

## Insights into the molecular mechanisms of the N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) methylation machinery in the regulation of the infection cycle of RNA plant viruses

**RESUMEN** - La N<sup>6</sup>-metiladenosina (m<sup>6</sup>A) es una modificación generalizada en los ARN celulares de diferentes organismos que puede afectar muchos procesos y vías celulares. En las plantas, la modificación de m<sup>6</sup>A ocurre mediante un complejo de metilación que contiene varias proteínas: MTA, MTB, FIP37, VIR y HAKAI. Esta modificación es eliminada por desmetilasas de la familia *AlkB*, mientras que los miembros de la familia ECT (EVOLUTIONARILY CONSERVED C-TERMINAL REGIONS) son las proteínas mejor descritas que reconocen y procesan los ARN modificados con m<sup>6</sup>A. En *Arabidopsis*, se ha informado que m<sup>6</sup>A controla el desarrollo de plantas en etapa embrionaria, el crecimiento vegetativo y la floración. Esta modificación también está presente en los ARN genómicos de los virus y en las transcripciones de algunos virus ADN. Los estudios de epitranscriptómica viral han revelado un papel igualmente importante de m<sup>6</sup>A durante la infección por virus; sin embargo, no existe una función proviral o antiviral de la metilación de m<sup>6</sup>A que pueda generalizarse. En plantas, hay pocos estudios de la actividad reguladora de m<sup>6</sup>A durante infecciones virales. El laboratorio donde se ha llevado a cabo este trabajo ha sido pionero en el estudio del efecto de m<sup>6</sup>A en la interacción planta-virus, utilizando como virus modelo el Virus del mosaico de la alfalfa (AMV). AMV pertenece a la familia *Bromoviridae* y, como el resto de los miembros de esta familia, su genoma está formado por tres ARN monocatenarios de polaridad positiva. El ARN 1 y el ARN 2 codifican las subunidades de replicasa (P1 y P2), mientras que el ARN 3 codifica la proteína de movimiento (MP) y sirve como molde para la síntesis del ARN subgenómico 4 (sgARN 4), que codifica la proteína de cubierta (CP). Al comienzo de esta tesis, nuestro laboratorio ya había informado sobre: (i) la presencia de supuestos motivos m<sup>6</sup>A en el 3'UTR del RNA 3, una región crítica para la replicación de AMV, (ii) la primera m<sup>6</sup>A-desmetilasa de *Arabidopsis* (ALKBH9B), (iii) la relevancia funcional de ALKBH9B para mantener niveles adecuados de m<sup>6</sup>A/A para la correcta replicación de AMV, (iv) la capacidad de la CP de AMV para interactuar con ALKBH9B, posiblemente para usurpar la actividad de ALKBH9B, y (v) la capacidad de las proteínas de *Arabidopsis* ECT2, ECT3 y ECT5 para interactuar con el ARNv de AMV que contienen m<sup>6</sup>A. Dada la relevancia funcional de m<sup>6</sup>A en la biología de AMV, en esta tesis se decidió profundizar en el conocimiento de las implicaciones del mecanismo de regulación de m<sup>6</sup>A en el ciclo infeccioso viral de AMV. Para ello, se decidió: (i) profundizar en la comprensión funcional de la m<sup>6</sup>A-desmetilasa ALKBH9B, (ii) evaluar la función *in vivo* de los supuestos dos sitios m<sup>6</sup>A presentes en el 3'UTR del RNA 3, y (iii) explorar una posible implicación de algunas m<sup>6</sup>A metiltransferasas en la infección causada por AMV.

Con respecto al primer objetivo, mapeamos los subdominios funcionales de atALKBH9B necesarios para su unión al ARN viral y a la CP de AMV. Sorprendentemente, se observó la presencia de regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) en la región N-terminal, dentro del dominio interno similar a *AlkB* y en la región C-terminal. Alrededor del 78% del dominio de unión a ARN (RBD) identificado en ALKBH9B está contenido en el IDR C-terminal. En este contexto, se ha propuesto que la capacidad de las RBP que contienen IDRs a dirigirse específicamente a diferentes ARN se debe a la flexibilidad conformacional, así como al establecimiento de interfaces electrostáticas conservadas extendidas con ARN. Además, debido a que las IDRs se localizan con frecuencia en proteínas que se someten a la separación de fases líquido-líquido (LLPS), un proceso que probablemente contribuye a la formación y estabilidad de los gránulos de ARN, es posible que las IDR y la RBD de ALKBH9B puedan actuar de manera cooperativa para promover la formación de gránulos de ARN.

El análisis de los putativos motivos DRACH localizados en el bucle de hpB y en el tallo inferior de hpE del 3'UTR/ARN 3 de AMV demostró que son sitios críticos involucrados en la replicación *in vivo* de AMV. La identidad de los residuos <sup>2012</sup>A, <sup>2013</sup>A y <sup>2014</sup>A en el bucle hpB parece ser un requisito estructural clave para la replicación y/o acumulación de AMV. Con respecto a hpE, nuestros resultados determinaron que el supuesto residuo de m<sup>6</sup>A (<sup>1902</sup>A), así como el apareamiento de bases del tallo inferior de hpE, también son requisitos esenciales para la síntesis *in vivo* de ARNs de cadena positiva en AMV. Hasta donde sabemos, esta es la primera evidencia en AMV que muestra que el bucle de hpB y el tallo inferior de hpE están involucrados en la replicación/acumulación viral y la síntesis de ARNs de cadena positiva, respectivamente.

Finalmente, en cuanto al estudio de la influencia de las m<sup>6</sup>A-metiltransferasas en el ciclo de infección viral de AMV, no se determinó un efecto proviral y/o antiviral en el complejo m<sup>6</sup>A-ARNm metiltransferasa conformado por atMTA:atMTB, ni en el putativo complejo m<sup>6</sup>A-ARNr metiltransferasa conformado por atMETTL5-like:atTRMT112-like sobre la biología de AMV.

En resumen, este trabajo: (i) aclara la estructura funcional de la primera m<sup>6</sup>A-desmetilasa de plantas, ALKBH9B, (ii) revela la importancia funcional de los supuestos motivos DRACH ubicados en 3'UTR del RNA 3 para la replicación/acumulación de ARN viral en AMV, y (iii) explora la participación de las m<sup>6</sup>A-metiltransferasas en la biología de AMV. Por lo tanto, esta tesis aporta nuevas observaciones que buscan comprender las implicaciones del mecanismo de regulación de m<sup>6</sup>A en el ciclo infeccioso viral de AMV.

**PALABRAS CLAVE** – N<sup>6</sup>-methyladenosine, RNA covalent modifications, DRACH motif, RNA demethylases, RNA-methyltransferases, epitranscriptomics, plant viruses, alfamovirus.