



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Análisis Estructural y Funcional de la Proteína de la
Cápsida del Virus del Mosaico del Pepino Dulce

D. Francisco Eduardo Méndez López

2019

UNIVERSIDAD DE
MURCIA



CEBAS-CSIC
CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA APLICADA DEL SEGURA



“Análisis estructural y funcional de la proteína de la cápsida del virus del mosaico del pepino dulce”

Memoria presentada por:

Francisco Eduardo Méndez López

Para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Murcia

Director:

Dr. Miguel Ángel Aranda Regules

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Aranda Regules, Profesor de investigación en el Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC)

El doctorando:

El Director de la tesis

Francisco Eduardo Méndez López

Dr. Miguel Ángel Aranda Regules

Abstract

This work focuses on the coat protein (CP) of pepino mosaic virus (PepMV), which has been analysed from structural and functional points of view. PepMV is a flexuous filamentous plant virus belonging to the genus *Potexvirus* within the family *Alphaflexiviridae*. PepMV has significant agronomic importance because it induces a disease affecting tomato crops causing important economic losses worldwide. PepMV has also raised recent biotechnological interest, and a PepMV-based clone tool-box is available for different potential uses facilitating the study of the PepMV biology.

The cryoEM structure of PepMV virions at 3.9 Å of resolution is shown and discussed in the first chapter of this work. The PepMV particle is built by thousands of CPs arranged in a left-handed helix fashion protecting the viral RNA. The near-atomic three-dimensional (3D) map allowed accurate modelling of the CP, the viral RNA, and their interaction. The CP has 3 regions: an N-terminal flexible arm, a core, and a C-terminal extension. An RNA binding pocket was identified in the core region of the CP, and the side-by-side contacts between assembled CPs were mediated by the N-terminal arm that interacts with an hydrophobic groove in the core of the neighbouring CP. *In vivo* functional studies of several CP mutants affecting the RNA binding pocket and the N-terminal arm confirmed the role of several residues in RNA binding and polymerization during cell-to-cell movement and assembly. Further Thesis work in this part focussed on the identification of an origin of assembly (OAS) of PepMV virions.

Virus-like particles (VLPs) were purified from plants expressing the PepMV CP and an heterologous RNA containing a putative PepMV OAS. A short region functioning as OAS was identified in the first 87 nucleotides of the viral RNA. The secondary structure of the OAS from *in vitro* and *ex virio* RNAs was resolved by SHAPE analysis.

In the second part of this work, two tomato proteins interacting with the PepMV CP were identified using a yeast-two hybrid (Y2H) screening of a tomato cDNA normalized library. For confidentiality reasons, in this abstract, these proteins will be called IP24 and IP10. The two interactions were confirmed by coimmunoprecipitation (CoIP) and the CP-IP24 interaction was also confirmed by directed Y2H. Furthermore, IP10 was also identified as an interacting protein of the PepMV triple gene block 1 protein (TGB1) in the Y2H screening. The TGB1-IP10 interaction was confirmed by both CoIP and directed Y2H assays. To analyse if IP24 or IP10 have a role in the PepMV biology, knocked-out Micro-Tom plants were generated using the CRISPR/Cas9 technology. The IP24 knocked-out plants showed loss of susceptibility to PepMV indicating that IP24 is a proviral factor. On the other hand, no difference on the PepMV accumulation was observed between IP10 knocked-out and wildtype plants. However, plants edited in the gene encoding an IP10 paralog (IP11), that is a possible TGB1-interacting protein, showed loss of susceptibility to PepMV. Then, live-cell imaging under the confocal laser scanning microscope was performed to infer possible functions of IP24, IP10 and IP11 during PepMV infection. IP24 colocalized with the CP in the virus replication complexes (VRCs) suggesting a function during virus replication. IP10 was also recruited to VRCs, but not IP11. Both IP10 and IP11 colocalized with TGB1 within the plasmodesmata (PD) channel suggesting that both proteins are implicated in viral cell-to-cell movement.

Resumen

En este trabajo se ha estudiado la proteína de la cápsida (CP) del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) bajo un punto de vista estructural y funcional. PepMV es un virus filamentosos flexuoso que pertenece al género *Potexvirus* y a la familia *Alphaflexiviridae*. Es el causante de una enfermedad que afecta a cultivos de tomate por todo el mundo y provoca importantes pérdidas económicas. Además del interés agronómico, PepMV ha despertado interés biotecnológico y existe un importante arsenal de clones basados en PepMV con diferentes usos potenciales y que facilitan el estudio de la biología del virus.

En el capítulo 1 se presenta y discute la estructura de la partícula de PepMV resuelta por criomicroscopía electrónica (crioEM) con una resolución de 3.9 Å. La arquitectura de PepMV es una hélice levógira formada por CPs que protegen el RNA viral. El mapa tridimensional (3D) casi a nivel atómico ha permitido el modelado de la CP, del RNA viral y de su interacción. La CP de PepMV se puede dividir en tres regiones: un brazo N terminal flexible, una región central rica en hélices alfa, y una extensión C terminal. Se ha identificado un bolsillo de interacción con el RNA en la región central de la CP, y se ha determinado que en el contacto lateral entre CPs participa el brazo N terminal que se aloja en un surco hidrofóbico de la región central de la CP vecina. Estudios funcionales *in vivo* de varias CPs mutadas en aminoácidos del bolsillo de interacción con el RNA y en el brazo N terminal confirmaron la implicación de varios residuos en la unión al RNA y en la oligomerización de la CP durante el movimiento célula

a célula y el ensamblaje del virión. Por otro lado, en este capítulo también se ha puesto el foco en la identificación de un origen de encapsidación (OAS) de PepMV. Se han purificado partículas similares a virus (*virus-like particles*, VLPs) a partir de hojas de *N. benthamiana* que expresaban la CP y un RNA heterólogo que contenía el OAS de PepMV. El OAS se ha mapeado en una región corta del extremo 5' del RNA genómico de PepMV y su estructura secundaria se ha determinado a partir de RNAs *in vitro* y *ex virio* mediante SHAPE.

En la segunda parte de este trabajo se han identificado dos proteínas de tomate que interactúan con la CP de PepMV mediante un escrutinio por doble híbrido en levadura (*yeast-two hybrid*, Y2H) de una genoteca de cDNA normalizada. Por motivos de confidencialidad, en este resumen llamaremos a estas proteínas IP24 e IP10. Las dos interacciones fueron confirmadas por coimmunoprecipitación (CoIP) y la interacción CP-IP24 fue también confirmada por Y2H dirigido. Además, IPO fue también identificada en el escrutinio por Y2H como interactante de la proteína 1 del bloque de tres genes (TGB1) de PepMV. La interacción TGB1-IP10 fue confirmada tanto por CoIP como por Y2H dirigido. Para analizar si IP24 o IP10 tienen un papel en la biología de PepMV, se generaron plantas Mmicro-Tom editadas en los genes que codifican IP24 e IPO mediante la tecnología CRISPR/Cas9. Las plantas mutantes defectivas en el gen que codifica IP24 mostraron una pérdida de susceptibilidad a PepMV, lo que indica que IP24 es un factor proviral. Por otro lado, no se observaron diferencias de acumulación de PepMV entre las plantas defectivas en el gen que codifica IP10 y las plantas de genotipo salvaje. Sin embargo, plantas editadas en el gen que codifica un parálogo de IP10 (IP11), para el que hay evidencias de que interacte con TGB1, mostraron pérdida de susceptibilidad a PepMV. A continuación, se localizaron subcelularmente las proteínas de interés mediante microscopía láser confocal de células vivas para tratar de inferir sus funciones en el ciclo infeccioso de PepMV. IP24 colocalizó con la CP en los complejos de replicación de virus (VRCs) lo que sugiere su posible implicación en la replicación viral. IP10 también fue reclutada a los VRCs, pero no así IP11. Por otro lado, IP10 e IP11 colocalizaron con la TGB1 en el interior del canal de los plasmodesmos (PDs), lo que sugiere que ambas proteínas participen en el movimiento célula a célula del virus.

Abreviaturas

Abreviaturas de virus (por orden alfabético)

BaMV	virus del mosaico del bambú
BSMV	virus del mosaico estriado de la cebada
CymMV	virus del mosaico del cymbidium
FMV	virus del mosaico de la cebadilla
LXV	virus X del lirio
NMV	virus del mosaico del narciso
PAMV	virus del mosaico aucuba de la patata
PapMV	virus del mosaico de la papaya
PEMV	virus del mosaico y enaciones del guisante
PepMV	virus del mosaico del pepino dulce
PVX	virus X de la patata
PVY	virus Y de la patata
RVFV	virus de la fiebre del valle del Rift
SFTSV	virus de la fiebre severa con trombocitopenia
SMV	viurs del mosaico de la soja
TBSV	virus del enanismo ramificado del tomate
TMV	virus del mosaico del tabaco
TOSV	virus Toscana
TRV	virus del cascabeleo del tabaco
TYLCV	virus del rizado amarillo del tomate
WCIMV	virus del mosaico del trébol blanco
WMV	virus del mosaico de la sandía

Otras abreviaturas (por orden alfabético)

3'UTR	región no traducida 3'
5'Cap	caperuza del 5'
5'UTR	región no traducida 5'
AD	dominio de activación del factor de transcripción Gal4
AGO	proteína argonauta
AgT	antígeno T grande de SV40
BD	dominio de unión a DNA del factor de transcripción Gal4
BzCN	cianuro de benzoilo
CAT1	catalasa 1
CDS	secuencia codificante
chl	cloroplasto
CoIP	coimmunoprecipitación
CP	proteína de la cápsida
crioEM	criomicroscopía electrónica
ddNTP	didesoxinucleótido

DO	densidad óptica
dominio NID	dominio N terminal intrínsecamente desordenado
dpa	días post agroinfiltración
dpi	días post inoculación
DSN	nucleasa específica de dúplex
EPPO	Organización Europea de Protección de Cultivos
FP	proteína fluorescente
GFP	proteína verde fluorescente
gRNA	RNA genómico
gRNA	RNA guía de la nucleasa Cas9
GST	glutatiión S-transferasa
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
indel	inserción y/o delección
lamC	laminina C
NP	nucleoproteína
OAS	origen de encapsidación
ORF	marco abierto de lectura
p53	supresor tumoral p53
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PD	plasmodesmo
PDS	fitoeno desaturasa
RdRp	polimerasa de RNA dependiente de RNA
RE	retículo endoplásmico
RFP	proteína roja fluorescente
RMSD	desviación media cuadrática
RNP	ribonucleoproteína
RT	transcripción reversa
SEL	límite de tamaño de exclusión del plasmodesmo
sgRNA	RNA subgenómico
SHAPE	acilación de los grupos 2'-hidroxilo analizada por extensión del cebador
ssRNA	RNA monocatenario
TEM	microscopía electrónica de transmisión
TGB1	proteína 1 del bloque de tres genes
TGB2	proteína 2 del bloque de tres genes
TGB3	proteína 3 del bloque de tres genes
UPR	respuesta de proteína desplegadas (unfolded protein response)
VIGS	silenciamiento génico inducido por virus
VLP	partícula similar a virus (virus like-particle)
VRC	complejo de replicación del virus
vRNA(-)	RNA viral de polaridad negativa
Y2H	doble híbrido en levadura
YFP	proteína amarilla fluorescente

Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 17 de julio de 2019.

Índice

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1.1. LOS VIRUS FILAMENTOSOS FLEXUOSOS DE PLANTAS	6
3.1.1. Estructura de los virus filamentosos flexuosos de plantas.....	8
3.1.2. Homología estructural entre las CPs de los virus filamentosos flexuosos de plantas.....	12
3.1.3. Diferencias entre la CP de virus filamentosos rígidos y flexuosos.....	14
3.1.4. Ensamblaje del virión de potexvirus	16
3.1.5. Desensamblaje de la partícula y activación de la traducción del RNA de potexvirus	17
1.2. BIOLOGÍA DE PEPMV.....	18
3.1.6. Organización genómica de PepMV.....	19
3.1.7. Las proteínas virales RdRp y TGBs	20
3.1.8. Infección temprana.....	22
3.1.9. Formación de los VRCs.....	25
3.1.10. Interacciones con proteínas del huésped.....	26
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.2. MATERIAL VEGETAL Y FUENTE DE INÓCULO VIRAL	31
3.3. CONSTRUCCIONES DE DNA	31
3.4. INOCULACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PEPMV.....	34
3.5. CRIOEM, PROCESAMIENTO DE IMAGEN DE LA PARTÍCULA DE PEPMV Y CONSTRUCCIÓN DEL MODELO ATÓMICO DE LA CP	35
3.6. CÓDIGOS DE ACCESO	35
3.7. AGROINFILTRACIÓN	36
3.8. ENSAYO DE LOS MUTANTES DE LA CP POR TRANSCOMPLEMENTACIÓN.....	37
3.9. PURIFICACIÓN DE VLPs	37
3.10. INMUNOMARCAJE CON ORO Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	37
3.11. SHAPE IN VITRO Y EX VIRIO.....	38
3.12. GENOTECA DE cDNA Y ESCRUTINIO MEDIANTE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA	40
3.13. ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA	41
3.14. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS, COINMUNOPRECIPITACIÓN Y WESTERN BLOT	42
3.15. SILENCIAMIENTO GÉNICO DE <i>SLGSTU38</i> MEDIADO POR TRV (VIGS).....	43
3.16. TRANSFORMACIÓN DE MICRO-TOM, EDICIÓN GENÉTICA POR CRISPR/CAS Y ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD A PEPMV	44
3.17. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL DE BARRIDO DE CÉLULAS VIVAS	45
4. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA E IDENTIFICACIÓN DE UN ORIGEN DE ENCAPSIDACIÓN (OAS).....	47
4.1. INTRODUCCIÓN	47
4.2. RESULTADOS	50
4.2.1. Puesta a punto de un sistema en trans de ensayo de mutantes de la CP.....	50
4.2.2. Interacción entre la CP y el RNA viral.....	52
4.2.3. La interacción CP-CP en el virión ensamblado.....	54
4.2.4. Existe homología estructural entre la CP de los potexvirus y la NP de los phlebovirus ...	55
4.2.5. El extremo 5' del RNA genómico de PepMV es necesario para la formación de partículas virales	57
4.2.6. SHAPE in vitro y ex virio del origen de encapsidación en el extremo 5' del RNA genómico de PepMV	62

4.3.	DISCUSIÓN.....	65
4.3.1.	<i>El ensamblaje del virión y el movimiento célula a célula son procesos que requieren la misma interacción CP-RNA, pero que se pueden desacoplar.....</i>	65
4.3.2.	<i>La homología entre la CP de los virus filamentosos flexuosos de plantas y la NP de los phlebovirus sugiere una transferencia horizontal del gen CP/NP.....</i>	67
4.3.3.	<i>El OAS de PepMV se encuentra en el extremo 5' de su genoma y funciona de manera modular.....</i>	69
5.	IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE TOMATE QUE INTERACCIONAN CON LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA.....	71
	Contenido inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 17 de julio de 2019.	
6.	CONCLUSIONS / CONCLUSIONES.....	72
	Contenido inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 17 de julio de 2019.	
7.	ANEXOS.....	73
	Contenido inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 17 de julio de 2019.	
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	75

1. Introducción general

Los virus son parásitos obligados que infectan a otros organismos para completar sus ciclos biológicos. La infección viral puede conducir al desarrollo de enfermedades en sus huéspedes. Cuando estas enfermedades afectan a plantas cultivadas pueden provocar grandes pérdidas económicas (Loebenstein 2009; Rybicki 2015; Scholthof et al. 2011; Waterworth y Hadidi 1998), de manera que el desarrollo de estrategias eficientes para hacer frente a las patologías víricas es uno de los principales retos de la patología vegetal y la agronomía. Las medidas más exploradas para proteger los cultivos amenazados por virosis son la generación de variedades resistentes, el control de los vectores, y la implementación de medidas profilácticas que limiten el establecimiento de focos primarios de infección. Sin duda alguna, el estudio de la biología de los virus, y de la relación entre los virus y sus huéspedes es fundamental para desarrollar nuevos métodos de protección de cultivos. Por otro lado, los virus de plantas tienen un enorme valor como herramientas biotecnológicas gracias a sus propiedades físicas y químicas. Su naturaleza proteica, su simetría icosaédrica o filamentosa, su capacidad para encapsular RNA, y su fácil multiplicación y purificación son características intrínsecas de los virus de plantas que han permitido su uso en el campo biomédico y nanotecnológico en los últimos años (Steele et al. 2017).

El virus del mosaico del pepino dulce (pepino mosaic virus, PepMV) es un virus filamentoso flexuoso que pertenece al género *Potexvirus* y a la familia *Alphaflexiviridae*. PepMV tiene una gran importancia agronómica porque es el causante de una

enfermedad que afecta al tomate cultivado y provoca cuantiosas pérdidas económicas en muchas regiones productoras de Europa y América (Gómez, Sempere, y Aranda 2012). Además, recientemente, PepMV ha despertado interés como plataforma biotecnológica (Le et al. 2019), y existe un rico arsenal de clones basados en PepMV (Ruiz-Ramón et al. 2019; Sempere et al. 2011) con diversos usos biotecnológicos potenciales que permiten estudiar la biología de la interacción entre PepMV y sus huéspedes. En este trabajo se ha resuelto la estructura del virión de PepMV y de su proteína de la cápsida (CP), y se ha estudiado la interacción de la CP consigo misma y con el RNA viral durante el movimiento célula a célula y la encapsidación del virus. Por otro lado, se ha estudiado la interacción entre la CP y proteínas de tomate con el fin de entender mejor la biología del virus y su relación con el huésped, y proponer posibles dianas para la mejora de la resistencia a PepMV. Así, los resultados presentados en esta tesis suponen avances en el conocimiento fundamental de la biología de PepMV y también pueden facilitar posibles aplicaciones en el campo biotecnológico y agronómico.

En los siguientes apartados de la introducción resumiré el estado actual del conocimiento sobre la arquitectura de la partícula de los virus filamentosos flexuosos. A continuación, introduciré aspectos de la biología de PepMV en el contexto del conocimiento sobre la biología de potexvirus.

1.1. Los virus filamentosos flexuosos de plantas

Los virus de plantas generalmente presentan cápsidas desnudas con simetría icosaédrica o filamentosas helicoidales (Hull 2013). El RNA de un virus icosaédrico puede representar el 30% de la masa del virión, mientras que el RNA del virus del mosaico del tabaco (TMV), un virus filamentosos, representa únicamente el 6% de la masa del virión (Booth, Rabb, y Beniac 2013). Esto sugiere que el ensamblaje de un virión filamentosos helicoidal sea bastante más costoso y menos eficiente que el de un virus icosaédrico. No obstante, aproximadamente la mitad de las especies conocidas de virus de plantas son de virus filamentosos (alrededor de 500 especies), y representan un tercio de los

géneros (Adams et al. 2016; Fauquet et al. 2005). Una de las ventajas funcionales que se atribuyen a la simetría helicoidal es que es una estructura que permite encapsidar cualquier longitud de genoma, al contrario que la simetría icosaédrica que se limita al volumen del interior de la cápsida. El género *Nepovirus* es el género de virus icosaédricos que encapsida genomas de mayor tamaño, aproximadamente de 7,5 kb, mientras que las partículas filamentosas flexuosas de virus de la familia *Closteroviridae* pueden llegar a encapsidar genomas de 19,3 kb (Dolja 2003).

Los virus filamentosos de plantas pueden ser rígidos o flexuosos. El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) reconoce ocho géneros y una familia (*Virgaviridae*; Adams, Antoniw, y Kreuze 2009) de virus de plantas filamentosos rígidos, y 20 géneros y cuatro familias de virus de plantas filamentosos flexuosos (Carstens 2010; Fauquet et al. 2005), aunque todavía no todos los virus filamentosos conocidos han sido asignados a géneros, y hay géneros aún no asignados a familias. Todos los virus filamentosos tienen un genoma de RNA, y la mayoría consta de un único tipo de proteína que constituye cada uno de los monómeros (capsómeros) integrantes de la cápsida.

Los virus filamentosos flexuosos de plantas se agrupan en las familias *Alphaflexiviridae* (50 especies de las cuales 35 pertenecen al género *Potexvirus*), *Betaflexiviridae* (89 especies), *Closteroviridae* (49 especies), y *Potyviridae* (195 especies). Todos estos virus tienen un genoma monopartito de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, salvo algunos géneros de la familia *Closteroviridae*, cuyo genoma está segmentado. Las partículas virales de los virus incluidos en estas familias muestran una arquitectura en la que cientos de copias de la CP se ordenan de manera muy similar y forman un virión helicoidal (Kendall et al. 2008) filamentosos y flexuosos de varios cientos de nm de largo y unos 10-15 nm de diámetro.

La clasificación clásica de los virus se basa en la relación filogenética de las polimerasas de RNA dependientes de RNA (*RNA dependent RNA polymerase*, RdRp) y sobre otras características genéticas y biológicas (ICTV). Esta clasificación agrupa a la mayoría de los virus filamentosos flexuosos de plantas en la superfamilia de los similares a alfavirus (*aphavirus-like*), puesto que sus replicasas tienen una relación filogenética próxima, con actividad metil-transferasa, y tienen un gen que codifica una helicasa de la superfamilia 1 (Koonin, Dolja, y Morris 1993). Sin embargo, la familia *Potyviridae*, que a

día de hoy se mantiene desclasificada, se aproxima a la superfamilia de los similares a picornavirus (*picornavirus-like*). Los miembros de la familia *Potyviridae* y la superfamilia de los similares a picornavirus presentan similitudes en sus RdRps, en la expresión de las proteínas virales a través de una poliproteína, y la presencia de una proteína VPg unida covalentemente al extremo 5' de su genoma. Si nos fijamos en la arquitectura de las partículas virales, los potyvirus, que tienen una cápsida helicoidal y filamentosa, no encajan en absoluto entre los similares a picornavirus, donde prevalecen las cápsidas icosaédricas y las CPs con un plegamiento tipo *jelly roll*. Esto plantea la idea, cada vez más aceptada, de un origen común del gen de la CP transferido de manera horizontal entre los virus filamentosos flexuosos (Dolja y Koonin 2018; Koonin, Dolja, y Krupovic 2015). En cualquier caso, aunque el origen sea polifilético (Krupovic, Dolja, y Koonin 2019), debe de existir una arquitectura y organización de las CPs más o menos común para los virus con este tipo de cápsida (Koonin et al. 2015).

3.1.1. Estructura de los virus filamentosos flexuosos de plantas

Los primeros estudios estructurales sobre virus filamentosos flexuosos revelaron una arquitectura general común. En el trabajo de Kendall et al. (2008) se compara la simetría a baja resolución del virión del virus del mosaico de la soja (SMV; un potyvirus) y del virus X de la patata (PVX; un potexvirus) determinadas por difracción de rayos X, criomicroscopía electrónica (crioEM) y microscopía electrónica de transmisión. Estos autores comprobaron que la simetría de ambos virus es muy similar y que solo existe alguna diferencia menor entre ellas. Las partículas de SMV y PVX son filamentos de 120-130 Å de diámetro en los que las CPs se ordenan de manera helicoidal con aproximadamente 9 subunidades por giro dejando un estrecho canal en el centro de la hélice. Años después, el mismo grupo comparó la simetría de tres potexvirus, PVX, el virus del mosaico de la papaya (PapMV) y el virus del mosaico del narciso (NMV) (Kendall et al. 2013). Los modelos a baja resolución propuestos para estos potexvirus mostraban una simetría helicoidal dextrógira, tal y como se observó para los virus filamentosos rígidos como TMV (Namba y Stubbs 1986). No obstante, en los últimos años se han

obtenido reconstrucciones por crioEM a alta resolución del potexvirus del mosaico del bambú (BaMV) (DiMaio et al. 2015), del potyvirus del mosaico de la sandía (WMV) (Zamora et al. 2017) y del potyvirus Y de la patata (PVY) (Kežar et al. 2019), además del modelo de PepMV (Agirrezabala et al. 2015) que se presenta en esta tesis. Estos modelos confirman que los virus filamentosos flexuosos presentan una simetría helicoidal levógira (Figura 1), y no dextrógira como se había propuesto erróneamente en el pasado.

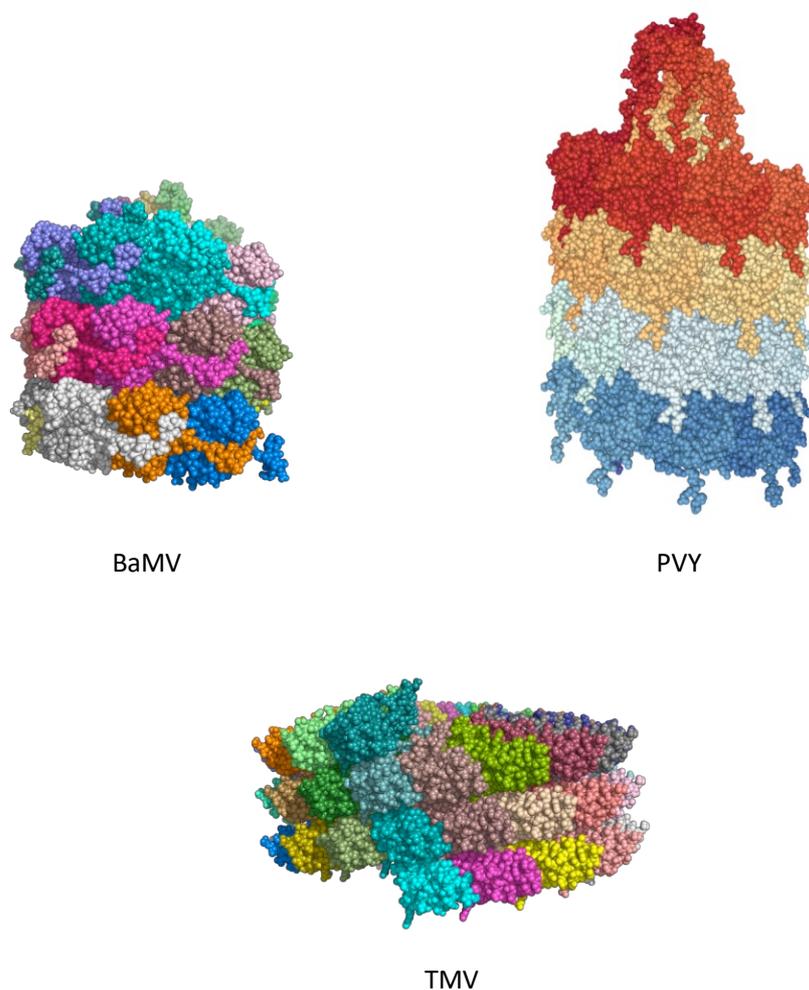


Figura 1. Arquitectura de los virus filamentosos flexuosos y filamentosos rígidos. En la parte superior se muestran las estructuras del virión del potexvirus del mosaico del bambú (BaMV) (código PDB 5a2t) (DiMaio et al. 2015) y del potyvirus Y de la patata (PVY) (código PDB 6hxx) (Kežar et al. 2019) en las que se aprecia una ordenación helicoidal levógira de las CPs. En la parte inferior se muestra la estructura del virión del tobamovirus del mosaico del tabaco (TMV) (código PDB 2om3) (Sachse et al. 2007) que muestra la arquitectura helicoidal dextrógira de los virus filamentosos rígidos de plantas. Cada CP se representa de un color.

La determinación de las estructuras de PepMV y BaMV por un lado, y WMV y PVY por otro, han permitido la comparación de partículas filamentosas flexuosas de dos familias muy alejadas filogenéticamente (*Alphaflexiviridae* y *Potyviridae*) casi a nivel atómico. Se ha comprobado que tienen una arquitectura casi idéntica con un pitch de 34,5-35 Å y 8,8 subunidades por giro. Esta similitud estructural se debe a una homología en el ensamblaje de las CPs que a su vez se debe a la enorme similitud de la topología de las CPs de las dos familias, pese a tener secuencias aminoacídicas muy diferentes. Las CPs de estos virus tienen tres regiones: una región central rica en hélices alfa que forma región central de la proteína, un brazo flexible en el extremo N terminal, y una extensión también flexible en el extremo C terminal (Figura 2A). El brazo flexible N terminal establece la polimerización lateral de la hélice al interactuar con un surco hidrofóbico en la región central de su CP vecina (Figura 2B). El extremo C terminal queda oculto en el canal interior de la hélice y participa en el ensamblaje longitudinal de la cápsida (Agirrezabala et al. 2015; DiMaio et al. 2015; Kežar et al. 2019; Zamora et al. 2017). Ambos contactos permiten cierto movimiento entre subunidades que confiere la flexibilidad a la partícula viral (DiMaio et al. 2015; Zamora et al. 2017). La mayor diferencia en el ensamblaje de las CPs entre los potexvirus y los potyvirus radica en que mientras que para los potexvirus el brazo N terminal de una subunidad se proyecta horizontalmente y contacta únicamente de manera lateral con su CP vecina (Agirrezabala et al. 2015; DiMaio et al. 2015), en los potyvirus el brazo N terminal contacta con su CP vecina y luego gira siguiendo el eje longitudinal contactando con la CP del giro del nivel inferior de la hélice (Figura 2B) (Kežar et al. 2019; Zamora et al. 2017). Es decir, el brazo flexible en el extremo N terminal de la CP de los potyvirus soporta la polimerización lateral y longitudinal (Kežar et al. 2019; Zamora et al. 2017).

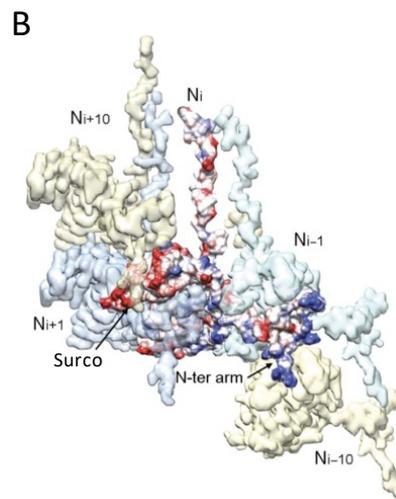
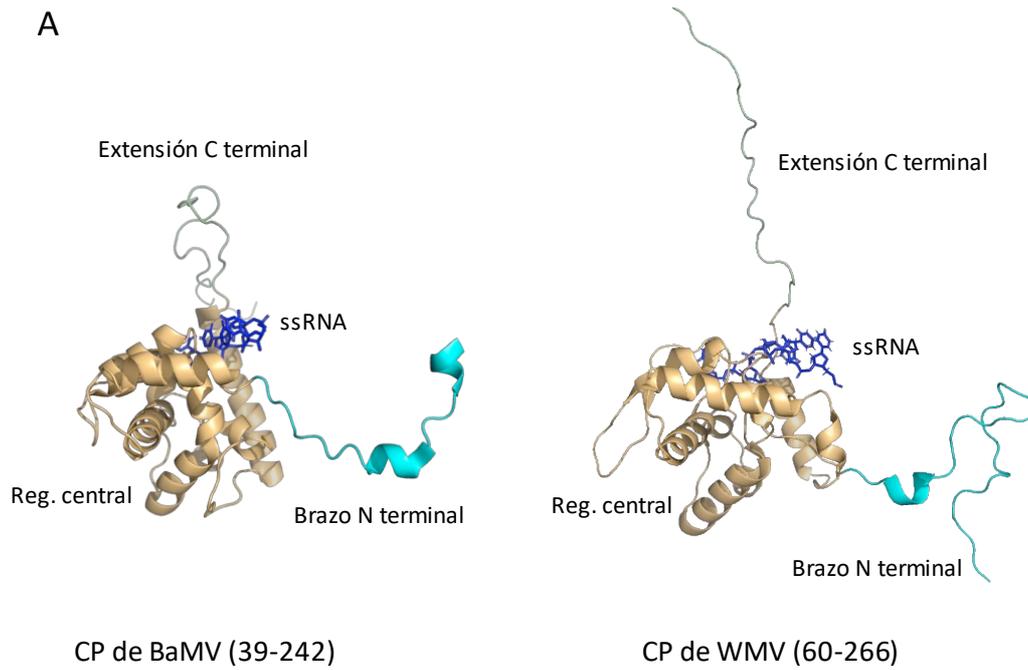


Figura 2. Estructura de la CP de los virus filamentosos flexuosos de plantas. (A) Representación de la CP del virus del mosaico del bambú (BaMV) (código PDB 5a2t) y del virus del mosaico de la sandía (WMV) (código PDB 5odv) en las que se representa en cian el brazo N terminal, en dorado la región central de la proteína, y en verde claro el extremo C terminal. En azul oscuro se representa un fragmento del genoma viral unido al bolsillo de unión a RNA. Entre paréntesis, junto al nombre de cada proteína, aparece el intervalo de aminoácidos que forman la estructura. (B) Imagen modificada de Zamora et al. (2017). Representación de 5 CPs de WMV ensambladas y pertenecientes a 3 giros diferentes de la hélice de la partícula viral. La subunidad N_i está coloreada en función del potencial electrostático de su superficie.

3.1.2. Homología estructural entre las CPs de los virus filamentosos flexuosos de plantas

Como se ha adelantado en el apartado anterior, las CPs de las familias de virus filamentosos flexuosos de plantas presentan un plegamiento y topología muy similares a pesar de la baja identidad de secuencia entre ellas (Figura 3A). La superimposición de las estructuras de las regiones centrales de las CPs de los potexvirus y de los potyvirus presentan un valor de desviación media cuadrática (RMSD) por debajo de 3 Å (Kežar et al. 2019; Zamora et al. 2017). Esta homología topológica contribuye a la hipótesis de la transferencia horizontal del gen de la CP entre familias filogenéticamente alejadas, pero que comparten una arquitectura helicoidal flexuosa (Dolja y Koonin 2018).

Otra característica común de las CPs de los virus filamentosos flexuosos de plantas es la manera de unirse al RNA viral. Tanto la CP de los potexvirus como la de los potyvirus, unen cinco nucleótidos en un surco que continúa en cada CP a lo largo de la hélice para formar el virión (Agirrezabala et al. 2015; DiMaio et al. 2015; Kežar et al. 2019; Zamora et al. 2017). En la región central de estas CPs hay un bolsillo de unión a RNA en cuyo fondo encaja un nucleósido mientras que alrededor ocurren interacciones entre residuos de la CP y el esqueleto de fosfato del RNA (Figura 2A). En concreto, existen tres aminoácidos (una serina, una arginina y un ácido aspártico) conservados en el bolsillo de unión a RNA de las CPs de las cuatro familias de virus filamentosos flexuosos de plantas (Dolja, Agranovsky, y Koonin 1991; Zamora et al. 2017) (Figura 3B), a excepción de las CPs de dos potexvirus, BaMV y el virus del mosaico de la cebadilla (foxtail mosaic virus, FoMV), que tienen una histidina en lugar de la arginina. Hoy en día no existen más mapas en 3D de otros virus de plantas filamentosos flexuosos, pero este bolsillo de unión a RNA está muy conservado en las CPs de estos virus y es muy posible que la topología y la manera de ensamblar el virión sea muy similar para todas estas CPs. Recientemente, se ha observado en el modelo de la partícula de PVY que existe un segundo sitio de interacción entre la CP y el RNA viral que se encuentra en el extremo C terminal que se proyecta longitudinalmente en el canal interior (Kežar et al. 2019).

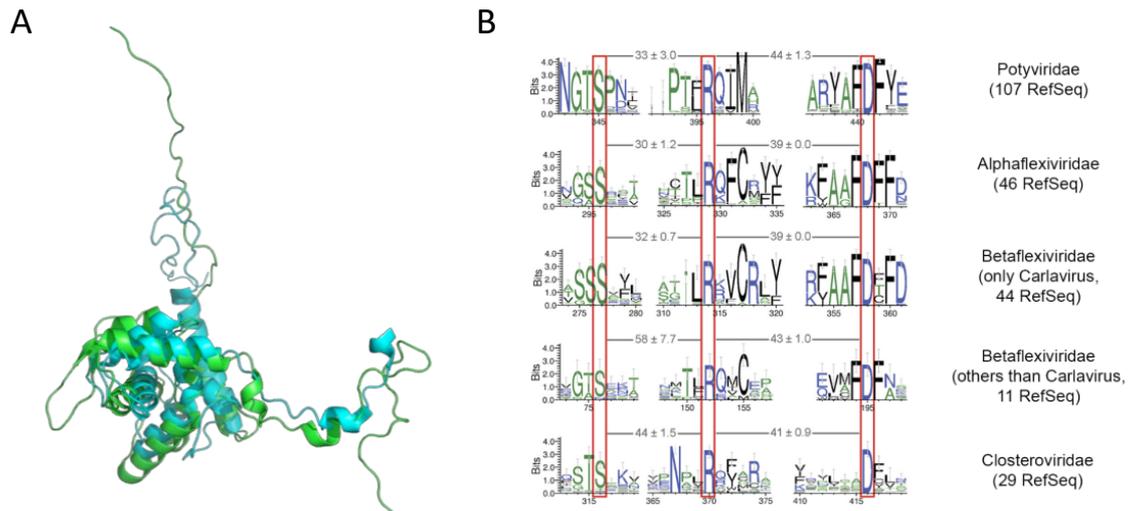


Figura 3. Homología estructural entre las CPs de los virus filamentosos flexuosos. (A) Alineamiento estructural de las CPs del virus del mosaico del bambú (BaMV) (azul) y del virus del mosaico de la sandía (WMV) (verde). (B) Imagen modificada de Zamora et al. (2017). Secuencias logo consenso de las CPs de diferentes familias de virus de plantas filamentosos flexuosos. Indicado en gris y con números se representa la distancia calculada por el número de residuos (media y desviación estándar) entre los aminoácidos invariantes (Ser, Arg y Asp) encuadrados en rojo. El número de secuencias de referencias (RefSeq) alineadas para cada familia se indica debajo del nombre. Los aminoácidos hidrofílicos, neutrales o hidrofóbicos representados en el esquema están coloreados de azul, verde o negro, respectivamente.

Los mapas 3D disponibles de CPs de virus flexuosos de plantas muestran una región intrínsecamente desordenada (dominio NID) en el extremo del brazo N terminal (Agirrezabala et al. 2015; DiMaio et al. 2015; Yang et al. 2012). El dominio NID ha sido predicho para miembros de las cuatro familias de virus flexuosos y es muy variable en longitud y secuencia (Solovyev y Makarov 2016). No se han encontrado dominios NID en las CPs de los virus filamentosos rígidos de plantas (Solovyev y Makarov 2016), pero sí en la CP de virus icosaédricos y parecen participar en la estabilización de la cápsida, en el control de la encapsidación, desencapsidación y en la interacción con ácidos nucleicos (Helgstrand et al. 2004). El dominio NID no es necesario para que se forme el virión en los potexvirus (Chapman et al. 1992; Lan et al. 2010; Lico et al. 2006; Ozeki et al. 2009), pero este tipo de motivos desordenados queda expuesto al exterior del virión y a veces se ha relacionado con reconocimiento molecular (Fink 2005; van der Lee et al. 2014; Van Der Lee et al. 2014; Uversky 2011). Para algunos potexvirus, el dominio NID de la CP se ha relacionado con la interacción con factores del huésped, movimiento, inducción de síntomas y con la prevención de agregación de viriones (Solovyev y Makarov 2016).

3.1.3. Diferencias entre la CP de virus filamentosos rígidos y flexuosos

Las estructuras de las partículas de los virus filamentosos rígidos TMV y del virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV), miembros tipo de los géneros *Tobamovirus* y *Hordeivirus*, respectivamente, han sido resueltas a alta resolución mediante crioeM (Clare et al. 2015; Clare y Orlova 2010; Ge y Zhou 2011; Sachse et al. 2007). Además, existen modelos de las CPs de otros tobamovirus obtenidos por difracción de fibra (Bhyravbhatla, Watowich, y Caspar 1998; Namba, Pattanegek, y Stubbs 1989; Pattanayek y Stubbs 1992; Stubbs, Warren, y Holmes 1977; Tewary et al. 2011; Wang y Stubbs 1994). Estos estudios han mostrado que las CPs de los virus filamentosos rígidos tienen un plegamiento muy similar, y la manera de ensamblarse y unirse al RNA es casi idéntica entre los géneros *Tobamovirus* y *Hordeivirus*. Probablemente, las CPs de los virus filamentosos rígidos tengan un origen evolutivo común y su topología y oligomerización sea similar para todos ellos (Krupovic et al. 2019; Krupovic y Koonin 2017). Estas CPs tienen una región central formada por cuatro hélices principales prácticamente paralelas, dos hélices menores en los extremos N y C terminales que están expuestas en la superficie del virión, y una pequeña lámina beta (Figura 4A y 4B). Todos estos elementos se orientan en el eje radial al formar el virión. Esta estructura no se parece en absoluto a la topología de las CPs de los virus filamentosos flexuosos (Figura 3C), y tampoco existen similitudes entre el ensamblaje o el contacto con el RNA. Esto sugiere que ambos tipos de CP no tengan un origen evolutivo común, y según el modelo propuesto en los trabajos de Krupovic et al. (2019) y Krupovic y Koonin (2017), provendrían de diferentes proteínas celulares ancestrales.

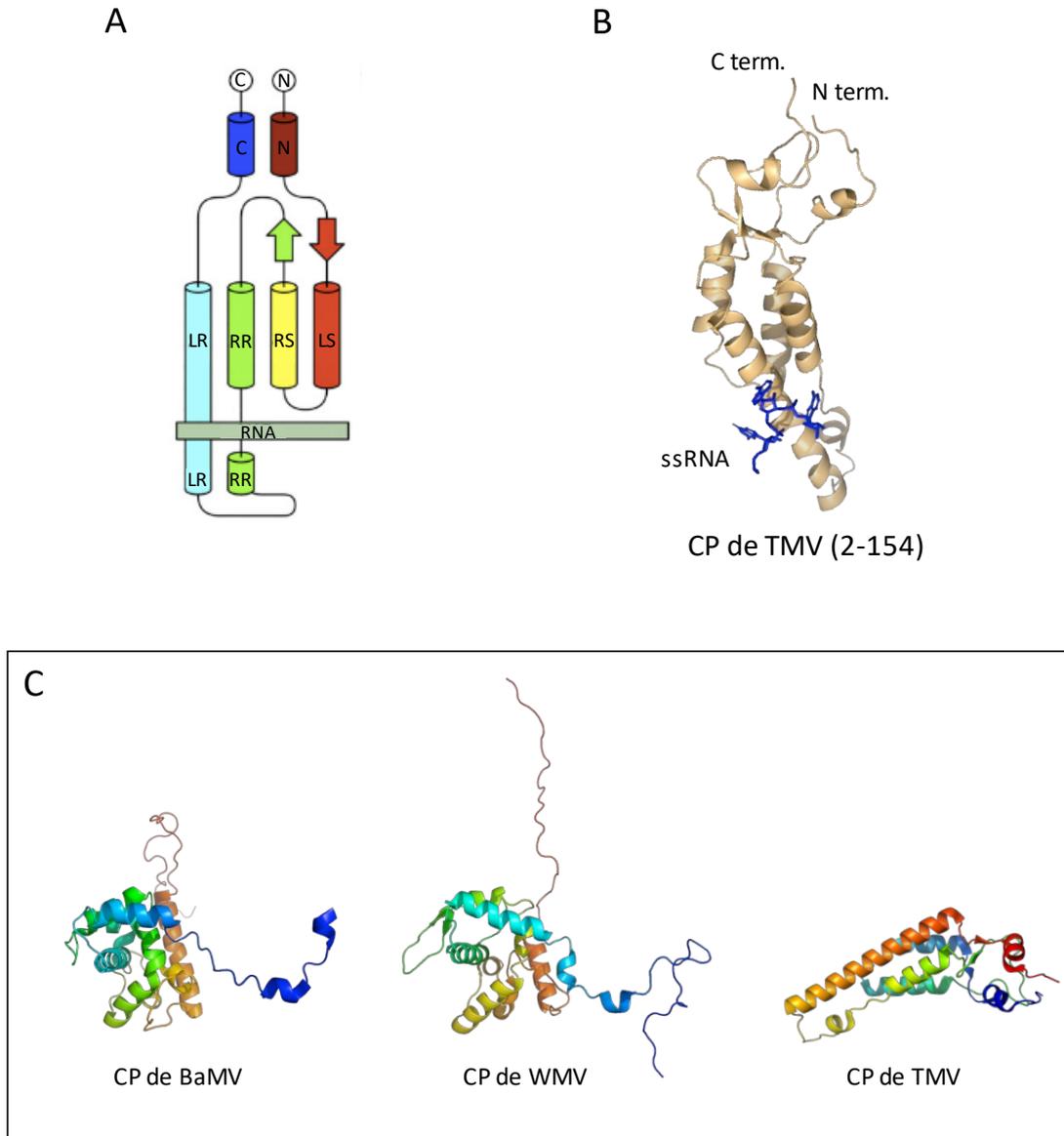


Figura 4. Estructura de la CP de un virus filamentosos rígido tipo y su comparación con la CP de los virus filamentosos flexuosos. (A) Imagen modificada de Sachse et al. (2007) que muestra el esquema topológico de la CP del virus del mosaico del tabaco (TMV) y el sitio de unión del RNA viral al formar el virión. N y C señalan las hélices alfa menores de los extremos N y C de la proteína; LR, RR, RS, LS representan las cuatro hélices alfa mayores. (B) Modelo estructural de la CP de TMV (código PDB 6i5a) (Song et al. 2019). En azul se representa la posición del RNA viral (ssRNA) en el virión ensamblado. (C) Modelos estructurales de la CP del virus del mosaico del bambú (BaMV) (DiMaio et al. 2015), del virus del mosaico de la sandía (WMV) (Zamora et al. 2017) y TMV (Song et al. 2019) coloreadas de colores más fríos a más cálidos desde el extremo N terminal al C terminal.

3.1.4. Ensamblaje del virión de potexvirus

Existen algunos trabajos sobre PapMV que abordan cómo ocurre el ensamblaje de la partícula viral de los potexvirus (Lecours et al. 2006; Tremblay et al. 2006). Estos trabajos realizados *in vitro* a partir de CP expresada en *E. coli* sugieren que primero oligomerizan unas 20 CPs en forma de discos helicoidales que luego se unen al RNA viral y se van ensamblando hasta formar el virión (Lecours et al. 2006; Tremblay et al. 2006). Este modelo es similar al descrito para TMV (Klug 1999). Se ha propuesto que la fosforilación del extremo N terminal de la CP modula la estabilidad de la partícula viral de los potexvirus (Lecours et al. 2006), y existen evidencias de que el extremo N terminal se puede glicosilar (Tozzini et al. 1994). La glicosilación del extremo N terminal de la CP parece tener el papel de crear una capa de moléculas de agua alrededor del virión que puede ser importante para mantener la morfología de la partícula viral (Baratova et al. 2004).

La CP de los potexvirus es capaz de unirse a RNA sin especificidad de secuencia (Agirrezabala et al. 2015) y, sin embargo, únicamente encapsida el genoma viral. Esto conduce a la idea de un origen de encapsidación (OAS) en el RNA viral que desencadene el ensamblaje de las CPs a su alrededor. Se han descrito OAS para muchos géneros virales (Newburn y White 2015). Para algunos potexvirus, se ha descrito que el OAS se ubica en el extremo 5' del genoma viral, en particular en la primera estructura tallo-bucle 5'SL1 (Kwon et al. 2005; Sit, Leclerc, y Abou Haidar 1994) que abarca, principalmente, parte de la región 5' no traducida (5'UTR), y también el principio de la secuencia del ORF1. En estos trabajos se pone en evidencia que al menos las CPs de PVX y PapMV no son capaces de formar la partícula viral en ausencia del RNA. Por el contrario, se ha descrito que la CP del virus del mosaico de Althernantera (Althernantera mosaic virus, AltMV) es capaz de formar partículas virales libres de RNA (Mukhamedzhanova 2011). Esto sugiere que no es una generalidad para las CPs de los potexvirus que se necesite la mediación del RNA viral para formar cápsidas filamentosas flexuosas. Para PVX, también se ha comprobado que la caperuza 5' es importante para desencadenar la encapsidación del RNA viral (Petrova et al. 2013), y que probablemente juega un papel conformacional que facilita la interacción entre la CP y el elemento de RNA 5'SL1. Cabe destacar que todos los trabajos en relación con la encapsidación de los

potexvirus se han realizado *in vitro* y tomando como modelo unos pocos miembros del género.

Además de iniciar la encapsidación del genoma viral, el elemento 5'SL1 y su entorno participan en otros procesos del ciclo viral. El bucle apical formado por el tetranucleótido GAAA del 5'SL1 de PVX, así como la primera de cinco repeticiones de la secuencia ACCA aguas arriba del 5'SL1 son necesarias para la replicación del virus (Kim et al. 1996; Kwon y Kim 2006; Miller et al. 1998; Miller, Kim, y Hemenway 1999; Park et al. 2008). También se ha descrito un octanucleótido en el 5'UTR de PVX que complementa con octanucleótidos en las regiones promotoras de los RNAs subgenómicos (sgRNAs) 1 y 2 que participan en la acumulación de los sgRNAs y el RNA de polaridad negativa (Hu, Pillai-Nair, y Hemenway 2007).

3.1.5. Desensamblaje de la partícula y activación de la traducción del RNA de potexvirus

Si consideramos la entrada del virus en una célula como el punto de inicio de la infección viral, lo que ocurre inmediatamente después es el desensamblaje del virión. En el caso de TMV se han propuesto dos modelos que son compatibles entre ellos: el desensamblaje cotraduccional, y el desensamblaje correplicativo (Shaw, Plaskitt, y Wilson 1986; Wu y Shaw 1997; Wu, Xu, y Shaw 1994). En el modelo cotraduccional, las CPs que unen el extremo del 5' del genoma viral se desestabilizan y dejan expuesto el 5'UTR del RNA al que se une el ribosoma. Con el inicio de la traducción del ORF1, que codifica la RdRp, se va liberando el RNA viral. En el modelo de desensamblaje correplicativo, la RdRp recién traducida se une al promotor del 3'UTR del genoma viral y desplaza las CPs unidas al RNA conforme sintetiza la cadena complementaria de polaridad negativa (Wu y Shaw 1997).

En el caso de los potexvirus, se ha observado que los viriones de PVX no se traducen en germen de trigo, pero al fosforilarse el N terminal de la CP, se desestabiliza la partícula viral y el RNA se vuelve traducible (Atabekov et al. 2001). Por otro lado, incrementos en la concentración de la proteína viral TGB1 en incubaciones con viriones

de PVX en germen de trigo, resultan en la traducción del RNA viral (Atabekov et al. 2000; Kiselyova et al. 2003; Rodionova et al. 2003). La capacidad de la TGB1 de desencadenar la traducibilidad del RNA viral está mediada por la interacción directa entre la TGB1 y el extremo 5' del virión (Karpova et al. 2006; Rodionova et al. 2003). Se ha propuesto que, tras la transmisión del virus de una planta a otra, el virión se desensambla por la fosforilación de las CPs mediada por kinasas del huésped y se inicia la traducción del RNA viral. Una vez puesta en marcha la infección viral, la TGB1 se une al extremo 5' de los viriones recién formados y participa en el movimiento del virus a las células vecinas donde desencadena el desensamblaje cotraduccional del RNA viral sin dependencia de las kinasas del huésped (Atabekov et al. 2000, 2001; Rodionova et al. 2003; Verchot-Lubicz, Ye, y Bamunusinghe 2007).

1.2. Biología de PepMV

PepMV es un virus de gran importancia agronómica porque es el causante de una preocupante enfermedad que afecta a los cultivos de tomate de gran parte del mundo y origina graves pérdidas económicas (Hanssen y Thomma 2010). Fue descrito por primera vez en cultivos de pepino dulce en Perú (Jones, Koenig, y Lesemann 1980), y en 1999 se describió por primera vez como patógeno de tomate en Holanda (Van Der Vlugt et al. 2002). A día de hoy, la enfermedad causada por PepMV afecta a cultivos de las principales zonas productoras de tomate de América, Marruecos y Europa (Gómez et al. 2012), y está incluido en la lista de alertas de la Organización Europea de Protección de Cultivos (EPPO). En España se describió por primera vez en el año 2000 (Jordá et al. 2001) y la mayor incidencia de la enfermedad causada por PepMV se da en las provincias de Murcia, Almería, Granada y en el Archipiélago Canario (Gómez-Aix et al. 2019; Gómez et al. 2009; Pagán et al. 2007; Soler-Aleixandre et al. 2007). Los síntomas descritos de esta enfermedad varían en función de las condiciones ambientales y del aislado (Hanssen y Thomma 2010). Es habitual observar abullonamiento de las hojas, maduración irregular del fruto y una merma en la producción de las plantas de tomate

infectadas con PepMV, pero también se conocen aislados necrogénicos más agresivos (Hasiów-Jaroszewska et al. 2013; Sempere, Gomez-Aix, et al. 2015). PepMV se transmite mecánicamente y es complicado conciliar las labores de mantenimiento de las plantas con una buena profilaxis para contener su diseminación en las explotaciones. A pesar de los intentos repetidos de identificación de fuentes de resistencia (Soler-Aleixandre et al. 2007), no existen variedades comerciales de tomate resistentes a PepMV. Por otro lado, la protección cruzada utilizando cepas poco agresivas de PepMV se ha observado eficaz para proteger los cultivos de aislados más agresivos (Agüero et al. 2018; Hanssen, Guriérrez-Aguirre, et al. 2010). También se ha descrito que, con una baja probabilidad, PepMV puede transmitirse por semilla (Hanssen, Mumford, et al. 2010; Salomone y Roggero 2002), a través del hongo *Oplidium virulentus* (Alfaro-Fernández et al. 2010), por los abejorros utilizados para fertilizar las flores (Shipp et al. 2008) e, incluso, por mosca blanca (Noël, Hance, y Bragard 2014), aunque en estos últimos tres casos lo más probable es que no exista especificidad en la transmisión. El estudio de la biología de la infección por PepMV puede conducir al desarrollo de nuevas estrategias de protección de cultivos frente a PepMV, y a la generación de variedades resistentes.

3.1.6. Organización genómica de PepMV

El genoma de PepMV es una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva con una caperuza en el 5' (5'Cap) y una cola poliadenilada (poliA) en su extremo 3', y contiene cinco marcos abiertos de lectura (ORFs) flanqueados por regiones 5' y 3' no traducidas (5'UTR y 3'UTR) (Figura 5). A grandes trazos, el ciclo infectivo de los potexvirus comienza una vez que el virus penetra en la célula y se desencapsida el RNA genómico (gRNA). El ORF1 se traduce directamente del gRNA y codifica una RdRp que sintetiza la cadena de polaridad negativa del genoma viral vRNA(-) y 3 RNAs subgenómicos (sgRNAs) a partir de los cuales se traducen las proteínas del bloque de tres genes 1, 2 y 3 (TGB1 TGB2 y TGB3) y la proteína de la cápsida (CP). Los sgRNAs también tienen 5'Cap y cola poliA (Figura 4).

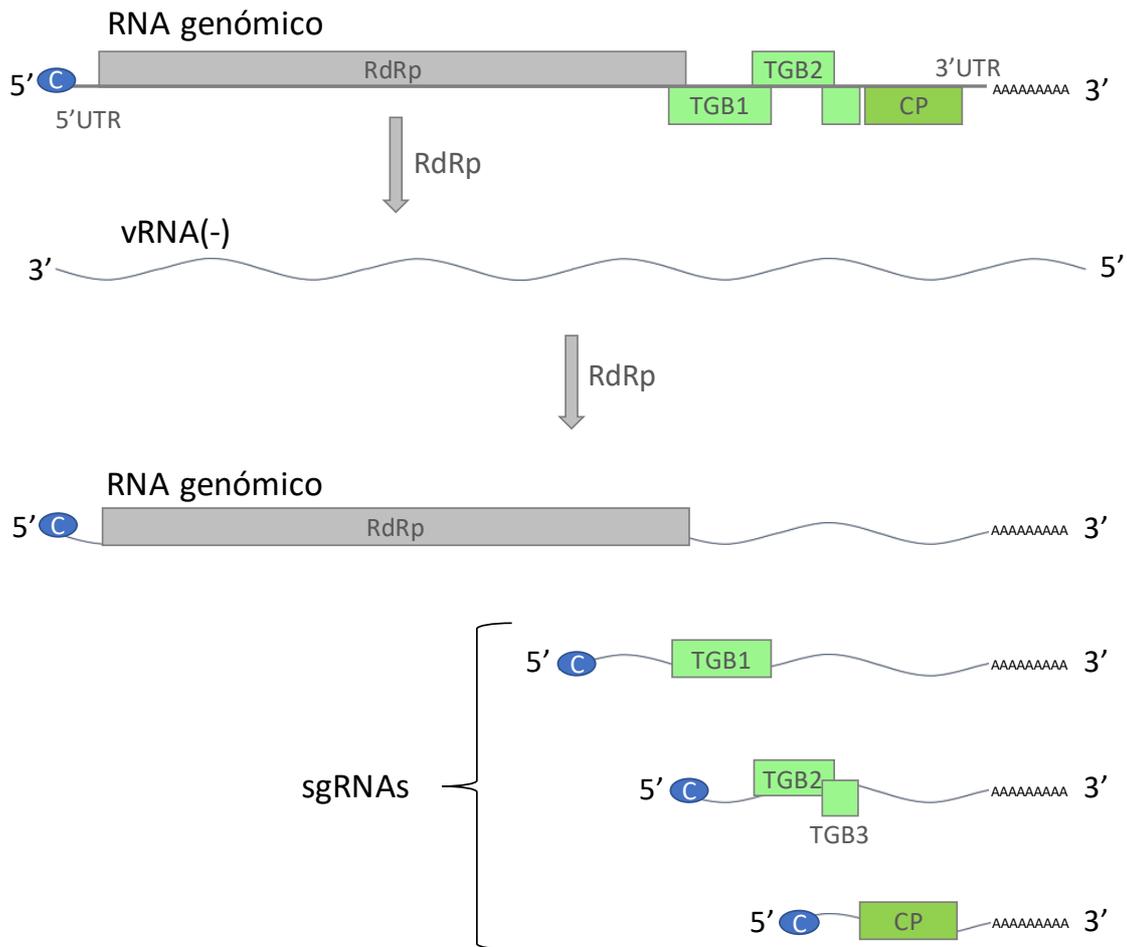


Figura 5. Organización genómica de PepMV y su replicación. Representación esquemática del RNA genómico, RNA de polaridad negativa (vRNA(-)), y los tres RNAs subgenómicos (sgRNAs). En el RNA genómico se representa la caperuza 5' (C), la cola 3' poliA, las regiones 5' y 3' no traducidas (5'UTR y 3'UTR), y los 5 marcos abiertos de lectura que codifican: una polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRP), las proteínas del bloque de tres genes (TGB1, TGB2 y TGB3) y la proteína de la cápsida (CP). En cada sgRNAs se representa qué ORF se traduce.

3.1.7. Las proteínas virales RdRp y TGBs

Hasta el momento solo he descrito aspectos estructurales de la CP y de la partícula de los potexvirus; antes de entrar en detalle en la biología de los potexvirus, conviene introducir el resto de proteínas virales. Las proteínas no estructurales de los potexvirus reorganizan el citoesqueleto y endomembranas del retículo endoplásmico (RE) y del aparato de Golgi para poner en marcha los complejos de replicación del virus (VRCs), donde se compartimentaliza y protege la replicación (Laliberté y Sanfaçon 2010; Laliberté y Zheng 2014; Ruiz-Ramón et al. 2019; Tilsner et al. 2012). Las proteínas TGB y

la CP participan en el transporte de la descendencia viral a las células vecinas a través de los plasmodesmos (PD) (Park, Jeong, y Kim 2014).

La RdRp es la primera proteína viral que se expresa tras la infección de la célula. Aunque para los potexvirus no está claro dónde ocurren las primeras rondas de replicación, las replicasas de algunos virus se asocian con endomembranas celulares y reclutan factores del huésped para crear un entorno favorable para la replicación (Mackenzie 2005; Park, Seo, y Kim 2013; Sanfaçon y Zhang 2008). La RdRp de PepMV tiene tres dominios funcionales: un dominio metiltransferasa que coloca el 5'cap de los RNAs virales, un dominio helicasa que separa dúplex de RNA durante la replicación, y un dominio ribonucleotidil transferasa que sintetiza nuevas cadenas de RNA. La RdRp sintetiza la cadena de polaridad negativa del genoma viral vRNA(-) usando como molde el gRNA. También sintetiza los 3 RNAs subgenómicos (sgRNAs) que codifican (i) la TGB1 traducida a partir del ORF2, (ii) las TGB2 y TGB3 traducidas a partir de los ORFs 3 y 4 respectivamente, y (iii) la CP traducida a partir del ORF 5 (Figura 5).

Las proteínas TGB son factores virales que, entre otras cosas, están implicados en el reclutamiento de vesículas del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi en los VRCs (Ruiz-Ramón et al. 2019; Tilsner et al. 2012). Son críticas en el tráfico intra-celular e inter-celular del RNA viral (Park et al. 2014). Por otro lado, ninguna de las TGBs son necesarias para la replicación (Beck et al. 1991; Morozov y Solovyev 2003; Tilsner et al. 2012; Verchot, Angell, y Baulcombe 1998), ni para la encapsidación (Tilsner et al. 2012). Las proteínas TGBs también se encuentran en otros géneros de virus filamentosos. Los géneros con TGBs se pueden clasificar en virus similares a potexvirus (*potex-like viruses*) y virus similares a hordeivirus (*hordei-like virus*) (Adams et al. 2004; King et al. 2011). Para BSMV, que es un hordeivirus, se ha descrito que los niveles de expresión de las proteínas TGB están regulados por la síntesis de los sgRNAs y que las proteínas se acumulan con una proporción TGB1:TGB2:TGB3 de 100:10:1 (Jackson et al. 2009; Johnson et al. 2003). Es de esperar que en el caso de los potexvirus ocurra algo parecido, y que exista un desfase temporal en los picos de acumulación de la TGB1, por un lado, y las proteínas TGB2 y 3 por otro, durante el ciclo infectivo viral.

La proteína TGB1 pertenece a la superfamilia I de las helicasas de DNA/RNA y tiene 7 motivos helicasa conservados. El sustrato de la TGB1 de los potexvirus son dúplex de RNA y su actividad helicasa es dependiente de Mg^{2+} y de la hidrólisis de ATP (Han et al. 2007; Kalinina et al. 2002; Leshchiner et al. 2006; Lin et al. 2004; Liou et al. 2000). La TGB1 es, por lo tanto, una proteína con actividad NTPasa y helicasa, capaz de unirse a RNA. Por su parte, la proteína TGB2 tienen dos dominios transmembrana predichos que interaccionan con la membrana del RE (Mitra et al. 2003; Morozov y Solovyev 2003). Se ha comprobado para BaMV que TGB2 se ancla a la membrana del retículo en forma de U quedando los extremos N y C terminales de la proteína expuestos en el citoplasma, y la región central entre los dominios transmembrana queda en el lumen del RE (Hsu et al. 2008). Además, TGB2 es capaz de unirse a RNA sin especificidad de secuencia (Cowan et al. 2002; Hsu et al. 2009). La proteína TGB3 se traduce por escape del proceso de rastreo ribosomal (*leaky scanning*) del codón de inicio de la traducción de la TGB2 (Verchot et al. 1998), y también es una proteína integral de membrana del RE (Krishnamurthy et al. 2003). TGB3 tiene un único dominio transmembrana. Su extremo N terminal está expuesto al lumen del RE y es rico en residuos de carga negativa, mientras que su extremo C terminal queda expuesto al citoplasma (Krishnamurthy et al. 2003; Morozov y Solovyev 2003). TGB3 tiene un péptido señal en su extremo citoplasmático C terminal muy conservado entre los potexvirus que media su transporte a los túbulos del RE cortical y que es necesario para su oligomerización (Wu, Lee, y Wang 2011).

3.1.8. Infección temprana

La infección temprana se puede delimitar temporalmente entre el momento en el que el virus entra en la célula hasta la compartimentalización de la replicación en los VRCs. Se acepta que las primeras rondas de traducción de las proteínas virales y la formación de los primeros viriones ocurre en el citoplasma, mientras que comienza el remodelado ultraestructural de la célula mediado por las proteínas virales. Una parte muy importante de los datos referentes a estos aspectos se han obtenido usando el

modelo experimental PVX/*N. benthamiana*, y los grupos del Dr. Oparka (Universidad de Edimburgo, Escocia) y del Dr. Tilsner (Universidad de St. Andrews, Escocia) han liderado la obtención de observaciones y la propuesta de modelos para explicarlas, como se describe a continuación.

Al inicio de la infección, TGB1 y CP se localizan dentro del canal del PD (Samuels et al. 2007; Tilsner et al. 2013). Por otro lado, TGB2 y TGB3 se acumulan en el orificio de entrada al PD y empiezan a remodelar las membranas del RE cortical formando una estructura que taponan el PD (Tilsner et al. 2013) (Figura 6A). En este tapón se recluta la replicasa del virus y se empieza a acumular RNA viral, lo que sugiere que esta estructura sea un punto de replicación del virus (Tilsner et al. 2013). En paralelo, la TGB2 induce la formación de gránulos a partir de membranas de los túbulos del RE y recluta TGB3 (Tilsner et al. 2013) (Figura 6A). Ambas parecen actuar como heterodímero (Lee, Wu, y Wang 2010). Se ha descrito la presencia de viriones y ribosomas en los gránulos formados por TGB2/3 y también se han asociado con la replicación de PVX (Bamunusinghe et al. 2009; Ju et al. 2005). Esto sugiere que puedan funcionar como incipientes factorías virales. Las TGB2/3 dirigen los gránulos a los PDs y los tapones de los PD se agrandan (Tilsner et al. 2013). Los gránulos TGB2/3 encuentran rápidamente el PD debido a que la superficie del RE es muy móvil y discurre de manera continua a través del PD (Tilsner, Amari, y Torrance 2011). Hoy en día, se acepta para los potexvirus el modelo propuesto por Tilsner et al. (2013) que sugiere que en los tapones del PD se acoplan la replicación y el transporte célula a célula del virus, y se forman incipientes VRCs (Figura 6B). En este modelo, la replicasa viral se ancla a la membrana de los tapones del PD y sintetiza los RNAs virales. Algunas cadenas nacientes son utilizadas por ribosomas como molde para producir proteínas virales. En otras ocasiones, TGB1 separa el 5' del gRNA recién sintetizado, y la CP encapsida parcial o totalmente el gRNA (Tilsner y Oparka 2012). A continuación, TGB1 se une al extremo 5' del virión (Atabekov et al. 2000; Karpova et al. 2006; Zayakina et al. 2008) y completa el complejo ribonucleoproteico de movimiento. Luego, TGB1 dirige el complejo a través del PD (Tilsner et al. 2013). TGB2, que tapiza la superficie del RE que atraviesa el canal del PD, interacciona con la CP, el RNA y TGB1 (Hsu et al. 2009; Wu et al. 2011). Además, se sabe que TGB2 y en menor medida TGB3, reclutan TGB1 al PD (Tilsner et al. 2013) y que TGB1

induce la dilatación del poro del PD (Howard et al. 2004). Esto sugiere que TGB2 guíe el paso de la ribonucleoproteína de movimiento a través del canal del PD.

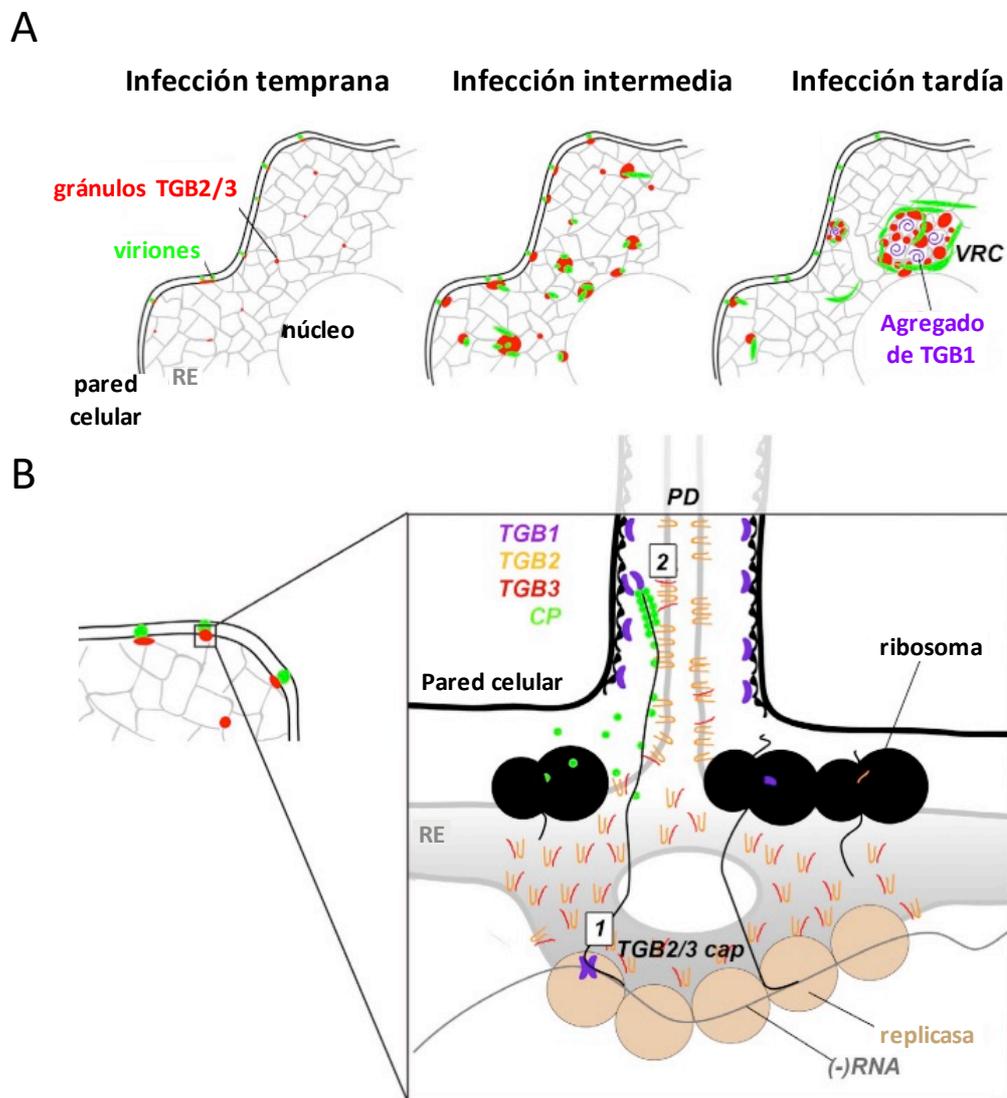


Figura 6. Modelo temporal de la infección de PVX y del transporte correplicativo del virus a través del plasmodesmo (PD). Figura modificada de Tilsner et al. (2013). (A) Desarrollo de los sitios de replicación de PVX. En infección temprana, los gránulos TGB2/3 son móviles sobre la red del RE y se anclan al PD donde ocurre la introducción de viriones en el poro. Luego, los sitios de replicación asociados a PD aumentan de tamaño por reclutamiento de más gránulos TGB2/3 y forman las estructuras en forma de tapón del PD. A tiempos tardíos de la infección, los gránulos TGB2/3 se acumulan alrededor de agregados de TGB1 formando los complejos de replicación del virus (VRCs) que suelen localizarse perinuclearmente. (B) En las estructuras en forma de tapón del PD (TGB2/3 cap), TGB2 y TGB3 han remodelado el RE adyacente al PD donde se ancla un VRC. El RNA sintetizado por la replicasa es derivado hacia movimiento célula a célula, quizá con la participación de la TGB1 como helicasa (caja 1). El RNA viral nascente se empieza a encapsidar inmediatamente. TGB1 se une al virión parcialmente encapsidado y lo dirige al PD (caja 2).

3.1.9. Formación de los VRCs

En las células en fase avanzada de infección por potexvirus se establece un VRC de gran tamaño generalmente perinuclear (Figura 6A). Se ha descrito para PVX que su formación tiene como actor principal la TGB1 (Tilsner et al. 2012). TGB1 reordena el citoesqueleto de la célula y forma agregados de actina donde se acumulan membranas del RE y del Golgi (Tilsner et al. 2012) (Figura 7). En plantas, el aparato de Golgi y el RE cortical son muy móviles y se estructuran sobre el citoesqueleto de actina (Boevink et al. 1998; Sparkes et al. 2009). El reclutamiento de las endomembranas del RE y el Golgi implica la incorporación a los VRCs de la TGB2, la TGB3, la RdRp, el RNA viral y ribosomas (Bamunusinghe et al. 2009; Ju et al. 2005; Tilsner et al. 2009, 2012, 2013). Los VRCs muestran una regionalización de sus componentes (Figura 7): la TGB1 aparece en acúmulos en el centro del VRC que están rodeados por microfilamentos de actina; la siguiente capa se compone de vesículas granulares del RE y el aparato de Golgi asociadas con TGB2 y 3 que colocalizan con el RNA viral desnudo; el VRC se encuentra dentro de una jaula formada por viriones que probablemente sea la descendencia viral (Linnik et al. 2013; Tilsner et al. 2012). Mutaciones individuales de las tres TGBs han demostrado que ninguna de ellas es indispensable para la replicación (Batten, Yoshinari, y Hemenway 2003; Beck et al. 1991; Morozov y Solovyev 2003; Tilsner et al. 2012; Verchot et al. 1998), y se ha observado en protoplastos de *N. benthamiana* que un mutante de PVX defectivo en las tres TGBs que no forma VRCs es capaz de replicarse y encapsidar viriones, aunque de forma limitada respecto al virus silvestre (Tilsner et al. 2012). Tilsner et al. (2012) han propuesto una hipótesis sobre el sentido biológico de la formación de los VRCs en la fase tardía de la infección. Los potexvirus se transmiten mecánicamente (Adams et al. 2004), y la estrategia con más probabilidad de éxito para garantizar la transmisión entre dos plantas que se rozan, es acumular altas cantidades de virión en las células infectadas. Por otro lado, se sabe que TGB1, además de ser una proteína de movimiento, es un activador de la traducción del RNA al desestabilizar la partícula viral (Atabekov et al. 2000; Karpova et al. 2006; Kiselyova et al. 2003; Rodionova et al. 2003). Parece entonces que la compartimentalización de la TGB1 en el interior de los VRCs, alejada de los viriones nacientes que quedan en el exterior del VRC, maximizaría la acumulación de las partículas virales.

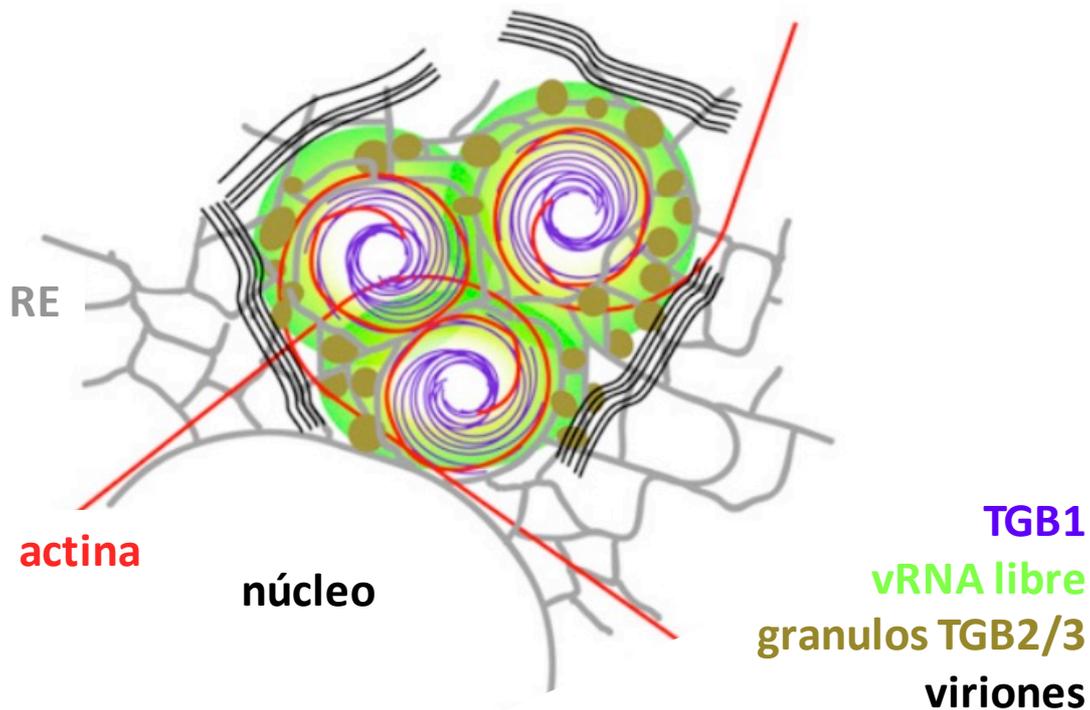


Figura 7. Regionalización del complejo de replicación de PVX. Modelo esquemático modificado de Tilsner et al. (2012) de la estructura de un VRC de PVX. El retículo endoplásmico (gris; RE) y microfilamentos de actina (rojo) se enrollan alrededor de los acúmulos de TGB1 (púrpura) que se ubican en el interior del VRC. Los gránulos TGB2/3 (marrón) se concentran sobre el RE del interior del VRC. El RNA viral recién sintetizado (verde; vRNA libre) en los gránulos TGB2/3 se acumula alrededor de los acúmulos de TGB1. Los viriones (negro) se van acumulando en la periferia del VRC.

3.1.10. Interacciones con proteínas del huésped

Sabemos que PepMV, como la mayoría de los virus, induce grandes cambios transcriptómicos (Hanssen et al. 2011) y de organización subcelular (Minicka et al. 2015; Ruiz-Ramón et al. 2019) en sus huéspedes. El hecho de que los virus dispongan de un reducido arsenal de elementos funcionales para poner en marcha procesos tan complejos, ha conducido a la idea del carácter multifuncional tanto de las estructuras secundarias del RNA viral (Chen, Huang, y Tsai 2017; Hyodo, Nagai, y Okuno 2017; Newburn y White 2015), como de las proteínas virales (Mathioudakis et al. 2014; Weber y Bujarski 2015). La limitación en número de los factores virales y su naturaleza

parasítica, hacen que el virus necesite reclutar numerosos factores del huésped (Wang 2015). Se han identificado algunas proteínas de los huéspedes que interactúan con proteínas codificadas por potexvirus que pueden tener un papel en el ciclo infeccioso.

El dominio polimerasa de la replicasa de BaMV interactúa con una hipotética AdoMet-metiltransferasa cuya sobreexpresión conduce a una disminución en la acumulación del virus en protoplastos de *N. benthamina* (Cheng et al. 2009). Recientemente, se ha identificado una E3 ubiquitina ligasa que interactúa con la RdRp de BaMV y cuyo silenciamiento conduce a un incremento de la acumulación del virus, lo que sugiere que actúe como proteína de defensa frente a BaMV (Chen et al. 2019). Además, se ha identificado que el dominio polimerasa de la RdRp de PepMV actúa como inductor de la respuesta de hipersensibilidad (HR) tanto en aislados necrogénicos como atenuados (Sempere, Gómez-Aix, et al. 2015). La proteína TGB1 de PepMV interactúa con la catalasa 1 (CAT1) de tomate que está implicada en el balance redox de la célula. La infección de PepMV provoca un incremento en la actividad catalasa y el silenciamiento de genes que codifican catalasas conduce a una reducción de la acumulación de PepMV (Mathioudakis et al. 2013). Se ha descrito que la TGB1 de PepMV, así como la de otros potexvirus, funciona como supresor del mecanismo de silenciamiento del huésped (Lim, Vaira, Reinsel, et al. 2010; Mathioudakis et al. 2014; Park et al. 2013; Voinnet, Lederer, y Baulcombe 2000). La TGB1 del virus del mosaico de plantago asiática (PIAMV) interactúa con las proteínas SGS3 y RDR6 e inhibe la síntesis de pequeños RNAs interferentes que actúan en *trans* (*trans-acting* siRNA) (Okano et al. 2014). No obstante, se cree que existen diferentes modos de acción de las TGB1s para inhibir el silenciamiento que varían en función del huésped y la especie viral (Park et al. 2013). La TGB2 de PVX interactúa con las proteínas TIP1, 2 y 3 (*TGB 12 K Interacting Proteins*) que interactúan a su vez con el enzima 1, 3 beta-glucanasa que regula el límite de tamaño de exclusión (SEL) del plasmodesmo mediante la degradación de callosa (Fridborg et al. 2003). Esta interacción puede tener un papel durante el transporte de la ribonucleoproteína de movimiento del virus a través del PD. Por otro lado, y a diferencia de las TGB3s de PVX y PepMV que se localizan en RE (dato interno del grupo), la TGB3 de AltMV se localiza en el cloroplasto (Lim, Vaira, Bae, et al. 2010) donde interactúa con la subunidad PsBO del complejo productor de oxígeno del

fotosistema II (Jang et al. 2013). Otro potexvirus, BaMV, ha sido relacionado con este orgánulo. Una fosfoglicerato kinasa de cloroplasto une y dirige el RNA de BaMV al cloroplasto (Cheng et al. 2013). Estos resultados sugieren que algunos potexvirus puedan utilizar el cloroplasto para organizar sus factorías virales.

En relación a la CP de PepMV, se ha descrito que interacciona con una Hsp70 de tomate (Mathioudakis et al. 2012), aunque no se conoce el sentido biológico de esta interacción. Respecto a las CPs de otros potexvirus, se ha determinado que la CP de PVX interacciona con las proteínas de *N. benthamiana* NbPCIP1, NbDnaJ, NbCPIP2a y NbCPIP2b modulando la replicación y el movimiento de PVX (Cho et al. 2012; Choi, Cho, y Kim 2016; Park y Kim 2013). La CP de AltMV interacciona con la proteína AtBOR1, un transportador de boro, y actúa como inductor de necrosis sistémica sensible a temperatura (Lim et al. 2014). La CP de PepMV también es un determinante de patogenicidad que es reconocido por la proteína codificada por el gen de resistencia *Rx* (Candresse et al. 2010), y cambios en los residuos 155 y 166 de su secuencia proteica determinan la aparición de amarilleo en el huésped y la gravedad de los síntomas (Hasiów-Jaroszewska et al. 2013). Además, la CP de PepMV tiene actividad supresora de silenciamiento génico mediado por RNA, e interacciona con la proteína TGB1 (Mathioudakis et al. 2014). La CP de PepMV es esencial para el movimiento célula a célula (Sempere et al. 2011). Algunas funciones descritas para la CP de PVX y BaMV parecen modularse a través de la fosforilación de ciertos residuos modificando su afinidad por el ARN viral (Atabekov et al. 2001; Hung et al. 2014).

A día de hoy queda mucho por conocer sobre la biología de las infecciones virales. Sin duda alguna, la identificación de nuevas proteínas del huésped que interactúan con proteínas virales y su caracterización funcional durante el ciclo viral, tiene un potencial excelente para ampliar el conocimiento de la biología de las infecciones virales y proponer dianas para la generación de nuevas fuentes de resistencia.

2. Objetivos

Esta tesis ha tenido como objetivo general el estudio de la CP de PepMV desde un punto de vista estructural y funcional con el fin de avanzar en el conocimiento sobre la biología del virus. La CP tiene como principales características que es capaz de unirse a RNA y de homo-oligomerizar. Muchas de las funciones que se han descrito para la CP en relación con la biología de los potexvirus, como el movimiento célula a célula, el movimiento sistémico y la encapsidación, dependen al menos de una de estas dos características. Aunque en la bibliografía existen trabajos en los que se han explorado las interacciones CP-CP y CP-RNA de los potexvirus, no se conoce con precisión la mecánica de estas. Por otro lado, reiterando la idea de que las proteínas virales son multifuncionales, determinar factores del huésped que interactúen con ellas puede conducir a describir con mayor exactitud sus funciones en la biología viral y en el desarrollo de la enfermedad. Por todo esto, los objetivos parciales de esta tesis han abordado la interacción de la CP de PepMV (i) consigo misma, (ii) con el RNA viral, (iii) y con proteínas de tomate con el fin de describir sus funciones, y si fuera posible, proponer genes de tomate candidatos como diana para generar nuevas fuentes de resistencia a PepMV.

Por tanto, los objetivos parciales de esta tesis han sido:

- Caracterización de la interacción CP-CP y CP-RNA en la formación del virión y el movimiento célula a célula de PepMV.
- Identificación del origen de encapsidación del RNA genómico de PepMV.
- Búsqueda de proteínas de tomate que interaccionan con la CP de PepMV como posibles dianas de pérdida de susceptibilidad.

Los dos primeros objetivos parciales se corresponden con el capítulo 1 de esta memoria, y el tercer objetivo parcial con el capítulo 2.

3. Materiales y métodos

3.2. Material vegetal y fuente de inóculo viral

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* y tomate (*Solanum lycopersicum* cvs. Money Maker y Micro-Tom) utilizadas en los diferentes experimentos de esta tesis crecieron en cámaras de cultivo o en un invernadero con condiciones controladas ajustadas a 25 °C día-18 °C noche y con un ciclo de luz/oscuridad de 16 h/8 h. El aislado de PepMV utilizado fue PepMV Sp13 (Aguilar et al. 2002) y como iniciador de las infecciones se utilizó su clon agroinfectivo pBPepXL6 (Sempere et al. 2011).

3.3. Construcciones de DNA

Las secuencias de PepMV clonadas en este trabajo se amplificaron con la polimerasa Prime Star (Takara) siguiendo las indicaciones del fabricante y utilizando como molde el plásmido pBPepXL6. Los mutantes de la CP que se utilizaron en los ensayos de transcomplementación se generaron por PCRs solapantes (Sambrook y Russell 2001). Para la amplificación de las secuencias codificantes (CDS) de transcritos de tomate, se extrajo RNA total de hoja y raíz con TRI reagent (Molecular Research Center, Inc.). A continuación, las preparaciones de RNA se usaron como molde en reacciones de transcripción reversa (RT) (Roche) utilizando un oligo-dT. El cDNA resultante se empleó

como molde para las PCRs (Takara). En cada paso se siguieron las indicaciones de los fabricantes. Los cebadores y el molde utilizado en cada amplificación se muestran en la tabla 1 del Anexo I, y la secuencia de los cebadores se muestran en la tabla 2 del Anexo I. Todos los productos de PCR se fraccionaron en geles de electroforesis al 0,7% de agarosa y la banda de interés se recortó y se purificó mediante columna (iNtRON). Para la mayoría de construcciones se utilizó la tecnología de clonaje Gateway (Invitrogen) y tras la reacción BP los amplicones se clonaron en el vector donador pDONR/Zeo (Invitrogen) para su posterior multiplicación en bacterias *Escherichia coli* electrocompetentes de la cepa Top10. Se obtuvieron preparaciones de DNA de los vectores de entrada mediante purificación por columna (Thermo Scientific) y se usaron en reacciones LR (Invitrogen) para clonar los insertos en los vectores de destino (Anexo I – tabla 1). Los vectores pGWBs se describen en los trabajos de Nakagawa, Kurose, et al. (2007), y Nakagawa, Suzuki, et al. (2007). Todos los vectores de expresión obtenidos por Gateway se utilizaron para transformar *Agrobacterium tumefaciens* C58C1, excepto las construcciones basadas en los plásmidos pGADT7 y pGBKT7 que se usaron para transformar *Saccharomyces cerevisiae* cepa AH109 en los ensayos de Y2H, y la construcción pYL89-SIGSTU38 utilizada para transformar *A. tumefaciens* GV3101 para el ensayo de VIGS.

Para la generación de los plásmidos empleados en la edición de los genes *SIGSTU38*, *SIRNaseH30* y *SIRNaseH60* mediante la tecnología CRISPR/Cas9, primero se diseñaron las guías de RNA (gRNA) GST19, RNH30 y RNH60 con ayuda de la herramienta online Breaking Cas (bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas) (Oliveros et al. 2016). Para la elección de las guías se tuvo en cuenta que su posición fuera lo más próxima posible al extremo 5' de la CDS del gen, que no tuvieran dianas fuera del gen de interés, y que el gRNA fusionado al RNA *scaffold* que une la nucleasa Cas9 tuviera un plegamiento óptimo (Liang et al. 2016) según la herramienta MFold (unafold.rna.albany.edu/?q=mfold) (Zuker 2003). Para cada guía se diseñó una pareja de cebadores solapantes con la secuencia de la guía, que al hibridar dejan los dos extremos 5' cohesivos con el sitio de corte de *BbsI* (Anexo I – tabla 1 y tabla 2). Las parejas de cebadores se incubaron 5 min a 95 °C y después se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente para formar dúplex de DNA. A continuación, los dúplex de DNA

se clonaron en el plásmido pA58 o pA59 (no publicados) previamente tratados con *BbsI* y se obtuvieron los plásmidos pA58-GST19, pA59-RNH30 y pA59-RNH60 en los que las guías quedan fusionadas al RNA *scaffold*. Los plásmidos pA58-GST19, pA59-RNH30 y pA59-RNH60 fueron digeridos con los enzimas de restricción *SpeI* y *KpnI*. Los productos de las digestiones se fraccionaron por electroforesis en geles de agarosa, y se cortaron y purificaron las bandas de interés. A continuación, los fragmentos purificados se clonaron en el vector binario pA60 (no publicado) que porta el gen que expresa la nucleasa Cas9 y el gen *neomicina fosfotransferasa II (nptII)* que se usa como gen de selección tras la transformación en tomate al conferir resistencia a kanamicina. Los plásmidos pA60-GST19, pA60-RNH30 y pA60-RNH60 se usaron para transformar *A. tumefaciens* electrocompetente de la cepa GV3101.

Para generar los plásmidos pLexA-CP y pLexA-TGB1 utilizados en el escrutinio de la genoteca de cDNA mediante Y2H, se amplificó la CDS de la CP y TGB1 con las parejas de cebadores CE802 / CE803 y CE800 / CE801, respectivamente (Anexo I – tabla 2). Estos cebadores se diseñaron con un sitio de corte del enzima de restricción *KpnI* en sus extremos 5'. Los productos de PCR se fraccionaron en gel de agarosa, se recortó la banda de interés, y se purificó por columna (Qiagen). El plásmido pLexA-N y los amplicones de la CP y TGB1 se digirieron con el enzima *KpnI* y de nuevo se purificó el DNA por columna (Qiagen). El plásmido pLexA-N se desfosforiló con el enzima SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) (Thermo Fisher scientific). Para la reacción de ligación de los insertos en el plásmido se utilizó la ligasa T4 (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante, y luego se transformaron bacterias *E. coli* Top10 electrocompetentes con las ligaciones. A continuación, se aislaron los plásmidos pLexA-CP y pLexA-TGB1, y se secuenciaron para comprobar su correcta inserción.

Para generar los plásmidos p5'SL1-SHAPE y p5'SL1&2-SHAPE se insertaron los 110 y los 198 primeros nucleótidos de PepMV aguas arriba de la secuencia de un segmento de una estructura tallo-bucle del RNA2 del virus del mosaico y enaciones del guisante (PEMV) (Wang et al. 2010). Los fragmentos 5'SL1 y 5'SL1&2 se amplificaron con las parejas de cebadores CE2451 / CE2452 y CE2451 / CE2453, respectivamente (Anexo I - tabla 2), que introducen un sitio de corte para *EcoRI* en el extremo 5' del amplicón, y otro para *HpaI* en el extremo 3'. Después de linearizar el vector de destino con los

mismos enzimas de restricción, se incubó con los amplicones en una reacción de ligación con la ligasa T4 (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación, se transformaron bacterias *E. coli* Top10 electrocompetentes, se aislaron los plásmidos y se secuenciaron para comprobar la correcta inserción de los fragmentos.

En los ensayos de observación de células vivas al microscopio láser confocal se utilizó el clon agroinfectivo pJL89-PepMV que expresa el virus de tipo silvestre. La longitud completa del virus fue amplificada con la polimerasa Prime Star (Takara) con pBPepXL6 como molde y clonada en el vector binario pJL89 mediante la tecnología de clonaje Gibson Assembly (New England Biolabs) siguiendo las indicaciones del fabricante. *A. tumefaciens* electrocompetente de la cepa C58C1 fue transformada con pJL89-PepMV.

3.4. Inoculación y purificación de PepMV

La purificación del virus se realizó a partir de hojas de *N. benthamiana* infectadas con PepMV Sp13 (Aguilar et al. 2002). Para la inoculación mecánica de PepMV, se espolvorearon dos hojas de plántulas con 4-5 hojas verdaderas con carburundo y se frotaron con un homogeneizado consistente en material vegetal liofilizado de hojas infectadas con PepMV trituradas en tampón fosfato 30 mM pH 8,0. A los 14 días post inoculación (dpi) se recolectaron las hojas infectadas sistémicamente y se procedió a la purificación de viriones de PepMV siguiendo una metodología descrita previamente (AbouHaidar, Xu, y Hefferon 1998) con algunas modificaciones. Las hojas infectadas se trituraron en una batidora con 2 ml de tampón de homogenización (Tris-ácido cítrico 0,1 M pH 8,0; 2-mercaptoetanol 0,2%; tioglicolato sódico 0,01 M) por g de hoja. El homogeneizado se filtró a través de 5 capas de gasa, se añadió Triton-X-100 (1% v/v) y se mezcló durante 15 min en agitación constante a 4 °C. Después, se añadió cloroformo hasta una concentración final del 25 % del volumen y se mezcló durante 30 min en agitación constante a 4 °C. A continuación, la mezcla se centrifugó a 12.000 x g, durante 15 min y a 4 °C, y se recuperó la fase acuosa a la que se añadió PEG 6000 hasta una concentración de 5 % (w/v). La mezcla se dejó en agitación constante a 4 °C durante 60

min para ser luego centrifugada a 10.000 x g durante 15 min. El concentrado resultante se resuspendió en Tris-ácido cítrico 0,1 M pH 8,0 con Triton-X-100 1% y se cargó sobre un colchón de sacarosa al 30 %. A continuación, se ultracentrifugó a 86.500 x g durante 3 h y a 4 °C. El concentrado se resuspendió en Tris-ácido cítrico 0,1 M pH 8,0 previamente filtrado y se estimó la cantidad de partículas virales midiendo la densidad óptica (DO) a 260 nm y utilizando el coeficiente de extinción $\epsilon_{0.1\%} = 2,9$ (AbouHaidar et al. 1998). Los viriones se conservaron en la nevera hasta su uso.

3.5. CrioEM, procesamiento de imagen de la partícula de PepMV y construcción del modelo atómico de la CP

El mapa 3D de la partícula de PepMV y el modelo atómico de la CP fueron creados por el grupo de CrioEM dirigido por el investigador Mikel Valle (Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias, CIC BioGUNE, Bilbao). Para generar el mapa 3D de la partícula de PepMV, se procesaron imágenes tomadas mediante crio-microscopía electrónica (crioEM) de viriones purificados de PepMV, y para el modelo atómico de la CP se tomó como plantilla la estructura de la CP cristalizada del virus del mosaico de la papaya (código PDB 4dox) (Yang et al. 2012). Todos los detalles de los procedimientos realizados para la obtención del mapa 3D de PepMV y el modelo atómico de la CP se describen en la publicación Agirrezabala et al. (2015) que forma parte de los resultados de esta tesis.

3.6. Códigos de acceso

El mapa 3D de PepMV obtenido por crioEM y el modelo atómico derivado de la CP se encuentran depositados en las bases de datos *Electron Microscopy Data Bank* (www.emdatabank.org) y *Protein Data Bank* (www.rcsb.org) bajo los códigos de acceso EMD-3236 y 5FN1.

3.7. Agroinfiltración

Los clones de *A. tumefaciens* criopreservados en glicerol se revivieron en placas de medio Luria-Bertani (LB) agar con el antibiótico correspondiente y se incubaron 2 días a 28 °C. Una pequeña cantidad de cultivo bacteriano crecido en la placa se añadió a un volumen de medio LB más antibiótico, y el cultivo se incubó a 28 °C y agitación hasta una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,6-0,9. A continuación, las bacterias se concentraron mediante centrifugación a 2.500 x g durante 10 min. El concentrado se resuspendió en la mitad del volumen inicial de tampón de agroinfiltración (MES 10 mM pH 5.5; MgCl₂ 10 mM; acetosiringona 100 mM), y la suspensión de bacterias se incubó a 25 °C y agitación. Transcurridas 3 horas, se midió la DO_{600} de la suspensión y se ajustó a la DO_{600} final deseada para cada experimento. En este trabajo se han utilizado dos técnicas de agroinfiltración. (i) Para la expresión transitoria de proteínas (CoIP, observaciones de células vivas al microscopio láser confocal) e iniciar la infección de PepMV Sp13 en *N. benthamiana* se utilizó una jeringa sin aguja para infiltrar la suspensión bacteriana en el envés de las hojas. (ii) Para el ensayo de mutantes de la CP en *N. benthamiana*, el mapeo del origen de encapsidación (OAS) de PepMV, y la inoculación de los clones de VIGS en tomate, se recurrió a la agroinfiltración por vacío. Para ello, las plantas se sumergieron en suspensiones de *A. tumefaciens* y se sometieron a vacío en una campana desecadora durante 30 segundos en el caso de *N. benthamiana*, y 1 min y 30 seg en el caso de tomate. A continuación, se rompió el vacío súbitamente, momento en el que ocurre la agroinfiltración de todas las hojas de la planta. En todas las suspensiones de *A. tumefaciens* se incluyó el clon que expresa el supresor de silenciamiento P19 del virus del enanismo ramificado del tomate (TBSV) a una DO_{600} final de 0,1.

3.8. Ensayo de los mutantes de la CP por transcomplementación

Se expresó PepGFP Δ CP en solitario, la CP en solitario, y las combinaciones de PepGFP Δ CP junto a la CP silvestre, o junto a los diferentes mutantes de la CP en *N. benthamiana* mediante agroinfiltración por vacío a una DO₆₀₀ final de cada clon de 0,25. A 4 y 6 días post-agroinfiltración (dpa), se fotografiaron hojas agroinfiltradas bajo una lámpara de luz UV (365 nm) Blak Ray B100-AP (UV products). A 7 dpa, se recolectaron las hojas de cada tratamiento por separado e inmediatamente después se utilizaron para purificar viriones siguiendo los pasos ya descritos en este trabajo.

3.9. Purificación de VLPs

Para el mapeo del OAS se expresó Pep(1-344)GFP y Pep(87-344)GFP junto a la CP en hojas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración por vacío a una DO₆₀₀ final de cada clon de 0,25. A 7 dpa, se recolectaron las hojas de cada tratamiento por separado y se utilizaron para purificar partículas similares a virus (*virus-like particles*; VLPs) siguiendo los pasos ya descritos para la purificación de PepMV.

3.10. Inmunomarcaje con oro y microscopía electrónica de transmisión

Diez μ l de las purificaciones de VLPs se incubaron 45 min con glutaraldehído al 2,5 % (Electron Microscopy Science). Una gota de 8 μ l se depositó sobre una rejilla de níquel, malla 200 y soporte Formvar/Carbon (Electron Microscopy Science). Transcurridos 10 min, la gota fue retirada por capilaridad mediante un trozo de papel Whatman. Las rejillas se dejaron secar y se prepararon gotas de tampón fosfato salino (PBS) sobre un trozo de Parafilm. Cada rejilla se posó boca abajo sobre una gota de PBS

durante 5 min y luego se transfirió a una gota de PBS con albumina sérica bovina acetilada (BSA-c) al 5 % (Ectron Microscopy Science) durante 15 min. El anticuerpo policlonal anti-CP (AC-Diagnostics) se diluyó 80 veces en PBS con BSA-c 5 % y se repartió en gotas de 20 μ l sobre las que se incubaron las rejillas durante 1 hora. A continuación, las rejillas se posaron en gotas de PBS durante 5 min. Este paso se repitió 3 veces para luego colocar las rejillas sobre gotas de 40 μ l de PBS con BSA-c 5 % y un anticuerpo anti-inmunoglobulina G (IgG) de conejo conjugado con partículas de oro coloidal de 10 nm (Electron Microscopy Science) a una dilución de trabajo 1:20. Las rejillas se incubaron en el anticuerpo secundario durante 1 hora y se sometieron después a 4 incubaciones sucesivas de 5 min sobre gotas de PBS. Luego, se lavaron con agua mili Q y se dejaron secar sobre papel Whatman. Para contrastarlas, se incubaron durante 1 min sobre una gota de acetato de uranilo al 2 %. Tras retirar la solución de contraste sobre un papel Whatman, se lavaron las rejillas con agua mili Q y se dejaron secar. Las observaciones de las rejillas se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips TECNAI 12 operando a 100 Kv con cámara digital megaview III (Figura 2B, 2C, 8B y 8C del capítulo 1), o en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1011 con cámara digital de alto contraste GATAN ORIUS SC200 (Figura 8D del capítulo 1).

3.11. SHAPE in vitro y ex virio

Los plásmidos p5'SL1-SHAPE y p5'SL1&2-SHAPE se usaron como molde en 250 μ l de reacción de PCR con los cebadores CE2093 y CE1213 (Anexo I – tabla 2). El cebador *forward* CE2093 tiene en su extremo 5' la secuencia del promotor T7. Los productos de las PCRs se cargaron en un gel de electroforesis al 0,7 % de agarosa, se recortaron las bandas de interés y se purificaron los productos de PCR T7-5'SL1-SHAPE y T7-5'SL1&2-SHAPE. Los amplicones se concentraron en un desecador de vacío y todo el volumen resultante se utilizó como molde en reacciones de transcripción *in vitro* con la transcriptasa MEGashortscript T7 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los RNAs se purificaron mediante columna (Ambion), se cuantificaron con un NanoDrop One (Thermo Scientific) y se conservaron a -20 °C. Por otro lado, a una alícuota de virión

purificado se le añadió el mismo volumen de tampón de desmontado 2x (Pronasa E 100 µg/ml; SDS 1 %; Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 0,2 M) y se incubó a 37 °C durante 30 min. Después el RNA viral se purificó mediante 2 extracciones consecutivas con fenol-cloroformo, 3 extracciones con cloroformo, y precipitación etanólica a -20 °C durante toda la noche. Después de recuperar el RNA viral mediante centrifugación, se lavó el concentrado con etanol al 70 % y se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada estéril. El análisis por SHAPE (*Selective 2'-Hydroxyl Acylation Analyzed by Primer Extension Assay*) de la estructura secundaria del extremo 5' del genoma de PepMV se hizo siguiendo el protocolo descrito por Miras et al. (2015). Brevemente, se utilizaron 500 ng del RNA transcrito *in vitro* y 3 µg de RNA viral en un volumen total de 10 µl por reacción, que fueron desnaturalizados a 94 °C durante 1 min, y luego incubados en hielo 2 min. Luego se añadió a cada reacción 0.5 µl de inhibidor de RNasa (Takara) y 10 µl de tampón de SHAPE (KCl 100 mM; HEPES KOH 50 mM pH7.5; MgCl₂ 3 mM) con concentraciones crecientes de cloruro de magnesio (0 mM; 0,1 mM; 0,3 mM; 1 mM; 3 mM; 5 mM; 8 mM), y se incubaron a 30 °C durante 30 min. Para la modificación, se añadió 5,5 µl de cianuro de benzoilo (BzCN) (Sigma-Aldrich) a las reacciones a modificar, y 5,5 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) a las reacciones que sirvieron como marcadores de tamaño y como control sin modificar, y se incubaron a temperatura ambiente 2 min. Luego, se precipitó el RNA durante la noche a -20 °C con acetato sódico (NaOAc) y etanol absoluto en presencia de tRNA de levadura (Invitrogen). Una vez recuperados los RNAs, se utilizaron para hacer extensión de los cebadores previamente marcados con ATP fósforo-32 (γP^{32} ATP) (PerkinElmer). Los cebadores utilizados fueron CE1213 para los RNAs *in vitro*, y CE2456 y CE2454 para el RNA viral (Anexo I – tabla 2). En las reacciones de los marcadores de tamaño, se añadió a la mezcla de desoxinucleótidos (ddNTP), el didesoxinucleótido ddATP o ddCTP. Las reacciones se cargaron en un gel desnaturalizante al 4 % de poliacrilamida para su fraccionamiento por electroforesis. Después de secar el gel, se expuso en una pantalla phosphorimager (Bio-Rad) y se escaneó en un escáner Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad). Las bandas se cuantificaron mediante el programa Quantity One (Bio-Rad) y se normalizó la intensidad respecto a las bandas de la reacción no modificada (datos de reactividad). La estructura secundaria de RNA se construyó con la herramienta MC-Fold (Parisien y Major 2008) en base a los datos de reactividad.

3.12. Genoteca de cDNA y escrutinio mediante doble híbrido en levadura

Para generar la genoteca normalizada de cDNA de tomate utilizada en el escrutinio mediante doble híbrido en levadura (Y2H), se inocularon plantas de tomate (cv. Money Maker) en estadio de cuatro hojas verdaderas con PepMV Sp13 (Aguilar et al. 2002). A 1 día post inoculación (dpi), se recolectaron las hojas inoculadas de 6 plantas y las hojas equivalentes de plantas sanas en el mismo estado de desarrollo. El procedimiento se repitió a los 3 dpi y 15 dpi. Adicionalmente, a los 15 dpi, se recolectaron las hojas superiores no inoculadas de 12 plantas infectadas y 12 plantas sanas. A continuación, se extrajo el RNA total del material vegetal recolectado con TRI reagent (Molecular Research Center, Inc.) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante, se mezclaron las preparaciones de RNA y se enviaron a las instalaciones de Evrogen (Moscú, Rusia) donde se generó la librería normalizada de cDNA. Después de la transcripción reversa de los mRNAs (protocolo de Evrogen), el cDNA de longitud completa se normalizó mediante nucleasas específicas de dúplex (DSN) (Zhulidov 2004). La librería normalizada de cDNA se envió a Dualsystems Biotech (Zurich, Switzerland) donde se insertó en el plásmido presa pGAD-HA de expresión en levadura que confiere prototrofia para la leucina.

Levaduras de la cepa NMY51 fueron transformadas con las construcciones pLexA-CP y pLexA-TGB1 que confieren prototrofia para el triptófano, y fueron cultivadas en medio *synthetic defined* (SD) carente de leucina, triptófano e histidina (SD-leu/-trp/-his) con diferentes concentraciones de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) para establecer el medio de escrutinio óptimo sin autoactivación de los genes reporteros mediada por las construcciones cebo. Tanto para la CP como para TGB1 se determinó como medio óptimo de escrutinio el medio SD-leu/-trp/-his + 1 mM 3-AT.

Los plásmidos pLexA-CP o pLexA-TGB1, y varias alícuotas de la librería normalizada de cDNA insertada en pGAD-HA se usaron para cotransformar levaduras NMY51. Los cultivos de levadura se incubaron en medio SD-leu/-trp/-his + 1 mM de 3-AT en placas de escrutinio. En el caso de la CP se escutaron unos $3,6 \times 10^6$ transformantes, de los cuales 48 activaron el gen reportero *HIS3* y crecieron en el medio

de escrutinio. Los 48 clones primarios se transfirieron a medio de escrutinio líquido y se sometieron a 5 pases de subcultivo para desechar posibles escapes. A continuación, los clones primarios se testaron en un ensayo cuantitativo de actividad beta-galactosidasa (HTX assay) para comprobar si ocurría activación de un segundo gen reportero, el gen *lacZ*. Treinta y cinco clones primarios fueron beta-galactosidasa positivos. Los plásmidos presa de los 35 clones secundarios fueron aislados, multiplicados en *E. coli* y secuenciados. En el caso de TGB1 se procedió de la misma manera que para la CP. Se escrutaron unos $3,7 \times 10^6$ cotransformantes, de los cuales se obtuvieron 83 clones primarios protótrofos para la histidina. Tras 5 pases en medio de escrutinio, se obtuvieron 50 clones secundarios protótrofos para la histidina y beta-galactosidasa positivos. Solo se pudieron aislar, multiplicar en *E. coli* y secuenciar 34 plásmidos presa.

3.13. Ensayo de doble híbrido en levadura

Levaduras AH109 fueron cotransformadas (Gietz y Schiestl 1994) con las siguientes combinaciones de construcciones: pGADT7-AgT (antígeno T grande de SV40) + pGBKT7-p53 (supresor tumoral p53) como control positivo; pGADT7-AgT + pGBKT7-lamC (lamina C) como control negativo; pGADT7-CP + pGBKT7-lamc como control de la CP de autoactivación de la transcripción; pGADT7-TGB1 + pGBKT7-lamc como control de TGB1 de autoactivación de la transcripción; pGADT7-AgT + pGBKT7-GSTU38/RNaseH30/parálogos como controles de autoactivación de la transcripción de las proteínas interactoras y sus parálogos; y finalmente pGADT7-CP/TGB1 + pGBKT7-GSTU38/RNaseH30/parálogos. Los cultivos de levadura cotransformada se incubaron en agitación constante a 30 °C toda la noche, y al día siguiente se hicieron diluciones seriadas 1:10, 1:100 y 1:1000. Se sembraron gotas de 3 µl de cada dilución de cada cultivo en placas de medio sólido de cotransformación SD-Leu/-Trp/-His/-Ade, y en 3 medios sólidos de interacción SD-Leu/-Trp/-His, SD-Leu/-Trp/-His/ + 2 mM 3-AT, y SD-Leu/-Trp/-His/-Ade ordenados de menos a más restringentes. A continuación, las placas sembradas se incubaron a 30 °C durante 2-3 días.

3.14. Extracción de proteínas, coimmunoprecipitación y Western blot

Para las coimmunoprecipitaciones (CoIPs) se partió de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con jeringa con los siguientes clones: (i) pGWB2-CP, (ii) pGWB2-CP y el plásmido pGWB452 vacío, (iii) pGWB2-CP y pGWB452-GSTU38, (iv) pGWB2-CP y pGWB452-RNaseH30, (v) pGWB417-TGB1 y el plásmido pGWB452 vacío, (vi) pGWB417-TGB1 y pGWB452-RNaseH30. Todos los clones de *A. tumefaciens* se utilizaron a una DO_{600} final de 0,25 y en todas las suspensiones de bacterias se incluyó el clon pBP19 a una DO_{600} final de 0,1. A 3 dpa se tomaron discos de 2 cm de diámetro del área agroinfiltrada de 3 hojas de 6 plantas de cada tratamiento. El material vegetal se congeló con nitrógeno líquido y se machacó en un mortero. A continuación, se añadieron 2 ml de tampón RIPA (Tris-HCl pH7,5 10 mM; NaCl 150 mM; EDTA 0,5 mM; SDS 0,1 %; Triton X-100 1 %; Desoxicholato 1 %) por g de hoja, se mezcló y se dejó reposar en hielo. Las suspensiones se centrifugaron a 3000 x g durante 15 min a 4 °C, y se recolectó y filtró el sobrenadante a través de 3 gasas. Este paso se repitió y se recuperó el sobrenadante en tubos de 2 ml para su posterior centrifugación a 12000 x g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se pipeteó en un tubo nuevo y se guardó a -20 °C hasta su uso. Antes de la CoIP, los extractos de proteínas se preincubaron con partículas de agarosa en tubos en constante rotación durante 1 hora a 4 °C, y después se centrifugaron a 2500 x g durante 2 min y a 4 °C. Los sobrenadantes se recolectaron y se incubaron esta vez con partículas de agarosa fusionadas a un anticuerpo monoclonal anti-GFP producido en alpaca (Chromotek). Las CoIPs se realizaron con la ayuda de columnas y siguiendo las indicaciones del fabricante (Chromotek). Los extractos de proteína de partida de la CoIP, y las fracciones unidas a las partículas de agarosa se mezclaron con tampón de Laemmli 5x (Tris-HCl pH 6,8 62,5 mM; Glicerol 25 %; SDS 2 %; azul de bromofenol 0,01 %; 2-mercaptoetanol 5 %) y se cargaron 15 μ l y 25 μ l respectivamente en un SDS-PAGE. A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) mediante transferencia húmeda. Las membranas se incubaron (i) con un anticuerpo policlonal anti-CP de PepMV producido en conejo para la detección de la CP (AC diagnostics, Inc.), (ii) con un anti-Myc monoclonal producido en ratón (Sigma-Aldrich) para la detección de Myc-TGB1, (iii) y con un anti-GFP monoclonal producido en

rata (Chromotek) para la detección de la GFP y las proteínas fusionadas a la GFP. Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos anti-IgG producidos en conejo, ratón o rata conjugados con la peroxidasa de rábano (Promega), y la posterior incubación de la membrana con sustrato quimioluminiscente (ECL) (SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). La detección de la señal de quimioluminiscencia y la captación de imagen se realizó con un Amersham Imager 600 (GE healthcare life sciences).

3.15. Silenciamiento génico de *SIGSTU38* mediado por TRV (VIGS)

El silenciamiento de *SIGSTU38* se realizó en plantas de tomate (cv. Money Maker) mediante la pareja de vectores basados en el virus del cascabeleo del tabaco (TRV) pTRV1 y pYL89 (Liu, Schiff, y Dinesh-Kumar 2002). Se agroinfiltraron por vacío plantas en estadio de desarrollo de 4 hojas verdaderas con las suspensiones de *A. tumefaciens* compuestas por los clones pTRV1 + pYL89-PDS + pBP19, o pTRV1 + pYL89-GSTU38 + pBP19 a una DO₆₀₀ final de 0,5:0,5:0,1 respectivamente. El silenciamiento satisfactorio de *SIGSTU38* se comprobó para cada planta mediante RT-PCR semicuantitativa. A 15 dpa, se inocularon las plantas silenciadas para *PDS* y *SIGSTU38*, y plantas sanas silvestres con extracto de hojas infectadas sistémicamente de *N. benthamiana* agroinoculadas con pBPepXL6. A 20 dpi, se recolectaron por separado todas las hojas por encima de la inoculada de cada planta y se trituraron en una batidora añadiendo 2 ml de TNA (Tris-HCl pH 8 100 mM; SDS 2 %; EDTA pH 8 10 mM) por g de material vegetal. Se recuperaron 500 µl de cada extracto para hacer extracción de RNA total con TRI reagent (Molecular Research Center, Inc.). Las preparaciones de RNA se trataron con DNasa I (Sigma-Aldrich), y se purificaron mediante extracción fenol-cloroformo y precipitación etanólica. La cantidad de RNA extraído se cuantificó en un NanoDrop One (Thermo) y se normalizó antes de realizar una RT (Roche) utilizando un oligo-dT. El cDNA se utilizó a continuación para cuantificación relativa por qPCR (Kappa) de la acumulación de PepMV con la pareja de cebadores CE432 / CE433 (Anexo I - tabla 2) y utilizando como gen

endógeno el gen del factor de elongación 1-alfa (*EF1a*) con la pareja de cebadores CE1199 y CE1200 (Anexo I - tabla 2).

3.16. Transformación de Micro-Tom, edición genética por CRISPR/Cas y ensayo de susceptibilidad a PepMV

La transformación de tomate se hizo siguiendo un método descrito previamente en Eck, Kirk, y Walmsley (2006). Semillas esterilizadas y germinadas de Micro-Tom crecieron en medio de germinación sólido (Murashige y Skoog basalt salt (MS) 4,3 g/L; sacarosa 10 g/L; agar 5 g/L) ajustado a pH 5,7 a 26 °C y con un ciclo luz/oscuridad de 16 h/8 h. En paralelo, cultivos de *A. tumefaciens* GV3101 transformados con pA60-GST19, pA60-RNH30 y pA60-RNH60 crecieron hasta una DO₆₀₀ de 0,4. Las bacterias se concentraron mediante centrifugación y se resuspendieron e incubaron en el mismo volumen de tampón SIM pH 5,5 (citrato sódico 20 mM; sacarosa 2 %) durante 3 h a 25 °C con agitación constante. Secciones de cotiledones de plántulas de 6 días preincubadas en medio de cocultivo (MS 4,3 g/L; sacarosa 30 g/L; KH₂PO₄ 200 mg/L; Mio-inositol 100 mg/L; Tiamina-HCl 1,3 mg/L; ácido indolacético 0,5 mg/L; kinetina 0,1 mg/L; acetosiringona 100 µM) ajustado a pH 5,5 durante 48 h a 28 °C y en oscuridad, se incubaron con las suspensiones de *A. tumefaciens* durante 10 min. A continuación, los cotiledones se secaron con papel de filtro estéril, y se incubaron en medio de cocultivo sólido durante 48 h a 26 °C y en oscuridad. Las células de *A. tumefaciens* se eliminaron de los cotiledones después de lavados con medio de cocultivo con timentina (Duchefa Biochemie), y los cotiledones se transfirieron a medio de regeneración/selección sólido (MS 4,3 g/L; sacarosa 30 g/L; Mio-inositol 100 mg/L; vitaminas Nitsch (1000x) 1 ml/L; ácido indolacético 0,1 mg/L; Zeatina 2 mg/L; Timentina 400 mg/L; Kanamicina 100 mg/L) ajustado a pH 6,0 y se incubaron a 26 °C con un ciclo luz/oscuridad de 16 h/8 h. Dos semanas después, aproximadamente, aparecieron las primeras yemas y se llevaron a cabo subcultivos en medio de regeneración/selección sólido con la mitad de concentración de zeatina de las plántulas cada 3 semanas. Cuando las yemas tuvieron aproximadamente 15 mm, se transfirieron a medio de enraizamiento selectivo sólido

(MS 4,3 g/L; sacarosa 20 g/L; Mio-inositol 100 mg/L; Tiamina HCl 1 mg/L; ácido indolacético 0,1 mg/L; Timentina 300 mg/L; Kanamicina 100 mg/L) ajustado a pH 5,7. El corte de los tallos y los nudos se realizó cada 3 semanas a partir de plántulas crecidas en medio de selección, y transferidas a medio de enraizamiento selectivo nuevo. Este procedimiento se repitió 3 veces. A continuación, 4 plantas de cada línea rescatada de plantas T0 con fenotipo silvestre fueron transferidas a macetas con tierra y aclimatadas en cámara de cultivo. Las ediciones en *SIGSTU38*, *SIRNaseH30* y *SIRNaseH60* se identificaron en la generación T1 mediante PCR directa de tejido con la polimerasa Phire Tissue direct PCR (Thermo Scientific) y posterior secuenciación del amplicón. Los cebadores utilizados en el genotipado de los tres genes de interés aparecen en la tabla 2 del Anexo I. Se seleccionaron plantas homocigotas editadas con un codón stop prematuro cerca de la secuencia PAM y se obtuvieron semillas de la generación T2. Las dos primeras hojas verdaderas de plantas silvestres y T2 de 3 semanas de edad fueron inoculadas con 10 µl de una purificación de virión de PepMV a una concentración de 100 ng/µl. A 14 dpi, se recolectaron todas las hojas por encima de las inoculadas de cada planta y se extrajo RNA total con TRI reagent (Molecular Research Center, Inc.). Las preparaciones de RNA se purificaron con fenol-cloroformo y una precipitación etanólica. Tras ser tratados con DNasa I (Sigma-Aldrich), los RNAs se cuantificaron con un NanoDrop One (Thermo Scientific) y se normalizaron. A continuación, se utilizaron para cuantificar la acumulación absoluta de PepMV mediante RT-qPCR (NZYTech) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.17. Microscopía láser confocal de barrido de células vivas

La localización de las proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes (FPs) se llevó a cabo en hojas de *N. benthamiana* como huésped experimental. Los clones de *A. tumefaciens* de expresión de las proteínas de fusión a FPs se agroinfiltraron a una DO 600 final de 0,25, mientras que los clones agroinfectivos que expresan PepMV silvestre y PepGFPm2 se utilizaron a una DO 600 final de 0,2. A los 3-5 dpa, las hojas se infiltraron con agua para evitar la formación de burbujas durante la observación al microscopio.

Inmediatamente después, se montaron secciones de hoja en un portaobjetos (Línea LAB) con ayuda de cinta adhesiva de doble cara, y se cubrió con un cristal cubreobjetos #1.5 (Duran group) añadiendo previamente una pequeña gota de agua entre la muestra y el cubreobjetos. Todas las imágenes fueron tomadas en un microscopio láser confocal de barrido Leica SP8 con un objetivo 63x de inmersión en glicerol (Leica). Las longitudes de onda de excitación utilizadas fueron: 488 nm para GFP; 514 nm para YFP; 561 nm para mRFP. Los rangos de detección fueron optimizados para cada FP, y se empleó barrido secuencial en todas las colocalizaciones de dos proteínas fluorescentes. Las condiciones del microscopio y los detectores híbridos (Leica) se ajustaron para cada imagen individual para optimizar el contraste. Las imágenes se tomaron utilizando el programa LasX (Leica) y en el caso de algunas series en el eje z se utilizó la herramienta de máxima proyección. Las imágenes fueron posteriormente exportadas a Power Point (Microsoft) para montar las figuras.

4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un origen de encapsidación (OAS)

4.1. Introducción

Parte de los resultados incluidos en este capítulo están descritos en la publicación de Agirrezabala et al. (2015), que se realizó en colaboración con el grupo de CrioEM dirigido por el investigador Mikel Valle (Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias, CIC BioGUNE, Bilbao) y en la que participé con un papel destacado. A continuación, describo el trabajo realizado por el grupo de CrioEM, y en los resultados describo mi aportación al trabajo, así como resultados adicionales posteriores sobre la encapsidación del RNA viral.

A partir de partículas de PepMV purificadas, se resolvió y se modelizó la estructura del virión mediante crioEM con una resolución casi atómica, de 3,9 Å. El mapa estructural mostró una arquitectura helicoidal levógira, con un diámetro de 130 Å y un canal interior de 13 Å de diámetro (Figura 1A). La partícula de PepMV presenta un *pitch* de 34,6 Å y 8,7 CPs por giro (Figura 1B). El mapa de crioEM alcanzó una resolución que permitió generar un modelo atómico de la CP de PepMV (Figura 1C) mediante modelado iterativo partiendo de la estructura de la CP del virus del mosaico de la papaya (PapMV) (Yang et al. 2012). La estructura de la CP de PepMV tiene tres regiones principales: un

4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS

brazo flexible N-terminal, una región central y una extensión C-terminal representados en púrpura, azul y amarillo respectivamente en la figura 1A-C. Los primeros 20 aminoácidos del extremo N-terminal no se incluyeron en el modelo atómico porque esa región se proyecta más allá de la estructura helicoidal y su densidad se desvanece debido a su flexibilidad. La estructura modelada para la CP muestra un plegamiento formado únicamente por hélices alfa (Figura 1C). El ensamblaje helicoidal de PepMV está mediado por el brazo N-terminal y la extensión C-terminal de la CP. El brazo N-terminal de cada subunidad interacciona con un surco hidrofóbico en la región central de la CP precedente y establece el contacto principal lateral entre CPs en el ordenamiento de la hélice (Figura 1A y 1D). Por otro lado, la extensión C-terminal, un *coil* largo con una hélice alfa en su extremo, forma el canal interno del virus (Fig. 1B). Este segmento C-terminal describe un giro que discurre a lo largo del eje longitudinal del canal y crea una red de pequeñas interacciones locales (Fig. 1B y 1E), donde cada CP contacta a sus CPs vecinas en los niveles superior e inferior. De esta manera, las extensiones C-terminal son responsables de las interacciones verticales que sustentan la formación de la hélice.

El RNA viral discurre en una hélice de 70 Å de diámetro (Fig. 1B). Cada CP une cinco ribonucleótidos (Fig. 1C), lo que supone que el genoma completo de PepMV requiere 1290 CPs ordenadas en una partícula de 510 nm, con un incremento axial por CP de 3,95 Å. El modelo de simulación por dinámica molecular de un RNA polyU de 5 ribonucleótidos interaccionando con 4 CPs tetramerizadas (Figura 1F) mostró que el RNA se aloja en un surco continuado con alto potencial electropositivo formado por las CPs a lo largo de los giros de hélice.

Los modelos construidos permitieron identificar residuos potencialmente críticos para el mantenimiento de la estructura de la partícula viral, que parecen participar en la interacción CP-CP, y la interacción CP-RNA. Para validar experimentalmente estas interacciones, puse a punto y utilicé un sistema experimental para testar mutantes en la CP de PepMV con rapidez y eficacia; los resultados obtenidos se describen a continuación. Además, los modelos y datos experimentales generados sugirieron que la interacción CP-RNA es independiente de la secuencia de nucleótidos,

4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS

lo cual contrasta con la encapsidación específica del RNA viral en el virión. También abordé esta cuestión, como se describe a continuación.

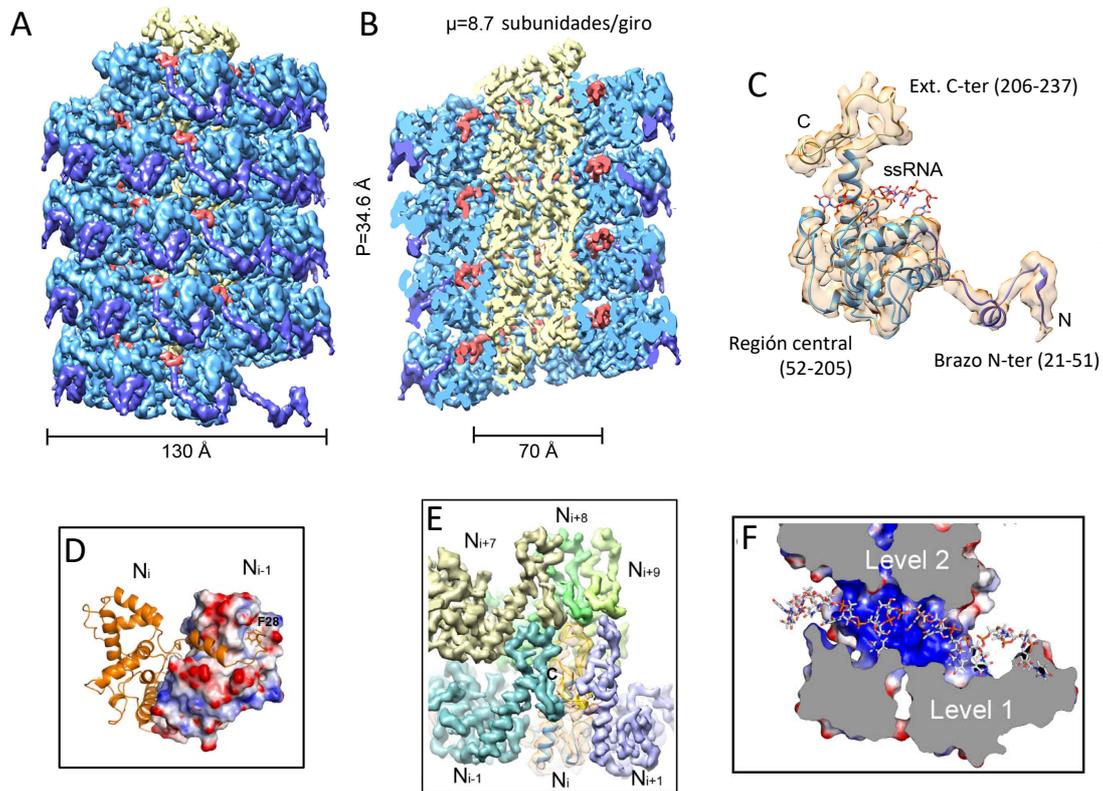


Figura 1. Estructura por crioEM de PepMV y modelo atómico de la CP. (A, B) Representación del mapa 3D de densidad de PepMV que muestra una simetría helicoidal levógira con un *pitch* helicoidal $P=34,6$ Å. El mapa se ve segmentado en cuanto a dominios y se colorea en púrpura el brazo N terminal, en azul la región central y en amarillo la extensión C terminal. El corte longitudinal de la partícula (B) muestra la localización del RNA viral (ssRNA; en rojo) que forma una hélice de 70 Å. (C) Se muestra la densidad aislada de una CP de PepMV semi-transparente, y la representación superpuesta del modelo atómico de la CP. También se representa el RNA viral (ssRNA). De nuevo el código de color es: en púrpura el brazo N terminal, en azul la región central, y en amarillo la extensión C terminal. (D) Se ilustran las interacciones del brazo flexible N terminal, que median en los contactos laterales de las CPs. La subunidad N_i se une a un surco hidrofóbico en la subunidad N_{i-1} a través del brazo N terminal. (E) Modelo de las interacciones a través de la región C terminal flexible, que median en los contactos axiales de las CPs. Densidades segmentadas de seis CPs vistas desde el interior del virión. La subunidad N_i aparece en semi-transparencia e incluye la representación del modelo atómico de la CP. (F) Se ilustra la interacción entre la CP y el RNA viral en el virión. Representación de un corte longitudinal de cuatro CPs de dos giros consecutivos con el RNA viral (ssRNA) entre ellos. Las superficies moleculares se colorean en función de su potencial electrostático usando una escala de colores que van de -5KT (rojo) a +5KT (azul).

4.2. Resultados

4.2.1. Puesta a punto de un sistema en *trans* de ensayo de mutantes de la CP

Con el fin de establecer un sistema para ensayar mutantes en la CP que simplificara los pasos de clonaje necesarios, se recurrió a un clon de PepMV que expresa la GFP en lugar de la CP (PepGFP Δ CP) (Sempere et al. 2011). Este clon no es capaz de establecer focos de infección multicelulares en hoja agroinfiltrada dado que la CP es indispensable en el movimiento célula a célula (Sempere et al. 2011). Al coexpresar PepGFP Δ CP y la CP silvestre en *trans*, se restaura el movimiento célula a célula y hay formación de focos de infección en hojas agroinfiltradas (Sempere et al. 2011). Un grupo de plantas de *N. benthamina* se agroinfiltró por vacío para coexpresar PepGFP Δ CP y la CP silvestre en *trans*, y otro grupo se agroinfiltró para expresar únicamente la CP (Figura 2A). Aproximadamente a los 7 dpa, se recolectaron todas las hojas agroinfiltradas y se purificó PepMV. Las preparaciones de viriones se observaron al microscopio electrónico de transmisión después de inmunomarcarse la CP con oro. En las preparaciones a partir de plantas que expresaban solo la CP no se observó ninguna partícula parecida a virus (*virus-like particle*, VLP) y solo se encontró alguna partícula de oro muy dispersa (Figura 2B). Por el contrario, en las preparaciones de plantas que coexpresaban PepGFP Δ CP y la CP en *trans* se observaron numerosas partículas virales marcadas con oro (Figura 2C). A continuación, las preparaciones de viriones se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo anti-CP de PepMV, y únicamente se detectó la CP en la purificación de virión realizada a partir de hojas que expresaban PepGFP Δ CP junto a la CP (Figura 2D). Estos resultados indican que la CP de PepMV, por sí sola, no es capaz de formar partículas virales, y para ello se requiere la presencia del RNA viral. También permite descartar que RNAs endógenos de la planta, sirvan para iniciar la formación de partículas virales. Además, el sistema descrito hace posible generar con rapidez y probar con eficacia mutantes de la CP en residuos potencialmente críticos en la interacción CP-RNA o CP-CP y, por lo tanto, potencialmente relevantes en la formación de viriones o en el movimiento célula a célula.

4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS

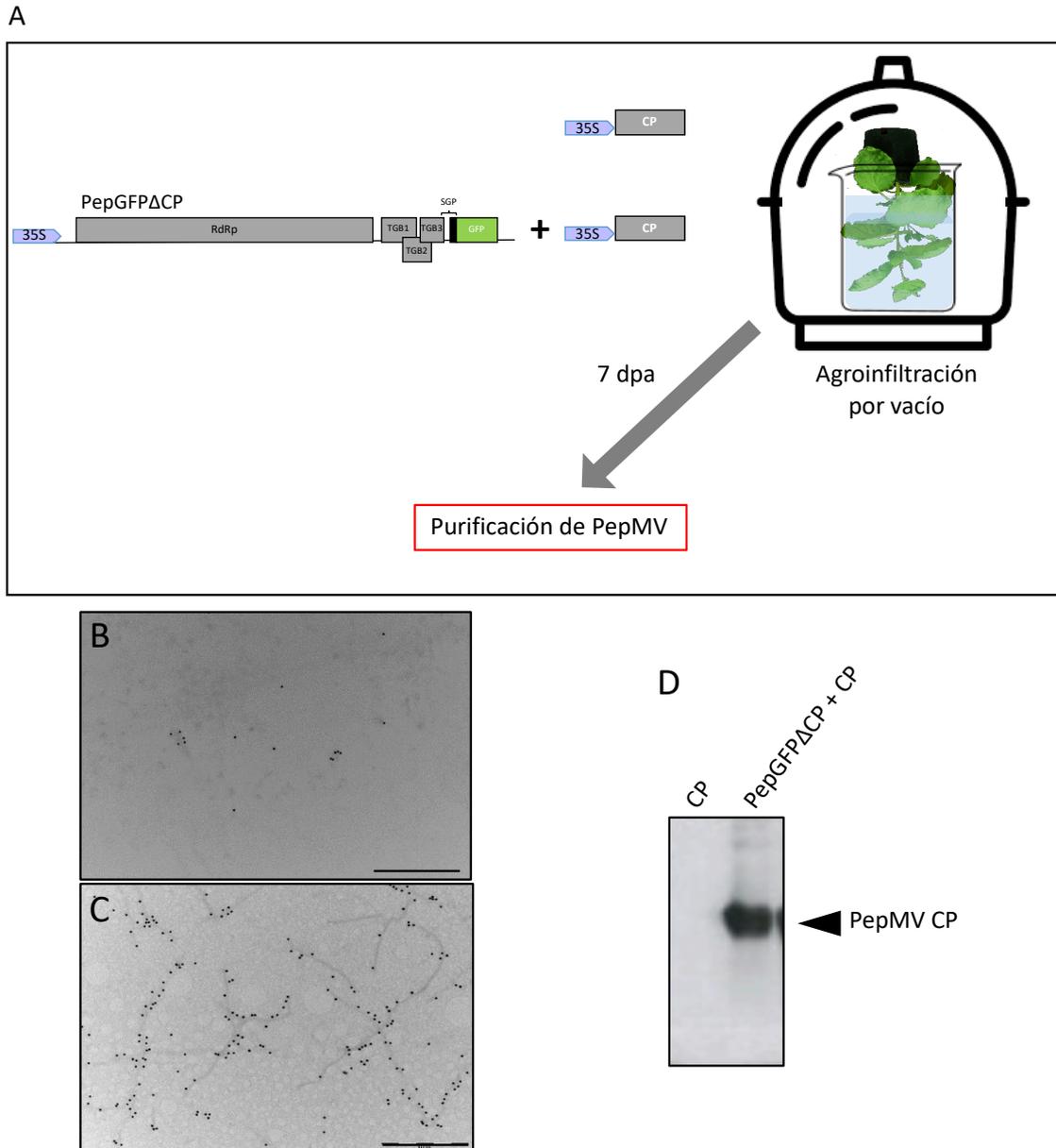


Figura 2. La complementación *in trans* de PepGFPΔCP con la CP resulta en la formación de viriones. (A) Representación esquemática de las construcciones utilizadas para la transformación transitoria de plantas de *N. benthamiana* y el procedimiento seguido en los ensayos de *trans*complementación. Las plantas fueron agroinfiltradas por vacío para expresar la CP sola, o expresar PepGFPΔCP junto a la CP. A los 7 días post agroinfiltración (dpa), se recolectaron todas las hojas infiltradas para purificar PepMV. RdRp: polimerasa de RNA dependiente de RNA; TGB1, 2 y 3: bloque de tres genes 1, 2 y 3; SGP: promotor subgenómico; GFP: proteína verde fluorescente; CP: proteína de la cápsida. (B, C) Observación al microscopio electrónico de transmisión (TEM) de preparaciones de PepMV inmunomarcadas con oro contra la CP. (B) No se observaron partículas de PepMV en la preparación a partir de hojas que expresaban solo la CP. (C) Viriones de PepMV marcados de manera específica con oro en la preparación de virus a partir de hojas que expresaban PepGFPΔCP + CP. (D) Western blot para detectar la CP en las preparaciones de PepMV. Solo se detectó la CP en la preparación a partir de hojas que expresaban PepGFPΔCP + CP.

4.2.2. Interacción entre la CP y el RNA viral

A partir del modelo de simulación por dinámica molecular de un RNA polyU de 5 ribonucleótidos y 4 CPs tetramerizadas, se identificó la posible interacción en las posiciones 1 y 3 del RNA con los residuos S92 y S94 en un lado, y Q203 en el lado opuesto (Figura 3A). La torsión del esqueleto azúcar-fosfato con ángulos de 85° y 130° en estas posiciones (Figura 3B) permite la unión de la base del nucleótido en posición 2 en un bolsillo profundo de la CP (Figura 3C). Tres residuos polares, R124, D163 y K196 establecen puentes de hidrógeno con esta base del RNA. El residuo D163 está en la región más conservada en las CPs del género *Potexvirus*, y en la secuencia consenso FDFFD (Anexo II – Figura 1) constituye el suelo del bolsillo de interacción con el RNA. Para comprobar la relevancia de estos residuos en la interacción CP-RNA, se generaron y testaron mutantes de la CP con sustituciones de un aminoácido en las posiciones K93, R124, D163, K196 o Q203 en ensayos de *trans*complementación de PepGFPΔCP. A los 4 y 6 dpa se monitorizó la aparición de focos de infección verde fluorescentes bajo la lámpara UV y al microscopio láser confocal. Los resultados (Figura 3D) mostraron que los mutantes de la CP en los residuos R124, D163 y K196 que forman el bolsillo de unión a RNA no restauraron el movimiento célula a célula de PepGFPΔCP, lo que sugiere una disrupción de la interacción CP-RNA necesaria en el transporte intercelular del virus. El mutante K93A en el que se sustituye un residuo que se encuentra entre dos aminoácidos (S92 y S94) que interaccionan con el esqueleto azúcar-fosfato del RNA tampoco restaura el movimiento célula a célula del virus defectivo de la CP probablemente también debido a la pérdida de la interacción CP-RNA. En el caso del mutante Q203A, parece que hay una ralentización en el crecimiento de los focos, pero no una disrupción total del movimiento célula a célula.

También se comprobó mediante Western blot si al expresar las CPs mutadas junto al virus defectivo de la CP en hojas de *N. benthamiana* se podían purificar viriones ensamblados. Se logró purificar viriones al suministrar en *trans* la CP silvestre y el mutante Q203A (Figura 3E), mientras que los cambios de un único aminoácido en las posiciones K93, R124, D163, K196 de la CP condujeron a la ausencia de viriones. Esto sugiere que la alteración de la interacción CP-RNA, probablemente con un efecto

4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS

cooperativo entre los miles de CPs que deben construir los viriones, impide el ensamblaje de la partícula viral.

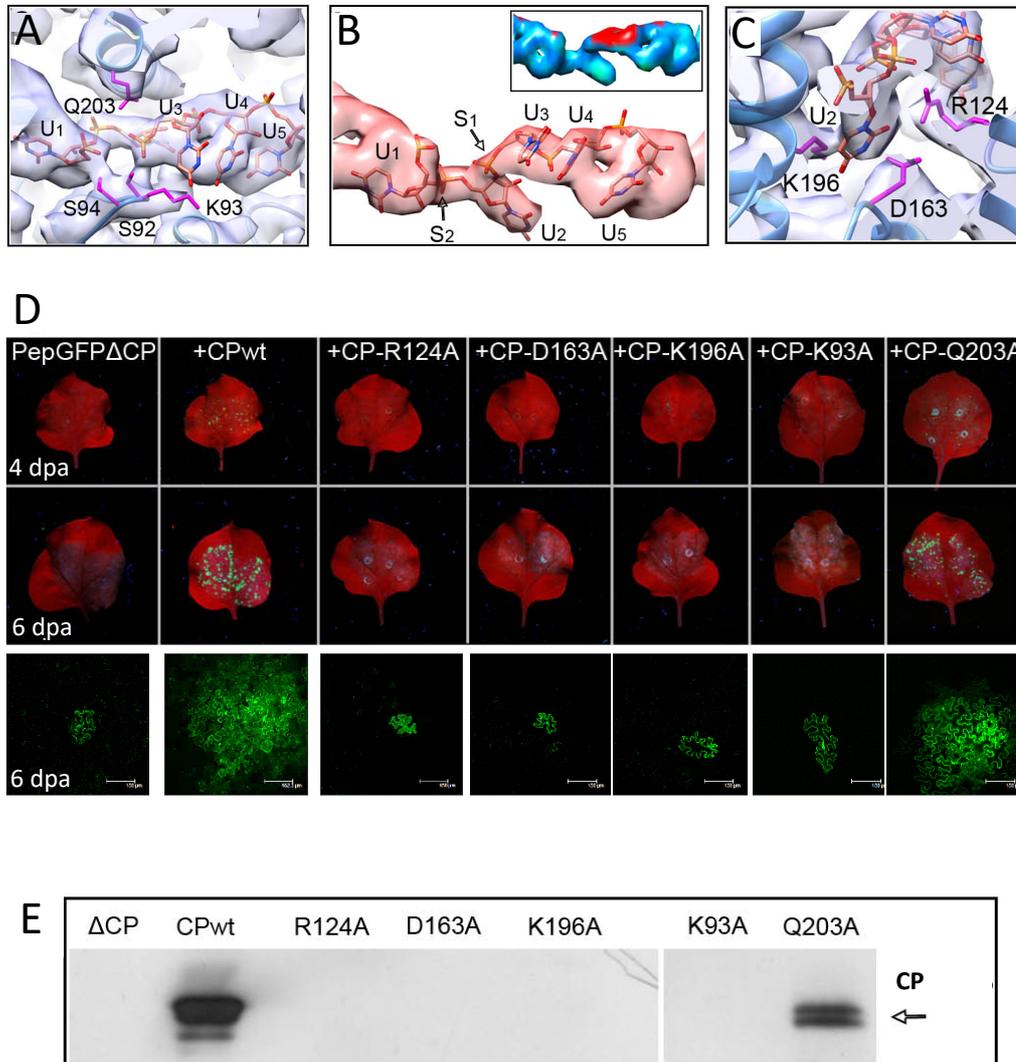
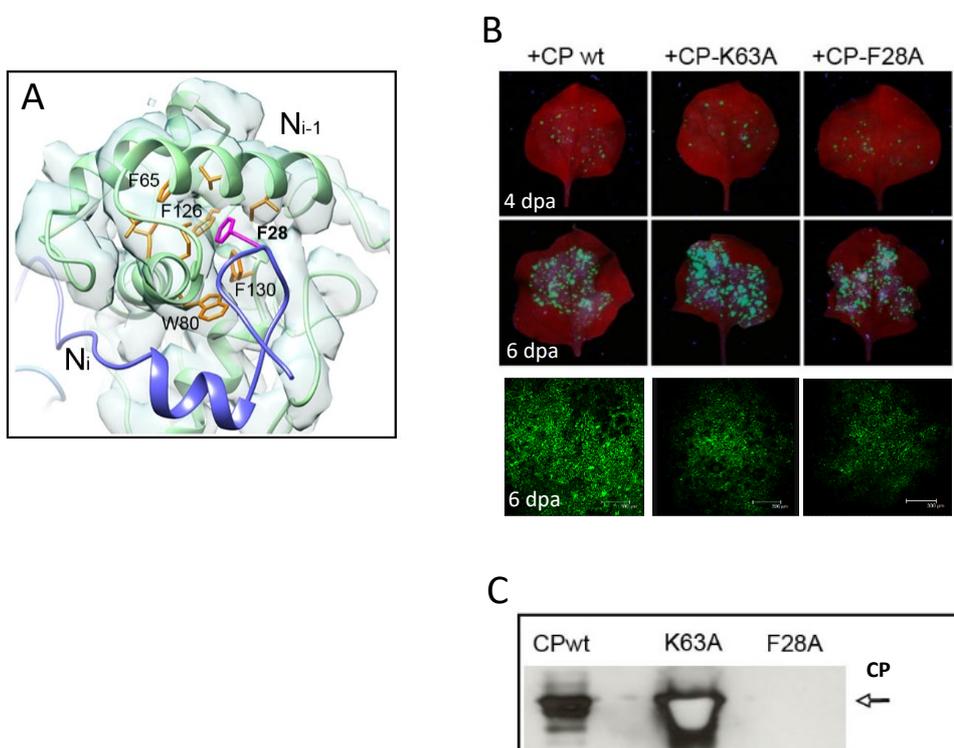


Figura 3. Análisis funcional de los residuos de la CP que interaccionan con el RNA viral. (A) Aumento de la interacción entre la CP y el RNA viral. Los residuos que interaccionan con el esqueleto azúcar-fosfato del RNA están realzados, así como algunas posiciones del pentarribonucleótido poliU. (B) Detalle estructural de la densidad del RNA asociado a una CP. El RNA es un pentarribonucleótido poliU de cadena sencilla modelado. S1 y S2 indican las dos torsiones del esqueleto azúcar-fosfato provocadas por la interacción con la CP. Aparece encuadrada la representación de la densidad del RNA según las medidas de resolución local (azul equivale a unos 4 Å, y rojo a 6 Å de resolución). (C) Aumento de la interacción entre la CP y el RNA viral en el bolsillo de unión a RNA. Los residuos que interaccionan con la base del nucleótido en posición 2 (U2) del RNA están realzados. (D) Ensayo de *transcomplementación* entre PepGFPΔCP y varias CPs mutantes. Las imágenes muestran hojas de *N. benthamiana* observadas bajo iluminación UV a 4 y 6 días post agroinfiltración (dpa), y bajo el microscopio láser confocal a 6 dpa para detectar la expresión de GFP y la aparición de focos fluorescentes. (E) Western blot para detectar la presencia de CP en las purificaciones de viriones a partir de hojas que expresan PepGFPΔCP y las CPs mutantes.

4.2.3. La interacción CP-CP en el virión ensamblado

El residuo F28 del N terminal de cada capsómero se encaja en un bolsillo del surco hidrofóbico del precedente (Figura 1D y 4A). Para la CP de PapMV (Yang et al. 2012) y de BaMV (DiMaio et al. 2015) se han observado interacciones parecidas en las que participan los residuos F13 y W41, respectivamente. La relevancia *in vivo* del residuo F28 en el movimiento célula a célula y la encapsidación se comprobó por complementación *in trans* de PepGFPΔCP con un mutante en la posición F28 de la CP y posterior purificación de viriones. El mutante en posición F28 restauró el movimiento célula a célula del virus defectivo en la CP (Figura 4B), pero no produjo partículas virales (Figura 4C), lo que validó la hipótesis de partida y, además, sugirió que el movimiento intercelular y la encapsidación son procesos que pueden ser desacoplados. En este ensayo también se incluyó como control la *trans*complementación de PepGFPΔCP con el mutante K63A. El residuo K63 se encuentra en la superficie expuesta al solvente del virión y no participa ni en la interacción CP-RNA, ni CP-CP. La sustitución del residuo K63 no derivó en la interrupción del movimiento célula a célula, ni en la pérdida de la capacidad de encapsidar el RNA viral.



4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS

Figura 4. Análisis funcional de un residuo de la CP que participa en el contacto lateral entre CPs en el virión de PepMV. (A) Representación semi-transparente y superposición de la estructura atómica de la región central del capsómero N_{i-1} , y representación de la estructura atómica del brazo N terminal del capsómero N_i alojado en el surco de la región central de N_{i-1} . El residuo F28 que se encaja en un bolsillo hidrofóbico aparece resaltado. (B) Ensayo de *trans*complementación que muestra que la sustitución del residuo F28 permite el movimiento célula a célula. Imágenes de hojas de *N. benthamiana* bajo iluminación UV a 4 y 6 días post agroinfiltración (dpa), y bajo el microscopio láser confocal a 6 dpa. El mutante K63A es un control positivo con una sustitución en un residuo expuesto en el virión. (C) Western blot contra la CP de preparaciones de viriones a partir de hojas que PepGFP Δ CP y las CPs mutantes. La complementación con el mutante de la CP con la sustitución en el residuo F28 no mostró señal de virus purificado.

4.2.4. Existe homología estructural entre la CP de los potexvirus y la NP de los phlebovirus

Para buscar homólogos estructurales de la CP de PepMV, se utilizó el servidor Dali (Holm y Tosenstrom, 2010). Se pudo comprobar que la estructura de la CP de los potexvirus comparte su topología con la de las nucleoproteínas (NPs) de varios representantes del género *Phlebovirus* (familia *Bunyaviridae*), como el virus de la fiebre del valle del Rift (RVFV), el virus Toscana (TOSV), y el virus de la fiebre severa con trombocitopenia (SFTSV). Estos virus infectan animales, incluyendo humanos, son transmitidos por artrópodos y causan importantes problemas de salud pública. Sus NPs se asocian con los tres RNAs de cadena sencilla y polaridad negativa que constituyen el genoma de los phlebovirus, formando tres ribonucleoproteínas en forma de collar de cuentas que quedan protegidas dentro de una envuelta glicoproteica (Freiberg et al. 2008; Huisken et al. 2009). Los géneros *Potexvirus* y *Phlebovirus* pertenecen a superfamilias de virus de RNA diferentes, no obstante, la CP de los potexvirus y la NP de los phlebovirus presentan una topología muy similar (ilustrada por RVFV) (Figura 9A y 9C), con un TM-score de 0,51 cuando son alineadas, lo que apunta a una familia de plegamiento común (Zhang y Skolnick, 2005). El TM-score es una medida de la similitud entre la estructura terciaria de dos proteínas. Su valor puede variar entre 0 y 1, siendo 1 el alineamiento perfecto de dos estructuras terciarias, y a partir de 0,5 se asume que dos proteínas tienen el mismo plegamiento. Las similitudes incluyen: la topología completa de la región central que forma un dominio compuesto de hélices alfa; el brazo

4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS

N-terminal y su sitio de unión a la proteína adyacente, y por lo tanto el mecanismo de oligomerización lateral; el surco para la unión con el RNA viral; y la posición relativa de todos estos elementos. La divergencia entre la CP de los potexvirus y la NP de los phlebovirus se encuentra en sus regiones C-terminales. El extremo C-terminal de la CP de PepMV sobresale del núcleo de la proteína (Fig. 9B) y permite las interacciones longitudinales para construir la hélice. El extremo C-terminal de la NP de los phlebovirus se pliega hacia la región central de la proteína y forma parte del sitio de unión a RNA donde se alojan siete bases por NP (Fig 9D). La posición del extremo C-terminal de las NPs de los phlebovirus no permite el ensamblaje longitudinal, por lo tanto, las RNPs quedan ensambladas de manera más holgada (Raymond et al. 2012) que las partículas virales de los potexvirus.

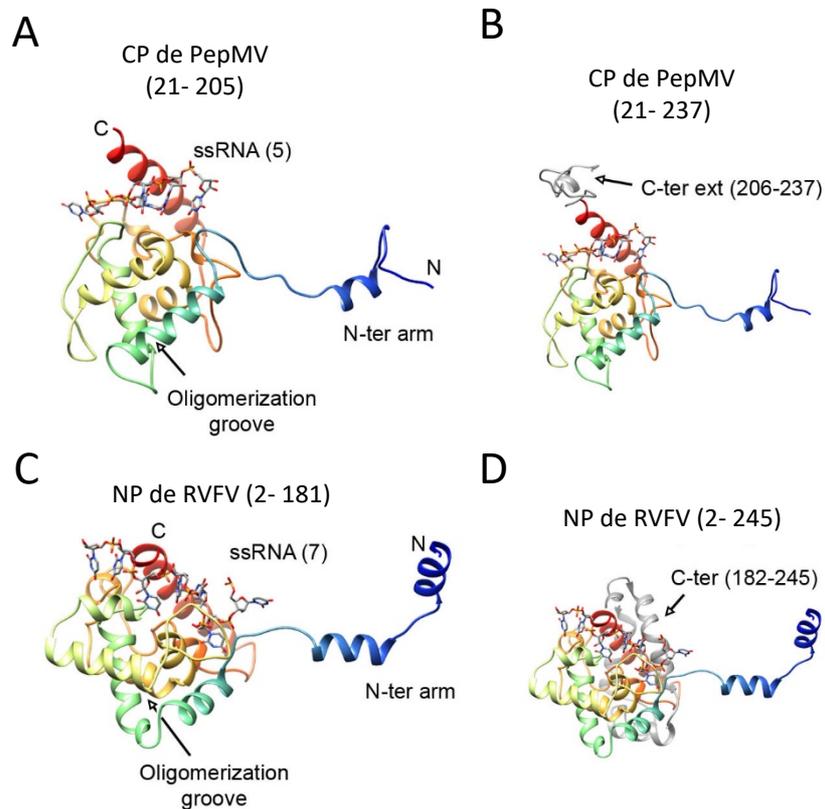


Figura 5. Homología estructural entre la CP de PepMV y la NP de los phlebovirus. (A-D) Las estructuras atómicas la CP de PepMV y de la NP de RVFV (código PDB 4h5o) (Raymond et al. 2012) se representan en orientaciones similares. Las representaciones incluyen el respectivo RNA viral (ssRNA). Ambas proteínas están coloreadas en modo arcoíris y su similitud topológica se ve clara cuando se les retira la región C terminal (A y C). Las regiones C terminales aparece en gris en B y D.

4.2.5. El extremo 5' del RNA genómico de PepMV es necesario para la formación de partículas virales

El trabajo descrito más arriba demostró que la CP de PepMV es dependiente del RNA viral para formar viriones (Figura 2). Esto conduce a la idea de la existencia de un origen de encapsidación (OAS) en el genoma de PepMV. Se sabe que para otros potexvirus el OAS se encuentra en el extremo 5' del genoma viral, y en concreto para PVX, en el 5'SL1 (Kwon et al. 2005; Sit, Leclerc, y Abou Haidar 1994). Una predicción de estructura secundaria del extremo 5'-terminal del RNA de PepMV mostró la posible existencia de una estructura muy parecido al 5'SL1 de PVX (Figura 6A). Cabe destacar que pese a la enorme homología estructural entre el elemento 5'SL1 de PepMV y PVX, sus secuencias son muy distintas (Figura 6B). En la predicción de la estructura secundaria del extremo 5' de PepMV, los 27 primeros nucleótidos del RNA están desapareados y continúan con el 5'SL1, que abarca del nucleótido 27 al 110. La predicción de la estructura secundaria del 5'SL1 de PepMV tiene un tetranucleótido GAAA en su extremo, igual que ocurre con PVX. El codón AUG de inicio de la traducción de la RdRp se encuentra en los nucleótidos en posiciones 87 a 89, y forma parte del 5'SL1.

4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS

genoma y por lo tanto carece del 5'SL1 (Figura 7A). El RNA que expresa el clon Pep(87-344)GFP comienza en el codón de inicio de la traducción de la RdRp y es una fusión de los primeros 258 nucleótidos de la CDS de la RdRp a la CDS de la GFP. Ambos clones se generaron como fusiones a la GFP para monitorizar la expresión de RNA sin necesidad de realizar extracciones y análisis de RNA. Al expresar mediante agroinfiltración cualquiera de las dos construcciones en hojas de *N. benthamiana* pudimos observar bajo el microscopio de fluorescencia la señal emitida por la GFP (Figura 7B). Se concluyó que ambas construcciones expresaban el RNA de interés. Los clones Pep(1-344)GFP y Pep(87-344)GFP se coexpresaron con la CP de PepMV mediante agroinfiltración por vacío de plantas completas de *N. benthamiana*. A los 7 dpa se recolectaron las hojas agroinfiltradas para realizar purificaciones de VLPs, que se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (Figura 8A). Solo se identificaron unas estructuras que recordaron a VLPs en la preparación de Pep(1-344)GFP (Figura 8B y 8C). Para confirmar estas observaciones, se inmunomarcó la CP en la preparación de Pep(1-344)GFP, identificándose inequívocamente VLPs (Figura 8D). Estos resultados sugieren que el OAS de PepMV se encuentra en la posición predicha del 5' UTR del genoma viral. Cabe destacar que con este sistema se obtiene una baja cantidad de VLPs, lo que dificulta su rastreo en las rejillas de microscopía electrónica y, por lo tanto, esta estrategia se descartó para un mapeo más fino del OAS.

4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS

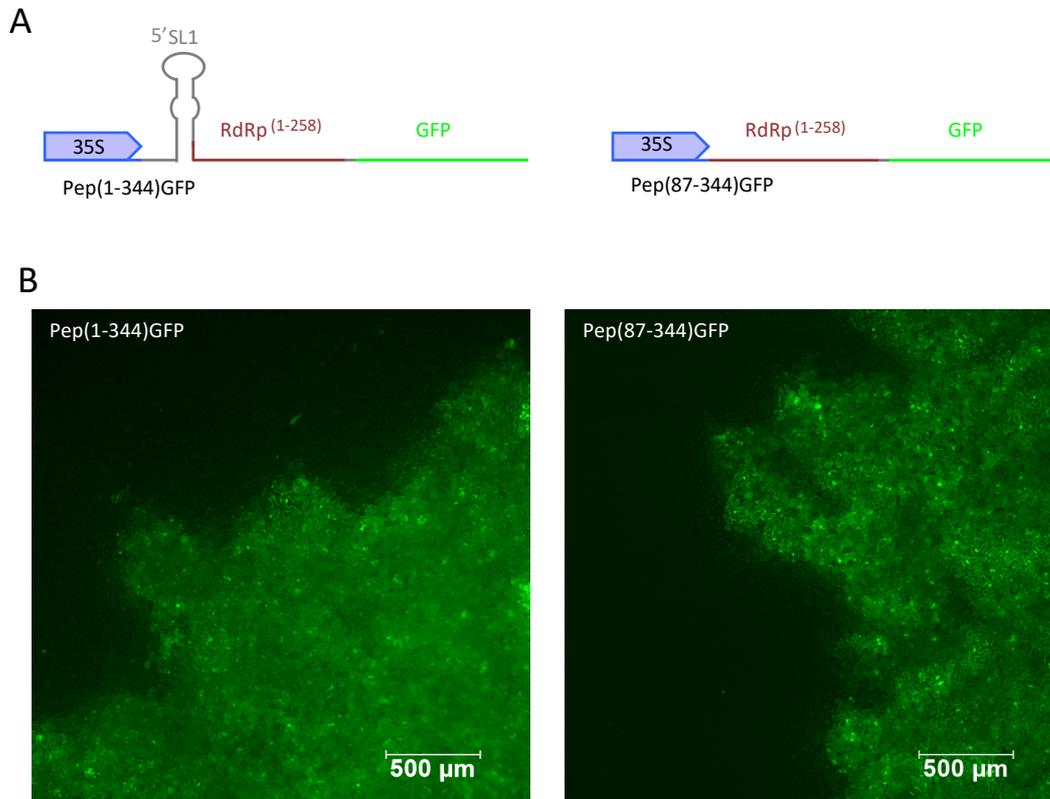


Figura 7. Pep(1-344)GFP y Pep(87-344)GFP expresan un RNA traducible. (A) Representación esquemática de Pep(1-344)GFP y Pep(87-344)GFP. 35S: promotor 35S; 5'SL1: estructura tallo-bucle 1 del extremo 5'; RdRp: polimerasa de RNA dependiente de RNA y entre paréntesis la longitud de la secuencia nucleotídica de RdRp; GFP: proteína verde fluorescente. (B) Observación al microscopio de fluorescencia del borde de un área de hoja de *N. benthamiana* agroinfiltrada con Pep(1-344)GFP y Pep(87-344)GFP.

4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS

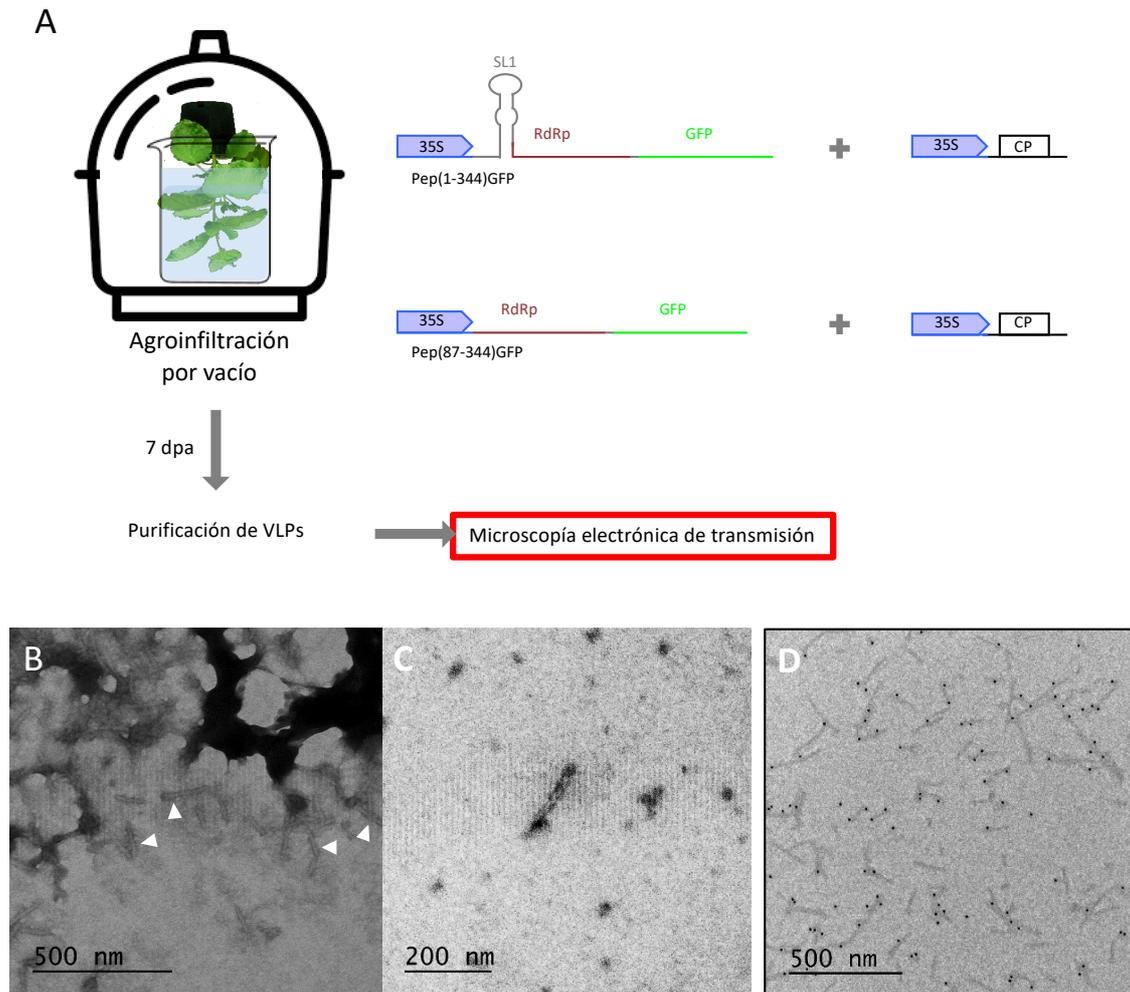
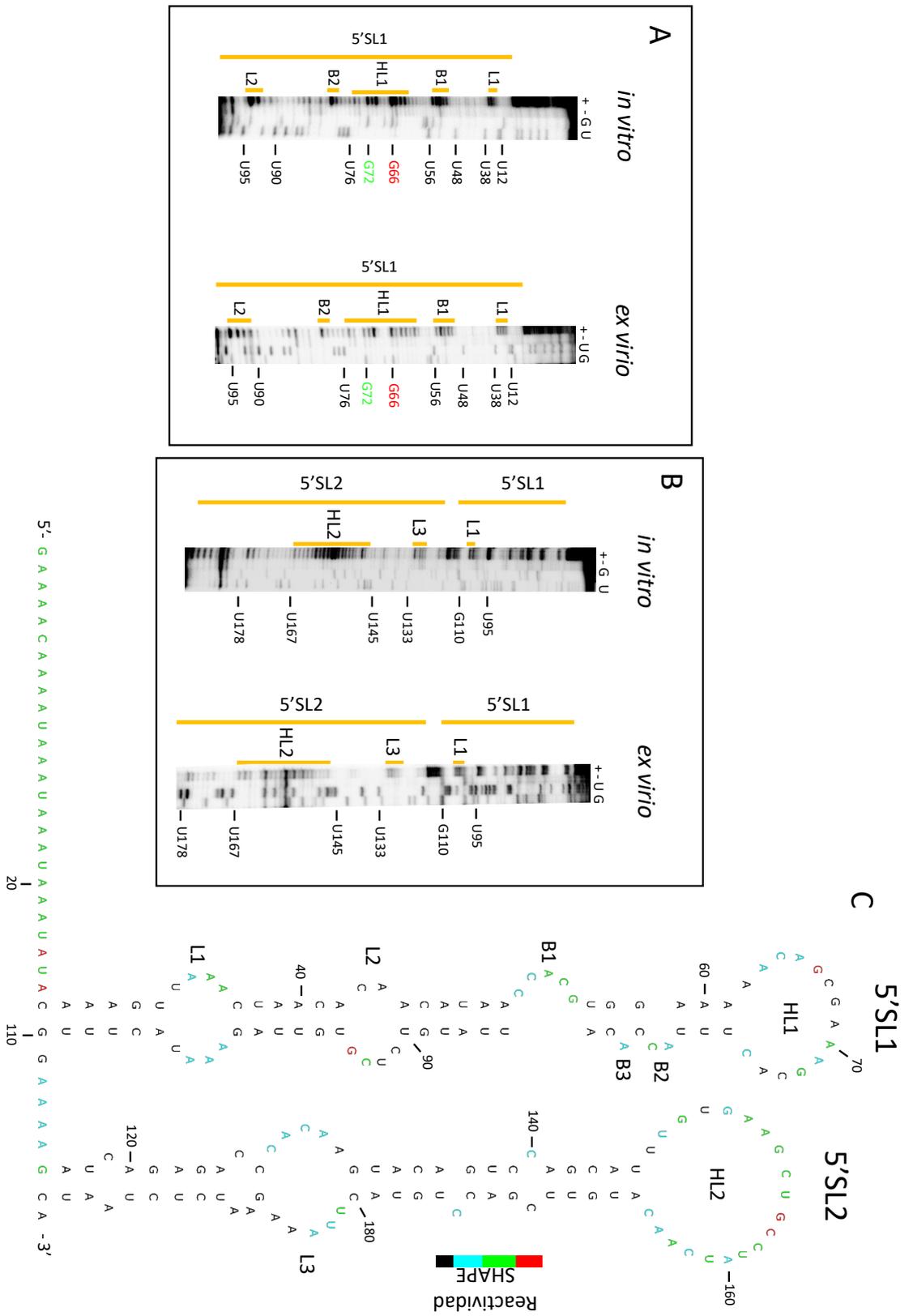


Figura 8. El OAS de PepMV se localiza en el extremo 5' del genoma viral. (A) Representación esquemática de las construcciones utilizadas para la transformación transitoria de plantas de *N. benthamiana* y procedimiento experimental. A 7 días post agroinfiltración (7 dpa) por vacío de Pep(1-344)GFP + CP, o Pep(87-344)GFP + CP, se recolectaron las hojas infiltradas para purificar partículas parecidas a virus (*virus-like particles*; VLPs). (B, C) Micrografías tomadas con un microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12 de VLPs de Pep(1-344)GFP. Las flechas (B) señalan VLPs. (D) Micrografía de VLPs de Pep(1-344)GFP inmunomarcadas con oro. Imagen tomada con un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1011.

4.2.6. **SHAPE *in vitro* y *ex virio* del origen de encapsidación en el extremo 5' del RNA genómico de PepMV**

La estructura secundaria del 5'SL1 de PepMV fue resuelta mediante acilación de los grupos 2'-hidroxilo analizada por extensión del cebador (SHAPE). Este experimento se hizo utilizando RNA *in vitro* y RNA *ex virio*. Para el ensayo de SHAPE de RNA *in vitro* se utilizó como molde el transcrito *in vitro* del extremo 5' del genoma de PepMV, mientras que para el SHAPE de RNA *ex virio* se utilizó RNA viral desencapsidado. Los RNAs *in vitro* y *ex virio* se trataron con cianuro de benzoilo (BzCN) que modifica los nucleótidos accesibles no apareados con independencia de secuencia de manera que se bloquea la transcripción reversa (Mortimer y Weeks, 2008). La extensión del cebador de los RNAs modificados mostró que la estructura del 5'SL1 del RNA *in vitro* es idéntica a la del RNA viral (Figura 9A). Esto sugiere que el plegamiento del 5'SL1 no se ve influido por la longitud completa del genoma del virus. A continuación, ensayos de SHAPE con concentraciones crecientes de Mg²⁺ mostraron que el plegamiento del 5'SL1 se mantenía constante con independencia de la concentración de cationes divalentes. Los primeros 26 nucleótidos del RNA viral mostraron una alta reactividad con el agente BzCN, lo que indica que están desapareados. El 5'SL1 abarca del nucleótido 27 al 110 y tiene forma de horquilla (Figura 9C), tal y como mostró la predicción (Figura 6A). Desde la base del 5'SL1 hasta su extremo aparecen dos bucles internos (L1 y L2), tres protuberancias (B1, B2 y B3) y un bucle apical (HL1) en el extremo de la horquilla (Figura 9C). El bucle HL1 está formado por 14 nucleótidos que van de la posición 62 a 75. Esto contrasta con el *tetra*loop GAAA en el apice del 5'SL1 resuelto para PVX (Miller et al. 1998), o predicho para PepMV (Figura 6A). Además, los nucleótidos en las posiciones G66 y G72 que flanquean el *tetra*loop GAAA presentan una reactividad muy alta, lo que indica que están desapareados y no forman el dúplex necesario para que se forme el *tetra*loop GAAA (Figura 9A y 9C).

4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS



4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS

Figura 9. Estructura secundaria del extremo 5' del genoma de PepMV determinado por SHAPE. (A, B) Productos de la extensión del cebador a partir de RNAs molde *in vitro* y *ex virio* tratados (+) y sin tratar (-) con BzCN fraccionados en un PAGE desnaturalizante. Los marcadores de tamaño se generaron por transcripción reversa de RNA sin modificar en presencia de ddCTP (G) o ddATP (U). (A) Las posiciones U12, U38, U48, U56, G66, G72, U76, U90 y U95 se indican a la derecha. G66 y G72 aparecen coloreadas según la escala de colores de la reactividad en el SHAPE. Las regiones más accesibles que forman los bucles 1 y 2 (L1 y L2), los protuberancias 1 y 2 (B1 y B2) y el bucle apical (HL1) del elemento tallo-bucle 1 del extremo 5' (5'SL1) se señalan a la izquierda del gel. (B) Las posiciones U95, G110, U133, U145, U167, y U178 se indican a la derecha. Las regiones más accesibles que forman el bucle 1 (L1) de 5'SL1, y el bucle 3 (L3) y el bucle apical (HL2) del elemento tallo-bucle 2 del extremo 5' (5'SL2) se señalan a la izquierda del gel. (C) Modelo de la estructura secundaria el extremo 5' del genoma de PepMV. El código de colores indica los niveles de reactividad al BzCN de cada nucleótido, donde los colores cálidos indican mayor modificación.

El genoma de PepMV tiene otra estructura bucle-tallo (5'SL2) predicha justo aguas abajo del 5'SL1. Este elemento de RNA también se ha estudiado para PVX (Miller, Plante, Kim, Brown, & Hemenway, 1998). Para resolver la estructura del 5'SL2 se utilizó de nuevo la técnica de SHAPE, y de nuevo, no se observaron diferencias entre las estructuras obtenidas a partir de RNAs *in vitro* o *ex virio* (Figura 9B). La extensión del cebador mostró que 5'SL1 y 5'SL2 están unidos a través de 5 nucleótidos (GAAAAA) desapareados (Figura 9C). La horquilla 5'SL2 abarca del nucleótido 116 al 198 y se identificó una región expuesta (HL2) modificada por el compuesto BzCN que corresponde al bucle del extremo de la horquilla, formado por 20 nucleótidos entre las posiciones 146 a la 165 del genoma viral (Figura 9C). En 5'SL2 hay otra región expuesta al agente modificante que corresponde a un bucle interno (L3) (Figura 9C).

4.3. Discusión

En este trabajo se ha generado un modelo de alta resolución de la partícula de PepMV y de la CP, y se han identificado residuos críticos que participan en la interacción CP-CP y CP-RNA durante la formación del virión y el movimiento célula a célula, contribuyendo a entender aspectos fundamentales de la relación estructura-función de la CP y la partícula de potexvirus. El mapa de crioEM de PepMV tiene la resolución más alta que se ha logrado nunca para un potexvirus, y la segunda que se ha alcanzado para un virus filamentoso flexible por detrás del mapa de PVY resuelto recientemente (Kežar et al. 2019). La arquitectura de PepMV es una hélice levógira (Figura 1A), y no dextrógira como proponían los primeros modelos crioEM de potexvirus que se inspiraron en la partícula de TMV para su reconstrucción (Kendall et al. 2008, 2013). El mapa 3D obtenido por crioEM de PepMV, así como el de BaMV (DiMaio et al. 2015), logran una resolución que ha permitido crear modelos atómicos de las CPs ensambladas y han confirmado la simetría helicoidal levógira de la partícula de los potexvirus. Como para BaMV (DiMaio et al. 2015), las interacciones entre CPs a través del brazo N-terminal y la región C-terminal permiten movimientos relativos entre CPs y explican la naturaleza flexuosa del virión de los potexvirus. Además, el mapa de la partícula de PepMV es el primero que ha resuelto la estructura del RNA viral dentro de la cápsida de un virus filamentoso flexuoso. La señal separa claramente cada nucleótido de manera individual, pero no es posible identificar las bases debido a que las secciones de virión empleadas para la reconstrucción del mapa encapsidan diferentes tramos de secuencia del RNA viral. Esto ha permitido observaciones adicionales nunca antes hechas, como determinar la interacción entre la CP y el RNA viral.

4.3.1. El ensamblaje del virión y el movimiento célula a célula son procesos que requieren la misma interacción CP-RNA, pero que se pueden desacoplar

La interacción CP-RNA es necesaria además de para la formación del virión, para el movimiento célula a célula del virus. En este trabajo se ha descrito con precisión casi atómica, un bolsillo de unión a RNA en la región central de la CP en el que se acopla la

4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS

base de un nucleótido del RNA viral (Figura 3C) y que tiene un tamaño lo suficientemente grande como para alojar pirimidinas o purinas. La presencia de tres aminoácidos (R124, D163 y K196) asegura la interacción mediante puentes de hidrógeno con el RNA sea cual sea el nucleótido. En los ensayos de *transcomplementación* y purificación de virus se comprobó que los aminoácidos R124, D163 y K196 son necesarios para el movimiento célula a célula y para la encapsidación (Figura 3D y 3E), lo que sugiere que la sustitución de cualquiera de ellos conduce a una disrupción de la interacción CP-RNA necesaria para el transporte intercelular del virus y para la encapsidación. Por otro lado, parece que los residuos en posición S92 y S93 interaccionan con la cadena azúcar-fosfato del RNA y permiten su torsión, lo que conduce al acoplamiento de la base del nucleótido dentro del bolsillo de unión a RNA. La sustitución K93A condujo de nuevo a la pérdida del movimiento célula a célula y la ausencia de viriones (Figura 3D y 3E), debido posiblemente a cambios estructurales en el *loop* que contiene S92 y S94, y la consecuente disrupción de la interacción CP-RNA. El residuo Q203 se encuentra en el extremo C de la hélice alfa que forma la base de la extensión C terminal. Este residuo queda por encima del bolsillo de unión a RNA y parece interaccionar con la cadena azúcar fosfato permitiendo una segunda torsión del RNA. La sustitución Q203A condujo a una ralentización del movimiento célula a célula y a la formación de viriones (Figura 3D y 3E). Es posible que este residuo participe en la interacción CP-RNA, pero no de manera crítica, y su sustitución conduzca a una pérdida de afinidad o de estabilidad de la interacción.

Nuestros resultados indican que la unión del RNA a la CP durante el movimiento célula a célula y durante la encapsidación ocurre en el mismo sitio de la CP, y probablemente este sea el único sitio de unión a RNA de la proteína. Esto apoya la idea de que el movimiento célula a célula y la encapsidación estén acoplados, y que el virus se mueve a través del PD encapsidado, o parcialmente encapsidado (Tilsner et al. 2013; Verchot-Lubicz et al. 2010). No obstante, al sustituir el residuo F28 que participa en la oligomerización lateral de las CPs, se mantuvo el movimiento célula a célula, pero no se recuperaron partículas virales (Figura 4B y 4C). Este resultado sugiere que el RNA del virus no necesite encapsidarse para moverse a través del PD, lo que apoya la hipótesis de que el tráfico de los potexvirus a través del PD está mediado por un complejo de

4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS

movimiento ribonucleoproteico (RNP) y no por la formación de viriones (Lough et al. 2000). Es posible que el tráfico de los potexvirus a través del PD ocurra de las dos maneras, mediado por un complejo RNP formado al menos por el RNA viral, una CP y una TGB1, y que también ocurra en forma de virión total o parcialmente encapsidado. El movimiento célula a célula tiene lugar a tiempos muy tempranos de la infección (Tilsner et al. 2013), cuando la CP se acumula a niveles muy bajos. En este momento puede que se imponga el transporte intercelular mediado por un complejo RNP en el que participen una o unas pocas CPs. Al avanzar la infección, el RNA viral es más susceptible de encapsidarse total o parcialmente por la mayor acumulación de CP en la célula.

No es la primera vez que se logra desacoplar movimiento célula a célula y encapsidación de un potexvirus. En el trabajo de Lough et al. (2000), la delección de los 5 últimos aminoácidos del extremo C terminal de la CP del potexvirus del mosaico del trébol blanco (WCIMV) conduce a una pérdida del movimiento célula a célula, pero permite la formación de viriones. En principio, esta mutación no afectaría a la interacción CP-RNA ya que permite el ensamblaje de viriones, por lo tanto, queda pendiente entender el papel que juega el extremo C terminal de la CP en el movimiento célula a célula. Quizá el extremo C terminal participe en la interacción con la TGB1 o con algún factor del huésped para formar la RNP de movimiento.

4.3.2. La homología entre la CP de los virus filamentosos flexuosos de plantas y la NP de los phlebovirus sugiere una transferencia horizontal del gen CP/NP

A día de hoy, además del modelo de PepMV, existen modelos a alta resolución de las CPs de otros cuatro virus filamentosos flexuosos de plantas, que incluyen dos miembros del género *Potexvirus* (Agirrezabala et al. 2015; DiMaio et al. 2015) y dos miembros del género *Potyvirus* (Kežar et al. 2019; Zamora et al. 2017). Estas CPs tienen el mismo plegamiento, se ensamblan de la misma manera para formar el virión y comparten el bolsillo de interacción con el RNA formado por una serina, una arginina y un ácido aspártico conservados en todas las familias de virus filamentosos flexuosos de

4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS

plantas (Zamora et al. 2017). Debido a esta homología, se cree que las CPs de los virus filamentosos flexuosos de plantas tienen un origen evolutivo común y que el gen que la codifica se transfirió horizontalmente entre familias muy alejadas filogenéticamente (Koonin, Dolja, y Krupovic 2015; Zamora et al. 2017). En este trabajo se ha ido más allá, y se ha identificado la homología estructural entre la CP de PepMV y la NP de algunos miembros del género *Phlebovirus* (familia *Bunyaviridae*). Los phlebovirus son virus de RNA de polaridad negativa y genoma segmentado que pertenecen a una superfamilia diferente a los potexvirus. La organización genómica y la arquitectura de la partícula de los phlebovirus es totalmente diferente a las de los potexvirus. Estos virus tienen envuelta lipídica y son esféricos, y en su interior se encuentran las ribonucleoproteínas formadas por los RNA virales cubiertos por NPs. Los estudios cristalográficos sobre las NPs de los phlebovirus muestran oligómeros tetraméricos, pentaméricos y hexaméricos en los que cada NP interacciona con la región central de la NP adyacente a través del brazo N-terminal (Zhou et al. 2013) siguiendo el mismo mecanismo de oligomerización lateral visto en los potexvirus. Las NPs de phlebovirus también tienen el mismo surco de unión a RNA que tienen los virus filamentosos flexuosos de plantas (Figura 5). Las CPs de los virus filamentosos flexuosos de plantas y las NPs de los phlebovirus tienen en común que protegen el RNA viral. Por otro lado, estos virus pertenecen a grupos evolutivamente muy distantes, y nunca antes se había evidenciado la homología estructural entre ellos. Este trabajo aporta datos que pueden sugerir una transferencia génica horizontal entre los géneros de virus filamentosos flexuosos de plantas y el género *Phlebovirus*. Mientras que los potexvirus y el resto de virus filamentosos flexuosos infectan plantas, los miembros del género *Phlebovirus* infectan animales. Algunos miembros de la familia *Bunyaviridae*, que pertenecen al género *Tospovirus*, se transmiten y replican en artrópodos, e infectan plantas (Ammar et al. 2009; Guu, Zheng, y Tao 2012). Un tipo similar de virus pudo haber mediado la transferencia de los genes CP/NP entre grupos distanciados de virus y con diferentes gamas de huéspedes.

4.3.3. El OAS de PepMV se encuentra en el extremo 5' de su genoma y funciona de manera modular

Las CPs de algunos miembros del género potexvirus son capaces de oligomerizar *in vitro* en forma de VLP (A. Mukhamedzhanova 2011). Por el contrario, otras CPs de potexvirus requieren la presencia del RNA viral que funciona como andamiaje para la formación de VLPs *in vitro* (Kwon et al. 2005; Sit, Leclerc, y Abou Haidar 1994). Los resultados obtenidos al utilizar el sistema de expresión *in planta* de la CP y PepGFPΔCP, sugieren que la CP de PepMV requiere la presencia del RNA viral para oligomerizar y formar el virión. Además, la CP de PepMV no parece tener afinidad por ningún RNA endógeno de la planta capaz de iniciar la encapsidación. Estos resultados conducen a la idea de que la CP de PepMV encapsida con alta especificidad el RNA genómico del virus y no RNAs foráneos, lo que supondría una disminución de la eficiencia en la transmisión. En el caso de la CP de PVX es necesario el RNA genómico para formar VLPs y se ha identificado el OAS en el extremo del elemento de RNA 5'SL1 del virus (Kwon et al. 2005). La función como OAS del 5'SL1 depende de la estructura secundaria y es independiente de secuencia (Kwon et al. 2005). Los autores de este trabajo logran acotar la secuencia entre los nucleótidos 51 a 84 del genoma de PVX como el elemento mínimo necesario para iniciar la encapsidación de RNAs de diferentes longitudes. No obstante, este y el resto de trabajos sobre encapsidación de potexvirus se realizaron en condiciones *in vitro*. En esta tesis se ha obtenido evidencia de que el OAS de PepMV también se encuentra en el entorno del extremo 5' del genoma, muy probablemente en el 5'SL1, y se ha resuelto su estructura secundaria mediante SHAPE. El 5'SL1 de PepMV, que las predicciones asemejaban mucho al 5'SL1 de PVX, tiene la mayor diferencia respecto al de PVX en el bucle apical. En PVX el ápice del 5'SL1 es un *tetra*loop de secuencia GAAA que ha sido ampliamente estudiado y se ha relacionado con la replicación del virus (Miller et al. 1998). En cambio, el 5'SL1 de PepMV tiene un bucle apical de 14 nucleótidos, pero que contiene un GAAA flanqueado por nucleótidos complementarios que de aparearse formarían el mismo *tetra*loop. El 5'SL1 de PVX también se ha comprobado que es necesario para el movimiento célula a célula del RNA viral (Lough

4. Análisis estructural de la proteína de la cápsida e identificación de un OAS

et al. 2006). Este elemento de RNA funciona como señal de reconocimiento del RNA viral por parte de la CP, y parece mediar en los procesos que requieren la interacción CP-RNA.

Por otro lado, además de mapear el OAS de PepMV, se ha logrado purificar VLPs producidas *in planta* proporcionando a la CP un RNA no replicativo que contiene el extremo 5' del genoma viral fusionado a un RNA heterólogo correspondiente al transcrito de la GFP. Al igual que ocurre con un sistema similar basado en TMV (Saunders y Lomonosoff 2017), parece que la longitud del RNA define la longitud de la VLP. En el trabajo de Saunders y Lomonosoff (2017) utilizan RNAs de distinta longitud que incluyen el OAS de TMV para generar VLPs de diferentes tamaños decoradas con un péptido al que se une cobalto-platino con el fin de generar nano-cables. En los últimos tiempos la virología sintética de plantas ha despertado mucho interés en los campos de la nano-biotecnología y nano-medicina (Steele et al. 2017). Por ejemplo, se han observado recientemente las propiedades *tumor homing* de PepMV y PVX (Le et al. 2019). Según los resultados obtenidos en esta tesis, sería posible desarrollar un sistema de producción en planta de VLPs que se dirijan a tumores, con la posibilidad de decorar las CPs con efectores y con la capacidad de contener RNAs de carga. Por estas posibilidades biotecnológicas, creo que el estudio del OAS de PepMV es de gran interés en el campo nano-biotecnológico.

5. Identificación de proteínas de tomate que interaccionan con la proteína de la cápsida

Contenido inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 17 de julio de 2019.

6. *Conclusions / Conclusiones*

Contenido inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 17 de julio de 2019.

7. Anexos

Contenido inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 17 de julio de 2019.

8. Bibliografía

- A. Mukhamedzhanova, Anna. 2011. "Characterization of Alternanthera Mosaic Virus and Its Coat Protein." *The Open Virology Journal* 5(1):136–40.
- AbouHaidar, M. G., H. Xu, and K. L. Hefferon. 1998. "Potexvirus Isolation and RNA Extraction." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 81:131–43.
- Adams, M. J., J. F. Antoniw, M. Bar-Joseph, A. A. Brunt, T. Candresse, G. D. Foster, G. P. Martelli, R. G. Milne, and C. M. Fauquet. 2004. "Virology Division News: The New Plant Virus Family Flexiviridae and Assessment of Molecular Criteria for Species Demarcation." *Archives of Virology* 149(5):1045–60.
- Adams, Michael J., John F. Antoniw, and Jan Kreuzer. 2009. "Virgaviridae: A New Family of Rod-Shaped Plant Viruses." *Archives of Virology* 154(12):1967–72.
- Adams, Michael J., Elliot J. Lefkowitz, Andrew M. Q. King, Balázs Harrach, Robert L. Harrison, Nick J. Knowles, Andrew M. Kropinski, Mart Krupovic, Jens H. Kuhn, Arcady R. Mushegian, Max Nibert, Sead Sabanadzovic, Hélène Sanfaçon, Stuart G. Siddell, Peter Simmonds, Arvind Varsani, Francisco Murilo Zerbini, Alexander E. Gorbalenya, and Andrew J. Davison. 2016. "Ratification Vote on Taxonomic Proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016)." *Archives of Virology* 161(10):2921–49.
- Agirrezabala, Xabier, Eduardo Méndez-López, Gorka Lasso, M. Amelia Sánchez-Pina, Miguel Aranda, and Mikel Valle. 2015. "The Near-Atomic CryoEM Structure of a Flexible Filamentous Plant Virus Shows Homology of Its Coat Protein with Nucleoproteins of Animal Viruses." *ELife* 4(DECEMBER2015):1–11.
- Agüero, Jesús, Cristina Gómez-Aix, Raquel N. Sempere, Julio García-Villalba, Jorge García-N  n  ez, Yolanda Hernando, and Miguel A. Aranda. 2018. "Stable and Broad Spectrum Cross-Protection Against Pepino Mosaic Virus Attained by Mixed Infection." *Frontiers in Plant Science* 9(December):1–12.
- Aguilar, J. M., M. D. Hernández-Gallardo, J. L. Cenis, A. Lacasa, M. A. Aranda, M. D. Hernández-Gallardo, J. L. Cenis, A. Lacasa, and M. A. Aranda. 2002. "Complete

- Sequence of the Pepino Mosaic Virus RNA Genome." *Archives of Virology* 147(10):2009–15.
- Alfaro-Fernández, Ana, María del Carmen Córdoba-Sellés, José Ángel Herrera-Vásquez, María del Carmen Cebrián, and Concepción Jordá. 2010. "Transmission of Pepino Mosaic Virus by the Fungal Vector *Olpidium virulentus*." *Journal of Phytopathology* 158(4):217–26.
- Ammar, El-Desouky, Chi-Wei Tsai, Anna E. Whitfield, Margaret G. Redinbaugh, and Saskia A. Hogenhout. 2009. "Cellular and Molecular Aspects of Rhabdovirus Interactions with Insect and Plant Hosts." *Annual Review of Entomology* 54(1):447–68.
- Atabekov, J. G., N. P. Rodionova, O. V. Karpova, S. V. Kozlovsky, V. K. Novikov, and M. V. Arkhipenko. 2001. "Translational Activation of Encapsidated Potato Virus X RNA by Coat Protein Phosphorylation." *Virology* 286(2):466–74.
- Atabekov, J. G., N. P. Rodionova, O. V. Karpova, S. V. Kozlovsky, and V. Yu Poljakov. 2000. "The Movement Protein-Triggered in Situ Conversion of Potato Virus X Virion RNA from a Nontranslatable into a Translatable Form." *Virology* 271(2):259–63.
- Bamunusinghe, Devinka, Cynthia L. Hemenway, Richard S. Nelson, Anton A. Sanderfoot, Chang M. Ye, Muniwarage A. T. Silva, M. Payton, and Jeanmarie Verchot-Lubicz. 2009. "Analysis of Potato Virus X Replicase and TGBp3 Subcellular Locations." *Virology* 393(2):272–85.
- Baratova, Lyudmila A., Nataliya V. Fedorova, Eugenie N. Dobrov, Elena V. Lukashina, Andrey N. Kharlanov, Vitaly V. Nasonov, Marina V. Serebryakova, Stanislav V. Kozlovsky, Olga V. Zayakina, and Nina P. Rodionova. 2004. "N-Terminal Segment of Potato Virus X Coat Protein Subunits Is Glycosylated and Mediates Formation of a Bound Water Shell on the Virion Surface." *European Journal of Biochemistry* 271(15):3136–45.
- Bartling, Dieter, Renate Radio, Ulrike Steiner, and Elmar W. Weiler. 1993. "A Glutathione S-Transferase with Glutathione-Peroxidase Activity from *Arabidopsis thaliana*." *European Journal of Biochemistry* 216(2):579–86.
- Batten, Jeffrey S., Shigeo Yoshinari, and Cynthia Hemenway. 2003. "Potato Virus X: A Model System for Virus Replication, Movement and Gene Expression." *Molecular Plant Pathology* 4(2):125–31.
- Beck, David L., Parry J. Guilford, Davin M. Voot, Mark T. Andersen, and Richard L. S. Forster. 1991. "Triple Gene Block Proteins of White Clover Mosaic Potexvirus Are Required for Transport." *Virology* 183(2):695–702.
- Bhyravbhatla, Balaji, Stanley J. Watowich, and Donald L. D. Caspar. 1998. "Refined Atomic Model of the Four-Layer Aggregate of the Tobacco Mosaic Virus Coat Protein at 2.4-Å Resolution." *Biophysical Journal* 74(1):604–15.
- Boevink, Petra, Karl Oparka, Simon Santa Cruz, Barry Martin, Alan Betteridge, and Chris Hawes. 1998. "Stacks on Tracks: The Plant Golgi Apparatus Traffics on an Actin/ER

- Network." *Plant Journal* 15(3):441–47.
- Booth, Tim F., Melissa J. Rabb, and Daniel R. Beniac. 2013. "How Do Filovirus Filaments Bend without Breaking?" *Trends in Microbiology* 21(11):583–93.
- Candresse, Thierry, Armelle Marais, Chantal Faure, Marie Pierre Dubrana, Julie Gombert, and Abdelhafid Bendahmane. 2010. "Multiple Coat Protein Mutations Abolish Recognition of *Pepino Mosaic Potexvirus* (PepMV) by the Potato Rx Resistance Gene in Transgenic Tomatoes." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(4):376–83.
- Carstens, E. B. 2010. "Ratification Vote on Taxonomic Proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016)." *Archives of Virology* 161(10):2921–49.
- Chapman, Sean, Graham Hills, John Watts, and David Baulcombe. 1992. "Mutational Analysis of the Coat Protein Gene of Potato Virus X: Effects on Virion Morphology and Viral Pathogenicity." *Virology* 191(1):223–30.
- Chen, I. Hsuan, Jui En Chang, Chen Yu Wu, Ying Ping Huang, Yau Huei Hsu, and Ching Hsiu Tsai. 2019. "An E3 Ubiquitin Ligase from *Nicotiana Benthamiana* Targets the Replicase of Bamboo Mosaic Virus and Restricts Its Replication." *Molecular Plant Pathology* 20(5):673–84.
- Chen, I. Hsuan, Meng Hsuen Chiu, Shun Fang Cheng, Yau Heiu Hsu, and Ching Hsiu Tsai. 2013. "The Glutathione Transferase of *Nicotiana Benthamiana* NbGSTU4 Plays a Role in Regulating the Early Replication of Bamboo Mosaic Virus." *New Phytologist* 199(3):749–57.
- Chen, I. Hsuan, Ying-Wen Huang, and Ching-Hsiu Tsai. 2017. "The Functional Roles of the Cis-Acting Elements in Bamboo Mosaic Virus RNA Genome." *Frontiers in Microbiology* 8(April):1–9.
- Cheng, C. W., Y. Y. Hsiao, H. C. Wu, C. M. Chuang, J. S. Chen, C. H. Tsai, Y. H. Hsu, Y. C. Wu, C. C. Lee, and M. Meng. 2009. "Suppression of Bamboo Mosaic Virus Accumulation by a Putative Methyltransferase in *Nicotiana Benthamiana*." *Journal of Virology* 83(11):5796–5805.
- Cheng, Shun-Fang, Ying-Ping Huang, Li-Hung Chen, Yau-Heiu Hsu, and Ching-Hsiu Tsai. 2013. "Chloroplast Phosphoglycerate Kinase Is Involved in the Targeting of Bamboo Mosaic Virus to Chloroplasts in *Nicotiana Benthamiana* Plants." *Plant Physiology* 163(4):1598–1608.
- Cho, Sang Yun, Won Kyong Cho, Seong Han Sohn, and Kook Hyung Kim. 2012. "Interaction of the Host Protein NbDnaJ with Potato Virus X Minus-Strand Stem-Loop 1 RNA and Capsid Protein Affects Viral Replication and Movement." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417(1):451–56.
- Choi, Hoseong, Won Kyong Cho, and Kook-hyung Hyung Kim. 2016. "Two Homologous Host Proteins Interact with Potato Virus X RNAs and CPs and Affect Viral Replication and Movement." *Nature Publishing Group* 6(April):1–12.
- Clare, Daniel K. and Elena V. Orlova. 2010. "4.6Å Cryo-EM Reconstruction of Tobacco

- Mosaic Virus from Images Recorded at 300keV on a 4k × 4k CCD Camera.” *Journal of Structural Biology* 171(3):303–8.
- Clare, Daniel Kofi, Eugenia V. Pechnikova, Eugene V. Skurat, Valentin V. Makarov, Olga S. Sokolova, Andrey G. Solovyev, and Elena V. Orlova. 2015. “Novel Inter-Subunit Contacts in Barley Stripe Mosaic Virus Revealed by Cryo-Electron Microscopy.” *Structure* 23(10):1815–26.
- Conn, Vanessa M., Véronique Hugouvieux, Aditya Nayak, Stephanie A. Conos, Giovanna Capovilla, Gökhan Cildir, Agnès Jourdain, Vinay Tergaonkar, Markus Schmid, Chloe Zubieta, and Simon J. Conn. 2017. “A CircRNA from SEPALLATA3 Regulates Splicing of Its Cognate mRNA through R-Loop Formation.” *Nature Plants* 3(April):4–8.
- Cowan, G. H., F. Lioliopoulou, A. Ziegler, and L. Torrance. 2002. “Subcellular Localisation, Protein Interactions, and RNA Binding of Potato Mop-Top Virus Triple Gene Block Proteins.” *Virology* 298(1):106–15.
- DiMaio, Frank, Chun Chieh Chen, Xiong Yu, Brandon Frenz, Yau Heiu Hsu, Na Sheng Lin, and Edward H. Egelman. 2015. “The Molecular Basis for Flexibility in the Flexible Filamentous Plant Viruses.” *Nature Structural and Molecular Biology* 22(8):642–44.
- Dixon, David P., Timothy Hawkins, Patrick J. Hussey, and Robert Edwards. 2009. “Enzyme Activities and Subcellular Localization of Members of the Arabidopsis Glutathione Transferase Superfamily.” *Journal of Experimental Botany* 60(4):1207–18.
- Dolja, Valerian V. 2003. “Beet Yellows Virus: The Importance of Being Different.” *Molecular Plant Pathology* 4(2):91–98.
- Dolja, Valerian V. and Eugene V. Koonin. 2018. “Metagenomics Reshapes the Concepts of RNA Virus Evolution by Revealing Extensive Horizontal Virus Transfer.” *Virus Research* 244(August 2017):36–52.
- Dolja, Valerian V, Alexey A. Agranovsky, and Eugene V Koonin. 1991. “Phylogeny of Capsid Proteins of Rod-Shaped and Fikmmtoua RNA Two Families with Distinct Patterns of Sequence and Probably Structure C.” *Virology* 86:79–86.
- Eck, Joyce Van, Dwayne D. Kirk, and Amanda M. Walmsley. 2006. “Tomato (*Lycopersicon Esculentum*) BT - *Agrobacterium* Protocols.” Pp. 459–74 in, edited by K. Wang. Totowa, NJ: Humana Press.
- Fauquet, Claude M., M. A[†] Mayo, Jack Maniloff, Ulrich Desselberger, and Laurence Andrew Ball. 2005. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press.
- Fink, Anthony L. 2005. “Natively Unfolded Proteins.” *Current Opinion in Structural Biology* 15(1 SPEC. ISS.):35–41.
- Freiberg, A. N., M. B. Sherman, M. C. Morais, M. R. Holbrook, and S. J. Watowich. 2008. “Three-Dimensional Organization of Rift Valley Fever Virus Revealed by Cryoelectron Tomography.” *Journal of Virology* 82(21):10341–48.

- Fridborg, Ingela, Jef Grainger, Anthony Page, Mark Coleman, Kim Findlay, and Susan Angell. 2003. "TIP, a Novel Host Factor Linking Callose Degradation with the Cell-to-Cell Movement of Potato Virus X." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(2):132–40.
- Ge, Peng and Z. Hong Zhou. 2011. "Hydrogen-Bonding Networks and RNA Bases Revealed by Cryo Electron Microscopy Suggest a Triggering Mechanism for Calcium Switches." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(23):9637–42.
- Gietz, R. D. and R. H. Schiestl. 1994. "Transforming Yeast with DNA." *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5(5):255–69.
- GINNO, Paul A., Paul L. Lott, Holly C. Christensen, Ian Korf, and Frédéric Chédin. 2012. "R-Loop Formation Is a Distinctive Characteristic of Unmethylated Human CpG Island Promoters." *Molecular Cell* 45(6):814–25.
- Gómez-Aix, Cristina, Cristina Alcaide, Jesús Agüero, Mohamed Faize, Miguel Juárez, Carlos J. Díaz-Marrero, Moises Botella-Guillén, Ana I. Espino, Miguel A. Aranda, and Pedro Gómez. 2019. "Genetic Diversity and Population Structure of Pepino Mosaic Virus in Tomato Crops of Spain and Morocco." *Annals of Applied Biology* 174(3):284–92.
- Gómez, P., R. N. Sempere, S. F. Elena, and M. a Aranda. 2009. "Mixed Infections of Pepino Mosaic Virus Strains Modulate the Evolutionary Dynamics of This Emergent Virus." *Journal of Virology* 83(23):12378–87.
- Gómez, Pedro, Raquel N. Sempere, and Miguel A. Aranda. 2012. "Pepino Mosaic Virus and Tomato Torrado Virus. Two Emerging Viruses Affecting Tomato Crops in the Mediterranean Basin." *Advances in Virus Research* 84:505–32.
- Gullner, Gábor, Tamas Komives, Lóránt Király, and Peter Schröder. 2018. "Glutathione S-Transferase Enzymes in Plant-Pathogen Interactions." *Frontiers in Plant Science* 9(December):1–19.
- Guu, Tom S. Y., Wenjie Zheng, and Yizhi J. Tao. 2012. "Bunyavirus: Structure and Replication." Pp. 245–66 in *Viral Molecular Machines*. Springer.
- Han, Yu Tsung, Chia Sheng Tsai, Ya Chio Chen, Ming Kuem Lin, Yau Heiu Hsu, and Menghsiao Meng. 2007. "Mutational Analysis of a Helicase Motif-Based RNA 5'-Triphosphatase/NTPase from Bamboo Mosaic Virus." *Virology* 367(1):41–50.
- Hanssen, I. M., H. Peter van Esse, A. R. Ballester, S. W. Hogewoning, N. O. Parra, A. Paeleman, B. Lievens, A. G. Bovy, and B. P. H. J. Thomma. 2011. "Differential Tomato Transcriptomic Responses Induced by Pepino Mosaic Virus Isolates with Differential Aggressiveness." *Plant Physiology* 156(1):301–18.
- Hanssen, Inge M., Ion Guriérrez-Aguirre, Anneleen Paeleman, Kris Goen, Lieve Wittemans, Bart Lievens, Alfons C. R. C. Vanachter, Maja Ravnkar, and Bart P. H. J. Thomma. 2010. "Cross-Protection or Enhanced Symptom Display in Greenhouse Tomato Co-Infected with Different Pepino Mosaic Virus Isolates." *Plant Pathology* 59(1):13–21.

- Hanssen, Inge M., Rick Mumford, Dag Ragnar Blystad, Isabel Cortez, Beata Hasiów-Jaroszewska, Dimitrinka Hristova, Israel Pagán, Ana Maria Pereira, Jeff Peters, Henryk Pospieszny, Maja Ravnikar, Ineke Stijger, Laura Tomassoli, Christina Varveri, R. van der Vlugt, and Steen Lykke Nielsen. 2010. "Seed Transmission of Pepino Mosaic Virus in Tomato." *European Journal of Plant Pathology* 126(2):145–52.
- Hanssen, Inge M. and Bart P. H. J. Thomma. 2010. "Pepino Mosaic Virus: A Successful Pathogen That Rapidly Evolved from Emerging to Endemic in Tomato Crops." *Molecular Plant Pathology* 11(2):179–89.
- Hasiów-Jaroszewska, Beata, Anneleen Paeleman, Nelia Ortega-Parra, Natasza Borodynko, Julia Minicka, Anna Czerwoniec, Bart P. H. J. Thomma, and Inge M. Hanssen. 2013. "Ratio of Mutated versus Wild-Type Coat Protein Sequences in Pepino Mosaic Virus Determines the Nature and Severity of Yellowing Symptoms on Tomato Plants." *Molecular Plant Pathology* 14(9):923–33.
- Helgstrand, Charlotte, Sanjeev Munshi, John E. Johnson, and Lars Liljas. 2004. "The Refined Structure of Nudaurelia Capensis ω Virus Reveals Control Elements for a T = 4 Capsid Maturation." *Virology* 318(1):192–203.
- Hernández, José Antonio, Gábor Gullner, María José Clemente-Moreno, Andrés Künstler, Csilla Juhász, Pedro Díaz-Vivancos, and Lóránt Király. 2016. "Oxidative Stress and Antioxidative Responses in Plant–Virus Interactions." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 94:134–48.
- Howard, Amanda R., Marty L. Heppler, Ho Jong Ju, Konduru Krishnamurthy, Mark E. Payton, and Jeanmarie Verchot-Lubicz. 2004. "Potato Virus X TGBp1 Induces Plasmodesmata Gating and Moves between Cells in Several Host Species Whereas CP Moves Only in *N. Benthamiana* Leaves." *Virology* 328(2):185–97.
- Hsu, Hsiu Ting, Yuan Lin Chou, Yang Hao Tseng, Yu Hsing Lin, Tzung Min Lin, Na Sheng Lin, Yau Heiu Hsu, and Ban Yang Chang. 2008. "Topological Properties of the Triple Gene Block Protein 2 of Bamboo Mosaic Virus." *Virology* 379(1):1–9.
- Hsu, Hsiu Ting, Yang Hao Tseng, Yuan Lin Chou, Shiao Hwa Su, Yau Heiu Hsu, and Ban Yang Chang. 2009. "Characterization of the RNA-Binding Properties of the Triple-Gene-Block Protein 2 of Bamboo Mosaic Virus." *Virology Journal* 6:2–7.
- Hu, Bin, Neeta Pillai-Nair, and Cynthia Hemenway. 2007. "Long-Distance RNA-RNA Interactions between Terminal Elements and the Same Subset of Internal Elements on the Potato Virus X Genome Mediate Minus- and plus-Strand RNA Synthesis." *Rna* 13(2):267–80.
- Huiskonen, J. T., A. K. Overby, F. Weber, and K. Grunewald. 2009. "Electron Cryo-Microscopy and Single-Particle Averaging of Rift Valley Fever Virus: Evidence for GN-GC Glycoprotein Heterodimers." *Journal of Virology* 83(8):3762–69.
- Hull, Roger. 2013. *Plant Virology*. Academic press.
- Hung, Chien Jen, Ying Wen Huang, Ming Ru Liou, Ya Chien Lee, Na Sheng Lin, Menghsiao Meng, Ching Hsiu Tsai, Chung Chi Hu, and Yau Heiu Hsu. 2014.

- “Phosphorylation of Coat Protein by Protein Kinase CK2 Regulates Cell-to-Cell Movement of Bamboo Mosaic Virus through Modulating RNA Binding.” *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI* 27(11):1211–25.
- Hyjek, Malwina, Małgorzata Figiel, and Marcin Nowotny. 2019. “RNases H: Structure and Mechanism.” *DNA Repair* (April):102672.
- Hyodo, Kiwamu, Hikari Nagai, and Tetsuro Okuno. 2017. “Dual Function of a Cis-Acting RNA Element That Acts as a Replication Enhancer and a Translation Repressor in a Plant Positive-Stranded RNA Virus.” *Virology* 512(August):74–82.
- Islam, Shiful, Iffat Ara Rahman, Tahmina Islam, and Ajit Ghosh. 2017. “Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Glutathione S-Transferase Gene Family in Tomato: Gaining an Insight to Their Physiological and Stress-Specific Roles.” *PLoS ONE* 12(11):1–28.
- Jackson, Andrew O., Hyoun-Sub Lim, Jennifer Bragg, Uma Ganesan, and Mi Yeon Lee. 2009. “Hordeivirus Replication, Movement, and Pathogenesis.” *Annual Review of Phytopathology* 47:385–422.
- Jang, Chanyong, Eun-Young Seo, Jiryun Nam, Hanhong Bae, Yeong Guk Gim, Hong Gi Kim, In Sook Cho, Zee-Won Lee, Gary R. Bauchan, John Hammond, and Hyoun-Sub Lim. 2013. “Insights into Alternanthera Mosaic Virus TGB3 Functions: Interactions with *Nicotiana Benthamiana* PsbO Correlate with Chloroplast Vesiculation and Veinal Necrosis Caused by TGB3 Over-Expression.” *Frontiers in Plant Science* 4(January):1–15.
- Johnson, Jennifer A., Jennifer N. Bragg, Diane M. Lawrence, and Andrew O. Jackson. 2003. “Sequence Elements Controlling Expression of Barley Stripe Mosaic Virus Subgenomic RNAs in Vivo.” *Virology* 313(1):66–80.
- JONES, R. A. C., RENATE KOENIG, and D. E. LESEMANN. 1980. “Pepino Mosaic Virus, a New Potexvirus from Pepino (*Solanum Muricatum*).” *Annals of Applied Biology* 94(1):61–68.
- Jordá, C., A. Lazaro Perez, P. Martínez-Culebras, P. Abad, A. Lacasa, and M. M. Guerrero. 2001. “First Report of Pepino Mosaic Virus on Tomato in Spain.” *Plant Disease* 85(12):1292.
- Ju, Ho Jong, Timmy D. Samuels, Yuh Shuh Wang, Elison Blancaflor, Mark Payton, Ruchira Mitra, Konduru Krishnamurthy, Richard S. Nelson, and Jeanmarie Verchot-Lubicz. 2005. “The Potato Virus X TGBp2 Movement Protein Associates with Endoplasmic Reticulum-Derived Vesicles during Virus Infection.” *Plant Physiology* 138(4):1877–95.
- Kachroo, Pradeep and Aardra Kachroo. 2012. “The Roles of Salicylic Acid and Jasmonic Acid in Plant Immunity.” *Molecular Plant Immunity* 55–79.
- Kalinina, N. O., D. V. Rakitina, A. G. Solovyev, J. Schiemann, and S. Yu Morozov. 2002. “RNA Helicase Activity of the Plant Virus Movement Proteins Encoded by the First Gene of the Triple Gene Block.” *Virology* 296(2):321–29.
- Karpova, O. V., O. V. Zayakina, M. V. Arkhipenko, E. V. Sheval, O. I. Kiselyova, V. Yu

- Poljakov, I. V. Yaminsky, N. P. Rodionova, J. G. Atabekov, and J. G. Atabekov. 2006. "Potato Virus X RNA-Mediated Assembly of Single-Tailed Ternary 'coat Protein-RNA-Movement Protein' Complexes." *Journal of General Virology* 87(9):2731–40.
- Kendall, Amy, Wen Bian, Alexander Maris, Caitlin Azzo, Joseph Groom, Dewight Williams, Jian Shi, Phoebe L. Stewart, Joseph S. Wall, and Gerald Stubbs. 2013. "A Common Structure for the Potexviruses." *Virology* 436(1):173–78.
- Kendall, Amy, Michele McDonald, Wen Bian, Timothy Bowles, Sarah C. Baumgarten, Jian Shi, Phoebe L. Stewart, Esther Bullitt, David Gore, Thomas C. Irving, Wendy M. Havens, Said A. Ghabrial, Joseph S. Wall, and Gerald Stubbs. 2008. "Structure of Flexible Filamentous Plant Viruses." *Journal of Virology* 82(19):9546–54.
- Kežar, Andreja, Luka Kavčič, Martin Polák, Jiří Nováček, Ion Gutiérrez-Aguirre, Magda Tušek Žnidarič, Anna Coll, Katja Stare, Kristina Gruden, Maja Ravnikar, David Pahovnik, Ema Žagar, Franci Merzel, Gregor Anderluh, and Marjetka Podobnik. 2019. "Structural Basis for the Multitasking Nature of the Potato Virus Y Coat Protein." *Science Advances* 5(7):eaaw3808.
- Kim, K. H., C Hemenway, Kook-hyung Kim, and Cynthia Hemenway. 1996. "The 5' Nontranslated Region of Potato Virus X RNA Affects Both Genomic and Subgenomic RNA Synthesis. These Include : The 5' Nontranslated Region of Potato Virus X RNA Affects Both Genomic and Subgenomic RNA Synthesis." *Virology* 70(8):5533–40.
- King, Andrew M. Q., Elliot Lefkowitz, Michael J. Adams, and Eric B. Carstens. 2011. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Vol. 9. Elsevier.
- Kiselyova, Olga I., Igor V. Yaminsky, Olga V. Karpova, Nina P. Rodionova, Stanislav V. Kozlovsky, Marina V. Arkhipenko, and Joseph G. Atabekov. 2003. "AFM Study of Potato Virus X Disassembly Induced by Movement Protein." *Journal of Molecular Biology* 332(2):321–25.
- Klaus, Anna, Sarah Zorman, Alexandre Berthier, Cécile Polge, Sacniete Ramirez, Sylvie Michelland, Michel Sève, Didier Vertommen, Mark Rider, Nicolas Lentze, Daniel Auerbach, and Uwe Schlattner. 2013. "Glutathione S-Transferases Interact with AMP-Activated Protein Kinase: Evidence for S-Glutathionylation and Activation In Vitro." *PLoS ONE* 8(5):1–10.
- Klug, A. 1999. "The Tobacco Mosaic Virus Particle: Structure and Assembly." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 354(1383):531–35.
- Koonin, Eugene V., Valerian V. Dolja, and Mart Krupovic. 2015. "Origins and Evolution of Viruses of Eukaryotes: The Ultimate Modularity." *Virology* 479–480:2–25.
- Koonin, Eugene V., Valerian V Dolja, and T. Jack Morris. 1993. "Evolution and Taxonomy of Positive-Strand RNA Viruses: Implications of Comparative Analysis of Amino Acid Sequences." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 28(5):375–430.

- Krishnamurthy, Konduru, Marty Heppler, Ruchira Mitra, Elison Blancaflor, Mark Payton, Richard S. Nelson, and Jeanmarie Verchot-Lubicz. 2003. "The Potato Virus X TGBp3 Protein Associates with the ER Network for Virus Cell-to-Cell Movement." *Virology* 309(1):135–51.
- Krupovic, Mart, Valerian V. Dolja, and Eugene V. Koonin. 2019. "Origin of Viruses: Primordial Replicators Recruiting Capsids from Hosts." *Nature Reviews Microbiology* 17(July):449–58.
- Krupovic, Mart and Eugene V. Koonin. 2017. "Multiple Origins of Viral Capsid Proteins from Cellular Ancestors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(12):E2401–10.
- Kwon, Sun-Jung and Kook-Hyung Kim. 2006. "The SL1 Stem-Loop Structure at the 5'-End of Potato Virus X RNA Is Required for Efficient Binding to Host Proteins and for Viral Infectivity." *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)* 21(1).
- Kwon, Sun-Jung, Mi-Ri Park, Ki-Woo Kim, Carol A. Plante, Cynthia L. Hemenway, and Kook-Hyung Kim. 2005. "Cis-Acting Sequences Required for Coat Protein Binding and in Vitro Assembly of *Potato Virus X*." *Virology* 334(1):83–97.
- Laliberté, Jean-François and Hélène Sanfaçon. 2010. "Cellular Remodeling During Plant Virus Infection." *Annual Review of Phytopathology* 48(1):69–91.
- Laliberté, Jean-François and Huanquan Zheng. 2014. "Viral Manipulation of Plant Host Membranes." *Annual Review of Virology* 1(1):237–59.
- Lan, Ping, Wen-Bin Yeh, Chih-Wei Tsai, and Na-Sheng Lin. 2010. "A Unique Glycine-Rich Motif at the N-Terminal Region of Bamboo Mosaic Virus Coat Protein Is Required for Symptom Expression ." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(7):903–14.
- Le, Duc H. T., Eduardo Méndez-López, Chao Wang, Ulrich Commandeur, Miguel A. Aranda, and Nicole F. Steinmetz. 2019. "Biodistribution of Filamentous Plant Virus Nanoparticles: Pepino Mosaic Virus versus Potato Virus X." *Biomacromolecules* 20(1):469–77.
- Le, Si Quang and Olivier Gascuel. 2008. "An Improved General Amino Acid Replacement Matrix." *Molecular Biology and Evolution* 25(7):1307–20.
- Lecours, Katia, Marie Hélène Tremblay, Marie Eve Laliberté Gagné, Stéphane M. Gagné, and Denis Leclerc. 2006. "Purification and Biochemical Characterization of a Monomeric Form of Papaya Mosaic Potexvirus Coat Protein." *Protein Expression and Purification* 47(1):273–80.
- Van Der Lee, Robin, Marija Buljan, Benjamin Lang, Robert J. Weatheritt, Gary W. Daughdrill, A. Keith Dunker, Monika Fuxreiter, Julian Gough, Joerg Gsponer, David T. Jones, Philip M. Kim, Richard W. Kriwacki, Christopher J. Oldfield, Rohit V. Pappu, Peter Tompa, Vladimir N. Uversky, Peter E. Wright, and M. Madan Babu. 2014. "Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins." *Chemical Reviews* 114(13):6589–6631.

- van der Lee, Robin, Benjamin Lang, Kai Kruse, Jörg Gsponer, Natalia Sánchez de Groot, Martijn A. Huynen, Andreas Matouschek, Monika Fuxreiter, and M. Madan Babu. 2014. "Intrinsically Disordered Segments Affect Protein Half-Life in the Cell and during Evolution." *Cell Reports* 8(6):1832–44.
- Lee, Shu Chuan, Chih Hang Wu, and Chao Wen Wang. 2010. "Traffic of a Viral Movement Protein Complex to the Highly Curved Tubules of the Cortical Endoplasmic Reticulum." *Traffic* 11(7):912–30.
- Leshchiner, Anna D., Andrey G. Solovyev, Sergey Yu Morozov, and Natalia O. Kalinina. 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." *Journal of General Virology* 87(10):3087–95.
- Liang, Gang, Huimin Zhang, Dengji Lou, and Diqu Yu. 2016. "Selection of Highly Efficient SgRNAs for CRISPR/Cas9-Based Plant Genome Editing." *Scientific Reports* 6:1–8.
- Lico, Chiara, Floriana Capuano, Giovanni Renzone, Marcello Donini, Carla Marusic, Andrea Scaloni, Eugenio Benvenuto, and Selene Baschieri. 2006. "Peptide Display on Potato Virus X: Molecular Features of the Coat Protein-Fused Peptide Affecting Cell-to-Cell and Phloem Movement of Chimeric Virus Particles." *Journal of General Virology* 87(10):3103–12.
- Lim, Hyoun Sub, Jiryun Nam, Eun Young Seo, Moon Nam, Anna Maria Vaira, Hanhong Bae, Chan Yong Jang, Cheol Ho Lee, Hong Gi Kim, Mark Roh, and John Hammond. 2014. "The Coat Protein of Alternanthera Mosaic Virus Is the Elicitor of a Temperature-Sensitive Systemic Necrosis in *Nicotiana Benthamiana*, and Interacts with a Host Boron Transporter Protein." *Virology* 452–453:264–78.
- Lim, Hyoun Sub, Anna Maria Vaira, Hanhong Bae, Jennifer N. Bragg, Steven E. Ruzin, Gary R. Bauchan, Margaret M. Dienelt, Robert A. Owens, and John Hammond. 2010. "Mutation of a Chloroplast-Targeting Signal in Alternanthera Mosaic Virus TGB3 Impairs Cell-to-Cell Movement and Eliminates Long-Distance Virus Movement." *Journal of General Virology* 91(8):2102–15.
- Lim, Hyoun Sub, Anna Maria Vaira, Michael D. Reinsel, Hanhong Bae, Bryan A. Bailey, Leslie L. Dornier, and John Hammond. 2010. "Pathogenicity of Alternanthera Mosaic Virus Is Affected by Determinants in RNA-Dependent RNA Polymerase and by Reduced Efficacy of Silencing Suppression in a Movement-Competent TGB1." *Journal of General Virology* 91(1):277–87.
- Lin, Ming Kuem, Ban Yang Chang, Jia Teh Liao, Na Sheng Lin, and Yau Heiu Hsu. 2004. "Arg-16 and Arg-21 in the N-Terminal Region of the Triple-Gene-Block Protein 1 of Bamboo Mosaic Virus Are Essential for Virus Movement." *Journal of General Virology* 85(1):251–59.
- Linnik, Olga, Johannes Liesche, Jens Tilsner, and Karl J. Oparka. 2013. "Unraveling the Structure of Viral Replication Complexes at Super-Resolution." *Frontiers in Plant Science* 4(January):1–13.
- Liou, Dann Ying, Yau Heiu Hsu, Chiung Hua Wung, Wen Horng Wang, Na Sheng Lin, and

- Ban Yang Chang. 2000. "Functional Analyses and Identification of Two Arginine Residues Essential to the ATP-Utilizing Activity of the Triple Gene Block Protein 1 of Bamboo Mosaic Potexvirus." *Virology* 277(2):336–44.
- Liu, Y. L., M. Schiff, and S. P. Dinesh-Kumar. 2002. "Virus-Induced Gene Silencing in Tomato." *Plant Journal* 31(OCTOBER):777–86.
- Loebenstein, G. 2009. "Plant Virus Diseases: Economic Aspects." *Encyclopedia of Virology* 197–201.
- Lough, T. J., R. H. Lee, S. J. Emerson, R. L. Forster, and W. J. Lucas. 2006. "Functional Analysis of the 5' Untranslated Region of Potexvirus RNA Reveals a Role in Viral Replication and Cell-to-Cell Movement." *Virology* 351(2):455–65.
- Lough, Tony J., Natalie E. Netzler, Sarah J. Emerson, Paul Sutherland, Fiona Carr, David L. Beck, William J. Lucas, and Richard L. S. Forster. 2000. "Cell-to-Cell Movement of Potexviruses: Evidence for a Ribonucleoprotein Complex Involving the Coat Protein and First Triple Gene Block Protein." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(9):962–74.
- Mackenzie, Jason. 2005. "Wrapping Things up about Virus RNA Replication." *Traffic* 6(11):967–77.
- Martinoia, Enrico, Erwin Grill, Roberto Tommasini, Klaus Kreuz, and Nikolaus Amrhein. 1993. "ATP-Dependent Glutathione S-Conjugate'export'pump in the Vacuolar Membrane of Plants." *Nature* 364(6434):247.
- Mathioudakis, Matthaios, Souheyla Khechmar, Carolyn Owen, Vicente Medina, Karima Ben Mansour, Weronika Tomaszewska, Theodore Spanos, Panagiotis Sarris, and Ioannis Livieratos. 2018. "A Thioredoxin Domain-Containing Protein Interacts with Pepino Mosaic Virus Triple Gene Block Protein 1." *International Journal of Molecular Sciences* 19(12):3747.
- Mathioudakis, Matthaios M., Luis Rodríguez-Moreno, Raquel Navarro Sempere, Miguel A. Aranda, and Ioannis Livieratos. 2014. "Multifaceted Capsid Proteins: Multiple Interactions Suggest Multiple Roles for *Pepino Mosaic Virus* Capsid Protein." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27(12):1356–69.
- Mathioudakis, Matthaios M., Rita Veiga, Melania Ghita, Daniela Tsikou, Vicente Medina, Tomas Canto, Antonios M. Makris, and Ioannis C. Livieratos. 2012. "Pepino Mosaic Virus Capsid Protein Interacts with a Tomato Heat Shock Protein Cognate 70." *Virus Research* 163(1):28–39.
- Mathioudakis, Matthaios M., Rita S. L. Veiga, Tomas Canto, Vicente Medina, Dimitris Mossialos, Antonios M. Makris, and Ioannis Livieratos. 2013. "Pepino Mosaic Virus Triple Gene Block Protein 1 (TGBp1) Interacts with and Increases Tomato Catalase 1 Activity to Enhance Virus Accumulation." *Molecular Plant Pathology* 14(6):589–601.
- Mieyal, John J. and P. Boon Chock. 2012. "Posttranslational Modification of Cysteine in Redox Signaling and Oxidative Stress: Focus on S-Glutathionylation." *Antioxidants and Redox Signaling* 16(6):471–75.

- Miller, Eric D., Kook Hyung Kim, and Cynthia Hemenway. 1999. "Restoration of a Stem-Loop Structure Required for Potato Virus X RNA Accumulation Indicates Selection for a Mismatch and a GNRA Tetraloop." *Virology* 260(2):342–53.
- Miller, Eric D., Carol A. Plante, Kook Hyung Kim, James W. Brown, and Cynthia Hemenway. 1998. "Stem-Loop Structure in the 5' Region of Potato Virus X Genome Required for plus-Strand RNA Accumulation." *Journal of Molecular Biology* 284(3):591–608.
- Minicka, Julia, Katarzyna Otulak, Grazyna Garbaczewska, Henryk Pospieszny, and Beata Hasiów-Jaroszewska. 2015. "Ultrastructural Insights into Tomato Infections Caused by Three Different Pathotypes of Pepino Mosaic Virus and Immunolocalization of Viral Coat Proteins." *Micron* 79:84–92.
- Miras, Manuel, Raquel N. Sempere, Jelena J. Kraft, W. Allen Miller, Miguel A. Aranda, and Veronica Truniger. 2015. "Determination of the Secondary Structure of an RNA Fragment in Solution: Selective 2'-Hydroxyl Acylation Analyzed by Primer Extension Assay (SHAPE)." *Bio-Protocol* 5(2):1–9.
- Mitra, Ruchira, Konduru Krishnamurthy, Elison Blancaflor, Mark Payton, Richard S. Nelson, and Jeanmarie Verchot-Lubicz. 2003. "The Potato Virus X TGBp2 Protein Association with the Endoplasmic Reticulum Plays a Role in but Is Not Sufficient for Viral Cell-to-Cell Movement." *Virology* 312(1):35–48.
- Moelling, Karin, Felix Broecker, Giancarlo Russo, and Shinichi Sunagawa. 2017. "RNase H As Gene Modifier, Driver of Evolution and Antiviral Defense." *Frontiers in Microbiology* 8(SEP):1–20.
- Morozov, Sergey Yu and Andrey G. Solovyev. 2003. "Triple Gene Block: Modular Design of a Multifunctional Machine for Plant Virus Movement." *Journal of General Virology* 84(6):1351–66.
- Nakagawa, Tsuyoshi, Takayuki Kurose, Takeshi Hino, Katsunori Tanaka, Makoto Kawamukai, Yasuo Niwa, Kiminori Toyooka, Ken Matsuoka, Tetsuro Jinbo, and Tetsuya Kimura. 2007. "Development of Series of Gateway Binary Vectors, PGWBs, for Realizing Efficient Construction of Fusion Genes for Plant Transformation." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104(1):34–41.
- Nakagawa, Tsuyoshi, Takamasa Suzuki, Satoko Murata, Shinya Nakamura, Takeshi Hino, Kenichiro Maeo, Ryo Tabata, Tsutae Kawai, Katsunori Tanaka, Yasuo Niwa, Yuichiro Watanabe, Kenzo Nakamura, Tetsuya Kimura, and Sumie Ishiguro. 2007. "Improved Gateway Binary Vectors: High-Performance Vectors for Creation of Fusion Constructs in Transgenic Analysis of Plants." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71(8):2095–2100.
- Namba, K., R. Pattanegek, and G. Stubbs. 1989. "Visualization of Protein RNA Interaction in a Virus: Refined Structure of TMV at 2.9 Å Resolution by X-Ray Fiber Diffraction." *J Mol Biol* 208:307–25.
- Namba, Keiichi and Gerald Stubbs. 1986. "Structure of Tobacco Mosaic Virus at 3.6 Å Resolution: Implications for Assembly." *Science* 231(4744):1401–6.

- Newburn, Laura R. and K. Andrew White. 2015. "Cis-Acting RNA Elements in Positive-Strand RNA Plant Virus Genomes." *Virology* 479–480:434–43.
- Noël, P., T. Hance, and C. Bragard. 2014. "Transmission of the Pepino Mosaic Virus by Whitefly." *European Journal of Plant Pathology* 138(1):23–27.
- Okano, Y., H. Senshu, M. Hashimoto, Y. Neriya, O. Netsu, N. Minato, T. Yoshida, K. Maejima, K. Oshima, K. Komatsu, Y. Yamaji, and S. Namba. 2014. "In Planta Recognition of a Double-Stranded RNA Synthesis Protein Complex by a Potexviral RNA Silencing Suppressor." *The Plant Cell* 26(5):2168–83.
- Oliveros, Juan C., Mònica Franch, Daniel Tabas-Madrid, David San-León, Lluís Montoliu, Pilar Cubas, and Florencio Pazos. 2016. "Breaking-Cas-Interactive Design of Guide RNAs for CRISPR-Cas Experiments for ENSEMBL Genomes." *Nucleic Acids Research* 44(W1):W267–71.
- Ozeki, Johji, Masayoshi Hashimoto, Ken Komatsu, Kensaku Maejima, Misako Himeno, Hiroko Senshu, Takeshi Kawanishi, Satoshi Kagiwada, Yasuyuki Yamaji, and Shigetou Namba. 2009. "The N-Terminal Region of the Plantago Asiatica Mosaic Virus Coat Protein Is Required for Cell-to-Cell Movement but Is Dispensable for Virion Assembly ." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(6):677–85.
- Pagán, Israel, María del Carmen Córdoba-Sellés, Lucía Martínez-Priego, Aurora Fraile, José M. Malpica, Concepción Jordá, and Fernando García-Arenal. 2007. "Genetic Structure of the Population of Pepino Mosaic Virus Infecting Tomato Crops in Spain ." *Phytopathology* 96(3):274–79.
- Parisien, Marc and François Major. 2008. "The MC-Fold and MC-Sym Pipeline Infers RNA Structure from Sequence Data." *Nature* 452(7183):51–55.
- Park, Mi-Ri, Rae-Dong Jeong, and Kook-Hyung Kim. 2014. "Understanding the Intracellular Trafficking and Intercellular Transport of Potexviruses in Their Host Plants." *Frontiers in Plant Science* 5(March):60.
- Park, Mi Ri and Kook Hyung Kim. 2013. "Molecular Characterization of the Interaction between the N-Terminal Region of Potato Virus X (PVX) Coat Protein (CP) and Nicotiana Benthamiana PVX CP-Interacting Protein, NbPCIP1." *Virus Genes* 46(3):517–23.
- Park, Mi Ri, Sun Jung Kwon, Hong Soo Choi, Cynthia L. Hemenway, and Kook Hyung Kim. 2008. "Mutations That Alter a Repeated ACCA Element Located at the 5' End of the Potato Virus X Genome Affect RNA Accumulation." *Virology* 378(1):133–41.
- Park, Mi Ri, Jang Kyun Seo, and Kook Hyung Kim. 2013. *Viral and Nonviral Elements in Potexvirus Replication and Movement and in Antiviral Responses*. Vol. 87. 1st ed. Elsevier Inc.
- Pattanayek, Rekha and Gerald Stubbs. 1992. "Structure of the U2 Strain of Tobacco Mosaic Virus Refined at 3.5 Å Resolution Using X-Ray Fiber Diffraction." *Journal of Molecular Biology* 228(2):516–28.
- Petrova, Ekaterina K., Nikolai A. Nikitin, Anna D. Protopopova, Marina V. Arkhipenko, Igor V. Yaminsky, Olga V. Karpova, and Joseph G. Atabekov. 2013. "The Role of the

- 5'??-Cap Structure in Viral Ribonucleoproteins Assembly from Potato Virus X Coat Protein and RNAs." *Biochimie* 95(12):2415–22.
- Raymond, Donald D., Mary E. Piper, Sonja R. Gerrard, Georgios Skiniotis, and Janet L. Smith. 2012. "Phleboviruses Encapsidate Their Genomes by Sequestering RNA Bases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(47):19208–13.
- Rodionova, Nina P., Olga V. Karpova, Stanislav V. Kozlovsky, Olga V. Zayakina, Marina V. Arkhipenko, and Joseph G. Atabekov. 2003. "Linear Remodeling of Helical Virus by Movement Protein Binding." *Journal of Molecular Biology* 333(3):565–72.
- Ruiz-Ramón, Fabiola, Raquel N. Sempere, Eduardo Méndez-López, M. Amelia Sánchez-Pina, and Miguel A. Aranda. 2019. "Second Generation of Pepino Mosaic Virus Vectors: Improved Stability in Tomato and a Wide Range of Reporter Genes." *Plant Methods* 15(1):58.
- Rybicki, Edward P. 2015. "A Top Ten List for Economically Important Plant Viruses." *Archives of Virology* 160(1):17–20.
- Rzhetsky, Andrey and Masatoshi Nei. 1992. "A Simple Method for Estimating and Testing Minimum-Evolution Trees."
- Sachse, Carsten, James Z. Chen, Pierre Damien Coureux, M. Elizabeth Stroupe, Marcus Fändrich, and Nikolaus Grigorieff. 2007. "High-Resolution Electron Microscopy of Helical Specimens: A Fresh Look at Tobacco Mosaic Virus." *Journal of Molecular Biology* 371(3):812–35.
- Salomone, A. and P. Roggero. 2002. "Gamma Di Ospiti - Trasmissione per Seme Ed Individuazione Tramite ELISA e Flusso Laterale Del Virus Del Mosaico Del Pepino Isolato in Italia [*Lycopersicon Esculentum* Mill.]." *Journal of Plant Pathology (Italy)* v. 84.
- Sambrook, Joseph and D. W. Russell. 2001. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, the Third Edition."
- Samuels, Timmy D., Ho Jong Ju, Chang Ming Ye, Christy M. Motes, Elison B. Blancaflor, and Jeanmarie Verchot-Lubicz. 2007. "Subcellular Targeting and Interactions among the Potato Virus X TGB Proteins." *Virology* 367(2):375–89.
- Sanfaçon, Hélène and Guangzhi Zhang. 2008. "Analysis of Interactions between Viral Replicase Proteins and Plant Intracellular Membranes." Pp. 361–75 in *Plant Virology Protocols*. Springer.
- Saunders, Keith and George P. Lomonossoff. 2017. "In Planta Synthesis of Designer-Length Tobacco Mosaic Virus-Based Nano-Rods That Can Be Used to Fabricate Nano-Wires." *Frontiers in Plant Science* 8(August):1335.
- Scholthof, Karen Beth G., Scott Adkins, Henryk Czosnek, Peter Palukaitis, Emmanuel Jacquot, Thomas Hohn, Barbara Hohn, Keith Saunders, Thierry Candresse, Paul Ahlquist, Cynthia Hemenway, and Gary D. Foster. 2011. "Top 10 Plant Viruses in Molecular Plant Pathology." *Molecular Plant Pathology* 12(9):938–54.

- Sempere, Raquel N., Cristina Gómez-Aix, Fabiola Ruíz-Ramón, Pedro Gómez, Beata Hasiów-Jaroszewska, María Amelia Sánchez-Pina, and Miguel A. Aranda. 2015. "Pepino Mosaic Virus RNA-Dependent RNA Polymerase POL Domain Is a Hypersensitive Response-Like Elicitor Shared by Necrotic and Mild Isolates." *Phytopathology* 106(4):395–406.
- Sempere, Raquel N., Cristina Gomez-Aix, Fabiola Ruiz-Ramon, Pedro Gomez, Beata Hasiów-Jaroszewska, M. Amelia Sánchez Pina, and Miguel A. Aranda. 2015. "Pepino Mosaic Virus RdRp-POL Domain Is a HR-like Elicitor Shared by Necrotic and Mild Isolates." *Phytopathology* 106(4):395–406.
- Sempere, Raquel N., Pedro Gómez, Verónica Truniger, and Miguel A. Aranda. 2011. "Development of Expression Vectors Based on Pepino Mosaic Virus." *Plant Methods* 7(1):6.
- Shaw, J. G., K. A. Plaskitt, and T. M. A. Wilson. 1986. "Evidence That Tobacco Mosaic Virus Particles Disassemble Contranslationally in Vivo." *Virology* 148(2):326–36.
- Shipp, J. L., R. Buitenhuis, L. Stobbs, K. Wang, W. S. Kim, and G. Ferguson. 2008. "Vectoring of Pepino Mosaic Virus by Bumble-Bees in Tomato Greenhouses." *Annals of Applied Biology* 153(2):149–55.
- Sit, Tim L., Denis Leclerc, and Mounir O. Abou Haidar. 1994. "The Minimal 5' Sequence for in Vitro Initiation of Papaya Mosaic Potexvirus Assembly." *Virology* 199(1):238–42.
- Skourti-Stathaki, Konstantina, Nicholas J. Proudfoot, and Natalia Gromak. 2011. "Human Senataxin Resolves RNA/DNA Hybrids Formed at Transcriptional Pause Sites to Promote Xrn2-Dependent Termination." *Molecular Cell* 42(6):794–805.
- Soler-Aleixandre, Salvador, C. López, J. Cebolla-Cornejo, and F. Nuez. 2007. "Sources of Resistance to Pepino Mosaic Virus (PepMV) in Tomato." *HortScience* 42(1):40–45.
- Solovyev, A. G. and V. V. Makarov. 2016. "Helical Capsids of Plant Viruses: Architecture with Structural Lability." *Journal of General Virology* 97(8):1739–54.
- Song, Boyuan, Julian Lenhart, Vanessa Judith Flegler, Cihan Makbul, Tim Rasmussen, and Bettina Böttcher. 2019. "Capabilities of the Falcon III Detector for Single-Particle Structure Determination." *Ultramicroscopy* 203(January):145–54.
- Sparkes, Imogen A., Lorenzo Frigerio, Nicholas Tolley, and Chris Hawes. 2009. "The Plant Endoplasmic Reticulum: A Cell-Wide Web." *Biochemical Journal* 423(2):145–55.
- Steele, John F. C., Hadrien Peyret, Keith Saunders, Roger Castells-graells, Johanna Marsian, Yulia Meshcheriakova, and George P. Lomonosoff. 2017. "Synthetic Plant Virology for Nanobiotechnology and Nanomedicine." 1–18.
- Stubbs, Gerald, Stephen Warren, and Kenneth Holmes. 1977. "Structure of RNA and RNA Binding Site in Tobacco Mosaic Virus from 4-Å Map Calculated from X-Ray Fibre Diagrams." *Nature* 267(5608):216.
- Tewary, Sunil Kumar, Toshiro Oda, Amy Kendall, Wen Bian, Gerald Stubbs, Sek Man

- Wong, and Kunchithapadam Swaminathan. 2011. "Structure of Hibiscus Latent Singapore Virus by Fiber Diffraction: A Nonconserved His122 Contributes to Coat Protein Stability." *Journal of Molecular Biology* 406(3):516–26.
- Tilsner, J., O. Linnik, K. M. Wright, K. Bell, a. G. Roberts, C. Lacomme, S. Santa Cruz, and K. J. Oparka. 2012. "The TGB1 Movement Protein of Potato Virus X Reorganizes Actin and Endomembranes into the X-Body, a Viral Replication Factory." *Plant Physiology* 158(3):1359–70.
- Tilsner, Jens, Khalid Amari, and Lesley Torrance. 2011. "Plasmodesmata Viewed as Specialised Membrane Adhesion Sites." *Protoplasma* 248(1):39–60.
- Tilsner, Jens, Olga Linnik, Nynne M. Christensen, Karen Bell, Ian M. Roberts, Christophe Lacomme, and Karl J. Oparka. 2009. "Live-Cell Imaging of Viral RNA Genomes Using a Pumilio-Based Reporter." *Plant Journal* 57(4):758–70.
- Tilsner, Jens, Olga Linnik, Marion Louveaux, Ian M. Roberts, Sean N. Chapman, and Karl J. Oparka. 2013. "Replication and Trafficking of a Plant Virus Are Coupled at the Entrances of Plasmodesmata." *Journal of Cell Biology* 201(7):981–95.
- Tilsner, Jens and Karl J. Oparka. 2012. "Missing Links? - The Connection between Replication and Movement of Plant RNA Viruses." *Current Opinion in Virology* 2(6):705–11.
- Tozzini, Alejandro C., Bo Ek, E. Tapio Palva, and H. Esteban Hopp. 1994. "Potato Virus X Coat Protein: A Glycoprotein." *Virology* 202(2):651–58.
- Tremblay, Marie Hélène, Nathalie Majeau, Marie Eve Laliberté Gagné, Katia Lecours, Hélène Morin, Jean Baptiste Duvignaud, Marilène Bolduc, Nicolas Chouinard, Christine Paré, Stéphane Gagné, and Denis Leclerc. 2006. "Effect of Mutations K97A and E128A on RNA Binding and Self Assembly of Papaya Mosaic Potexvirus Coat Protein." *FEBS Journal* 273(1):14–25.
- Uversky, Vladimir N. 2011. "Intrinsically Disordered Proteins from A to Z." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 43(8):1090–1103.
- Verchot-Lubicz, Jeanmarie, Lesley Torrance, Andrey G. Solovyev, Sergey Yu Morozov, Andrew O. Jackson, and David Gilmer. 2010. "Varied Movement Strategies Employed by Triple Gene Block-Encoding Viruses." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(10):1231–47.
- Verchot-Lubicz, Jeanmarie, Chang Ming Ye, and Devinka Bamunusinghe. 2007. "Molecular Biology of Potexviruses: Recent Advances." *Journal of General Virology* 88(6):1643–55.
- Verchot, J., S. M. Angell, and D. C. Baulcombe. 1998. "In Vivo Translation of the Triple Gene Block of Potato Virus X Requires Two Subgenomic MRNAs." *Journal of Virology* 72(10):8316–20.
- Van Der Vlugt, R. A. A., C. Cuperus, J. Vink, I. C. M. M. Stijger, D. E. Lesemann, J. Th J. Verhoeven, and J. W. Roenhorst. 2002. "Identification and Characterization of Pepino Mosaic Potexvirus in Tomato." *EPPO Bulletin* 32(3):503–8.

- Voinnet, Olivier, Carsten Lederer, and David C. Baulcombe. 2000. "A Viral Movement Protein Prevents Spread of the Gene Silencing Signal in *Nicotiana Benthamiana*." *Cell* 103(1):157–67.
- Wagner, Ulrich, Robert Edwards, David P. Dixon, and Felix Mauch. 2002. "Probing the Diversity of the Arabidopsis Glutathione S-Transferase Gene Family." *Plant Molecular Biology* 49(5):515–32.
- Wang, Aiming. 2015. "Dissecting the Molecular Network of Virus-Plant Interactions: The Complex Roles of Host Factors." *Annual Review of Phytopathology* 53(1):45–66.
- Wang, Hong and Gerald Stubbs. 1994. "Structure Determination of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus by X-Ray Fiber Diffraction. Significance for the Evolution of Tobamoviruses." *Journal of Molecular Biology* 239(3):371–84.
- Wang, Zhaohui, Jelena J. Kraft, Alice Y. Hui, and W. Allen Miller. 2010. "Structural Plasticity of Barley Yellow Dwarf Virus-like Cap-Independent Translation Elements in Four Genera of Plant Viral RNAs." *Virology* 402(1):177–86.
- Waterworth, H. E. and Ahmed Hadidi. 1998. "Economic Losses Due to Plant Viruses." *Plant Virus Disease Control. APS, St. Paul*.
- Weber, Philipp H. and Jozef J. Bujarski. 2015. "Multiple Functions of Capsid Proteins in (+) Stranded RNA Viruses during Plant-Virus Interactions." *Virus Research* 196:140–49.
- Wu, Chih Hang, Shu Chuan Lee, and Chao Wen Wang. 2011. "Viral Protein Targeting to the Cortical Endoplasmic Reticulum Is Required for Cell-Cell Spreading in Plants." *Journal of Cell Biology* 193(3):521–35.
- Wu, Xiaojie and John G. Shaw. 1997. "Evidence That a Viral Replicase Protein Is Involved in the Disassembly of Tobacco Mosaic Virus Particles in Vivo." *Virology* 239(2):426–34.
- Wu, Xiaojie, Zhengkai Xu, and John G. Shaw. 1994. "Uncoating of Tobacco Mosaic Virus RNA in Protoplasts." *Virology* 200(1):256–62.
- Yang, Shaoqing, Tao Wang, Jen Bohon, Marie Ève Laliberté Gagné, Marilène Bolduc, Denis Leclerc, and Huilin Li. 2012. "Crystal Structure of the Coat Protein of the Flexible Filamentous Papaya Mosaic Virus." *Journal of Molecular Biology* 422(2):263–73.
- Ye, Changming, Martin B. Dickman, Steven A. Whitham, Mark Payton, and Jeanmarie Verchot. 2011. "The Unfolded Protein Response Is Triggered by a Plant Viral Movement Protein." *Plant Physiology* 156(2):741–55.
- Zamora, Miguel, Eduardo Méndez-López, Xabier Agirrezabala, Rebeca Cuesta, José L. Lavín, M. Amelia Sánchez-Pina, Miguel A. Aranda, and Mikel Valle. 2017. "Potyvirus Virion Structure Shows Conserved Protein Fold and RNA Binding Site in SsRNA Viruses." *Science Advances* 3(9):1–8.
- Zayakina, Olga, Marina Arkhipenko, Stanislav Kozlovsky, Nikolai Nikitin, Alexander

- Smirnov, Petri Susi, Nina Rodionova, Olga Karpova, and Joseph Atabekov. 2008. "Mutagenic Analysis of Potato Virus X Movement Protein (TGBp1) and the Coat Protein (CP): In Vitro TGBp1-CP Binding and Viral RNA Translation Activation." *Molecular Plant Pathology* 9(1):37–44.
- Zhang, Lingrui and Aiming Wang. 2012. "Virus-Induced ER Stress and the Unfolded Protein Response." *Frontiers in Plant Science* 3(December):1–16.
- Zhou, Honggang, Yuna Sun, Yu Guo, and Zhiyong Lou. 2013. "Structural Perspective on the Formation of Ribonucleoprotein Complex in Negative-Sense Single-Stranded RNA Viruses." *Trends in Microbiology* 21(9):475–84.
- Zhulidov, P. A. 2004. "Simple CDNA Normalization Using Kamchatka Crab Duplex-Specific Nuclease." *Nucleic Acids Research* 32(3):37e – 37.
- Zouine, Mohamed, Elie Maza, Anis Djari, Mattieu Lauvernier, Pierre Frasse, Abdelaziz Smouni, Julien Pirrello, and Mondher Bouzayen. 2017. "TomExpress, a Unified Tomato RNA-Seq Platform for Visualization of Expression Data, Clustering and Correlation Networks." *Plant Journal* 92(4):727–35.
- Zuker, Michael. 2003. "Mfold Web Server for Nucleic Acid Folding and Hybridization Prediction." *Nucleic Acids Research* 31(13):3406–15.