv. Virus Res.* **76**: 123-177.
- Nagy, P.D. & Pogany, J. (2011). The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 137-149.
- Nagy, P.D. (2008). Yeast as a model host to explore plant virus-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**: 217-42.
- Nagy, P.D., Pogany, J. & Simon, A.E. (1999). RNA elements required for RNA recombination function as replication enhancers *in vitro* and *in vivo* in a plus-strand RNA virus. *EMBO J.* **18**: 5653-5665.
- Nagy, P.D., Pogany, J. & Simon, A.E. (2001). *In vivo* and *in vitro* characterization of an RNA replication enhancer in a satellite RNA associated with *Turnip crinkle virus*. *Virology* **288**: 315-324.
- Nam, M., Kim, S.M., Domier, L.L., Koh, S., Moon, J.K., Choi, H.S., Kim, H.G., Moon, J.S. & Lee, S.H. (2009). Nucleotide sequence and genomic organization of a newly identified member of the genus *Carmovirus*, from soybean. *Arch. Virol.* **154**: 1679-1684.
- Nameth, S.T. & Adkins, S.T. (1993). Viral diseases. En: White, J.W. (ed.), *Geraniums IV*, Pennsylvania Flower Growers Inc., pp. 267-275.
- Napoli, C., Lemieux, C. & Jørgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **2**: 279-289.
- Navarro, B., Rubino, L. & Russo, M. (2004). Expression of the *Cymbidium ringspot virus* 33-kilodalton protein in *Saccharomyces cerevisiae* and molecular dissection of the peroxisomal targeting signal. *J. Virol.* **78**: 4744-4752.
- Navarro, J.A., Genovés, A., Climent, J., Saurí, A., Martínez-Gil, L., Mingarro, I. & Pallás, V. (2006). RNA-binding properties and membrane insertion of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) double gene block movement proteins. *Virology* **356**: 57-67.
- Nelson, R.S. & Citovsky, V. (2005). Plant viruses. Invaders of cells and pirates of cellular pathways. *Plant Physiol.* **138**: 1809-1814.

- Neupert, W. & Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 723-749.
- Niehl, A. & Heinlein, M. (2011). Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* **248**: 75-99.
- Noordeen, N.A., Carafoli, F., Hohenester, E., Horton, M.A. & Leitinger, B. (2006). A transmembrane leucine zipper is required for activation of the dimeric receptor tyrosine kinase DDR1. *J. Biol. Chem.* **32**: 22744-22751.
- Norrby, E. (2008). Nobel Prizes and the emerging virus concept. *Arch. Virol.* **153**: 1109-1123.
- Noueiry, A., Lucas, W. & Gilbertson, R. (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* **76**: 925-932.
- Noueiry, A.O. & Ahlquist, P. (2003). *Brome mosaic virus* RNA replication: revealing the role of the host in RNA virus replication. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**: 77-98.
- Nurkiyanova, K.M., Ryabov, E.V., Kalinina, N.O., Fan, Y., Andreev, I., Fitzgerald, A.G., Palukaitis, P. & Taliansky, M. (2001). Umbravirus-encoded movement protein induces tubule formation on the surface of protoplasts and binds RNA incompletely and non-cooperatively. *J. Gen. Virol.* **82**: 2579-2588.
- Offei, S.K., Coffin, R.S. & Coutts, R.H. (1995) The *Tobacco necrosis virus* p7a protein is a nucleic acid-binding protein. *J. Gen. Virol.* **76**: 1493-1496.
- Okamoto, K., Nagano, H., Iwakawa, H., Mizumoto, H., Takeda, A., Kaido, M., Mise, K. & Okuno, T. (2008). *Cis*-preferential requirement of a -1 frameshift product p88 for the replication of *Red clover necrotic mosaic virus* RNA1. *Virology* **375**: 205-212.
- Omarov, R., Sparks, K., Smith, L., Zindovic, J. & Scholthof, H.B. (2006). Biological relevance of a stable biochemical interaction between the tobusvirus-encoded P19 and short interfering RNAs. *J. Virol.* **80**: 3000-3008.
- Omarov, R.T., Ciomperlik, J.J. & Scholthof, H.B. (2007). RNAi-associated ssRNA-specific ribonucleases in Tombusvirus P19 mutant-infected plants and evidence for a discrete siRNA-containing effector complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 1714-1719.
- Opalka, N., Brugidou, Ch., Bonneau, C., Nicole, M., Beachy, R.N., Yeager, M. & Fauquet, C. (1998). Movement of *Rice yellow mottle virus* between xylem cells through pit membranes. *Plant Biology* **95**: 3323-3328.
- Oparka, K.J., Prior, D.A.M., Santa Cruz, S., Padgett, H.S. & Beachy, R.N. (1997). Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of *Tobacco mosaic virus* (TMV). *Plant J.* **12**: 781-789.
- O'Reilly, E.K. & Kao, C.C. (1998). Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* **252**: 287-303.
- O'Reilly, E.K., Paul, J.D. & Kao, C.C. (1997). Analysis of the interaction of viral RNA replication proteins by using the yeast two-hybrid assay. *J. Virol.* **71**: 7526-7532.
- Osman, T.A. & Buck, K.W. (1991). Detection of the movement protein of *Red clover necrotic mosaic virus* in a cell wall fraction from infected *Nicotiana clevelandii* plants. *J. Gen. Virol.* **72**: 2853-2856.
- Osman, T.A. & Buck, K.W. (1996). Complete replication *in vitro* of *Tobacco mosaic virus* RNA by a template-dependent, membrane-bound RNA polymerase. *J. Virol.* **70**: 6227-6234.
- Osman, T.A., Hayes, R.J. & Buck, K.W. (1992). Cooperative binding of the *Red clover necrotic mosaic virus* movement protein to single-stranded nucleic acids. *J. Gen. Virol.* **73**: 223-227.
- Osman, T.A., Ingles, P.J., Miller, S.J. & Buck, K.W. (1991). A spontaneous *Red clover necrotic mosaic virus* mutant with a truncated movement protein. *J. Gen. Virol.* **72**: 1793-1800.

- Osman, T.A., Thommes, P. & Buck, K.W. (1993). Localization of a single-stranded RNA-binding domain in the movement protein of *Red clover necrotic mosaic dianthovirus*. *J. Gen. Virol.* **74**: 2453-2457.
- Oster, S.K., Wu, B. & White, K.A. (1998). Uncoupled expression of p33 and p92 permits amplification of *Tomato bushy stunt virus* RNAs. *J. Virol.* **72**: 5845-5851.
- Otera, H., Taira, Y., Horie, C., Suzuki, Y., Suzuki, H., Setoguchi, K., Kato, H., Oka, T. & Mihara, K. (2007). A novel insertion pathway of mitochondrial outer membrane proteins with multiple transmembrane segments. *J. Cell Biol.* **179**: 1355-1363.
- Pagano, M., Clynes, M.A., Masada, N., Ciruela, A., Ayling, L.J., Wachten, S. & Cooper, D.M. (2009). Insights into the residence in lipid rafts of adenylyl cyclase AC8 and its regulation by capacitative calcium entry. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**: C607-C619.
- Paludan, N. & Begtrup, J. (1987). *Pelargonium flower break virus* and *Tomato ringspot virus*: infection trials, symptomatology and diagnosis. *Danish J. Plant Soil Sci.* **91**: 183-194.
- Palukaitis, P., Rezaian, A. & García-Arenal, F. (2008). Satellite RNAs, satellite DNAs, and satellite viruses. *Encyclopedia of Virology, Vol. 4*, pp. 526-534.
- Panavas, T. & Nagy P.D. (2005). Mechanism of stimulation of plus-strand synthesis by an RNA replication enhancer in a tombusvirus. *J. Virol.* **79**: 9777-9785.
- Panavas, T. & Nagy, P.D. (2003a). The RNA replication enhancer element of tombusviruses contains two interchangeable hairpins that are functional during plus-strand synthesis. *J. Virol.* **77**: 258-269.
- Panavas, T. & Nagy, P.D. (2003b). Yeast as a model host to study replication and recombination of defective interfering RNA of *Tomato bushy stunt virus*. *Virology* **314**: 315-325.
- Panavas, T., Hawkins, C.M., Panaviene, Z. & Nagy, P.D. (2005a). The role of the p33:p33/p92 interaction domain in RNA replication and intracellular localization of p33 and p92 proteins of *Cucumber necrosis tombusvirus*. *Virology* **338**: 81-95.
- Panavas, T., Pogany, J. & Nagy P.D. (2002a). Analysis of minimal promoter sequences for plus-strand synthesis by the *Cucumber necrosis virus* RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **296**: 263-274.
- Panavas, T., Pogany, J. & Nagy, P.D. (2002b). Internal initiation by the *Cucumber mosaic virus* RNA-dependent RNA polymerase is facilitated by promoter-like sequences. *Virology* **296**: 275-287.
- Panavas, T., Serviène, E., Brasher, J. & Nagy, P.D. (2005b). Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 7326-7331.
- Panaviene, Z., Baker, J.M. & Nagy, P.D. (2003). The overlapping RNA-binding domains of p33 and p92 replicase proteins are essential for tombusvirus replication. *Virology* **308**: 191-205.
- Panaviene, Z., Panavas, T. & Nagy, P.D. (2005). Role of an internal and two 3'-terminal RNA elements in assembly of tombusvirus replicase. *J. Virol.* **79**: 10608-10618.
- Panaviene, Z., Panavas, T., Serva, S. & Nagy, P.D. (2004). Purification of the *Cucumber necrosis virus* replicase from yeast cells: role of coexpressed viral RNA in stimulation of replicase activity. *J. Virol.* **78**: 8254-8263.
- Pantaleo, V. (2011). Plant RNA silencing in viral defence. *Adv. Exp. Med. Biol.* **722**: 39-58.
- Pantaleo, V., Grieco, F., Castellano, M.A. & Martelli, G.P. (1999). Synthesis of infectious transcripts of *Olive latent virus 1*: genes required for RNA replication and virus movement. *Arch. Virol.* **144**: 1071-1079.
- Pantaleo, V., Rubino, L. & Russo, M. (2003). Replication of *Carnation Italian ringspot virus* defective interfering RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* **77**: 2116-23.
- Pantaleo, V., Rubino, L. & Russo, M. (2004). The p36 and p95 replicase proteins of *Carnation Italian ringspot virus* cooperate in stabilizing defective interfering RNA. *J. Gen. Virol.* **85**: 2429-2433.

- Park, C.Y., Jun, H.J., Wakita, T., Cheong, J.H. & Hwang, S.B. (2009). Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *J. Biol. Chem.* **284**: 9237-9246.
- Pascal, E., Sanderfoot, A.A., Ward, B.M., Medville, R., Turgeon, R. & Lazarowitz, S.G. (1994). The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *Plant Cell* **6**: 995-1006.
- Paschen, S.A., Neupert, W. & Rapaport, D. (2005). Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 575-582.
- Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V., Hemmer, O., Kretsch, T., Richards, K.E., Genschik, P. & Ziegler-Graff, V. (2006). F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 1994-1999.
- Pelczyk, M., Obrepalska-Stepłowska, A. & Pospieszny, H. (2006). Subviral molecules of RNA associated with plant ss(+)RNA viruses. *Postepy Biochem.* **52**: 212-221.
- Pennazio, S. & Conti, M. (2002). The origin of modern plant virology. *New Microbiol.* **25**: 499-518.
- Perbal, M.C., Thomas, C.L. & Maule, A.J. (1993). Cauliflower mosaic virus gene I product (P1) forms tubular structures which extend from the surface of infected protoplasts. *Virology* **195**: 281-285.
- Peremyslov, V.V., Pan, Y.W. & Dolja, V.V. (2004). Movement protein of a closterovirus is a type III integral transmembrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **78**: 3704-3709.
- Petty, I.T. & Jackson, A.O. (1990). Mutational analysis of Barley stripe mosaic virus RNA beta. *Virology* **179**: 712-718.
- Pfanner, N., Wiedemann, N., Meisinger, C. & Lithgow, T. (2004). Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**: 1044-1048.
- Pickford, A.S., Catalanotto, C., Cogoni, C. & Macino, G. (2002). Quelling in *Neurospora crassa*. *Adv. Genet.* **46**: 277-303.
- Pierini, R., Cottam, E., Roberts, R. & Wileman, T. (2009). Modulation of membrane traffic between endoplasmic reticulum, ERGIC and Golgi to generate compartments for the replication of bacteria and viruses. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**: 828-833.
- Pogany, J., Fabian, M.R., White, K.A. & Nagy, P.D. (2003). A replication silencer element in a plus-strand RNA virus. *EMBO J.* **22**: 5602-5611.
- Pogany, J., White, K.A. & Nagy, P.D. (2005). Specific binding of tombusvirus replication protein p33 to an internal replication element in the viral RNA is essential for replication. *J. Virol.* **79**: 4859-4869.
- Pollard, T.D. & Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**: 1208-1212.
- Pouwels, C., Carette, J.E., van Lent, J. & Wellink, J. (2002). Cowpea mosaic virus: Effects on host cell processes. *Mol. Plant. Pathol.* **3**: 411-418.
- Powers, J.G., Sit, T.L., Heinsohn, C., George, C.G., Kim, K.H. & Lommel, S.A. (2008a). The Red clover necrotic mosaic virus RNA-2 encoded movement protein is a second suppressor of RNA silencing. *Virology* **381**: 277-286.
- Powers, J.G., Sit, T.L., Qu, F., Morris, T.J., Kim, K.H. & Lommel, S.A. (2008b). A versatile assay for the identification of RNA silencing suppressors based on complementation of viral movement. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**: 879-890.
- Prod'homme, D., Le-Panse, S., Drugeon, G. & Jupin, I. (2001). Detection and subcellular localization of the Turnip yellow mosaic virus 66K replication protein in infected cells. *Virology* **281**: 88-101.
- Prod'homme, D., Jakubic, A., Tournier, V., Drugeon, G. & Jupin, I. (2003). Targeting of the Turnip yellow mosaic virus 66K replication protein to the chloroplast envelope is mediated by the 140K protein. *J. Virol.* **77**: 9124-9135.

- Prokhnevsky, A.I., Peremyslov, V.V., Napuli, A.J. & Dolja, V.V.** (2002). Interaction between long-distance transport factor and Hsp70-related movement protein of *Beet yellows virus*. *J. Virol.* **76**: 11003-11011.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C. & Vance, V.B.** (1997). Synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**: 859-868.
- Qi, X., Bao, F.S. & Xie, Z.** (2009). Small RNA deep sequencing reveals role for *Arabidopsis thaliana* RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. *PLoS One* **4**: e4971.
- Qi, Y., Denli, A.M. & Hannon, G.J.** (2005). Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. *Mol. Cell* **19**: 421-428.
- Qi, Y., Zhong, X., Itaya, A. & Ding, B.** (2004). Dissecting RNA silencing in protoplasts uncovers novel effects of viral suppressors on the silencing pathway at the cellular level. *Nucleic Acids Res.* **32**: e179.
- Qiu, W., Park, J.W. & Scholthof, H.B.** (2002). Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 269-280.
- Qu, F. & Morris, T.J.** (2002). Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by *Tomato bushy stunt virus* is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 193-202.
- Qu, F., Ren, T. & Morris, T.J.** (2003). The coat protein of *Turnip crinkle virus* suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J. Virol.* **77**: 511-522.
- Qu, F., Ye, X. & Morris, T.J.** (2008). Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 14732-14737.
- Quadt, R., Kao, C.C., Browning, K.S., Hershberger, R.P. & Ahlquist, P.** (1993). Characterization of a host protein associated with *Brome mosaic virus* RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1498-1502.
- Radtke, K., Döhner, K. & Sodeik, B.** (2006). Viral interactions with the cytoskeleton: A hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol.* **8**: 387-400.
- Rajendran, K.S. & Nagy, P.D.** (2003). Characterization of the RNA-binding domains in the replicase proteins of *Tomato bushy stunt virus*. *J. Virol.* **77**: 9244-9258.
- Rajendran, K.S. & Nagy, P.D.** (2004). Interaction between the replicase proteins of *Tomato bushy stunt virus* *in vitro* and *in vivo*. *Virology* **326**: 250-261.
- Rajendran, K.S., Pogany, J. & Nagy, P.D.** (2002). Comparison of *Turnip crinkle virus* RNA-dependent RNA polymerase preparations expressed in *Escherichia coli* or derived from infected plants. *J. Virol.* **76**: 1707-1717.
- Rana, T.M.** (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**: 23-36.
- Rashid, U.J., Hoffmann, J., Brutschy, B., Piehler, J. & Chen, J. C.H.** (2008). Multiple targets for suppression of RNA interference by *Tomato aspermy virus* protein 2B. *Biochemistry* **47**: 12655-12657.
- Ray, D. & White, K.A.** (1999). Enhancer-like properties of an RNA element that modulates tombusvirus RNA accumulation. *Virology* **256**: 162-171.
- Reed, J.C., Kasschau, K.D., Prokhnevsky, A.I., Gopinath, K., Pogue, G.P., Carrington, J.C. & Dolja, V.V.** (2003). Suppressor of RNA silencing encoded by *Beet yellows virus*. *Virology* **306**: 203-209.
- Reichel, C. & Beachy, R.N.** (1998). *Tobacco mosaic virus* infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 11169-11174.



- Restrepo-Hartwig, M. & Ahlquist, P.** (1999). *Brome mosaic virus* RNA replication proteins 1a and 2a colocalize and 1a independently localizes on the yeast endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **73**: 10303-10309.
- Richmond, K.E., Chenault, K., Sherwood, J.L. & German, T.L.** (1998). Characterization of the nucleic acid binding properties of *Tomato spotted wilt virus* nucleocapsid protein. *Virology* **248**: 6-11.
- Rico, P. & Hernández, C.** (2004). Complete nucleotide sequence and genome organization of *Pelargonium flower break virus*. *Arch. Virol.* **149**: 641-651.
- Rico, P. & Hernández, C.** (2006). Infectivity of *in vitro* transcripts from a full length cDNA clone of *Pelargonium flower break virus* in an experimental and a natural host. *J. Plant Pathol.* **88**: 103-106.
- Rico, P. & Hernández, C.** (2009). Characterization of the subgenomic RNAs produced by *Pelargonium flower break virus*: Identification of two novel RNAs species. *Virus Res.* **142**: 100-107.
- Rico, P., Ivars, M.P., Elena, S.F. & Hernández, C.** (2006). Insights into the selective pressures restricting *Pelargonium flower break virus*. *J. Virol.* **80**: 8124-8132.
- Riviere, C. & Rochon, D.** (1990). Nucleotide sequence and genomic organization of *Melon necrotic spot virus*. *J. Gen. Virol.* **71**: 1887-1896.
- Roberts, I.M., Boevink, P., Roberts, A.G., Sauer, N., Reichel, C. & Oparka, K.J.** (2001). Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink-source transition in tobacco leaves. *Protoplasma* **218**: 31-44.
- Roberts, I.M., Wang, D., Findlay, K. & Maule A.J.** (1998). Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* **245**: 173-181.
- Robertson, N.L., Côté, F., Paré, C., Leblanc, E., Bergeron, M.G. & Leclerc, D.** (2007). Complete nucleotide sequence of *Nootka lupine vein-clearing virus*. *Virus Genes* **35**: 807-814.
- Rochon, D., Lommel, S., Martelli, G.P., Rubino, L. & Russo, M.** (2011). Family *Tombusviridae*. En: 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., pp. 1111-1138.
- Rochon, D.M., Johnston, J.C. & Riviere, C.J.** (1991). Molecular analysis of the *Cucumber necrosis virus* genome. *Canadian Journal of Plant Pathology* **13**: 142-154.
- Rohl, C.A., Strauss, C.E., Chivian, D. & Baker, D.** (2004). Modeling structurally variable regions in homologous proteins with Rosetta. *Proteins* **55**: 656-577.
- Rojas, M.R., Noueir, A.O., Lucas, W.J. & Gilbertson, R.L.** (1998). Bean Dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell* **95**: 105-113.
- Roth, B.M., Pruss, G.J. & Vance V.B.** (2004). Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res.* **102**: 97-108.
- Rouleau, M., Smith, R.J., Bancroft, J.B. & Mackie, G.A.** (1994). Purification, properties, and subcellular localization of *Foxtail mosaic potyvirus* 26-kDa protein. *Virology* **204**: 254-265.
- Roux, L.** (2008). Defective interfering viruses. *Encyclopedia of Virology, Vol. 2*, pp. 1-4.
- Rubino, L. & Russo, M.** (1997). Molecular analysis of the *Pothos latent virus* genome. *J. Gen. Virol.* **78**: 1219-1226.
- Rubino, L., Di Franco, A. & Russo, M.** (2000). Expression of a plant virus non-structural protein in *Saccharomyces cerevisiae* causes membrane proliferation and altered mitochondrial morphology. *J. Gen. Virol.* **81**: 279-286.
- Rubino, L., Navarro, B. & Russo, M.** (2007). *Cymbidium ringspot virus* defective interfering RNA replication in yeast cells occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes in the absence of peroxisomes. *J. Gen. Virol.* **88**: 1634-1642.

- Rubino, L., Weber-Lotfi, F., Dietrich, A., Stussi-Garaud, C. & Russo, M. (2001). The open reading frame 1-encoded ("36 K") protein of *Carnation Italian ringspot virus* localizes to mitochondria. *J. Gen. Virol.* **82**: 29-34.
- Ruiz-Ferrer, V. & Voinnet, O. (2009). Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 485-510.
- Russo, M. & Martelli, G.P. (1982). Ultrastructure of *Turnip crinkle-* and *Saguaro cactus virus* infected tissues. *Virology* **118**: 109-116.
- Russo, M., Burgyán, J. & Martelli, G.P. (1994). Molecular biology of toombusviridae. *Adv. Virus Res.* **44**: 381-428.
- Russo, M., Di Franco, A. & Martelli, G.P. (1983). The fine structure of *Cymbidium ringspot virus* infection in host tissues. III. Role of peroxisomes in the genesis of multivesicular bodies. *J. Ultrastruct. Res.* **82**: 52-63.
- Ryabov, E.V., Kim, S.H. & Taliansky, M. (2004). Identification of a nuclear localization signal and nuclear export signal of the umbraviral long-distance RNA movement protein. *J. Gen. Virol.* **85**: 1329-1333.
- Sáenz, P., Salvador, B., Simón-Mateo, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. & García, J.A. (2002). Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. *J. Virol.* **76**: 1922-1931.
- Saitoh, T., Igura, M., Obita, T., Ose, T., Kojima, R., Maenaka, K., Endo, T. & Kohda, D. (2007). Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *EMBO J.* **26**: 4777-4787.
- Saldarelli, P., Minafra, A., Castellano, M.A. & Martelli, G.P. (2000). Immunodetection and subcellular localization of the proteins encoded by ORF 3 of *Grapevine viruses A* and *B*. *Arch. Virol.* **145**: 1535-1542.
- Salonen, A., Ahola, T. & Kääriäinen, L. (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **285**: 139-173.
- Sambade, A., Brandner, K., Hofmann, C., Seemanpillai, M., Mutterer, J. & Heinlein, M. (2008). Transport of TMV movement protein particles associated with the targeting of RNA to plasmodesmata. *Traffic* **9**: 2073-2088.
- Samuels, T.D., Ju, H.J., Ye, C.M., Motes, C.M., Blancaflor, E.B. & Verchot-Lubicz, J. (2007). Subcellular targeting and interactions among the *Potato virus X* TGB proteins. *Virology* **367**: 375-389.
- Sánchez, V. & Dong, J.J. (2010). Alteration of lipid metabolism in cells infected with human cytomegalovirus. *Virology* **404**: 71-77.
- Sasvari, Z. & Nagy, P.D. (2010). Making of viral replication organelles by remodeling interior membranes. *Viruses* **2**: 2436-2442.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Boyko, V.P., Albiach-Marti, M.R., Mawassi, M., Navas-Castillo, J., Karasev, A.V., Dolja, V., Hilf, M.E., Lewandowski, D.J., Moreno, P., Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M. & Dawson, W.O. (1999). An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 7433-7438.
- Sauri, A., Saksena, S., Salgado, J., Jhonson, A.E. & Mingarro, I. (2005). Double-spanning plant viral movement protein integration into the endoplasmic reticulum membrane is signal recognition particle-dependent, translocon-mediated, and concerted. *J. Biol. Chem.* **280**: 25907-25912.
- Schaad, M.C., Lellis, A.D. & Carrington, J.C. (1997). VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J. Virol.* **71**: 8624-8631.
- Schepetilnikov, M.V., Manske, U., Solovyev, A.G., Zamyatnin A.A. Jr., Schiemann, J. & Morozov, S.Y. (2005). The hydrophobic segment of *Potato virus X* TGBp3 is a major determinant of the protein intracellular trafficking. *J. Gen. Virol.* **86**: 2379-2391.

- Schepetilnikov, M.V., Solovyev, A.G., Gorshkova, E.N., Schiemann, J., Prokhnevsky, A.I., Dolja, V.V. & Morozov, S.Y. (2008). Intracellular targeting of a hordeiviral membrane-spanning movement protein: Sequence requirements and involvement of an unconventional mechanism. *J. Virol.* **82**: 1284-1293.
- Schoelz, J.E., Harries, P.A. & Nelson, R.S. (2011). Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Mol. Plant* **4**: 813-831.
- Scholthof, H.B. (2006). The Tombusvirus-encoded P19: from irrelevance to elegance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 405-411.
- Scholthof, H.B., Alvarado, V.Y., Vega-Arreguin, J.C., Ciomperlik, J., Odokonyero, D., Brosseau, C., Jaubert, M., Zamora, A. & Moffett, P. (2011). Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* **156**: 1548-1555.
- Scholthof, H.B., Scholthof, K.B.G., Kikkert, M. & Jackson A.O. (1995a). *Tomato bushy stunt virus* spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology* **213**: 425-438.
- Scholthof, K.B., Scholthof, H.B. & Jackson, A.O. (1995b). The *Tomato bushy stunt virus* replicase proteins are coordinately expressed and membrane associated. *Virology* **208**: 365-369.
- Schoumacher, F., Giovane, C., Maira, M., Poirson, A., Godefroy-Colburn, T. & Berna, A. (1994). Mapping of the RNA-binding domain of the *Alfalfa mosaic virus* movement protein. *J. Gen. Virol.* **75**: 3199-3202.
- Schwach, F., Vaistij, F.E., Jones, L. & Baulcombe, D.C. (2005). An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by *Potato virus X* and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol.* **138**: 1842-1852.
- Schwartz, M., Chen, J., Janda, M., Sullivan, M., den Boon, J. & Ahlquist, P. (2002). A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol. Cell.* **9**: 505-514.
- Schwer, B., Ren, S., Pietschmann, T., Kartenbeck, J., Kaehlcke, K., Bartenschlager, R., Yen, T.S.B. & Ott, M. (2004). Targeting of *Hepatitis C virus* core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *J. Virol.* **78**: 7958-7968.
- Setoguchi, K., Otera, H. & Mihara, K. (2006). Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO J.* **25**: 5635-5647.
- Shen, M., Xu, Y., Jia, R., Zhou, X. & Ye, K. (2010). Size-independent and noncooperative recognition of dsRNA by the *Rice stripe virus* RNA silencing suppressor NS3. *J. Mol. Biol.* **404**: 665-679.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H. & Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**: 465-476.
- Silhavy, D. & Burgyán, J. (2004). Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci.* **9**: 76-83.
- Silhavy, D., Molnár, A., Luciola, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M. & Burgyán, J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* **21**: 3070-3080.
- Simon, A.E. & Howell, S.H. (1986). The virulent satellite RNA of *Turnip crinkle virus* has a major domain homologous to the 3' end of the helper virus genome. *EMBO J.* **5**: 3423-3428.
- Simon, A.E., Roossinck, M.J. & Havelda, Z. (2004). Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 415-437.
- Sivakumaran, K., Kim, C.H., Tayon, R. Jr. & Kao, C.C. (1999). RNA sequence and secondary structural determinants in a minimal viral promoter that directs replicase recognition and initiation of genomic plus-strand RNA synthesis. *J. Mol. Biol.* **294**: 667-682.
- Skotnicki, M.L., Mackenzie, A.M., Torronen, M. & Gibbs, A.J. (1993). The genomic sequence of *Cardamine chlorotic fleck carmovirus*. *J. Gen. Virol.* **74**: 1933-1937.

- Soellick, T.R., Uhrig, J.F., Bucher, G.L., Kellmann, J.W. & Schreier, P.H. (2000). The movement protein NSm of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 2373-2378.
- Sokolova, M., Pruffer, D., Tacke, E. & Rohde, W. (1997). The *Potato leafroll virus* 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Lett.* **400**: 201-205.
- Song, C. & Simon, A.E. (1995). Requirement of a 3'-terminal stem-loop in *in vitro* transcription by an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **254**: 6-14.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. & Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* **305**: 1434-1437.
- Sorger, P.K., Stockley, P.G. & Harrison, S.C. (1986). Structure and assembly of *Turnip crinkle virus*. II. Mechanism of reassembly *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **191**: 639-658.
- Spuul, P., Salonen, A., Merits, A., Jokitalo, E., Kääriäinen, L. & Ahola, T. (2007). Role of the amphipathic peptide of *Semliki forest virus* replicase protein nsP1 in membrane association and virus replication. *J. Virol.* **81**: 872-883.
- Sriskanda, V.S., Pruss, G., Ge, X. & Vance, V.B. (1996). An eight-nucleotide sequence in the *Potato virus X* 3' untranslated region is required for both host protein binding and viral multiplication. *J. Virol.* **70**: 5266-5271.
- Stapleford, K.A. & Miller, D.J. (2010). Role of cellular lipids in positive-sense RNA virus replication complex assembly and function. *Viruses* **2**: 1055-1068.
- Stapleford, K.A., Rapaport, D. & Miller, D.J. (2009). Mitochondrion-enriched anionic phospholipids facilitate *Flock house virus* RNA polymerase membrane association. *J. Virol.* **83**: 4498-4507.
- Stojanovski, D., Guiard, B., Kozjak-Pavlovic, V., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2007). Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of  $\alpha$ -helical TOM proteins. *J. Cell Biol.* **179**: 881-893.
- Stojanovski, D., Müller, J.M., Milenkovic, D., Guiard, B., Pfanner, N. & Chacinska, A. (2008). The MIA system for protein import into the mitochondrial intermembrane space. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**: 610-617.
- Stone, O.M. & Hollings, M. (1973). Some properties of *Pelargonium flower break virus*. *Ann. Appl. Biol.* **75**: 15-23.
- Stone, O.M. (1974). *Pelargonium flower break virus*. *CMI/AAB Description of Plant Viruses*, N° 130.
- Stone, O.M. (1980). Nine viruses isolated from *Pelargonium* in United Kingdom. *Acta Hort.* **110**: 177-182.
- Stork, J., Kovalev, N., Sasvari, Z. & Nagy, P.D. (2011). RNA chaperone activity of the tombusviral p33 replication protein facilitates initiation of RNA synthesis by the viral RdRp *in vitro*. *Virology* **409**: 338-347.
- Stork, J., Panaviene, Z. & Nagy, P.D. (2005). Inhibition of *in vitro* RNA binding and replicase activity by phosphorylation of the p33 replication protein of *Cucumber necrosis tombusvirus*. *Virology* **343**: 79-92.
- Strauss, J.H. & Strauss, E.G. (1999). Viral RNA replication. With a little help from the host. *Science* **283**: 802-804.
- Stupina, V. & Simon, A.E. (1997). Analysis *in vivo* of *Turnip crinkle virus* satellite RNA C variants with mutations in the 3'-terminal minus-strand promoter. *Virology* **238**: 470-477.
- Stupina, V.A., Meskauskas, A., McCormack, J.C., Yingling, Y.G., Shapiro, B.A., Dinman, J.D. & Simon, A.E. (2008). The 3' proximal translational enhancer of *Turnip crinkle virus* binds to 60S ribosomal subunits. *RNA* **14**: 2379-2393.

- Su, S., Liu, Z., Chen, C., Zhang, Y., Wang, X., Zhu, L., Miao, L., Wang, X.C. & Yuan, M. (2010). *Cucumber mosaic virus* movement protein severs actin filaments to increase the plasmodesmal size exclusion limit in tobacco. *Plant Cell* **22**: 1373-1387.
- Suzuki, M., Yoshida, M., Yoshinuma, T. & Hibi, T. (2003). Interaction of replicase components between *Cucumber mosaic virus* and *Peanut stunt virus*. *J. Gen. Virol.* **84**: 1931-1939.
- Suzuki, S., Hase, S., Takahashi, H. & Ikegami, M. (2002). The genome organization of *Pea stem necrosis virus* and its assignment to the genus *Carmovirus*. *Intervirology* **45**: 160-163.
- Szittiya, G., Molnár, A., Silhavy, D., Hornyik, C. & Burgyán, J. (2002). Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted by trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell* **14**: 359-372.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S. & Okuno, T. (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Lett.* **532**: 75-79.
- Takeda, A., Tsukuda, M., Mizumoto, H., Okamoto, K., Kaido, M., Mise, K. & Okuno, T. (2005). A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO J.* **24**: 3147-3157.
- Takemoto, Y. & Hibi, T. (2005). Self-interaction of ORF II protein through the leucine zipper is essential for *Soybean chlorotic mottle virus* infectivity. *Virology* **332**: 199-205.
- Takemoto, Y., Kanehira, T., Shinoraha, M., Yamashita, S. & Hibi, T. (2000). The nucleotide sequence and genome organization of *Japanese iris necrotic ring virus*, a new species in the genus *Carmovirus*. *Arch. Virol.* **145**: 651-657.
- Taliansky, M.E. & Robinson, D.J. (2003). Molecular biology of umbraviruses: Phantom warriors. *J. Gen. Virol.* **84**: 1951-1960.
- Tamai, A. & Meshi, T. (2001). Cell-to-cell movement of *Potato virus X*: The role of p12 and p8 encoded by the second and third open reading frames of the triple gene block. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 1158-1167.
- Tao, Y.J. & Ye, Q. (2010). RNA virus replication complexes. *PLoS Pathog.* **6**: e1000943.
- Tau, R. & Frankel, A.D. (1995). Structural variety of arginine-rich RNA peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 5282-5286.
- Tau, R., Chen, L., Buettner, J.A., Hudson, D. & Frankel, A.D. (1993). RNA recognition by an isolated alpha helix. *Cell* **73**: 1031-1040.
- Te, J., Melcher, U., Howard, A. & Verchot-Lubicz, J. (2005). *Soilborne wheat mosaic virus* (SBWMV) 19K protein belongs to a class of cysteine rich proteins that suppress RNA silencing. *Virol. J.* **2**: 18.
- Tellinghuisen, T.L. & Rice, C.M. (2002). Interaction between *Hepatitis C virus* proteins and host cell factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 419-427.
- Thivierge, K., Nicaise, V., Dufresne, P.J., Cotton, S., Laliberté, J.F., Le Gall, O. & Fortin, M.G. (2005). Plant virus RNAs. Coordinated recruitment of conserved host functions by (+) ssRNA viruses during early infection events. *Plant Physiol.* **138**: 1822-1827.
- Thomas, C.L. & Maule, A.J. (1995). Identification of the *Cauliflower mosaic virus* movement protein RNA binding domain. *Virology* **206**: 1145-1149.
- Thomas, C.L., Leh, V., Lederer, C. & Maule, A.J. (2003). *Turnip crinkle virus* coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* **306**: 33-41.
- Tilsner, J., Amari, K. & Torrance, L. (2011). Plasmodesmata viewed as specialised membrane adhesion sites. *Protoplasma* **248**: 39-60.
- Tilsner, J., Cowan, G.H., Roberts, A.G., Chapman, S.N., Ziegler, A., Savenkov, E. & Torrance, L. (2010). Plasmodesmal targeting and intercellular movement of *Potato mop-top pomovirus* is mediated by a membrane anchored tyrosine-based motif on the luminal side of the endoplasmic

- reticulum and the C-terminal transmembrane domain in the TGB3 movement protein. *Virology* **402**: 41-51.
- Tomari, Y. & Zamore, P.D.** (2005). Perspective machines for RNAi. *Genes Dev.* **19**: 517-529.
- Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Akbergenov, R., Oakeley, E.J., Veluthambi, K., Hohn, T. & Pooggin, M.M.** (2005). Suppression of silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J. Virol.* **79**: 2517-2527.
- Truniger, V., Nieto, C., González-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**: 716-727.
- Trutnyeva, K., Bachmaier, R. & Waigmann, E.** (2005). Mimicking carboxyterminal phosphorylation differentially effects subcellular distribution and cell-to-cell movement of *Tobacco mosaic virus* movement protein. *Virology* **332**: 563-577.
- Turina, M., Desvoyes, B. & Scholthof, K.B.** (2000). A gene cluster encoded by *Panicum mosaic virus* is associated with virus movement. *Virology* **266**: 120-128.
- Turner, K.A., Sit, T.L., Callaway, A.S., Allen, N.S. & Lommel, S.A.** (2004). *Red clover necrotic mosaic virus* replication proteins accumulate at the endoplasmic reticulum. *Virology* **320**: 276-290.
- Ueki, S. & Citovsky, V.** (2011). To gate, or not to gate: regulatory mechanisms for intercellular protein transport and virus movement in plants. *Mol. Plant* **4**:782-793.
- Ushiyama, R. & Matthews, R.E.** (1970). The significance of chloroplast abnormalities associated with infection by *Turnip yellow mosaic virus*. *Virology* **42**: 293-303.
- Uversky, V.N.** (2002). Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci.* **11**: 739-756.
- Vaistij, F.E., Jones, L., & Baulcombe, D.C.** (2002). Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* **14**: 857-867.
- Valli, A., Dujovny, G. & García, J.A.** (2008). Protease activity, self-interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor P1b from *Cucumber vein yellowing ipomovirus*. *J. Virol.* **82**: 974-986.
- van der Heijden, M.W., Carette, J.E., Reinhoud, P.J., Haegi, A. & Bol, J.F.** (2001). *Alfalfa mosaic virus* replicase proteins P1 and P2 interact and colocalize at the vacuolar membrane. *J. Virol.* **75**: 1879-1887.
- van der Wel, N.N., Goldbach, R.W. & van Lent, J.W.** (1998). The movement protein and coat protein of *Alfalfa mosaic virus* accumulate in structurally modified plasmodesmata. *Virology* **244**: 322-329.
- van Lent, J., Storms, M., van der Meer, F., Wellink, J. & Goldbach, R.** (1991). Tubular structures involved in movement of *Cowpea mosaic virus* are also formed in infected cowpea protoplasts. *J. Gen. Virol.* **72**: 2615-2623.
- van Meer, G., Voelker, D.R. & Feigenson, G.W.** (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 112-124.
- van Regenmortel, M.H. & Mahy, B.W.** (2004). Emerging issues in virus taxonomy. *Emerg. Infect. Dis.* **10**: 8-13.
- Vanyushin, B.F. & Ashapkin, V.V.** (2011). DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta* **1809**: 360-368.
- Vaquero, C., Liao, Y.C. & Fischer, R.** (1998). Nonradioactive UV cross-linking assay for the study of protein-RNA binding. *Biotechniques* **68**: 70-71.
- Vaquero, C., Liao, Y.C., Nähring, J. & Fischer, R.** (1997). Mapping of the RNA-binding domain of the *Cucumber mosaic virus* movement protein. *J. Gen. Virol.* **78**: 2095-2099.

- Várallyay, E., Válóczy, A., Agyi, A., Burgyán, J. & Havelda, Z. (2010). Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO J.* **29**: 3507-3519.
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyán, J. & Tanaka, Hall, T.M. (2003). Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* **115**: 799-811.
- Vaucheret, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* **20**: 759-771.
- Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci.* **13**: 350-358.
- Vaucheret, H., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Mourrain, P., Palauqui, J.C. & Vernhettes, S. (1998). Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J.* **16**: 651-659.
- Verchot, J., Driskel, B.A., Zhu, Y., Hunger, R.M. & Littlefield, L.J. (2001). Evidence that *Soilborne wheat mosaic virus* moves long distance through the xylem in wheat. *Protoplasma* **218**: 57-66.
- Verchot-Lubicz, J. (2005). A new cell-to-cell transport model for Potexviruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**: 283-290.
- Verchot-Lubicz, J., Torrance, L., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y., Jackson, A.O. & Gilmer, D. (2010). Varied movement strategies employed by triple gene block-encoding viruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**: 1231-1247.
- Vilar, M., Esteve, V., Pallás, V., Marcos, J.F. & Pérez-Payá, E. (2001). Structural properties of *Carnation mottle virus* p7 movement protein and its RNA-binding domain. *J. Biol. Chem.* **276**: 18122-18129.
- Vilar, M., Saurí, A., Marcos, J.F., Mingarro, I. & Pérez-Payá, E. (2005). Transient structural ordering of the RNA-binding domain of *Carnation mottle virus* p7 movement protein modulates nucleic acid binding. *Chembiochem.* **6**: 1391-1396.
- Vilar, M., Saurí, A., Monné, M., Marcos, J.F., von Heijne, G., Pérez-Payá, E. & Mingarro, I. (2002). Insertion and topology of a plant viral movement protein in the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **277**: 23447-23452.
- Vives, M.C., 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.
- Vlot, A.C., Laros, S.M. & Bol, J.F. (2003). Coordinate replication of *Alfalfa mosaic virus* RNAs 1 and 2 involves *cis*- and *trans*-acting functions of the encoded helicase-like and polymerase-like domains. *J. Virol.* **77**: 10790-10798.
- Vogler, H., Akbergenov, R., Shivaprasad, P.V., Dang, V., Fasler, M., Kwon, M.O., Zhanybekova, S., Hohn, T. & Heinlein, M. (2007). Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by tobamovirus replicase protein. *J. Virol.* **81**: 10379-10388.
- Voynet, O. & Baulcombe, D.C. (1997). Systemic signaling in gene silencing. *Nature* **389**: 553.
- Voynet, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* **17**: 449-459.
- Voynet, O. (2005a). Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Lett.* **579**: 5858-5871.
- Voynet, O. (2005b). Induction and suppression of RNA silencing: Insights from viral infections. *Nature Rev. Genet.* **6**: 206-220.
- Voynet, O. (2008). Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 464-470.
- Voynet, O., Lederer, C. & Baulcombe, D.C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene-silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**: 157-167.
- Voynet, O., Pinto, Y.M. & Baulcombe, D.C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14147-14152.

- Vuorinen, A.L., Kelloniemi, J. & Valkonen, J.P. (2011). Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? *Plant Sci.* **181**: 355-363.
- Wada, Y., Tanaka, H., Yamashita, E., Kubo, C., Ichiki-Uehara, T., Nakazono-Nagaoka, E., Omura, T. & Tsukihara, T. (2008). The structure of *Melon necrotic spot virus* determined at 2.8 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **64**: 8-13.
- Waigmann, E., Chen, M.H., Bachmaier, R., Ghoshroy, S. & Citovsky, V. (2000). Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of *Tobacco mosaic virus* cell-to-cell movement protein. *EMBO J.* **19**: 4875-4884.
- Waigmann, E., Curin, M. & Heinlein, M. (2007). *Tobacco mosaic virus* - a model for macromolecular cell-to-cell spread. En: Waigmann, E. & Heilein, M. (eds.), *Viral Transport in Plants. Plant Cell Monographs*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 29-62.
- Waigmann, E., Lucas, W.J., Citovsky, V. & Zambryski, P. (1994). Direct functional assay for *Tobacco mosaic virus* cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1433-1437.
- Waigmann, E., Ueki, S., Trutnyeva, K. & Citovsky, V. (2004). The ins and outs of nondestructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. *Crit. Rev. Plant Sci.* **23**: 195-250.
- Walther, D.M. & Rapaport, D. (2009). Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**: 42-51.
- Wang, F., Koyama, N., Nishida, H., Haraguchi, T., Reith, W. & Tsukamoto, T. (2006). The assembly and maintenance of heterochromatin initiated by transgene repeats are independent of the RNA interference pathway in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **26**: 4028-4040.
- Wang, H., Buckley, K.J., Yang, X., Buchmann, R.C. & Bisaro, D.M. (2005). Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J. Virol.* **79**: 7410-7418.
- Wang, H., Hao, L., Shung, C.Y., Sunter, G. & Bisaro, D.M. (2003). Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell* **15**: 3020-3032.
- Wang, H.H. & Wong, S.M. (2004). Significance of the 3'-terminal region in minus strand RNA synthesis of *Hibiscus chlorotic ringspot virus*. *J. Gen. Virol.* **85**: 1763-1776.
- Wang, J.L. & Simon, A.E. (2000). 3'-end stem-loops of the subviral RNAs associated with *Turnip crinkle virus* are involved in symptom modulation and coat protein binding. *J. Virol.* **74**: 6528-6537.
- Wang, R.Y. & Nagy, P.D. (2008). *Tomato bushy stunt virus* co-opts the RNA-binding function of a host metabolic enzyme for viral genomic RNA synthesis. *Cell Host Microbe* **3**: 178-187.
- Wang, X., Kelman, Z. & Culver, J.N. (2010). Helicase ATPase activity of the *Tobacco mosaic virus* 126-kDa protein modulates replicase complex assembly. *Virology* **402**: 292-302.
- Wang, X.B., Jovel, J., Udornporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W.X., Gascioli, V., Vaucheret, H. & Ding, S.W. (2011a). The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative Argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**: 1625-1638.
- Wang, Z., Parisien, M., Scheets, K. & Miller, W.A. (2011b). The cap-binding translation initiation factor, eIF4E, binds a pseudoknot in a viral cap-independent translation element. *Structure* **19**: 868-880.
- Waris, G., Felmlee, D.J., Negro, F. & Siddiqui, A. (2007). *Hepatitis C virus* induces proteolytic cleavage of sterol regulatory element binding proteins and stimulates their phosphorylation via oxidative stress. *J. Virol.* **81**: 8122-8130.
- Wassenegger, M. & Krczal, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.* **11**: 142-151.
- Weber-Lotfi, F., Dietrich, A., Russo, M. & Rubino, L. (2002). Mitochondrial targeting and membrane anchoring of a viral replicase in plant and yeast cells. *J. Virol.* **76**: 10485-10496.



- Welker, M.W., Welsch, C., Meyer, A., Antes, I., Albrecht, M., Forestier, N., Kronenberger, B., Lengauer, T., Piiper, A., Zeuzem, S. & Sarrazin, C. (2010). Dimerization of the *Hepatitis C virus* nonstructural protein 4B depends on the integrity of an aminoterminal basic leucine zipper. *Protein Sci.* **19**: 1327-1336.
- Welvaert, W. & Samyn, A. (1985). Relative importance of *Pelargonium* viruses in cutting nurseries. *Acta Hortic.* **164**: 341-346.
- Weng, Z. & Xiong, Z. (1997). Genome organization and gene expression of *Saguaro cactus virus*. *J. Gen. Virol.* **78**: 525-534.
- White, K.A. & Nagy, P.D. (2004). Advances in the molecular biology of tombusviruses: gene expression, genome replication, and recombination. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **78**: 187-226.
- White, K.A., Skuzeski, J.M., Li, W., Wei, N. & Morris, T.J. (1995). Immunodetection, expression strategy and complementation of *Turnip crinkle virus* p28 and p88 replication components. *Virology* **211**: 525-534.
- Wobbe, K.K., Akgoz, M., Dempsey, D.M. & Klessig, D.F. (1998). A single aminoacid change in *Turnip crinkle virus* movement protein p8 affects RNA binding and virulence on *Arabidopsis thaliana*. *J. Virol.* **72**: 6247-6250.
- Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N. & Lucas, W.J. (1989). Movement protein of *Tobacco mosaic virus* modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* **246**: 377-379.
- Wright, K.M., Cowan, G.H., Lukhovitskaya, N.I., Tilsner, J., Roberts, A.G., Savenkov, E.I. & Torrance, L. (2010). The N-terminal domain of PMTV TGB1 movement protein is required for nucleolar localization, microtubule association, and long distance movement. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 1486-1497.
- Wright, K.M., Wood, N.T., Roberts, A.G., Chapman, S., Boevink, P., Mackenzie, K.M. & Oparka, K.J. (2007). Targeting of TMV movement protein to plasmodesmata requires the actin/ER network: Evidence from FRAP. *Traffic* **8**: 21-31.
- Wu, B., Pogany, J., Na, H., Nicholson, B.L., Nagy, P.D. & White, K.A. (2009). A discontinuous RNA platform mediates RNA virus replication: building an integrated model for RNA-based regulation of viral processes. *PLoS Pathog.* **5**: e1000323.
- Wu, Ch-H., Lee, Sh-Ch. & Wang, Ch-W. (2011). Viral protein targeting to the cortical endoplasmic reticulum is required for cell-cell spreading in plants. *J. Cell Biol.* **193**: 521-535.
- Wu, Q., Wang, X. & Ding, S.W. (2010). Viral suppressors of RNA-based viral immunity: host targets. *Cell Host Microbe* **22**:12-15.
- Wung, C.H., Hsu, Y.H., Liou, D.Y., Huang, W.C., Lin, N.S. & Chang, B.Y. (1999). Identification of the RNA-binding sites of the triple gene block protein 1 of *Bamboo mosaic potexvirus*. *J. Gen. Virol.* **80**: 1119-1126.
- Xia, Z., Zhu, Z., Zhu, J. & Zhou, R. (2009). Recognition mechanism of siRNA by viral p19 suppressor of RNA silencing: a molecular dynamics study. *Biophys J.* **96**: 1761-1769.
- Xiong, R., Wu, J., Zhou, Y. & Zhou, X. (2009). Characterization and subcellular localization of an RNA silencing suppressor encoded by *Rice stripe tenuivirus*. *Virology* **387**: 29-40.
- Yaegashi, H., Takahashi, T., Isogai, M., Kobori, T., Ohki, S. & Yoshikawa, N. (2007). *Apple chlorotic leaf spot virus* 50 kDa movement protein acts as a suppressor of systemic silencing without interfering with local silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* **88**: 316-324.
- Yaegashi, H., Tamura, A., Isogai, M. & Yoshikawa, N. (2008). Inhibition of long-distance movement of RNA silencing signals in *Nicotiana benthamiana* by *Apple chlorotic leaf spot virus* 50 kDa movement protein. *Virology* **382**: 199-206.
- Yamamura, Y. & Scholthof, H.B. (2005). *Tomato bushy stunt virus*: a resilient model system to study virus-plant interactions. *Mol. Plant Pathol.* **6**: 491-502.

- Yamanaka, T., Ohta, T., Takahashi, M., Meshi, T., Schmidt, R., Dean, C., Naito, S. & Ishikawa, M.** (2000). TOM1, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 10107-10112.
- Yamano, K., Tanaka-Yamano, S. & Endo, T.** (2010). Mdm10 as a dynamic constituent of the TOB/SAM complex directs coordinated assembly of Tom40. *EMBO Rep.* **11**: 187-93.
- Yamano, K., Yatsukawa, Y., Esaki, M., Hobbs, A.E., Jensen, R.E. & Endo, T.** (2008). Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. *J. Biol. Chem.* **283**: 3799-3807.
- Yang, X., Tan, S.H., Teh, Y.J. & Yuan, Y.A.** (2011). Structural implications into dsRNA binding and RNA silencing suppression by NS3 protein of *Rice hoja blanca tenuivirus*. *RNA* **17**: 903-911.
- Yang, Y., Ding, B., Baulcombe, D.C. & Verchot, J.** (2000). Cell-to-cell movement of the 25K protein of *Potato virus X* is regulated by three other viral proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 599-605.
- Yang, Z., Ebright, Y.W., Yu, B. & Chen, X.** (2006). HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res.* **34**: 667-675.
- Ye, C., Dickman, M.B., Whitham, S.A., Payton, M. & Verchot, J.** (2011). The unfolded protein response is triggered by a plant viral movement protein. *Plant Physiol.* **156**: 741-755.
- Ye, K., Malinina, L. & Patel, D.J.** (2003). Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* **426**: 874-878.
- Yelina, N.E., Savenkov, E.I., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y. & Valkonen, J.P.** (2002). Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families. *J. Virol.* **76**: 12981-12991.
- Yi, G. & Kao, C.** (2008). *Cis*- and *trans*-acting functions of *Brome mosaic virus* protein 1a in genomic RNA1 replication. *J. Virol.* **82**:3045-3053.
- You, X.-J., Kim, J.W., Stuart, G.W. & Bozarth, R.F.** (1995). The nucleotide sequence of *Cowpea mottle virus* and its assignment to the genus *Carmovirus*. *J. Gen. Virol.* **76**: 2841-2845.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R. & Chen, X.** (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* **307**: 932-935.
- Yu, Y., Clippinger, A.J. & Alwine, J.C.** (2011). Viral effects on metabolism: changes in glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection. *Trends Microbiol.* **19**: 360-367.
- Zamore, P.D.** (2004). Plant RNAi: How a viral silencing suppressor inactivates siRNA. *Curr. Biol.* **14**: R198-R200.
- Zamyatnin, A.A. Jr., Solovyev, A.G., Sablina, A.A., Agranovsky, A.A., Katul, L., Vetten, H.J., Schiemann, J., Hinkkanen, A.E., Lehto, K. & Morozov, S.Y.** (2002). Dual-colour imaging of membrane protein targeting directed by *Poa semilatent virus* movement protein TGBp3 in plant and mammalian cells. *J. Gen. Virol.* **83**: 651-662.
- Zamyatnin, A.A. Jr., Solovyev, A.G., Savenkov, E.I., Germundsson, A., Sandgren, M., Valkonen, J.P.T. & Morozov, S.Y.** (2004). Transient coexpression of individual genes encoded by the triple gene block of *Potato mop-top virus* reveals requirements for TGBp1 trafficking. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**: 921-930.
- Zamyatnin, A.A., Solovyev, A.G., Bozhkov, P.V., Valkonen, J.P.T., Morozov, S.Y. & Savenkov, E.I.** (2006). Assessment of the integral membrane protein topology in living cells. *Plant J.* **46**: 145-154.
- Zavaliev, R., Ueki, S., Epel, B.L. & Citovsky, V.** (2011). Biology of callose ( $\beta$ -1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. *Protoplasma* **248**: 117-130.
- Zavriev, S.K., Hickey, C.M. & Lommel, S.A.** (1996). Mapping of the *Red clover necrotic mosaic virus* subgenomic RNA. *Virology* **216**: 407-410.

- Zhang, G., Zhang, J. & Simon, A.E.** (2004a). Repression and derepression of minus-strand synthesis in a plus-strand RNA virus replicon. *J. Virol.* **78**: 7619-7633.
- Zhang, J., Stuntz, R.M. & Simon, A.E.** (2004b). Analysis of a viral replication repressor: sequence requirements for a large symmetrical internal loop. *Virology* **15**: 90-102.
- Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S, Tuschl, T., Patel, D.J. & Chua, N.H.** (2006). *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute 1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* **20**: 3255-3268.
- Zhou T, Fan ZF, Li HF, Wong SM.** (2006a). *Hibiscus chlorotic ringspot virus* p27 and its isoforms affect symptom expression and potentiate virus movement in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**: 948-957.
- Zhou, Z.Sh., Dell'Orco, M., Saldarelli, P., Turturo, C., Minafra, A. & Martelli, G.P.** (2006b). Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of *Grapevine virus A*. *J. Gen. Virol.* **87**: 2387-2395.
- Zinser, E. & Daum, G.** (1995). Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**: 493-536.
- 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.



**ANEXO**





Tabla Anexa 1: Ejemplos de supresores codificados por virus de plantas para los que se ha dilucidado o propuesto un mecanismo de supresión.

Familia (Género)	Virus	Supresor	Otras funciones	Mecanismo de supresión	Referencia		
<b>ssRNA(+)</b>							
Tombusviridae (Tombusvirus)	CIRV	p19	Movimiento Determinante de patogenicidad	Unión a siRNAs	Silhavy et al., 2002.		
	TBSV	p19			Vargason et al., 2003		
Tombusviridae (Carmovirus)	TCV	p38	Proteína de cubierta	Unión a dsRNAs	Mérai et al., 2006.		
					Thomas et al., 2003		
	HCRSV	CP	Proteína de cubierta	Inhibición de DCL4 (por unión al factor DRB4)	Deleris et al., 2006		
Tombusviridae (Dianthovirus)	RCNMV	p27/p88	Replicación	Secuestro de factores del huésped (ej. DCL1)	Qu et al., 2003		
					Azevedo et al., 2010		
Tombusviridae (Aureusvirus)	PoLV	p14	Determinante de patogenicidad	Unión a dsRNAs	Meng et al., 2008		
					Takeda et al., 2005		
Closteroviridae (Closterovirus)	CTV	p20	Potenciador de la replicación	Suprime silenciamiento intracelular e intercelular	Mérai et al., 2005		
		p23	Unión a ácidos nucleicos			Suprime silenciamiento intracelular	Lu et al., 2004
		CP	Proteína de cubierta			Suprime silenciamiento intercelular	
Closteroviridae (Crinivirus)	SPCSV	RNasa III	Determinante de patogenicidad	Unión a siRNAs	Reed et al., 2003		
					Lakatos et al., 2006		
					Kreuze et al., 2005		
Bromoviridae (Cucumovirus)	TAV	2b	Especificidad de huésped Movimiento	Unión a siRNAs	Cuellar et al., 2009		
					Zhang et al., 2006		
Luteoviridae (Poleovirus)	BWV	p0	Determinante de patogenicidad	Desestabilización de AGO1	Goto et al., 2007		
					Chen et al., 2008		
					Baumberg et al., 2007		
					Bortolamiol et al., 2007		

Familia (Género)	Virus	Supresor	Otras funciones	Mecanismo de supresión	Referencia
Potyviridae (Potyvirus)	TEV	HC-Pro	Transmisión por áfidos Determinante de patogenicidad	Unión a siRNAs	Lakatos <i>et al.</i> , 2006
	PVY	HC-Pro	Movimiento Procesamiento de poliproteínas	Unión a siRNAs Acción sobre regulador negativo del PTGS	Kasschau, & Carrington, 1998 Anandalakshmi <i>et al.</i> , 2000 Lakatos <i>et al.</i> , 2006
Potyviridae (Ipomovirus)	SPMMV	p1	Proteinasa de serina	Interacción con AGO1	Giner <i>et al.</i> , 2010
	CVYV	p1b	Proteinasa de serina	Unión a siRNAs	Valli <i>et al.</i> , 2008
Comoviridae (Comovirus)	CPMV	S-CP	CP (región C-t)	Actúa corriente abajo de la producción de siRNAs	Liu, <i>et al.</i> , 2004 Cafizares, <i>et al.</i> , 2004
Flexiviridae (Potexvirus)	PVX	p25	Movimiento	Inhibe silenciamiento sistémico	Voignet <i>et al.</i> , 2000
	ACLSV	p50	Movimiento	Interacción con AGO1 y degradación por la vía del proteosoma	Bayne <i>et al.</i> , 2005 Chiu <i>et al.</i> , 2010
Flexiviridae (Trichovirus)	ACLSV	p50	Movimiento	Inhibe el silenciamiento a largas distancias	Yaegashi <i>et al.</i> , 2007, 2008
Flexiviridae (Vitivirus)	GVA	p10	Determinante de patogenicidad Movimiento Unión a RNA	Unión a siRNAs monocatenarios, siRNAs, dsRNAs	Chiba <i>et al.</i> , 2006 Zhou <i>et al.</i> , 2006
Tymoviridae (Tymovirus)	TYMV	p69	Movimiento Determinante de patogenicidad	Actúa corriente arriba de la formación de dsRNAs, inhibiendo RDR6	Chen <i>et al.</i> , 2004
	TMV	p126	Replicación	Unión a siRNAs	Harriss <i>et al.</i> , 2008
(Tobamovirus)	Cr-TMV	p122	Replicación	Unión a siRNAs	Csorba <i>et al.</i> , 2007
	ToMV	p130	Replicación	Unión a siRNAs Interfiere con la metilación de siRNAs/miRNAs mediada por HEN1	Kubota, <i>et al.</i> , 2003 Vogler <i>et al.</i> , 2007
(Hordeivirus)	BSMV	Yβ	Determinante de patogenicidad	Unión a siRNAs	Yelina <i>et al.</i> , 2002 Mérat <i>et al.</i> , 2006
(Peclavirus)	PCV	p15	Movimiento intercelular	Unión a siRNAs	Dunoyer <i>et al.</i> , 2002a
<b>ssRNA(-)</b>					
Bunyaviridae (Tospovirus)	TSWV	NSs	Determinante de patogenicidad	Inhibición del PTGS de secuencias sentido	Bucher <i>et al.</i> , 2003 Takeda <i>et al.</i> , 2002



Familia (Género)	Virus	Supresor	Otras funciones	Mecanismo de supresión	Referencia
(Tenuivirus)	RHBV	NS3	Desconocida	Unión a siRNAs y miRNAs	Hemmes <i>et al.</i> , 2007, 2009 Shen <i>et al.</i> , 2010 Yang <i>et al.</i> , 2011
	RSV	NS3	Desconocida	Unión a ss-siRNA, siRNAs y ssRNAs	Xiong <i>et al.</i> , 2009
<b>dsRNA</b>					
Reoviridae (Phytoreovirus)	RDV	Pns10	Desconocida	Actúa corriente arriba de la formación de dsRNAs	Cao <i>et al.</i> , 2005
<b>ssDNA</b>					
Geminiviridae (Curtovirus)	BCTV	L2	Determinante de patogenicidad	Inhibe la ADK y la trans-metilación	Wang <i>et al.</i> , 2003, 2005
	TGMV	AL2	Sinergismo AC2-AC4	Inhibe la ADK y la trans-metilación	Wang <i>et al.</i> , 2005
Geminiviridae (Begomovirus)	ACMV	AC4	Movimiento Determinante de patogenicidad	Unión a ssRNAs	Bisaro, 2006 Chellappan <i>et al.</i> , 2005
		AC2	Trans-activador transcripcional	Unión a ssRNAs	Voynet <i>et al.</i> , 1999
	TYLCV	V2	Desconocida	Inhibe la actividad de SGS3	Fukunaga & Doudna, 2009 Gilick <i>et al.</i> , 2008
MYMV	AC2	Desconocida	Activa supresores endógenos de silenciamiento	Trinks <i>et al.</i> , 2005	
<b>dsDNA(RT)</b>					
Caulimoviridae (Caulimovirus)	CaMV	p6	Trans-activador traduccional	Interacción con RDB4	Love <i>et al.</i> , 2007 Haas <i>et al.</i> , 2008

Virus de las manchas en anillos del clavel italiano (CIRV); virus del enanismo arbutivo del tomate (TBSV); virus del arrugamiento del nabo (TCV); virus de las manchas cloróticas en anillo del Hibisco (HCRSV); virus del mosaico necrótico del trébol rojo (RCNMV); virus latente del Pothos (PoLV); virus de la tristeza de los cítricos (CTV); virus del amarillero de la remolacha (BYV); virus del enanismo clorótico de la batata (SPCSV); virus del mosaico del pepino (CMV); virus de la aspermita del tomate (TAV); virus del amarillero de la remolacha del oeste (BWVY); virus del grabado del tabaco (TEV); virus Y de la patata, (PVY); virus del moteado suave de la batata (SPMMV); virus del amarillamiento de las venas del pepino (CVVY); virus del mosaico del chicharo (CPMV); virus X de la patata (PVX); virus de las manchas cloróticas de la hoja del manzano (ACLSV); virus A de la vid (GVA); virus del mosaico amarillo del nabo (TYMV); virus del mosaico del tabaco (TMV); virus del mosaico del tomate (ToMV); virus del mosaico rayado de la cebada (BSMV); virus del macizo del cacahuete (PCV); virus del bronceado del tomate (TSWV); virus de la hoja blanca del arroz (RHBV); virus del rayado del arroz (RSV); virus del enanismo del arroz (RDV); virus del rizado superior de la remolacha (BCTV); virus del mosaico dorado del tomate (TGMV); virus del mosaico de la yuca africana (ACMV); virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (TYLCV); virus del mosaico amarillo del frijol mungo (MYMV); virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

