



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

EFEECTO DE COMPONENTES VIRALES SOBRE
LA ACTIVIDAD RIBONUCLEASA DE LA
FIBRILARINA

Tesis que presenta
CARLO STEFANO DECLE CARRASCO

En opción al título de
DOCTOR EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR)

Mérida, Yucatán, México

2023

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Carlo Stefano Decle Carrasco** titulado **Efecto de componentes virales sobre la actividad ribonucleasa de la fibrilarina**, fue realizado en la **Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Regulación Genética y Morfogénesis, laboratorio 23** del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



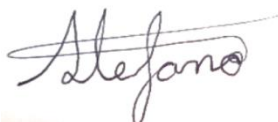
Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 19 de enero de 2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Firma: _____

Nombre: Carlo Stefano Declé Carrasco

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado Estudio funcional de la interacción entre fibrilarina y fosfolípidos en la progresión viral de plantas bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT FC 1572, 576664.)

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada número 689272.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por la oportunidad de cursar mis estudios de doctorado en sus instalaciones, así como el laboratorio número 23 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular (UBBM), a cargo del Dr. Enrique Castaño de la Serna.

Al director de tesis, el Dr. Enrique Castaño de la Serna, por la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, su asesoría y consejos durante todos estos años.

A mis asesores, la Dra. Luisa A. López Ochoa, el Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata y el Dr. Alejandro Pereira Santana por su guía y enseñanzas durante todo este proceso.

Al comité revisor en el que se incluye las colaboraciones de la Dra. Luisa A. López Ochoa, la Dra. Renata Rivera Madrid, el Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, el Dr. Alejandro Pereira Santana y el Dr. Hernán de Jesús Villanueva Alonzo.

Al Dr. Francisco Guillén Chable, por su asesoramiento en los ensayos de ribonucleasa de Fibrilarina.

Al apoyo técnico de la Ingeniera Wilma González Kantun, y soporte en el mismo periodo

A los compañeros del laboratorio número 23 de la UBBM presentes en el periodo 2015-I al 2022-II, por sus asesorías.

DEDICATORIAS

A mis padres, Evelyn Carrasco Castilla y Benito Decle Jesús, ya que sin su amor y apoyo incondicional este logro no hubiera sido posible.

A mis hermanos, Mariana y Benito Decle Carrasco, así como a mi sobrina Barbara Miranda Decle, con ustedes a mí lado, todo es posible.

A Diana Laura Sierra Ulín, mi compañera de vida, este logro es de los dos.

A mis compañeros y amigos, con quienes compartí esta gran aventura, hicieron de este posgrado más grato.

PRODUCTOS ASOCIADOS

1. Congreso: XVIII National Congress of Plant Biochemistry and Molecular Biology.
2. Artículo de revisión: Plant viral proteins and fibrillarín: the link to complete the infective Cycle. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/S11033-021-06401-1/TABLES/1>
3. Artículo de revisión: Current research on viral proteins that interact with fibrillarín.
*Aceptado, en proceso de publicación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	4
ANTECEDENTES.....	4
1. Generalidades de la FBL	4
1.1 Estructura de la FBL	7
1.2 Funciones de la FBL	8
1.3 La FBL como oncogén.....	9
1.4 La actividad ribonucleasa de la FBL en plantas	9
1.5 La actividad de ribonucleasa de la FBL de humanos	10
1.6 El dominio GAR de HsFib en la actividad de ribonucleasa	11
1.7 Interacción de la FBL en la infección viral de plantas	12
1.8 Proteínas intrínsecamente desordenadas.....	13
1.9 Proteínas intrínsecamente desordenadas en virología	14
RECAPITULACIÓN DE LOS ANTECEDENTES	16
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	16

CAPÍTULO II MAPEO DEL SITIO DE INTERACCIÓN DE TGB1 CON la FBL	17
INTRODUCCIÓN	17
MATERIALES Y METODOS	17
2.1 Predicción de IDRs de TGB1 de BSMV.....	17
2.2 Plásmidos y cepas	18
2.3 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes	19
2.4 Western blot.....	20
2.5 Mapeo del sitio de interacción de TGB1 con la FBL mediante Far Western	20
RESULTADOS	21
2.6 Predicción de IDRs de TGB1	21
2.7 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de las regiones de <i>TGB1</i> de BSMV 21	
2.8 Clonación de las regiones de <i>TGB1</i> de BSMV en pET15b.....	23
2.9 Expresión y purificación de TGB1 de BSMV y sus regiones	24
2.10 Expresión y purificación de HsFib, AtFib y DelGAR.....	26
2.11 Mapeo del sitio de unión de TGB1 a HsFib.....	27
2.12 Análisis de la región de interacción de TGB1 con HsFib mediante Far Western	27
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	30
CAPÍTULO III ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA EN PRESENCIA DE TGB1.....	31

INTRODUCCIÓN	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1 Plásmidos y cepas	32
3.2 Western blot.....	32
3.3 Material biológico	32
3.4 Actividad de ribonucleasa de la FBL	33
3.5 Estudio de la actividad de ribonucleasa de HsFib en interacción con TGB1 de BSMV 33	
RESULTADOS	33
3.6 Ensayo de la actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib.....	33
3.7 Ensayo de 6His:TGB1 en presencia de RNA total.....	34
3.8 Ensayo de la actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib en presencia de 6His:TGB1 36	
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES	40
CAPÍTULO IV ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA CON RNA VIRAL COMO SUSTRATO.....	41
INTRODUCCIÓN	41
MATERIALES Y METODOS	42
4.1 Plásmidos y cepas	42
4.2 Material biológico.....	42
4.3 Estudio de la actividad de ribonucleasa de HsFib con RNA viral como sustrato	42

RESULTADOS	42
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	44
CAPÍTULO V FIBRILARINA Y VIRUS DE PLANTAS	46
Plant viral proteins and fibrillarlin: the link to complete the infective cycle	46
CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES	59
Current research on viral proteins that interact with fibrillarlin	59
CAPÍTULO VII DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	79
DISCUSIÓN.....	79
CONCLUSIONES GENERALES	80
PERSPECTIVAS	81
BIBLIOGRAFÍA	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Metilación del rRNA mediante FBL.....	7
Figura 2 Representación de la estructura primaria de FBL de eucariotas.....	8
Figura 3 Predicción de IDRs de TGB1 con el servidor IUPred2A.	21
Figura 4 Esquema de las regiones de <i>TGB1</i> de BSMV.	23
Figura 5 Clonación de las regiones de <i>TGB1</i> de BSMV en un vector de expresión bacteriano	24
Figura 6 Purificación de 6His:TGB1 y 6His:ΔTGB1.	25
Figura 7 Inmunodetección de 6His:TGB1 y 6His:ΔTGB1.....	26
Figura 8 Purificación de GST:HsFib:6His GST:DelGAR:6His GST:AtFib2:6His y 6His:HsFib...27	
Figura 9 Mapeo del sitio de interacción de 6His:TGB1 con 6His:HsFib mediante Far Western	29
Figura 10 Inmunodetección de 6His:HsFib y ensayo de su actividad de ribonucleasa.	34
Figura 11 Efecto de la incubación de 6His:TGB1 con RNA total.	35
Figura 12 Ensayo de la actividad de ribonucleasa de GST:AtFib2:6His y GST:DelGAR:6His..	36
Figura 13 Ensayo de la actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib con diferentes concentraciones de 6His:TGB1.	37
Figura 14 Ensayo de la actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib en presencia de 6His:TGB1 por duplicado.	38
Figura 15 Ensayo de la actividad de ribonucleasa con diferentes concentraciones de 6His:HsFib en presencia de 6His:TGB1.	39
Figura 16 Ensayo de la actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib con RNA viral.	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Oligonucleótidos utilizados para la generación de mutantes de TGB1	22
---	----

ABREVIATURAS

FBL: Fibrilarina

HsFib: Fibrilarina de *Homo sapiens*

AtFib1: Fibrilarina 1 de *Arabidopsis thaliana*

Atfib2: Fibrilarina 2 de *Arabidopsis thaliana*

NORs: Regiones de organización nuclear

ADN: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

CF: Componente fibrilar

CG: Componente granular

CFD: Componente fibrilar denso

GAR: Dominio rica en glicinas y argininas

SAM: S-Adenosilmetionina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

RNP: Ribonucleoproteínas

snoRNP: Ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares

snoRNA: RNAs pequeños nucleolares

(+)ssRNA: RNA monocatenario positivo

(-)ssRNA: RNA monocatenario negativo

RESUMEN

La fibrilarina es una proteína esencial, conservada en secuencia y función durante la evolución. Con su actividad de metiltransferasa es responsable de metilar más de 100 sitios diferentes sobre el rRNA de humanos y plantas, para su correcto funcionamiento. Igual, en fibrilarina de humanos y plantas, recientemente, se ha encontrado poseer actividad de ribonucleasa contra rRNA. La región catalítica reside en el dominio GAR, un dominio flexible que, al ser desordenado, le confiere la capacidad de poseer múltiples ligandos, entre ellos proteínas virales. Esta asociación no es exclusiva, pues virus de mamíferos y plantas de diferentes familias, dependen de fibrilarina. El papel que tiene tampoco es único, en virus de plantas se ha reportado asociada en la formación de estructuras similares a partículas virales mediante la interacción con RNA viral, en el movimiento sistémico y célula a célula, y en la supresión del silenciamiento de RNA. Sin embargo, el efecto que conlleva esta asociación sobre sus actividades catalíticas no ha sido estudiada. Esta tesis se enfocó en determinar el efecto que tiene la primera proteína de movimiento del triple bloque de genes (TGB1) del virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV) y el RNA viral de Papaya meleira virus México (PMeV-Mx) sobre la actividad de ribonucleasa de fibrilarina. Se determinó que el dominio N-terminal desordenado de TGB1, es la región de interacción y que la fibrilarina de humanos también puede interactuar con proteínas virales de plantas. La actividad de ribonucleasa de fibrilarina parece ser modulada por TGB1 y al parecer es selectiva, pues no degrada el RNA viral, no obstante, la presencia de este RNA inhibe la degradación del rRNA. Este es el primer trabajo en explorar el efecto de la degradación de RNA por fibrilarina en el contexto viral.

ABSTRACT

Fibrillarin is an essential protein, conserved in sequence and function throughout evolution. Through its methyltransferase activity is responsible for more than 100 different methylation sites in human and plant rRNAs required for its proper functioning. Recently, both human and plant fibrillarins showed a ribonuclease activity. The catalytic region resides in the GAR domain, a flexible and disordered region, which confers its ability to possess multiple ligands, among them, viral proteins. This association is not exclusive, since different families from mammal and plant viruses, depends on fibrillarin. It has been associated in the formation of similar structures of viral particles by interacting with viral RNA, cell-to-cell and systemic movement, and in the suppression of RNA silencing of plant viruses. However, the effect of such association over its catalytic activities has not been established. The present thesis' focus was to assess the effect of both, the first movement protein of the triple gene block (TGB1) of Barley stripe mosaic virus (BSMV) and the viral RNA of Papaya meleira virus-Mexican variant (PMeV-Mx), over fibrillarin's ribonuclease activity. The binding region of TGB1 was mapped to its disordered N-terminal domain, and human fibrillarin can interact with a plant viral protein. Fibrillarin's ribonuclease activity seems to be modulated by TGB1, and to be selective, since it can't degrade viral RNA, and this type of RNA inhibited the rRNA degradation. This is the first work to explore the effect of fibrillarin RNA degradation in the viral context.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El nucléolo es el componente más grande del núcleo. Se puede dividir como una región dinámica o estable dependiendo de la naturaleza y cantidad de moléculas de las cuales está compuesto. La principal función de esta estructura es la biogénesis ribosomal. Proceso comprendido por la transcripción de rDNA, procesamiento de rRNA y ensamblaje de proteínas ribosomales (Kressler *et al.*, 1999). Además de la biogénesis, diversas funciones se le han atribuido al nucléolo, como el silenciamiento génico, la progresión del ciclo celular y biogénesis de RNA nuclear pequeños y proliferación de tRNA y otras formas de respuesta a estrés (Andersen *et al.*, 2005; Hinsby *et al.*, 2006; Boisvert *et al.*, 2007; Shaw y Brown, 2012). El nucléolo consiste en tres componentes: centros fibrilares (FCs), componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular. Entre las proteínas nucleolares (NOP), la fibrilarina (FBL) es una proteína nucleolar y ha sido conservada en secuencia y función durante la evolución (Ochs *et al.*, 1985).

La FBL es una metiltransferasa la cual cataliza la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) al grupo 2'-hidroxilo de la ribosa blanco. Es una proteína con peso molecular de entre 34 - 38 kDA, dependiendo del organismo del cual sea aislada y fue originalmente identificada en el nucléolo de *Physarum polycephalum* (Christensen *et al.*, 1977). Sus estructuras primaria y secundaria son altamente conservadas y su principal característica es un sitio rico en residuos de arginina y glicina y un motivo específico para la unión de RNA.

En células eucarióticas, la FBL se localiza principalmente en el nucléolo y debido a que en procariontes no hay núcleo es poco probable que todas sus funciones estén conservadas. Por ejemplo; la FBL de arquea muestra una unión débil a RNA (Omer *et al.*, 2002) , mientras que la FBL de organismos eucarióticos muestran una unión a RNA bien definida y en algunos casos, más de dos sitios de unión se han descrito (Rakitina *et al.*, 2011). Además, el reemplazo de la FBL de levadura por la FBL de *Homo sapiens* (HsFib), *Xenopus* o de *Arabidopsis thaliana* cambia el crecimiento y la morfología nuclear.

La FBL se ha mostrado involucrada en diferentes procesos post-traduccionales tales como la escisión de rRNA, metilación de rRNA y ensamblaje ribosomal (Tollervey *et al.*, 1993). Además, la dinámica de la FBL con los cuerpos cajales (CB) puede ser una explicación del porqué esta proteína es objetivo de diversos virus con fase nuclear. Las dos fases del ciclo replicativo de umbravirus sugiere el involucramiento de la FBL, la cual es redistribuida al citoplasma y participa

INTRODUCCIÓN

en la formación de ribonucleoproteínas virales capaces de desplazarse a través del floema de la planta resultando en una infección completa de la planta (Kim *et al.*, 2007; Sang *et al.*, 2007a). Por lo tanto, la interacción entre antígenos nucleares virales con la FBL en el nucléolo es clave para la expansión sistemática de este tipo de virus de plantas (Hiscox, 2002; Zheng *et al.*, 2014).

Los virus son parásitos obligatorios los cuales necesitan de la maquinaria celular de su hospedador para su propia replicación. Para esto los virus, han desarrollado diversas estrategias con el fin de utilizar elementos de los procesos celulares del hospedador. El genoma viral está compuesto por DNA o RNA que codifican los componentes virales necesarios para infectar de manera latente o lítica. Generalmente, los virus de DNA replican en el núcleo mientras que los virus de RNA lo hacen en el citoplasma. Existen diversas estrategias de replicación, sin embargo, una característica en común que tienen la mayoría de los virus es interactuar con el nucléolo (Greco, 2009; Hiscox, 2002). La interacción de virus con esta región nuclear ha sido un tema de estudio desde inicios de los 90's. Encontrando que células infectadas con diversos tipos de virus el nucléolo se ve afectado en estructura y composición. Además, un gran número de componentes virales trafican a y desde el nucléolo, así como proteínas nucleolares que son localizados fuera del nucléolo, mientras que proteínas no-nucleolares entran al nucléolo a realizar otra función (Greco, 2009; Hiscox *et al.*, 2010). Por ejemplo, son pocos los estudios que se enfocan en la relación que tiene la infección viral con la biosíntesis ribosomal, de tal manera que proteínas virales interactúan con rRNA, inhibiendo o estimulando su transcripción o bien, modulando su maduración. Sin embargo, se cuenta con más estudios donde la infección viral interfiere con otros procesos fundamentales como en la regulación del ciclo celular, apoptosis y traducción. La participación viral en estos procesos celulares tiene como objetivo promover la infección mediante la replicación del DNA viral, su ensamblaje y el control del tráfico intracelular (Yoo *et al.*, 2003; Ponti *et al.*, 2008; Sadagopan *et al.*, 2009; Belin *et al.*, 2010).

En este trabajo doctoral se presenta información relevante de la estructura y funciones de la FBL, como sus actividades enzimáticas de metiltransferasa y de ribonucleasa. También se incluye una breve introducción de su localización nucleolar y su participación en la biogénesis ribosomal y la metilación de la histona H2A. Todo esto como contexto a considerar en los diferentes tipos de estrés a los que está sometida como en cancer y virus.

El enfoque de este trabajo recae en las implicaciones que tiene la interacción de proteínas virales con la FBL, particularmente sobre su actividad de ribonucleasa. Por tanto, se describe la

INTRODUCCIÓN

información acerca de la actividad de ribonucleasa de la FBL 1 y 2 de *H. sapiens* y *A. thaliana*, respectivamente. De igual manera, se detalla la asociación que tienen las proteínas virales de plantas con la FBL, destacando que su dominio rico en glicinas y argininas (GAR), en el cual reside la actividad de ribonucleasa, es además el sitio de interacción. El complejo proteína viral-FBL, también incluye RNA viral, formando complejos ribonucleoproteicos virales. Por último, se describe la presencia de regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) en las proteínas virales y las características que le proporcionan dichas regiones desordenadas.

Aprovechando la información generada en nuestro laboratorio sobre la actividad de ribonucleasa de la FBL, se estableció como objetivo general la presente tesis que radica en el efecto de dicha actividad enzimática durante la interacción de la FBL con los componentes virales, como proteínas y RNA virales. En este trabajo se estudió la información concerniente a la interacción entre la FBL y virus de animales y plantas, del cual se realizó dos artículos de revisión. Entre las proteínas virales de plantas, se escogió a la primera proteína de movimiento del triple bloque de genes (TGB1) del virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV), la cual está reportada de interactuar con la FBL. Se mapeó el sitio de interacción con la FBL en el dominio N-terminal de TGB1 de BSMV. Además, se observó que TGB1 de BSMV afecta la actividad de ribonucleasa de la FBL. De igual forma, el RNA viral de Papaya meleira virus México (PMeV-Mx) no es degradado por la FBL, sin embargo, sí inhibe la degradación del rRNA. Por tanto, la información generada en este trabajo sugiere que los virus que interactúan con la FBL, además de relocalizarla y utilizarla para diferentes propósitos, afectan su actividad de ribonucleasa.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. Generalidades de la FBL

El nucléolo es la estructura más grande del núcleo. El procesamiento del pre-rRNA y la biogénesis ribosomal son procesos localizados en el nucléolo. Además, el nucléolo está involucrado en la progresión del ciclo celular, la senescencia, el silenciamiento génico, la biosíntesis de la partícula de detección de señal y la síntesis de snRNA y satRNA (Lafontaine *et al.*, 2020)

El nucléolo está organizado de la siguiente manera: (1) el centro fibrilar (FC), donde sucede la transcripción del rDNA; (2) el componente fibrilar denso (DFC), el cual rodea parcialmente el FC; (3) el componente granular (GC), estructura situada en la periferia del nucléolo y donde sucede la maduración de las sub-unidades ribosomales (Figura 1).

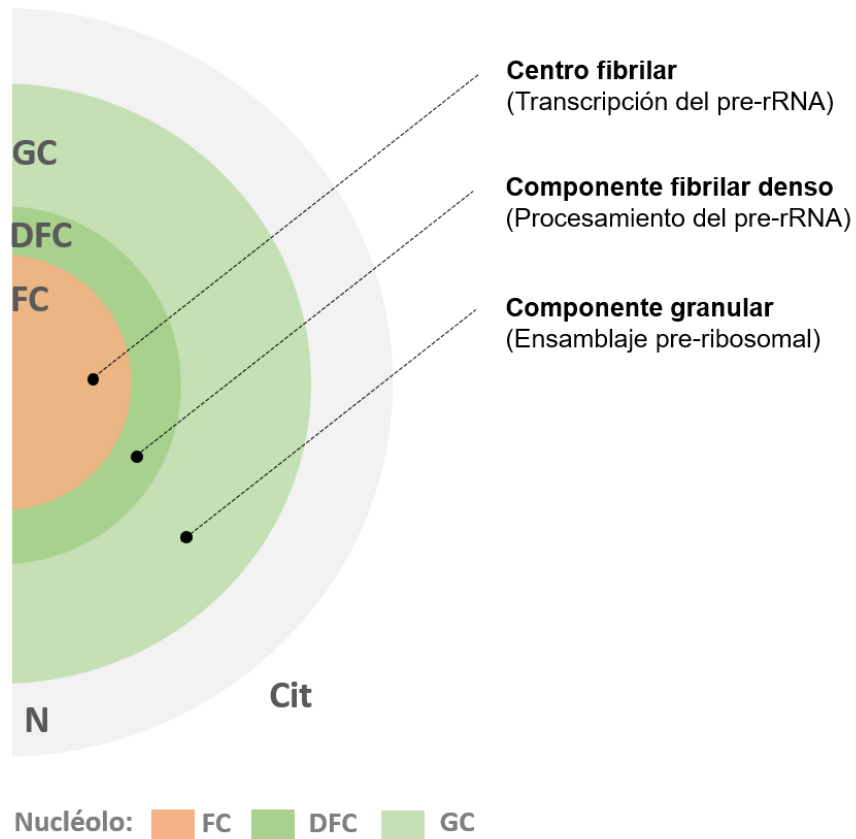


Figura 1 Representación esquemática de la estructura del nucléolo. La figura ilustra la arquitectura del nucléolo el cual comprende el centro fibrilar (FC), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (CG). La transcripción del rRNA ocurre en el FC y en la interface entre el FC y DFC. En el DFC ocurren múltiples pasos de procesamiento y maduración del pre-rRNA. El ensamblaje de la subunidad pre-ribosomal ocurre en el GC. N: núcleo; Cit: citoplasma.

Respecto al núcleo, otras estructuras como los CB, los cuerpos promeolíticos de leucemia (PML) y manchas nucleares han sido identificadas. Los CB tienen una interacción específica con el nucléolo y han sido conservados en humanos y plantas (Ding y Lozano-Durán, 2020) . Fueron descubiertos en 1903 por Ramón y Cajal y descritos como estructuras de 0.2 a 1.5 μm que contienen a la proteína coilina p80. Una baja expresión de p80 genera la pérdida de los CB, la inactividad de la RNA polimerasa I y en la descomposición de la estructura del nucléolo (Bowmann *et al.*, 1995). La maduración y reciclaje de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares (snoRNPs), en el ensamblaje, procesamiento y transporte al nucléolo de las snoRNPs y el procesamiento de los mRNA de las histonas.

CAPÍTULO I

Dentro de las funciones del nucléolo; la biogénesis ribosomal requiere del ensamblaje de los rRNA 28S, 18s, 5.8S con el 5S y las proteínas ribosomales (Lafontaine *et al.*, 2020). Los genes que codifican a las proteínas ribosomales son transcritos por la RNA polimerasa II, además, la mayoría de los RNA pequeños nucleolares (snoRNA) se encuentran codificados en los intrones de las proteínas ribosomales, durante el corte de los intrones. La interacción entre los rRNA con las proteínas ribosomales, dan lugar a precursores de ribonucleoproteínas (RNP), que promueven la maduración de las subunidades 40S y 60S que son exportados al citoplasmaa través de los poros nucleares (Fatica y Tollervey, 2002). La exportación del ribosoma está mediada por factores incluidos en las proteínas ribosomales, como nucleasas, RNA helicasas, GTPasas, entre otros.

Dentro del nucléolo existe una gran variedad de proteínas. Un estudio bio-informático ha demostrado que en las secuencias de proteínas del nucléolo hay un mayor porcentaje de aminoácidos cargados como glutamato, aspartato, lisina qué en otros componentes de la célula (Leung *et al.*, 2003). La FBL es la proteína más abundante en el DFC del nucléolo, región donde se procesa el pre-rRNA (Ochs *et al.*, 1985).

La FBL es una metiltransferasa la cual cataliza la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) al grupo 2'-hidroxilo de la ribosa blanco (Ye *et al.*, 2009) (Figura 2). Fue identificada en el nucléolo de *Physarum polycephalum* (Christensen *et al.*, 1977). Es una proteína con peso molecular de 34-38 kDa, dependiendo del organismo y se encuentra asociada con los snoRNA U3, U8 y U14. Su secuencia de aminoácidos y estructura secundaria se encuentra altamente conservada y cuenta con un dominio rico en arginina y glicina y un motivo de unión a RNA. La FBL junto con los snoRNPs realizan modificaciones postraduccionales para la maduración del rRNA (Rodríguez-Corona *et al.*, 2015; Shubina *et al.*, 2016).

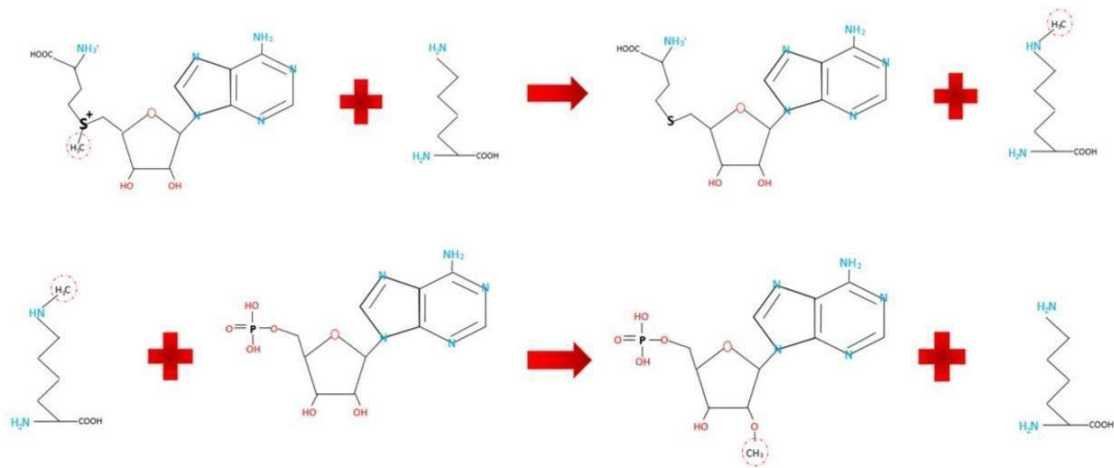


Figura 2 Metilación del rRNA mediante la FBL. La FBL cataliza la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) al grupo 2'-hidroxilo de la ribosa blanco.

Recientemente, se identificó que el dominio N-terminal de la FBL 2 de *A. thaliana* (AtFib2) tiene función de ribonucleasa, a diferencia de la FBL 1 (AtFib1). Además, de que ambas FBLs tienen diferente habilidad para interactuar con fosfoinosítidos y ácido fosfatídico (PA). Sin embargo, el sitio de unión a fosfolípidos y la función de ribonucleasa se encuentran en el sitio GAR (Rodríguez-Corona *et al.*, 2017).

1.1 Estructura de la FBL

La secuencia de la FBL de eucariotas puede ser clasificada en dos dominios: el dominio N-terminal y el dominio metiltransferasa (Figura 3, imagen de Rodríguez-Corona *et al.*, 2015). El dominio N-terminal de *A. thaliana* está dividido en dos regiones: (1) el dominio GAR con alrededor de 77 aminoácidos y (2) una región espaciadora con 61 aminoácidos. El dominio GAR es responsable de la interacción con diferentes proteínas virales y celulares, además de una señal de retención nucleolar (Snaar *et al.*, 2000). La FBL ha sido mostrada como sustrato para la metilación de arginina por la proteína arginina N-metiltransferasa 1 (PRMT1) (Ochs *et al.*, 1985). El dominio metiltransferasa está dividido en dos regiones: (1) la región R o central con 87 aminoácidos y (2) una región rica en estructuras α -hélices con 95 aminoácidos. En la región R, hay un motivo específico de unión a RNA GCVYAVCF para proteínas que se unen a RNA (Aris y Blobel, 1991). Mediante la utilización de dos mutantes de AtFib2, dos regiones adicionales de

CAPÍTULO I

unión a RNA se determinaron. Una dentro de la región R entre el aminoácido 138 y 179, y la otra en la región rica de α -hélices entre los aminoácidos 225 y 281. Ambos sitios de unión a RNA trabajan independientemente, además de interactuar con varios RNAs. El dominio C-terminal es caracterizado por 7 hojas- β y 7 α -hélices y tres aminoácidos conservados que rodean la región de unión-AdoMet (Rodríguez-Corona *et al.*, 2015).

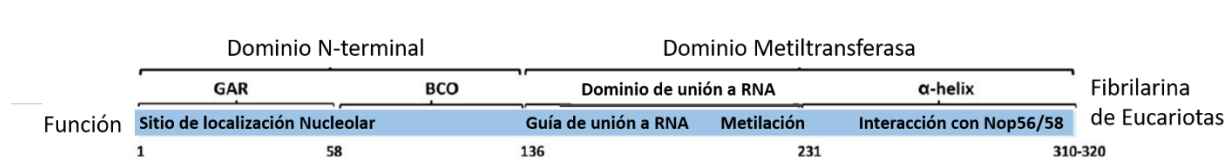


Figura 3 Representación de la estructura primaria de la FBL de eucariotas. La secuencia de la FBL está dividida en cuatro regiones: El dominio GAR es una secuencia rica en glicinas y argininas con actividad de ribonucleasa. BCO: secuencia con actividad indefinida. El dominio metiltransferasa contiene la actividad enzimática, así como la secuencia conservada de unión a RNA. Esta secuencia puede ser dividida en el dominio de unión a RNA y la región de α -hélices que interactúa con Nop56/58. La posición promedio de aminoácidos de cada dominio está indicado debajo de la barra.

1.2 Funciones de la FBL

La FBL está involucrada en procesos como el procesamiento del pre-rRNA, la metilación del pre-rRNA y el ensamblaje de los ribosomas (Rodríguez-Corona *et al.*, 2015). La principal metilación de la FBL es la 2'-O-ribose blanco del rRNA y de los RNA pequeños nucleares (snRNA), aunque debido a que la FBL tiene una baja afinidad por el RNA se sugiere que ésta forma complejos con otras proteínas formando así un snRNA específico para llevar a cabo la metilación (Dunbar *et al.*, 2000; Reichow *et al.*, 2007; Lechertier *et al.*, 2009). De esta forma dicho complejo es dirigido por un snoRNA guía que tiene la secuencia de la caja H/ACA, la cual determina la especificidad por el RNA a modificar.

El complejo de unión de la FBL a RNA en eucariotas se compone por las proteínas Nop56 y Nop58, la FBL y la proteína 15.5K. La proteína 15.5K es la primera en unirse al RNA guía que reconoce el motivo K-turn. Posteriormente, la Nop5 se une a la FBL. Esta unión forma el dominio C-terminal o dominio Nop, que se une a la proteína 15.5K ya situada en el complejo con el RNA (Vidovic *et al.*, 2000; Watkins *et al.*, 2000). De esta forma se une la FBL al snoRNP (Ye *et al.*, 2009).

1.3 La FBL como oncogén

El nucléolo está involucrado en el proceso en general de la traducción de proteínas y eventualmente en el crecimiento celular y en la progresión celular (Tsai y Pederson, 2014). Se ha mostrado que la FBL es sobreexpresada en neoplasia intraepitelial prostática de ratón y humanos, lo que puede progresar en cáncer de próstata (Koh *et al.*, 2011). En el adenocarcinoma de humanos, la cantidad de la FBL está correlacionada in vivo con la cantidad de la proteína MYC, oncogén con interacción con la FBL (Koh *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2012). Gene Atlas U133A muestra que en leucemia y linfoma la expresión del mRNA de la FBL está al doble comparado con células normales. Además, hay una expresión elevada de la FBL en células como linfoblastos. Además, p53 disminuye la expresión y la cantidad de la FBL por medio de la interacción con el intrón 1 de la FBL que contiene un sitio regulatorio de p53 (Marcel *et al.*, 2013). En células de cáncer de mama, la falta de regulación de la FBL es causada por la reducción de p53, que resulta en el incremento de la FBL y el incremento de metilaciones aberrantes en rRNA y consecuentemente, en la alteración de la actividad ribosomal, así como en la fidelidad traduccional. Se sugiere que una reducción específica en la cantidad de la FBL es requerido para controlar ciertos tipos de cáncer y su redistribución puede marcar ciertos tipos de muerte celular (Rodriguez-Corona *et al.*, 2015).

1.4 La actividad ribonucleasa de la FBL en plantas

Rodriguez-Corona *et al.*, (2017) describió dos aspectos relevantes de dos de los genes de la FBL en *A. thaliana*: 1) su actividad ribonucleasa y 2) su capacidad de interacción con fosfoinosítidos y ácido fosfático. También observó que esta actividad difiere entre los genes que codifican para las FBLs en *Arabidopsis*: AtFib1 y AtFib2. En este estudio, se demuestra que la actividad de ribonucleasa es diferente entre las FBLs, siendo AtFib2 más activa que AtFib1, además de que la actividad es proporcional a la cantidad de proteína presente en la reacción. Como otras ribonucleasas, AtFib2 es activada por calcio a una concentración óptima de 1 mM, mientras que la presencia de calcio no influye en la actividad de AtFib1. Además, se define que el dominio GAR de AtFib2 presenta la actividad ribonucleasa, con menor selectividad hacia los sustratos de RNA 28 y 18S.

Es importante hacer notar que las principales diferencias entre Fib1 y Fib2 de *A. thaliana* residen en la región N-terminal, es decir en el dominio GAR. Esto hace suponer que las diferencias corresponden a diferentes actividades que las FBLs puedan llevar a cabo.

CAPÍTULO I

Algo realmente interesante es la interacción con fosfolípidos de inositol, ya que al igual que la actividad ribonucleasa, difiere entre ambas FBLs, puesto que en un ensayo fat-blot de manera *in vitro* se demuestra que AtFib1 interactúa principalmente con fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP4), mientras que AtFib2 interactúa con todos los fosfolípidos incluido PA, evaluados en el ensayo. Además, estas interacciones con fosfoinosítidos influyen la actividad ribonucleasa de AtFib2 inhibiéndola en presencia de ácido PA, mientras que ninguna alteración se percibe con AtFib1 en las mismas condiciones de reacción. La actividad ribonucleasa de Fib2 puede ser recuperada por la adición de calcio a la reacción.

De esta información derivada de nuestro grupo de trabajo surgen otras preguntas interesantes relacionadas con la actividad ribonucleasa de la FBL: ¿Tendrán la misma actividad las FBLs de otras especies?; Si la FBL se encuentra en los CBs, ¿Es posible que esta nueva actividad se encuentre relacionado con el procesamiento de mRNA o splicing alternativo?, ¿La actividad ribonucleasa se ve influenciada por las modificaciones postraduccionales que puedan residir en el dominio GAR? ¿Cómo se regula la actividad ribonucleasa durante el ciclo celular?

1.5 La actividad de ribonucleasa de la FBL de humanos

Previamente, se evaluó si la actividad de ribonucleasa de AtFib2 se conservaba en humanos. Se purificó la FBL de *Homo sapiens* (HsFib) recombinante cerca de la homogeneidad mediante diversos pasos cromatográficos (Guillen-Chable *et al.*, 2020). La detección de la proteína recombinante por Western Blot utilizando el anticuerpo primario anti-FBL generó la detección de dos bandas. Una a la señal esperada de la longitud completa de HsFib mientras que la segunda con un peso molecular menor, probablemente correspondiente a un producto de degradación de la misma proteína. Se estudió la actividad de ribonucleasa en un gel de actividad. Ambas bandas exhibieron actividad de ribonucleasa. Por tanto, la actividad de ribonucleasa de HsFib debe ser modular y presente en algún dominio particular dentro de la secuencia de HsFib. Posteriormente, se estudió la actividad de ribonucleasa de HsFib aumentando su concentración de 1 a 6 ng con una cantidad constante de 2 µg de rRNA, de manera *in vitro*. La degradación fue directamente proporcional con la cantidad agregada de HsFib, aunque únicamente la 28S fue degradada y no la 5S. Adicionalmente se encontró que la actividad de ribonucleasa de HsFib es dependiente a tiempo, temperatura y sensible a ión.

Se ha descrito que la FBL y PIP2 interactúan (Yildirim *et al.*, 2013). Esta interacción es evidente puesto que la FBL está constituida por los aminoácidos (carga negativa y anillos aromáticos)

CAPÍTULO I

necesarios para interactuar con fosfoinosítidos. Mediante un phospholipid strip assay, se encontró que HsFib es capaz de interactuar con fosfoinosítidos pero con preferencia a PA. Por esto, se evaluó la actividad de ribonucleasa con los fosfolípidos PIP5 y PIP3 con y sin 1 mM de Ca²⁺ (Guillen-Chable *et al.*, 2020). La adición de PIP3 tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad de ribonucleasa, mientras que PIP5 incrementó la actividad de ribonucleasa.

1.6 El dominio GAR de HsFib en la actividad de ribonucleasa

El dominio N-terminal (1-34 aa) de HsFib incluye el dominio GAR y el dominio BCO. Mediante una serie de construcciones con diferentes secciones del dominio N-terminal, fusionados con GST y 6xHis y finalmente expresados y purificados, se estudió qué región tiene la actividad de ribonucleasa de HsFib (Guillen-Chable *et al.*, 2020). El dominio GAR exhibió actividad, mientras que el dominio BCO no mostró actividad alguna.

La actividad de ribonucleasa del dominio GAR recombinante fusionado con una etiqueta de GST es significativamente mayor a medida que la cantidad de la proteína aumenta. Además, la subunidad 28S es el primer blanco para la degradación de este dominio (Guillen-Chable *et al.*, 2020).

Las argininas conservadas de la secuencia del dominio GAR en las posiciones 34 y 45 fueron analizadas en el contexto de unión a fosfolípidos y sobre la actividad de ribonucleasa. Ambas posiciones fueron sustituidas por alanina. Se propone que probablemente estas alteraciones generan un cambio conformacional del dominio GAR, estando más expuesto en la mutante R45A a diferencia de la mutante R34A. Se evaluó la interacción de las mutantes con fosfolípidos mediante fat blot, de tal manera que ambas mutantes de la FBL perdieron la habilidad de unir con fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), PA y fosfatidilserina (PS), conservando la interacción con fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) y fosfatidilinositol 5-fosfato (PI5P). Aunque la mutante R34A mostró una interacción débil con fosfatidilcolina (PC) y con esfingosina-1-fosfato (S1P). Respecto al efecto de las mutantes en la actividad de ribonucleasa, HsFib WT y la mutante R34A mostraron un nivel similar de degradación sobre la subunidad 28S, mientras que la mutante R45A mostró una actividad por arriba del 80% sobre el rRNA 28S.

1.7 Interacción de la FBL en la infección viral de plantas

El tráfico de RNA es esencial para los requerimientos de la planta. El movimiento sistémico se base en el transporte a través del floema, mientras que la comunicación célula a célula sucede en microcanales que atraviesan la pared celular o bien, los plasmodesmos (PD) (Kragler, 2013). El esparcimiento viral de células infectadas a células vecinas requiere que el tamaño de exclusión de PD incremente a través de proteínas de movimiento (MP) (Gopinath y Kao 2007; Canetta *et al.*, 2008; Harries *et al.*, 2009; Hipper *et al.*, 2013). Se sugiere que cambios en la permeabilidad de PD permitan el movimiento al sistema vascular durante el movimiento sistémico a través del floema. De tal manera que los virus debieron evolucionar para desarrollar diversas estrategias para interactuar con factores celulares para entrar y salir del sistema vascular (Sang *et al.*, 2007a; Harries *et al.*, 2009; Taliansky *et al.*, 2010; Semashko *et al.*, 2012).

El virus BSMV es miembro del género Hordeivirus que contiene 3 RNAs genómicos (gRNA) designados α , β y γ (Lim *et al.*, 2008). Particularmente, el RNA β sirve como mRNA para la cápside y tres proteínas de movimiento viral (MPs) conocidas como del triple bloque (TGB1, TGB2 y TGB3) a partir de la expresión del RNA β 1 subgenómico (sgRNA β 1) y sgRNA β 2, respectivamente (Bragg y Jackson, 2004). La proteína multifuncional de movimiento con unión a RNA, con actividad de ATPasa y helicasa, TGB1, localiza en PD de células infectadas de *N. benthamiana*. TGB1 interacciona con la FBL en el dominio GAR y colocalizan con su genoma en PD de células infectadas donde la expresión de la FBL tiene un incremento de 60-70%. Al ser silenciada la FBL, el movimiento célula a célula de BSMV se reduce. Por tanto, se sugiere que TGB1 secuestra a la FBL para formar un complejo RNP con el RNA de BSMV para moverse de célula a célula (Li *et al.*, 2018).

De manera similar, el virus de la roseta de maní (GRV) que pertenece al género de umbravirus dentro de la familia Tombusviridae codifica la proteína ORF3 (pORF3). pORF3 difunde del citosol hacia el nucléolo donde interactúa con la FBL mediante el dominio GAR para inmediatamente dirigirla al citosol y formar un complejo RNP con el RNA de GRV. El silenciamiento del gen de la FBL en *N. benthamiana* previene el movimiento de larga distancia del GRV, aunque no afecta la replicación viral o el movimiento de célula a célula. Esto indica que la FBL es un componente esencial para la translocación de RNPs virales de GRV y expandirse sistémicamente a lo largo de la planta (Sang *et al.*, 2007a).

CAPÍTULO I

El dominio con unión al genoma (VPg) de la proteína de inclusión (NIa) del virus de la papa A (PVA) interactúa con la FBL únicamente en el nucléolo y CBs, a diferencia de pORF3 que además lo dirige al citoplasma. Otra diferencia de PVA-NIa con GRV-pORF3 es que, pORF3 divide los CBs en múltiples agregados de CBs para posteriormente fusionarse con el nucléolo, mecanismo que no sucede con NIa. Sin embargo, PVA-NIa y GRV-pORF3 requieren de la FBL para la infección viral. Aunque la reducción de la FBL de un 30 a 80% reduce al 50% la acumulación de PVA (Rajamäki y Valkonen, 2009), mientras que en un experimento similar en GRV, la expansión sistémica del virus se inhibe en su totalidad (Sang *et al.*, 2007a).

Otro virus que utiliza a fibrilarina para su movimiento sistémico es el Virus de la franja de arroz (RSV), el cual representa el mayor patógeno viral para la producción de arroz en el Este de Asia (Cho *et al.*, 2013). Mediante la técnica de complementación bimolecular fluorescente, se observó que p2 interactúa con la FBL únicamente en el nucléolo. El silenciamiento de la FBL en células de *N. benthamiana* infectadas con RSV impidió el movimiento sistémico a diferencia con lo visto con pORF3 de GRV (Kim *et al.*, 2007). pORF3 dirige a la FBL al citoplasma para formar el complejo RNP, mientras que p2-fibrilarina localiza en el nucléolo. Entonces se sugiere que RSV utiliza a la FBL de manera diferente (Zheng *et al.*, 2015).

Además de los virus, los virus satélites también requieren de proteínas del hospedador. Los virus satélites son parásitos de RNA que son casi exclusivamente asociados a plantas. Carecen en similitud con el genoma de su virus ayudador (HV), pero dependen de ello para su replicación e encapsidación (Hu *et al.*, 2009). El RNA del bamboo mosaic potyvirus satRNA (satBaMV) forma un complejo RNP con P20 y la FBL sin las proteínas del Virus del mosaico de bamboo (BaMV), cápside y su RNA que son reclutados con la coinfección del HV. P20 y la FBL colocalizan en el nucléolo formando estructura punteadas asociadas a PD. El silenciamiento de la FBL suprime el movimiento sistémico de satBaMV pero no del HV. De tal manera que satBaMV necesita a la FBL para su movimiento sistémico a través del floema (Chang *et al.*, 2016).

En resumen, con los antecedentes mostrados, sugiere que la FBL puede ser utilizada por diferentes virus y para diferentes propósitos, o el mismo propósito, pero de manera diferente.

1.8 Proteínas intrínsecamente desordenadas

Las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) y/o IDRs carecen de una estructura tridimensional estable en condiciones nativas, sin embargo, son capaces de realizar actividades

CAPÍTULO I

biológicas. Las IDPs son tan abundantes en la naturaleza, que los aminoácidos de desorden constituyen cerca del 19% de los aminoácidos de proteínas de eucariotas y 30% del 50% de dichas proteínas contiene al menos una IDR. Su característica de desorden potencia la interacción y las reacciones químicas entre un complejo, facilitando modificaciones postraduccionales, splicing alternativo, inserciones y deleciones. Dichas actividades son posibles debido a que las IDPs pueden reconocer proteínas, ácidos nucleicos, entre otras moléculas (Oldfield y Dunker, 2014). Su flexibilidad conformacional y su potencial de mediar múltiples interacciones intermoleculares sugieren, que durante la evolución adquieran nuevas funciones rápidamente.

Las secuencias de IDPs/IDRs son diferentes a las de proteínas estructuradas. Por ejemplo, las IDRs poseen un alto contenido de residuos con carga y con baja composición de residuos hidrofóbicos, que en esencia los distingue de proteínas estructuradas o irregulares (Meng *et al.*, 2017). La diferencia en la composición aminoacídica entre proteínas estructuradas y IDPs posibilita el desarrollo de algoritmos para la predicción de desorden. Estos métodos utilizan la secuencia de una proteína para calcular qué tan propenso es cada residuo de ser desordenado. Actualmente existen múltiples predictores, como PONDR-FIT, PrDOS y IUPred. Este último se basa en las propiedades fisicoquímicas de cada residuo de la proteína en cuestión, como su “input”.

1.9 Proteínas intrínsecamente desordenadas en virología

Las proteínas virales contienen una reducida fracción de residuos hidrofóbicos, ácidos y de lisinas, y a su vez, contienen una elevada proporción significativa de residuos polares (Xue *et al.*, 2014). La alta tasa de aminoácidos polares en IDPs es conservada y no es exclusivo de proteínas virales (Wright y Dyson, 2014). Sin embargo, hay una diferencia fundamental entre el proteoma eucariótico y viral, los eucariontes contienen más proteínas con regiones desordenadas largas, mientras que los proteomas virales son caracterizados principalmente por tener segmentos desordenados que son mucho más cortos. En resumen, las proteínas virales son claramente diferentes a las del hospedador, siendo menos densamente compactadas y menos afectadas por mutaciones, estando enriquecidas por regiones desordenadas cortas y ser caracterizadas por tener una red significativamente menor de interacciones por residuos. Por tanto, las proteínas virales, especialmente los de virus de RNA, se caracterizan por tener un gran número de regiones desordenadas. De hecho, estudios recientes sugieren que los virus contienen motivos cortos en

CAPÍTULO I

regiones desordenadas para evolucionar muchos de sus interacciones con proteínas del hospedador. La gran frecuencia de regiones desordenadas en proteínas virales puede ser una estrategia para los virus de RNA que son susceptibles a una alta tasa de mutación, amortiguando los efectos perjudiciales de las mutaciones. Puesto que una proteína sin una estructura tiene menos que perder por una mutación que una con un gran grado de estructura, pues ya está desplegada (Xue *et al.*, 2014).

RECAPITULACIÓN DE LOS ANTECEDENTES

Como breve recapitulación de los antecedentes presentados con anterioridad haremos un resumen puntual de algunos aspectos relevantes que permitieron dirigir la actividad experimental de la presente tesis, estos los detallamos como oraciones puntuales:

- La FBL es una proteína altamente conservada durante la evolución, con actividad de metil transferasa y una recién identificada actividad de ribonucleasa.
- La FBL localiza en la interfase entre el CF y el DFC, así como en el DFC del nucléolo, donde lleva a cabo sus principales funciones en la biogénesis ribosomal. La relocalización de la FBL afecta los procesos en los que participa, así como la morfología del nucleolo.
- La FBL está asociada con múltiples tipos de estrés, como en cancer y virus. En virus de plantas, la FBL es relocalizada para diferentes procesos virales, donde interacciona con proteínas y RNA virales.
- Se desconoce si la interacción de proteínas virales afecta las actividades enzimáticas de la FBL.
- Las proteínas virales con interacción a la FBL tienen características en común como poseer IDRs. Estas regiones IDRs pueden ser fundamentales para dicha interacción.
- El dominio GAR de la FBL es el dominio de interacción de proteínas virales y, a su vez, es donde reside la actividad de ribonucleasa.

JUSTIFICACIÓN

El nucléolo es un dominio nuclear multifuncional, principalmente dedicado a la biogénesis ribosomal. Ciertos virus han desarrollado estrategias para manipular proteínas nucleolares para facilitar su propia replicación. Esta asociación interfiere con los procesos nucleolares, resultando en la sobreactivación o inhibición de la biogénesis ribosomal. Diversos virus de mamíferos y plantas, principalmente con genomas de RNA, dependen de fibrilarina, una proteína metiltransferasa, clave en el procesamiento del rRNA. El papel de fibrilarina en virus de plantas se ha encontrado en el movimiento sistémico y célula a célula mediante la formación de complejos ribonucleoproteicos virales. Recientemente, se encontró que su dominio rico en glicinas y argininas (GAR), posee actividad de ribonucleasa, el cual es el sitio de unión de proteínas virales. Debido a que fibrilarina forma complejos con genomas de RNA virales, mediante la interacción con proteínas virales a través del dominio GAR es posible que su actividad de ribonucleasa sea afectada. Por esto, es necesario estudiar el efecto que tienen dichos componentes virales sobre su actividad de ribonucleasa.

HIPÓTESIS

La proteína viral TGB1 del virus del mosaico estriado de la cebada al igual que el RNA viral de Papaya meleira virus México modulan negativamente la actividad de ribonucleasa de la fibrilarina.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si TGB1 del virus del mosaico estriado de la cebada y el RNA viral de Papaya meleira virus México modulan negativamente la actividad de ribonucleasa de la fibrilarina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Mapear el sitio de unión de TGB1 del virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV) con la fibrilarina.
2. Determinar el efecto de TGB1 de BSMV sobre la actividad de ribonucleasa de la fibrilarina.
3. Determinar si el RNA viral de Papaya meleira virus México (PMeV-Mx) es sustrato de la actividad de ribonucleasa de la fibrilarina.
4. Determinar el efecto del RNA viral de PMeV-Mx sobre la actividad de ribonucleasa de la fibrilarina.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se muestra en la Figura 4 y en breve consiste en la expresión y purificación de las proteínas recombinantes; HsFib1 y AtFib2, así como de TGB1 de BSMV y sus diferentes dominios para realizar de manera *in vitro* lo siguiente. (1) El mapeo del sitio de interacción de TGB1 de BSMV con la FBL, mediante mutantes con los diferentes dominios y su IDR de la proteína viral. (2) Los ensayos de ribonucleasa de la FBL en presencia de TGB1 de BSMV y (3) el RNA viral de Papaya meleira virus México (PMeV-Mx).

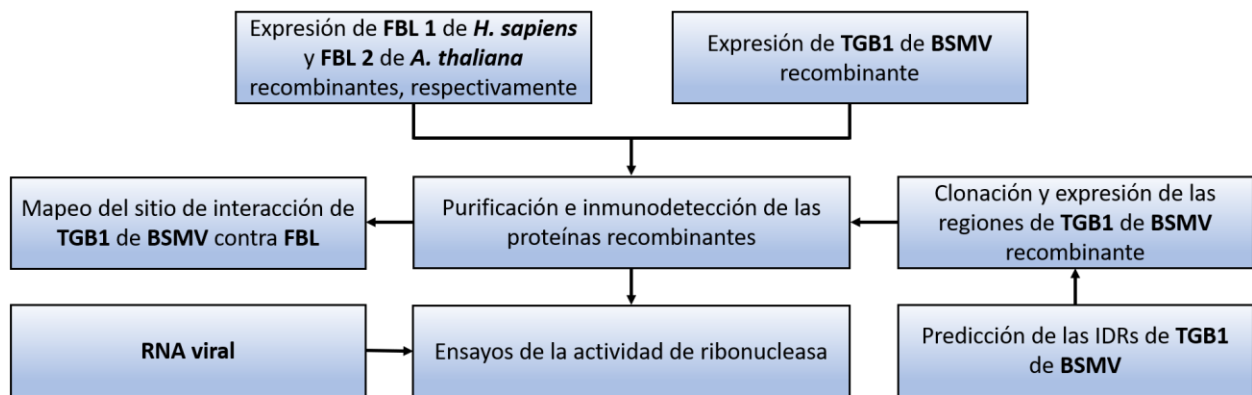


Figura 4 Estrategia experimental.

CAPÍTULO II MAPEO DEL SITIO DE INTERACCIÓN DE TGB1 CON la FBL

CAPÍTULO II MAPEO DEL SITIO DE INTERACCIÓN DE TGB1 CON la FBL

INTRODUCCIÓN

Las interacciones proteína-proteína son críticas para la mayoría de los procesos biológicos. Localizar los sitios de interacción puede brindar información valiosa, como determinar el tipo de unión entre las proteínas, así como blancos farmacológicos potencialmente importantes.

La FBL es requerida por importantes virus de plantas como RSV (Zheng *et al.*, 2015), PVA (Rajamäki y Valkonen, 2009) y BSMV (Li *et al.*, 2018), entre otros, así como con virus de mamíferos, como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Ponti *et al.*, 2008), influenza A H3N2 (Melén *et al.*, 2012) y Epstein-Barr virus (EBV) (Hutzinger *et al.*, 2009), por nombrar algunos. La secuencia de la FBL en eucariotas está altamente conservada, por tanto, es factible que HsFib pueda interactuar con alguna proteína de virus de plantas. De ser así, el diseño de estrategias anti-virales enfocadas en la FBL podría ser aplicables para virus de plantas como de mamíferos (para aquellos reportados con interacción a la FBL).

Por otro lado, las IDRs presentes en el dominio N-terminal de las proteínas virales con unión a la FBL, tienden a ser los sitios de unión (Decle-Carrasco *et al.*, 2021). El dominio N-terminal de TGB1 de Poa semilatifolia virus (PSLV) es desordenado y es el que interactúa con el dominio GAR de la FBL (Semashko *et al.*, 2012). BSMV TGB1 también interactúa con el dominio GAR de NbFib2, sin embargo, el sitio de interacción de la proteína viral no ha sido identificada (Li *et al.*, 2018). Aquí se pretende localizar el sitio de interacción de BSMV TGB1 contra HsFib y AtFib2, con el fin de explorar si las IDRs de las proteínas virales son fundamentales para la unión con la FBL y entender el tipo de unión que se da en la interacción.

MATERIALES Y METODOS

2.1 Predicción de IDRs de TGB1 de BSMV

Se realizó la predicción de IDRs en TGB1 de BSMV. Se seleccionó la herramienta IUPred2a (Mészáros *et al.*, 2018) para identificar regiones desordenadas dentro de la secuencia aminoacídica de TGB1 de BSMV (AAA79153.1). El modelo de IUPred2a está diseñado para

CAPÍTULO II MAPEO DEL SITIO DE INTERACCIÓN DE TGB1 CON la FBL

estimar la energía por-pares de la composición aminoacídica de las proteínas. Los puntajes mayores a 0.5, se consideran desordenados.

2.2 Plásmidos y cepas

El gen de TGB1 de BSMV (ND18) fue donado por el Dr. Dawei Li, de *China Agricultural University*. Se diseñaron oligonucleótidos con los sitios NdeI (sentido) y XhoI (antisentido) para amplificar el dominio N-terminal (nt 1-714), C-terminal (nt 750-1522) y la IDR del dominio N-terminal (nt 1-285) de TGB1 (ND18) y el gen completo (nt 1-1522). La amplificación se realizó con el Master Mix PCR de Thermo Scientific™ (número de catalogo: K0171). Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento entre 61°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos de extensión. Los amplicones de TGB1 (1586 pb), NTD (714 pb) CTD (786 pb) e IDR (285 pb) fueron recuperadas y purificadas con el paquete comercial “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega. El DNA purificado de cada dominio fue clonado individualmente en pGEM-T Easy y transformados por separado en *E. coli* cepa DH5α. Se picaron colonias y se agitaron a 150 rpm en medio LB a 37°C toda la noche. Seguido, se extrajo DNA de plásmido (pDNA) de los cultivos bacterianos, con el paquete comercial “QIAprep Spin Miniprep Kit” de QIAGEN. Se utilizaron las enzimas comerciales de rápida digestión NdeI y XhoI de Thermo Scientific para liberar el inserto. Seguido, se realizó la ligación de cada región de TGB1 de BSMV en el vector pET15b, mediante la T4 DNA ligasa de Thermo Scientific. Los productos de ligación fueron transformados en *E. coli* cepa DH5α. Se picaron colonias y se incubaron en medio LB a 37°C a 150 rpm, durante toda la noche. Finalmente, se extrajo pDNA de cada cultivo bacteriano y se analizaron las construcciones con XhoI y NdeI. De igual forma se transformó en *E. coli* cepa BL21 (DE3) y se corroboró mediante XhoI y NdeI.

HsFib fue clonada en los vectores de expresión pET42b y pET15b fusionándola con las etiquetas de glutatión S transferasa y 6 histidinas (GST:HsFib:6His) y a una etiqueta de 6 histidinas (6His:HsFib) con una masa aproximada de ~71 kDa y ~38 kDa; respectivamente. Los plásmidos fueron transformados en *E. coli* cepa BL21 (DE3) por choque térmico.

Igualmente se transformó pET42b:AtFib2:6His y pET42b:DelGAR:6His en *E. coli* cepa BL21 (DE3) por choque térmico.

CAPÍTULO II MAPEO DEL SITIO DE INTERACCIÓN DE TGB1 CON la FBL

2.3 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Se indujo la expresión de 6His:HsFib, 6His:TGB1, 6His:TGB1_NTD, 6His:TGB1_CTD y 6His:TGB1_IDR en *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) con 1mM de isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) a una densidad óptica (DO) entre 0.5-0.8 unidades de absorbancia; a una temperatura de 25°C y 200 rpm durante 4h. Posterior a la inducción, las células se bajaron por centrifugación a 12 000 g por 20 min, re-suspendiéndolas en amortiguador de extracción (300 mM de NaCl, 25 mM de Tris-HCl pH 8, 10% de glicerol, 20 mM de imidazol, 0.1% de tritón X-100, 10 µM de leupeptina, 10 µM de pepstatina, 1 mM de BME y 1mM de PMSF); para ser lisadas por sonicación.

Las células lisadas se sometieron a centrifugación a 14 000 g por 15 min a 4°C, y el sobrenadante (fracción soluble del extracto) fue sometido a purificación por afinidad a resina de níquel agarosa Ni-NTA (Qiagen). Se lavó la columna con el amortiguador de extracción, para descartar las proteínas nativas de *E. coli*. Las proteínas recombinantes fusionadas con 6His fueron eluidas de la resina de níquel con amortiguador de elución (200 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 8, 100/250/500 mM de imidazol, 0.1% de tritón X-100, 10 µM de Leupeptina, 10 µM de Pepstatina, 1 mM de BME y 1mM de PMSF).

Por otro lado, se indujo la expresión de GST:HsFib:6His, GST:AtFib2:6His y GST:DeIGAR:6His en *E. coli* cepa BL21 (DE3), con base a la metodología ya descrita. Posteriormente, se recolectaron las células por centrifugación y se resuspendieron en amortiguador de extracción (300 mM de NaCl, 50 mM Tris- HCl pH 8, 15 mM de DTT, 0.1% tritón X-100, 10 µM de Leupeptina, 10 µM de Pepstatina, 1 mM de BME y 1mM de PMSF) y finalmente fueron lisadas por sonicación.

Seguido, las células lisadas se centrifugaron y el sobrenadante (fracción soluble del extracto) fue sometido a purificación por afinidad a resina de glutatión sefarosa 4B (GE Healthcare). Se lavó la columna con el amortiguador de extracción, para descartar las proteínas nativas de *E. coli*. Las proteínas recombinantes fusionadas con GST fueron eluidas de la resina con glutatión, utilizando el amortiguador de extracción complementado con 20 mM de glutatión reducido.

Todas las fracciones fueron almacenadas a -80°C.

CAPÍTULO II MAPEO DEL SITIO DE INTERACCIÓN DE TGB1 CON la FBL

2.4 Western blot

Las eluciones de 6His:TGB1, 6His:TGB1_NTD, 6His:TGB1_CTD y 6His:TGB1_IDR fueron cargados en un gel de SDS-PAGE, para ser transferidos a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y bloqueada con 3% de leche en polvo en TSB-T (20 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 0.1% de Tween 20, pH 7.5) a temperatura ambiente por 1 hora. La membrana fue incubada con el anticuerpo monoclonal de conejo (dilución 1:3000), anti-Histidinas (Abcam™, ab18184) en roller durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG (dilución 1:3000) acoplado a peroxidasa de Amersham durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de tres lavados de 10 min cada uno con TBS-T. La detección se realizó mediante el paquete de ECL Western Blotting Analysing System de Amersham.

2.5 Mapeo del sitio de interacción de TGB1 con la FBL mediante Far Western

Se cargó en un gel de SDS-PAGE al 15% las eluciones de 6His:TGB1, 6His:TGB1_NTD, 6His:TGB1_CTD y 6His:TGB1_IDR. Finalizada la corrida, el gel se lavó con amortiguador de transferencia (25 mM de Tris, 190 mM de Glicina, 20% de Metanol, pH 8.3) durante 10 min. En paralelo, se activó la PVDF con metanol por 30 seg. Posteriormente, se transfirió en húmedo durante 1 h a 100 V. Se verificó la transferencia de las proteínas a la membrana, tiñendo con Rojo de Ponceau. Seguido, se retiró la tinción de la membrana con agua destilada y se bloqueó con TSB-T (20 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 0.1% de Tween 20, pH 7.5) con 5% de leche en polvo y se incubó en roller durante 1 hora a 25°C. Se descartó el amortiguador de la membrana y se agregó una elución de 6His:HsFib con 3% de leche y TSB-T. Se incubó toda la noche en roller a 4°C. Al día siguiente, se descartó el amortiguador y se agregó el anticuerpo monoclonal anti-HsFib de conejo (1:2000) con 3% de leche en TSB-T. Se incubó toda la noche en roller a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, se descartó el amortiguador con el anticuerpo primario y se incubó con anti-conejo 1:3000 acoplado a peroxidasa de Amersham. Finalmente, se lavó 3 veces por 5 min cada uno con TBS-T. La detección se realizó mediante el paquete de ECL Western Blotting Analysing System de Amersham.

RESULTADOS

2.6 Predicción de IDRs de TGB1

El servidor de IUPred2 identificó una IDR en el dominio N-terminal de TGB1 del aminoácido 1 al 160 (Figura 5). Puntuaciones mayores a 0.5 se predicen ser desordenados.

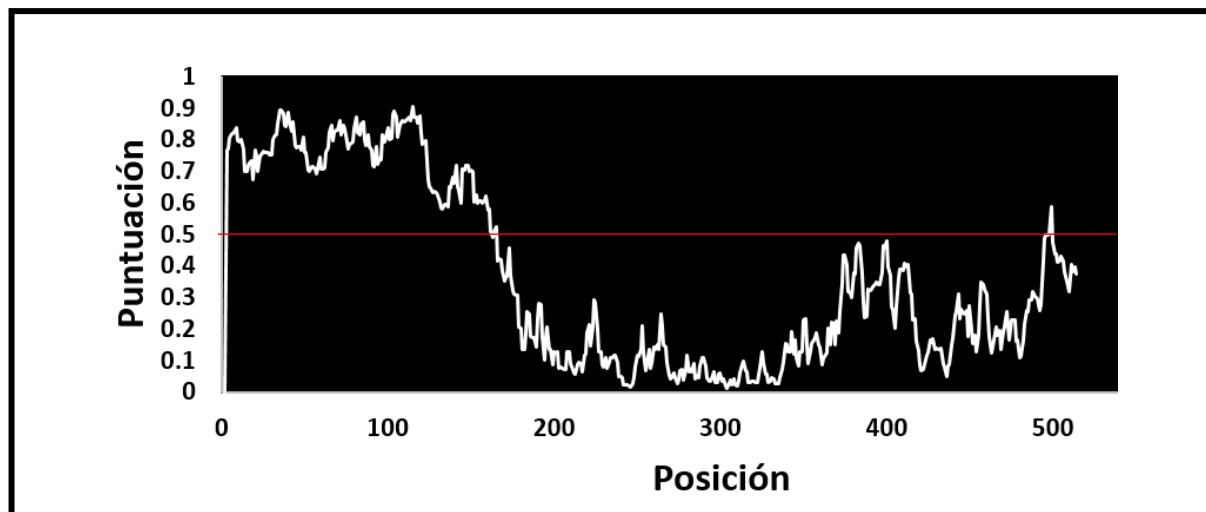


Figura 5 Predicción de IDRs de TGB1 con el servidor IUPred2A. Puntuaciones mayores a 0.5 se predicen ser desordenados.

2.7 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de las regiones de TGB1 de BSMV

Se diseñaron oligos para amplificar el dominio N-terminal (nt 1-714), C-terminal (nt 750-1522) y la IDR del dominio N-terminal (nt 1-285) de TGB1 (ND18), representados de manera esquemática en la Figura 6. Se agregaron los sitios de restricción NdeI y XhoI para los oligonucleótidos sentido y antisentido, respectivamente, para su clonación en el vector de expresión, pET15b (Tabla 1).

CAPÍTULO II MAPEO DEL SITIO DE INTERACCIÓN DE TGB1 CON la FBL

Tabla 1 Oligonucleótidos utilizados para la generación de mutantes de *TGB1*

Oligonucleótidos	Secuencia del oligonucleótido (5'-3') ^a	Posición y descripción ^b	Objetivo
NTD-TGB1-F	CATATGG ACATGACGAAAAC	<i>TGB1</i> nt 1-17	pET15b-NTD-TGB1
NTD-TGB1-R	CTCGAG AGTAACTTACGCTT	<i>TGB1</i> nt 714-700	
CTD-TGB1-F	CATATGC ATCTCTGGAGTTC	<i>TGB1</i> nt 750-764	pET15b-CTD-TGB1
CTD-TGB1-R	CTCGAG TTATTTGGCCTTGA	<i>TGB1</i> nt 1536-1522	
IDR ₉₅ -TGB1-R	CTCGAG CTTAACGTTGGGTT	<i>TGB1</i> nt 285-271	pET15b-IDR ₁₋₉₅ -TGB1

a: Las letras en negritas indican los sitios de restricción.

b: Los números corresponden a las posiciones de los nucleótidos blancos del gen.

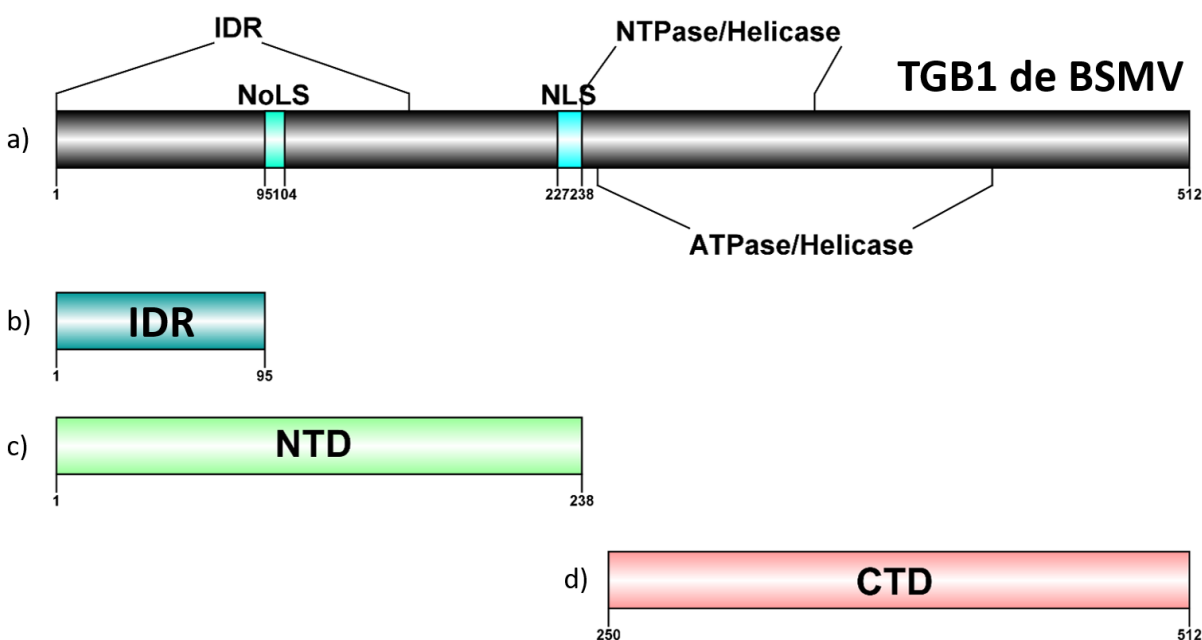


Figura 6 Esquema de las regiones de *TGB1* de BSMV. a) Descripción gráfica de la secuencia codificante de *TGB1* de BSMV (1-512 aa). b) Región desordenada de *TGB1* de BSMV; IDR (1-95 aa). c) Dominio N-terminal de *TGB1* de BSMV; NTD (1-238 aa). d) Dominio C-terminal de *TGB1* de BSMV; CTD (250-512 aa).

2.8 Clonación de las regiones de *TGB1* de BSMV en pET15b

Con el fin de clonar las regiones de *TGB1* de BSMV en el vector de expresión pET15b; se aislaron las regiones y la secuencia completa de *TGB1* por PCR para ser clonadas en pGEM-T Easy y finalmente subclonadas en pET15b (Figura 7a). Por tanto, las regiones de *TGB1* de BSMV y el gen completo fueron amplificados por PCR punto final (Figura 7b) para ser clonados en pGEM-T Easy (Figura 7c) y pET15b (Figura 7d). Las construcciones fueron digeridas con NdeI y XhoI, liberando bandas con longitudes aproximadas a los dominios y gen completo de *TGB1* de BSMV: *TGB1* (1586 pb), *NTD* (714 pb) *CTD* (786 pb) e *IDR* (285 pb).

CAPÍTULO II MAPEO DEL SITIO DE INTERACCIÓN DE TGB1 CON la FBL

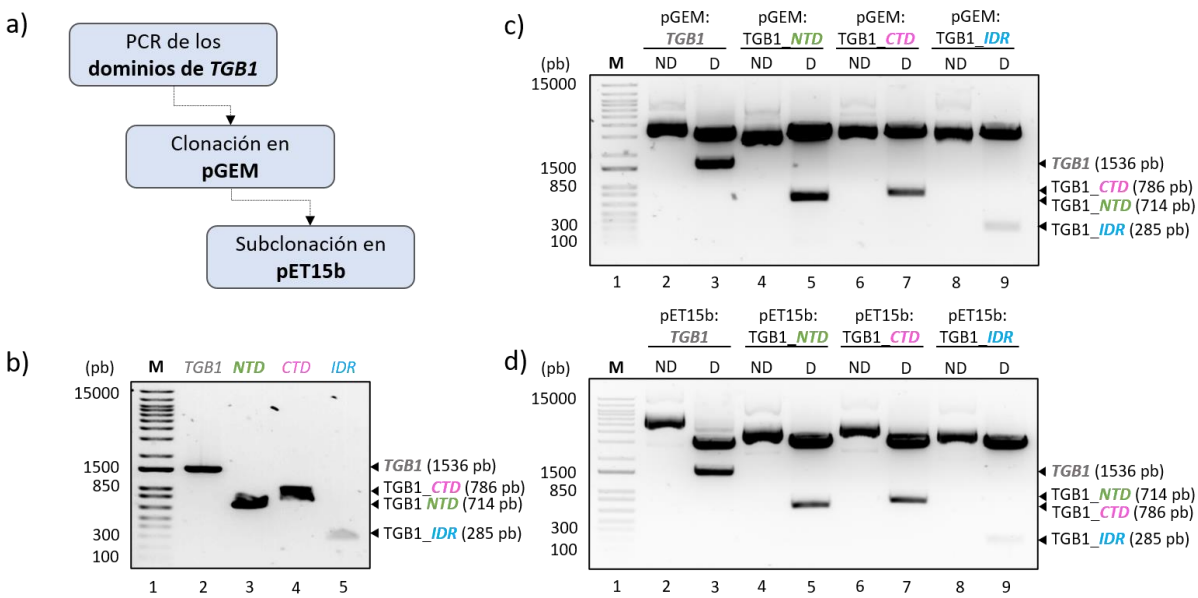


Figura 7 Clonación de las regiones de *TGB1* de BSMV en un vector de expresión bacteriano. a) Esquema de la estrategia de clonación de las regiones de *TGB1* y el gen completo. b) PCR punto final de las regiones de *TGB1* de BSMV. Análisis con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* sobre la clonación de las regiones de *TGB1* de BSMV en pGEM-T Easy (c) y pET15b (d). Las cabezas de flechas indican las bandas de interés. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe. M: Marcador de masa molecular; pb: pares de bases; ND: no digerido; D: digerido

2.9 Expresión y purificación de TGB1 de BSMV y sus regiones

Las construcciones de pET15b:TGB1 y sus regiones (pET15b:ΔTGB1) fueron transformados en BL21 DE3. La expresión y purificación de las proteínas recombinantes se llevaron a cabo a como se describe en la metodología.

Mediante eluciones con gradiente de imidazol de 100, 250 y 500 mM, se descartaron bandas contaminantes, de tal manera que en las eluciones finales se pueden observar bandas con masas aproximadas a las esperadas en la Figura 8: (a) 6His:TGB1 (69 kDa); (b) 6His:TGB1_NTD (32 kDa); (c) 6His:TGB1_CTD (35 kDa) y (d) 6His:TGB1_IDR (12.8 kDa).

CAPÍTULO II MAPEO DEL SITIO DE INTERACCIÓN DE TGB1 CON la FBL

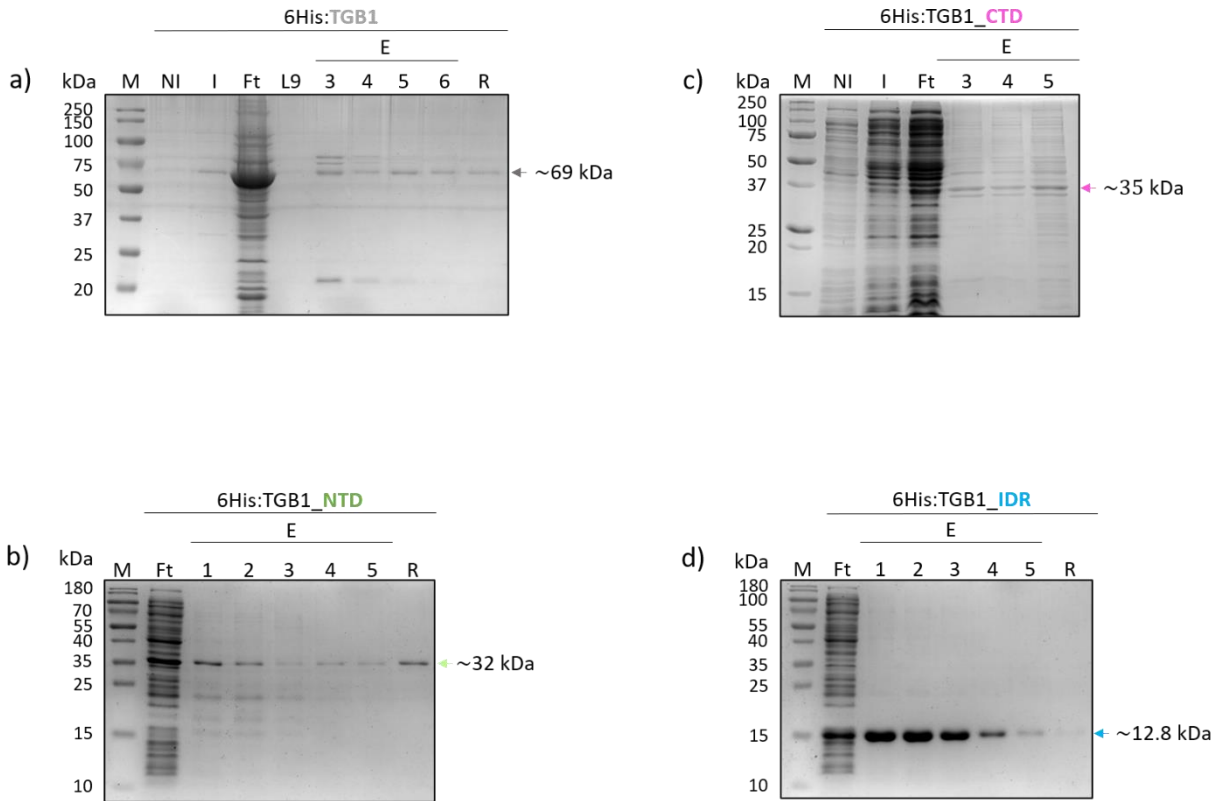


Figura 8 Purificación de 6His:TGB1 y 6His: Δ TGB1. Purificación mediante columna de níquel de a) 6His:TGB1 (69 kDa); b) 6His:TGB1_NTD (32 kDa); c) 6His:TGB1_CTD (35 kDa) y d) 6His:TGB1_IDR (12.8 kDa). Las flechas indican aquellas bandas con masas aproximadas a las esperadas. Los geles de SDS-PAGE son al 15% (a-c) y 12% (d). Fueron teñidos con Coomassie Blue. M: marcador de masa molecular; NI: No inducido; I: Inducido; Ft: Flujo a través de la columna; L: Lavado; E: Elución; R: Resina.

Posteriormente, se realizó WB a las eluciones finales de TGB1 y sus regiones, con el anticuerpo monoclonal contra 6x-His (HIS.H8) de ThermoFisher. En la Figura 9 se observan las señales a las alturas correspondientes de las proteínas recombinantes: 6His:TGB1 (69 kDa), 6His:TGB1_NTD (32 kDa), 6His:TGB1_CTD (35 kDa) y 6His:TGB1_IDR (12.8 kDa).

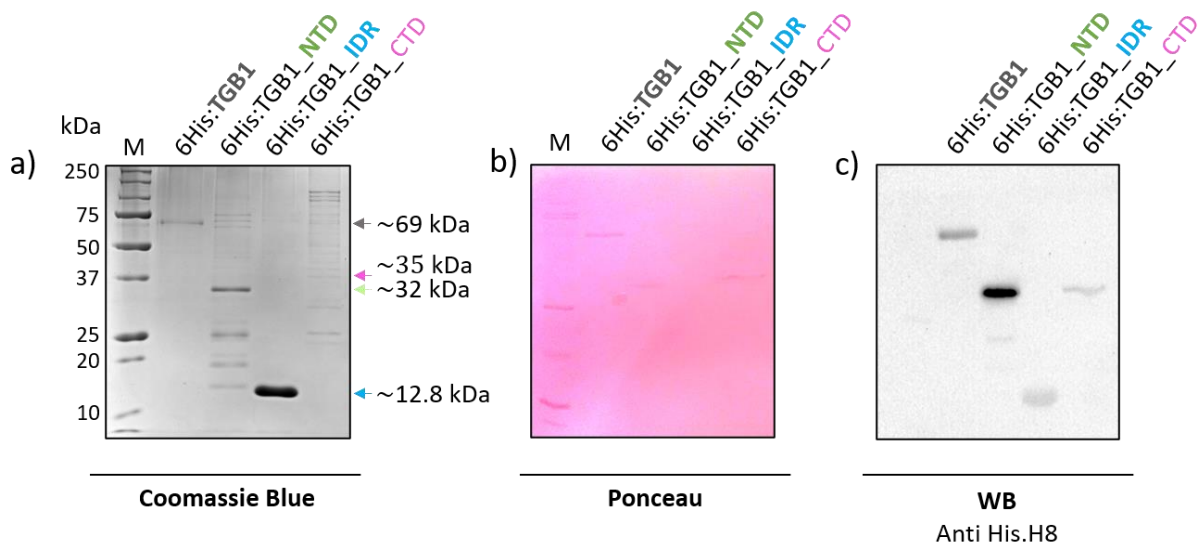


Figura 9 Inmunodetección de 6His:TGB1 y 6His:ΔTGB1. a) Se corrieron las eluciones finales de la purificación de 6His:TGB1 y 6His:ΔTGB1 en gel de SDS-PAGE al 15% y se tiñó con Coomassie Blue. Se realizó un duplicado del gel a) y se transfirió en PVDF y se tiñó con Rojo de Ponceau b). c) Western blot con anti Histidinas (*His.H8*) de 6His:TGB1 y 6His:ΔTGB1. Las flechas indican aquellas bandas con masas aproximadas a las esperadas. El marcador de proteínas es de Bio-rad (no. de catalogo: 1610317). WB: Western Blot; M: marcador de proteínas.

2.10 Expresión y purificación de HsFib, AtFib y DelGAR

La expresión y purificación de HsFib, AtFib y DelGAR fue llevado a cabo según lo descrito en la metodología. En las eluciones de GST:HsFib:6His (Figura 10a), GST:DelGAR:6His (Figura 10b) y GST:AtFib2:6His (Figura 10d), se pueden observar bandas contaminantes con masas alrededor de los 25 a 37 kDa, que probablemente sean en parte la etiqueta de GST “libre” (26 kDa) y/o productos de la degradación de las proteínas recombinantes. Sin embargo, en cada elusión se observan bandas con masas aproximadas a las correspondientes con GST:HsFib:6His, GST:DelGAR:6His y GST:AtFib2:6His de 71 kDa, 39 kDa y 71 kDa, respectivamente. Por otra parte, la expresión y purificación de 6His:HsFib de igual manera, persistieron bandas contaminantes de distintas masas moleculares, sin embargo, en la última elusión sobre la resina (R) se obtuvo la banda con una masa esperada a los 38 kDa, más pura con respecto a las eluciones previas (Figura 10c).

CAPÍTULO II MAPEO DEL SITIO DE INTERACCIÓN DE TGB1 CON la FBL

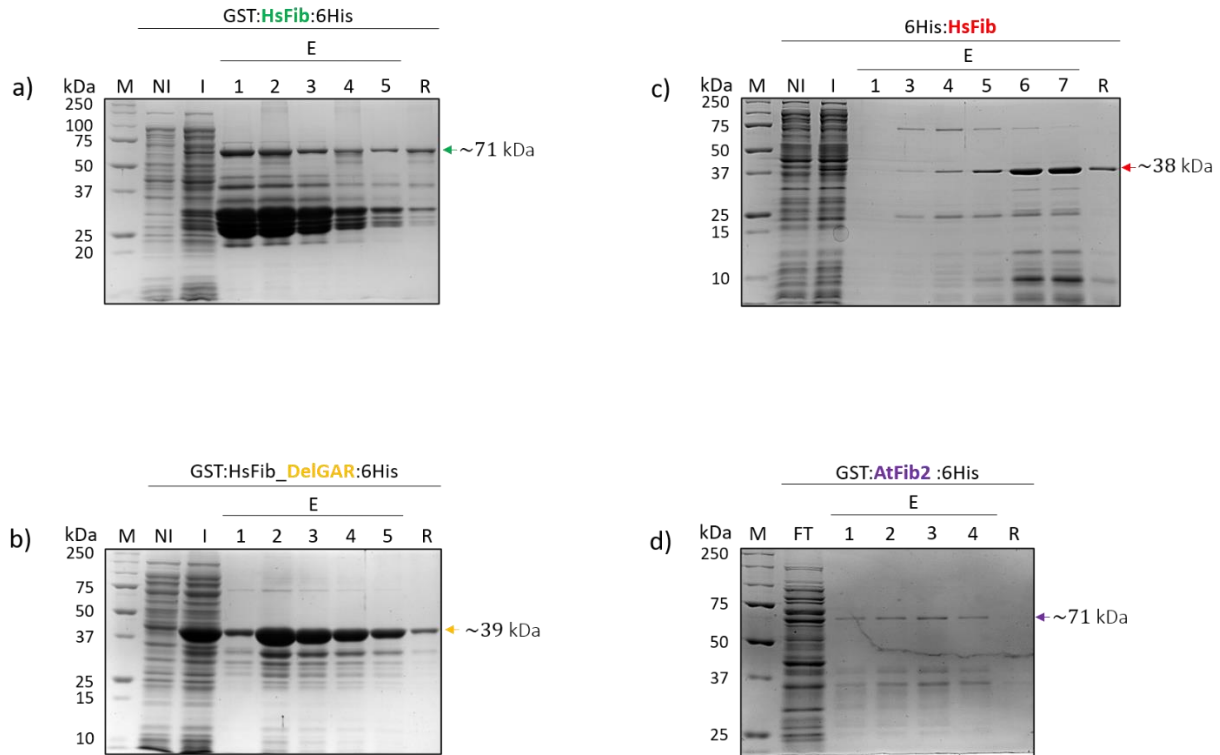


Figura 10 Purificación de GST:HsFib:6His GST:DelGAR:6His GST:AtFib2:6His y 6His:HsFib. Se purificó mediante columnas de glutatión las proteínas recombinantes a) GST:HsFib:6His b) GST:DelGAR:6His y d) GST:AtFib2:6His. Por otro lado, c) la purificación de 6His:HsFib se realizó con columna de níquel. Las bandas con masas aproximadas a las esperadas son señaladas con una flecha. Los geles de SDS-PAGE son al 15% (a-c) y 12% (d). Fueron teñidos con Coomassie Blue. El marcador de proteínas es de Bio-rad (no. de catalogo: 1610317). M: marcador de masa molecular; NI: No inducido; I: Inducido; Ft: Flujo a través de la columna; E: Elución; R: Resina.

2.11 Mapeo del sitio de unión de TGB1 a HsFib

El sitio de unión de NbFib2 con TGB1 de BSMV es el dominio GAR (Li *et al.*, 2018) sin embargo, no se ha elucidado la región de interacción de la proteína viral. Por tanto, utilizando las mutantes de TGB1 y HsFib recombinantes, se realizó Far western (FW) para determinar el sitio de unión.

2.12 Análisis de la región de interacción de TGB1 con HsFib mediante Far Western

Primeramente, se corrieron las eluciones de las mutantes de TGB1 por duplicado (en dos geles de SDS-PAGE) con el fin de visualizar las bandas de las mutantes teñidas en Coomassie y el

CAPÍTULO II MAPEO DEL SITIO DE INTERACCIÓN DE TGB1 CON la FBL

segundo gel para el experimento. La estrategia fue realizar la inmunodetección de las mutantes contra anti-6His y posteriormente el FW. De tal manera, el segundo gel fue transferido y procesado como se indica en la metodología. Una vez transferido y teñido con rojo de Ponceau, se bloqueó y se incubó con anti-His (His.H8). El anticuerpo sólo reconoció la proteína completa (6His:TGB1) y el dominio N-terminal de TGB1; 6His:TGB1_NTD (Figura 11c). No obstante, se prosiguió con el FW con el fin de estudiar al menos la interacción de estas dos bandas contra HsFib, en caso de que las demás regiones no se hayan transferido o fijado eficientemente a la membrana. Posterior a la inmunodetección se lavó y se volvió a bloquear para ser incubado con la elución 6 de 6His:HsFib y finalmente contra anti-HsFib. El FW fue únicamente positivo contra 6His:TGB1. Tomando en consideración los resultados obtenidos, se puede concluir que incluso la FBL de humanos puede interactuar con una proteína de virus de plantas, que era de esperarse dado a la alta conservación de la secuencia en las FBLs de eucariotas. Es significativo, ya que los estudios anti-virales enfocados a la FBL podrían ser eficientes tanto para virus de plantas como de mamíferos. Sin embargo, se realizó una segunda prueba donde previo al FW, se inmunodetecten todas las regiones de TGB1 de BSMV.

CAPÍTULO II MAPEO DEL SITIO DE INTERACCIÓN DE TGB1 CON la FBL

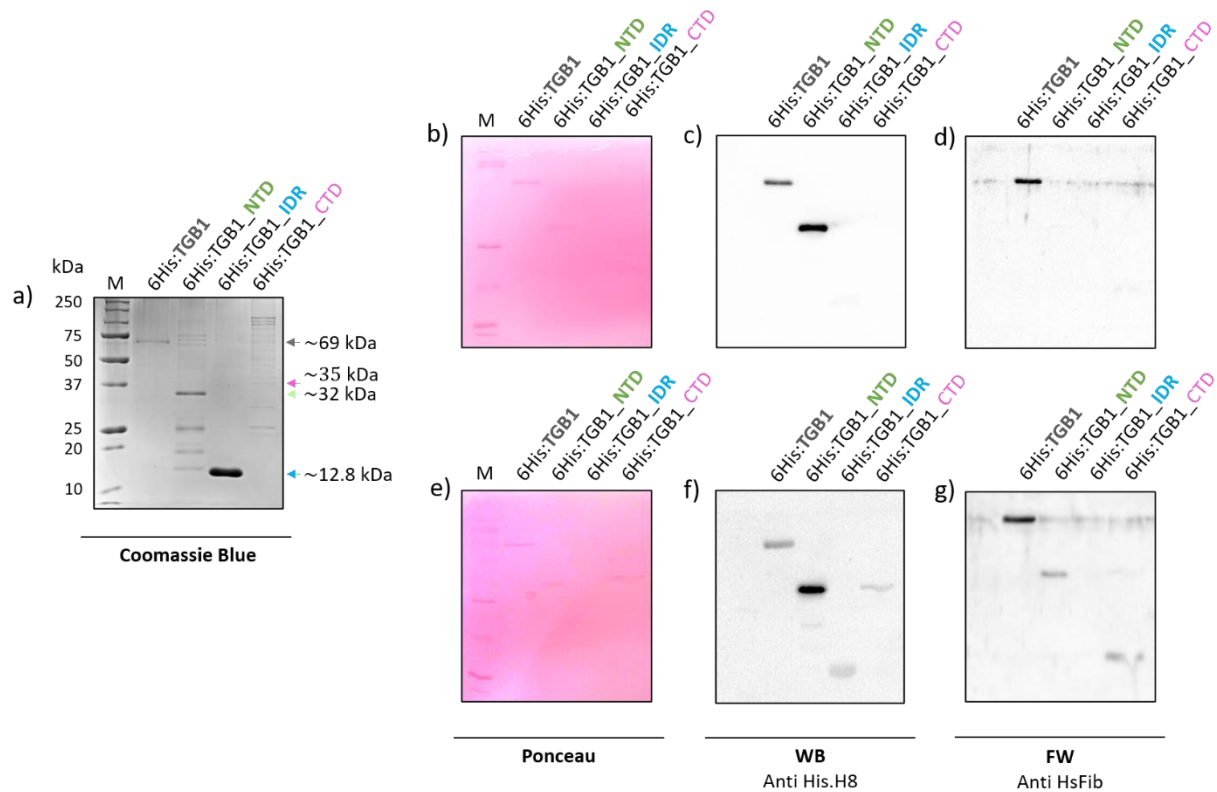


Figura 11 Mapeo del sitio de interacción de 6His:TGB1 con 6His:HsFib mediante Far Western. a) Electroforesis de de 6His:TGB1 y 6His: Δ TGB1. El gel de SDS-PAGE fue al 15% y teñido con Commassie blue. b-d) Primer ensayo de Far Western. b) evidencia de la transferencia de 6His:TGB1 y 6His: Δ TGB1 teñidos con rojo de Ponceau. c) Western blot con anti-6His y d) far western con anti-HsFib. e-g) Segundo ensayo de Far Western. e) evidencia de la transferencia de 6His:TGB1 y 6His: Δ TGB1 teñidos con rojo de Ponceau. f) Western blot con anti-6His y g) far western con anti-HsFib. El marcador de proteínas es de Bio-rad (no. de catalogo: 1610317). M: Marcador de masa molecular; WB: Western Blot y FW: Far Western.

Esta segunda vez (Figura 11 e-g), el WB contra anti-6His reconoció todas las mutantes y proteína completa de TGB1 fusionadas a 6His (Figura 11f). Posteriormente, siguiendo la misma metodología para el FW, 6His:HsFib reconoció la proteína completa y esta vez el dominio N-terminal de TGB1 (Figura 11g). La secuencia de TGB1_IDR (aa 1-95) forma parte de TGB1_NTD (aa 1-238), que sí mostró una interacción con 6His:HsFib, por lo que se esperaría que también interaccione. Esto podría explicarse con alguno de los tres escenarios: (1) 6His:TGB1_IDR fue lavado de la membrana en algunos de los pasos previos, a tal grado que no pudo ser reconocido por 6His:HsFib; (2) la región de unión de TGB1 a HsFib contempla la secuencia de TGB1_IDR

CAPÍTULO II MAPEO DEL SITIO DE INTERACCIÓN DE TGB1 CON la FBL

(aa 1-95) pero es más extensa (hasta el límite 3' de TGB1_NTD) (3) la región de unión contempla la secuencia de TGB1_NTD pero sin la de TGB1_IDR (del aa 95-238).

DISCUSIÓN

Las proteínas virales tienden a interactuar con el dominio GAR de la FBL (Sang *et al.*, 2007a; Semashko *et al.*, 2012; Yoo *et al.*, 2003; L. Zheng *et al.*, 2015), sin embargo, la región de interacción de las proteínas virales ha sido determinado sólo para algunas cuantas (Melén *et al.*, 2007; Semashko *et al.*, 2012; Yoo *et al.*, 2003). En este trabajo se encontró mediante FW que, el dominio N-terminal de TGB1 de BSMV es el sitio de interacción con HsFib. Dicho resultado era de esperarse ya que este es el caso de PSLV TGB1 (Semashko *et al.*, 2012), la cual comparte una alta identidad en sus secuencias. Además, la interacción entre el dominio N-terminal de BSMV TGB1 (carga negativa) y el dominio GAR de HsFib (carga positiva) podría ser debida a una interacción electroestática.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, el sitio de interacción de TGB1 de BSMV con fibrilarina, se encuentra en el dominio N-terminal. Con este resultado, se puede establecer que la interacción sucede a partir del dominio N-terminal de TGB1 de BSMV y el dominio GAR fibrilarina. Con esto, se cumple el primer objetivo específico.

CAPÍTULO III ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA EN PRESENCIA DE TGB1

CAPÍTULO III ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA EN PRESENCIA DE TGB1

INTRODUCCIÓN

La FBL 2 de *A. thaliana* y 1 de *H. sapiens* tienen actividad de ribonucleasa, a diferencia de AtFib1 y HsFib2 (Rodríguez-Corona *et al.*, 2017; Guillen-Chable *et al.*, 2020). El dominio GAR de ambas FBLs, es el dominio catalítico de dicha actividad enzimática que se ve afectada por algunos fosfoinosítidos y PA. La actividad de ribonucleasa de ambas FBLs, es afectada por PA y su interacción libera la interacción de la FBL con U3. Siendo U3, el snoRNA más abundante y que forma un complejo con la FBL, no guía metilaciones, sino, escisiones sobre el pre-rRNA (Granneman *et al.*, 2004). Por tanto, se hipotetiza que, durante mitosis, las interacciones entre PA y la FBL, deben prevenir la degradación no-específica del RNA e inducir la formación de un complejo diferente a FBL-U3. La actividad de ribonucleasa de la FBL debe ser dirigida por algún RNA guía, como U3, sin embargo, en los ensayos *in vitro* donde se adicionó U3, la FBL no degradó el rRNA (Guillen-Chable *et al.*, 2020). El rRNA adicionado como sustrato, es un rRNA maduro, que no tiene los espacios de transcripción internos y externos, donde U3 guía cortes en al menos tres sitios diferentes (Kass *et al.*, 1990). Esta debe ser la razón del porqué la FBL no es capaz de degradar el rRNA maduro cuando U3 está presente, además de reforzar la idea de que U3, guía la actividad de ribonucleasa de la FBL.

El dominio GAR de la FBL es el sitio de interacción de algunas proteínas virales (Decle-Carrasco *et al.*, 2021), entre ellas TGB1 (Li *et al.*, 2018). TGB1 secuestra a NbFib2 y lo exporta al citoplasma donde participa en el transporte célula a célula formando un complejo RNP con el genoma de BSMV. Aunque TGB1 relocalice a la FBL, por un periodo de tiempo, este colocaliza con la FBL en el nucleolo y el efecto de esa interacción en el núcleo no ha sido explorado. Particularmente, al interaccionar la proteína viral con el dominio GAR podría afectar su actividad catalítica. Por tanto, aquí se estudió la actividad de ribonucleasa tanto de HsFib1 y AtFib2 en presencia de TGB1.

CAPÍTULO III ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA EN PRESENCIA DE TGB1

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Plásmidos y cepas

Para los ensayos de la actividad de ribonucleasa, se utilizaron las fracciones de elución de 6His:HsFib, GST:AtFib2:6His, GST:DelGAR:6His y 6His:TGB1, descritos en el Capítulo II.

3.2 Western blot

Las eluciones de 6His:TGB1 y 6His:HsFib, fueron cargados en un gel de SDS-PAGE (en geles independientes), para ser transferidos a una membrana de PVDF y bloqueada con 3% de leche en polvo en TSB-T (20 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 0.1% de Tween 20, pH 7.5) a temperatura ambiente por 1 hora. La membrana fue incubada con el anticuerpo monoclonal de conejo (dilución 1:3000), anti-Histidinas (His-H8 de AbcamTM, ab18184) en roller durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG (dilución 1:3000) acoplado a peroxidasa de Amersham durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de tres lavados de 10 min cada uno con TBS-T. La detección se realizó mediante el paquete

de ECL Western Blotting Analysing System de Amersham.

6His:HsFib también fue inmunodetectado con anti-HsFib de conejo (dilución 1:2000), siguiendo la misma metodología.

3.3 Material biológico

Como RNA blanco para evaluar la actividad de ribonucleasa de la FBL se utilizó RNA total de las hojas de *Brassica oleracea*. La extracción se realizó mediante el paquete comercial y protocolo de extracción TRIzol® Reagent (LifeTechnologies, cat. No. 15596026, Carlsbad, CA). Constituida por una solución monofásica de fenol, isotiocinato de guanidina y otros componentes (Chomczynski y Sacchi, 2006) . El principio consiste en la separación de fases por la adición de TRIzol® y cloroformo, donde el RNA se encontrará en la fase acuosa. El aislamiento del RNA se lleva a cabo por la adición de TRIzol® e isopropanol para la formación de una pastilla por centrifugación. La pastilla es lavada 3 veces con 1 mL de etanol al 75%. Finalmente, se resuspende la pastilla con agua libre de RNAasas. Las reacciones fueron cargadas en un gel de agarosa 1% teñido con SYBR SAFE para validar la integridad del RNA extraído y reservadas a -80°C para su posterior uso.

CAPÍTULO III ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA EN PRESENCIA DE TGB1

3.4 Actividad de ribonucleasa de la FBL

La actividad de ribonucleasa de HsFib y AtFib2 se ensayó mediante la mezcla con RNA total de *B. oleracea* con el amortiguador BC200 (20 mM de Tris-HCl pH 8, 200 mM de KCl, 0.2 mM de EDTA y 10 % de glicerol), incubando las reacciones a 37 °C por 30 min. Las reacciones fueron cargadas en un gel de 1% de agarosa teñido con SYBR SAFE y se corrieron en la cámara de electroforesis a 95V durante 30 min.

3.5 Estudio de la actividad de ribonucleasa de HsFib en interacción con TGB1 de BSMV

Previo a la incubación a 37 °C, se indujo la interacción de 6His:HsFib y 6His:TGB1 en ausencia de RNA total, incubando a temperatura ambiente durante 30 min. Seguido, se agregó el amortiguador BC200 y RNA total de *B. oleracea* a 37 °C por 30 min. Las reacciones fueron cargadas en un gel de 1% de agarosa teñido con SYBR SAFE y se corrieron en la cámara de electroforesis a 95V durante 30 min.

RESULTADOS

3.6 Ensayo de la actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib

Con el fin de evaluar la presencia de 6His:HsFib en las eluciones a utilizar para los ensayos de la actividad de ribonucleasa, se realizó WB (siguiendo lo descrito en la metodología) a las eluciones 3, 4 y 5 de su purificación con anti-6His (His.H8) de ThermoFisher y con anti-HsFib. Ambos anticuerpos reconocieron la misma banda de 38 kDa, aproximada a la masa de 6His:HsFib (Figura 12a).

Una vez que las eluciones de 6His:HsFib fueron corroboradas por WB, se ensayó la actividad de ribonucleasa de la proteína recombinante 6His:HsFib, utilizando como sustrato el RNA total de *B. oleracea* extraído (Figura 12b). Se incubó 1, 3 y 5 ng de 6His:HsFib con RNA total a 37°C durante 30 min. Los tres volúmenes ensayados degradaron las subunidades 28S y 18S en las condiciones descritas (Figura 12c). Se escogió 1 ng de 6His:HsFib para los siguientes experimentos ya que tuvo la mejor eficiencia en la actividad de ribonucleasa.

CAPÍTULO III ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA EN PRESENCIA DE TGB1

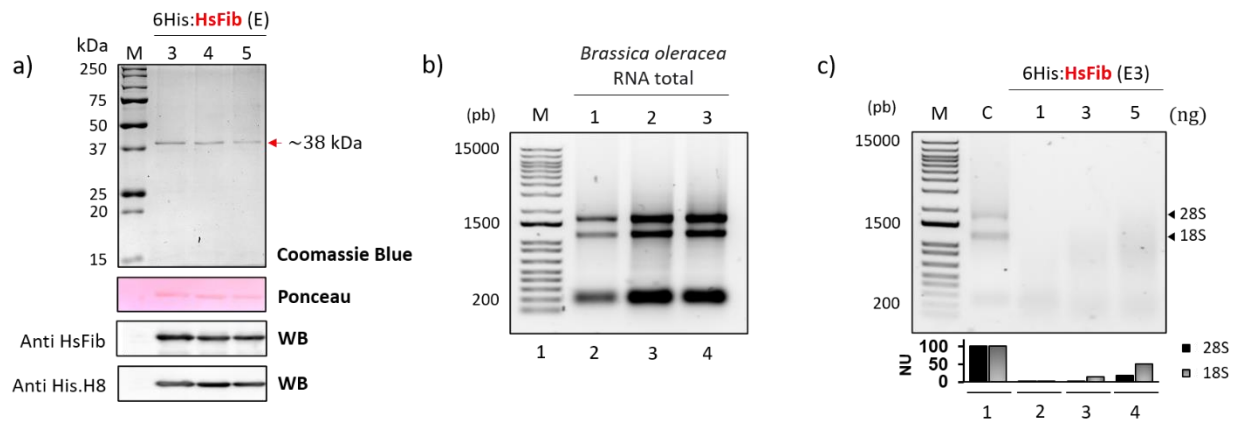


Figura 12 Inmunodetección de 6His:HsFib y ensayo de su actividad de ribonucleasa. a) Se inmunodetectó 6His:HsFib con anti-HsFib y anti-6His (His.H8). La flecha indica la banda con la masa correspondiente a la proteína recombinante. El gel de SDS-PAGE fue al 15%. b) Electroforesis de la extracción de 3 muestras independientes de RNA total de *B. oleracea*. c) Ensayo de la actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib, en concentración ascendente (1, 3 y 5 ng). En los carriles 2, 3 y 4 se observa el resultado de la degradación de las subunidades 28S y 18S, con respecto al carril 1, donde únicamente se cargó RNA total de *B. oleracea*. Cuantificación de las señales 28S y 18S mediante el programa ImageJ y representado en unidades normalizadas (NU). Los geles de agarosa al 1% fueron teñidos con SYBR Safe. El marcador de proteínas es de Bio-rad (no. de catalogo: 1610317). M: Marcador de masa molecular; E: Elución; C: Control; WB: Western blot; pb: pares de bases.

3.7 Ensayo de 6His:TGB1 en presencia de RNA total

Posteriormente, se determinó que la fracción de 6His:TGB1 purificada no degrade el RNA total de *B. oleracea*, con el objetivo de descartar un falso positivo al agregar la proteína viral recombinante en el ensayo de la actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib. Primeramente, se determinó la presencia de 6His:TGB1 en la elución 6 mediante WB con anti-6His (His.H8) (Figura 13a). Ya establecida la presencia de la proteína recombinante, se prosiguió con el ensayo. Con el fin de determinar que los amortiguadores de elución y lavado, utilizados para la purificación de 6His:TGB1 no contenga RNAsas, se incubaron con RNA total, así como la elución 6 con 6His:TGB1. Las reacciones se corrieron en un gel de agarosa al 1% (Figura 13b). Tanto en los controles (carril 1 y 2), como en los amortiguadores (carril 3 y 4) y con la proteína viral

CAPÍTULO III ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRARINA EN PRESENCIA DE TGB1

recombinante (carril 5), no se observó una degradación de las subunidades ribosomales 28S y 18S, descartando una posible degradación de 6His:TGB1 al rRNA.

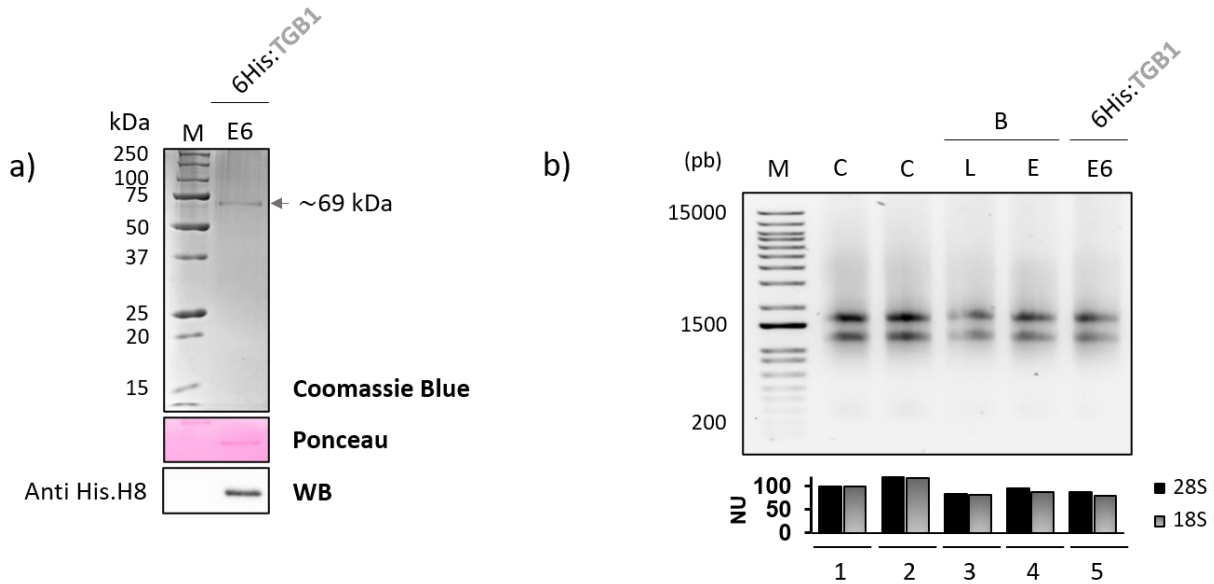


Figura 13 Efecto de la incubación de 6His:TGB1 con RNA total. a) Se inmunodetectó 6His:TGB1 con anti-His (His.H8). La flecha indica la banda con la masa correspondiente a la proteína recombinante. El gel de SDS-PAGE al 15% fue teñido con Commassie Blue. b) La elución 6 de la purificación de 6His:TGB1 fue incubada con RNA total de *B. oleracea* (carril 5), así como los amortiguadores de elución y lavado (carriles 3 y 4, respectivamente). La integridad de las subunidades ribosomales en dichos carriles es similar a los controles (carriles 1 y 2). Cuantificación de las señales 28S y 18S mediante el programa ImageJ y representado en unidades normalizadas (NU). El gel de agarosa al 1% fue teñido con SYBR Safe. El marcador de proteínas es de Bio-rad (no. de catalogo: 1610317). M: Marcador de masa molecular; WB: Western blot; C: Control; B: Amortiguador; L: Lavado; E: Elución; pb: pares de bases.

De igual forma se ensayó la actividad de ribonucleasa GST:AtFib2:6His y la FBL sin el dominio GAR; GST:DelGAR:6His. El gel de agarosa de la Figura 14a, muestra en el carril 2 y 3, la corrida de las reacciones de GST:AtFib2:6His con RNA total, donde se aprecia la degradación de las subunidades ribosomales con respecto al control (carril 1). En contraste, el control negativo de la actividad de ribonucleasa (sin el dominio GAR), se puede apreciar que en la corrida de la incubación de GST:DelGAR:6His con RNA total (carril 2, 3 y 4) no degradó las subunidades ribosomales, con respecto al control (carril 1) (Figura 14b).

CAPÍTULO III ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA EN PRESENCIA DE TGB1

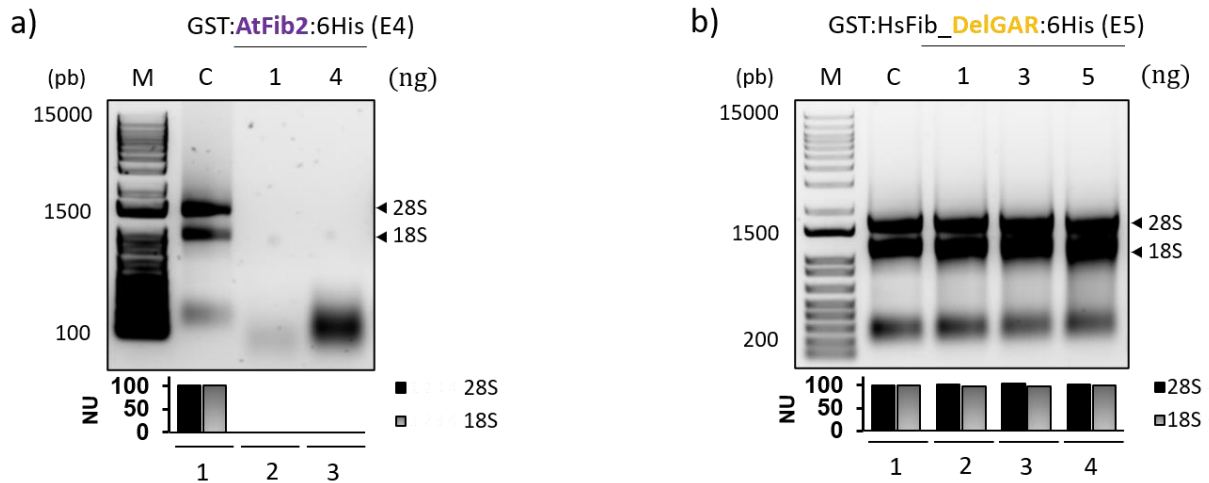


Figura 14 Ensayo de la actividad de ribonucleasa de GST:AtFib2:6His y GST:DelGAR:6His. a) Ensayo de la actividad de ribonucleasa de GST:AtFib2:6His. En los carriles 2 y 3 con concentración ascendente de la proteína recombinante, se observa el resultado de la degradación de las subunidades 28S y 18S, con respecto al carril 1, donde únicamente se cargó RNA total de *B. oleracea*. b) Control negativo de la actividad de ribonucleasa con GST:DelGAR:6His. No se observa una degradación de las subunidades ribosomales (carril 2, 3 y 4) donde se cargó la delección del dominio GAR en concentración ascendente, en comparación al carril, donde únicamente se cargó RNA total de *B. oleracea*. En las gráficas se muestra la cuantificación de las señales 28S y 18S mediante el programa ImageJ y representado en unidades normalizadas (NU). Los gels de agarosa al 1% fueron teñidos con SYBR Safe. M: Marcador de masa molecular; E: Elución; C: Control; pb: pares de bases.

3.8 Ensayo de la actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib en presencia de 6His:TGB1

Se evaluó la actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib (elusión 7) en presencia de 6His:TGB1 (elusión 6), según lo descrito en la metodología. Se ensayó 1, 3 y 5 ng de 6His:TGB1 con la actividad de ribonucleasa de 1 ng de 6His:HsFib y RNA total. El aumento de la concentración de 6His:TGB1 aparentemente genera menos cortes de 6His:HsFib al rRNA, ya que el producto de la degradación se aprecia con mayor masa, comparando la reacción del carril 7 (5 ng de 6His-TGB1) con la del carril 5 (1 ng de 6His-TGB1) del gel de agarosa de la Figura 15.

CAPÍTULO III ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA EN PRESENCIA DE TGB1

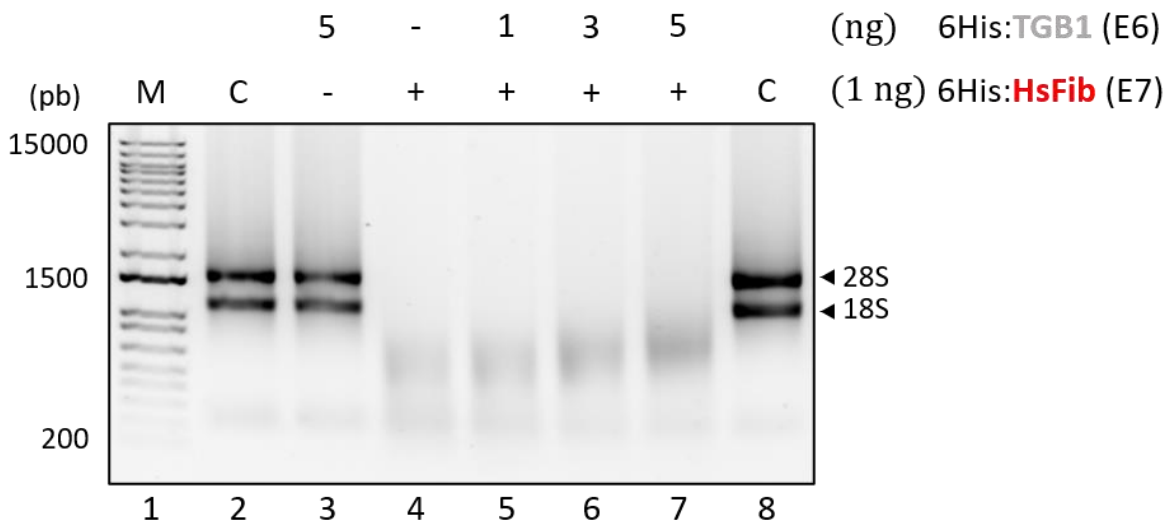


Figura 15 Ensayo de la actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib con diferentes concentraciones de 6His:TGB1. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe. M: Marcador de masa molecular; E: Elución; C: Control; pb: pares de bases.

Se replicó la reacción del carril 7 (1 ng de 6His:HsFib y 5 ng de 6His:TGB1) de la Figura 15, por duplicado. En los carriles 6 y 7 donde se adicionó 6His:TGB1, se aprecia que la subunidad 18S no es completamente degradada en comparación a los carriles 4 y 5, donde 6His:TGB1 está ausente de la reacción (Figura 16).

CAPÍTULO III ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA EN PRESENCIA DE TGB1

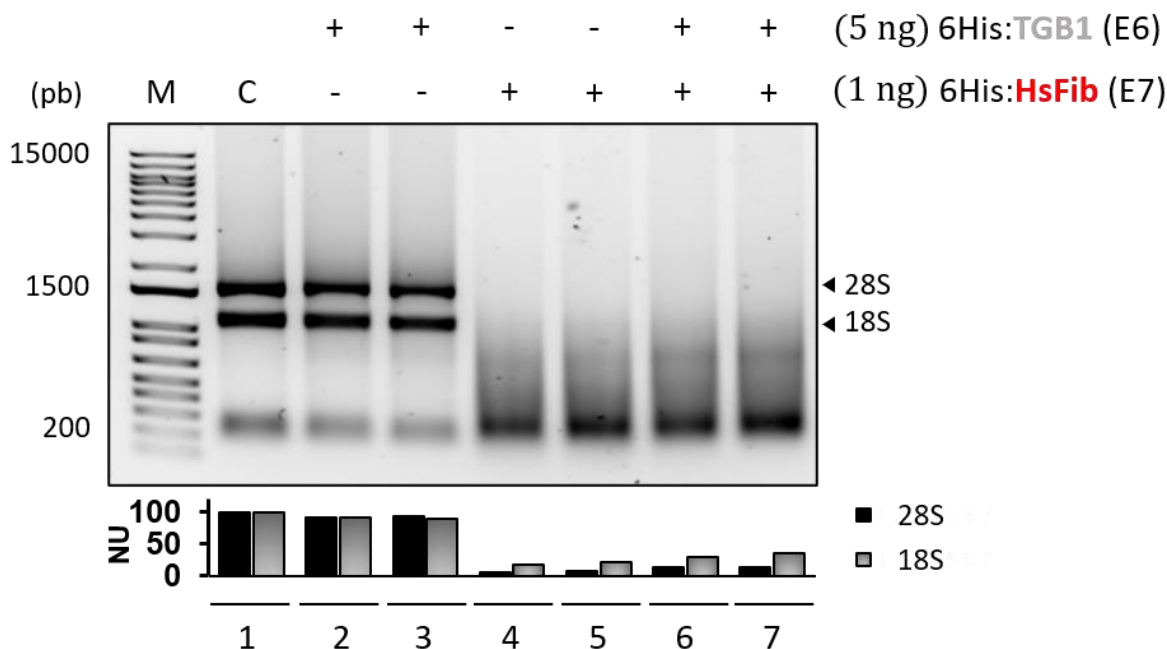


Figura 16 Ensayo de la actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib en presencia de 6His:TGB1 por duplicado. Cuantificación de las señales 28S y 18S mediante el programa ImageJ y representado en unidades normalizadas (NU). Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe. M: Marcador de masa molecular; E: Elución; C: Control; pb: pares de bases.

Además, se ensayó la actividad de ribonucleasa a diferentes volúmenes de 6His:HsFib en presencia de 6His:TGB1, con los siguientes cambios. (1) Con el objetivo de visualizar la degradación del RNA total antes de que sea completamente degradado por 6His:HsFib, se acortó el tiempo de incubación de 37 °C por 30 min. Con el fin de promover la interacción entre las proteínas recombinantes, (2) se modificó el amortiguador de BC200 (20 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM KCl) y (3) se modificó a una incubación en hielo. Por último, (4) se diluyó 4 veces la elución 7 de 6His:HsFib para tomar volúmenes más grandes y reducir el error de la micropipeta. Se evaluó la actividad de 2 y 4 ng de 6His:HsFib en presencia de 5 ng de 6His:TGB1, por duplicado. El nivel de degradación de 6His:HsFib aumentó respecto al incremento en su concentración, en ausencia de TGB1 de BSMV (carriles 4-7). Sin embargo, en las reacciones donde se adicionó 4 ng de 6His:TGB1 y 2 ng de 6His:HsFib (carriles 10 y 11) hay una leve inhibición en la degradación de las subunidades ribosomales con respecto al control (carriles 6 y 7) (Figura 17).

CAPÍTULO III ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA EN PRESENCIA DE TGB1

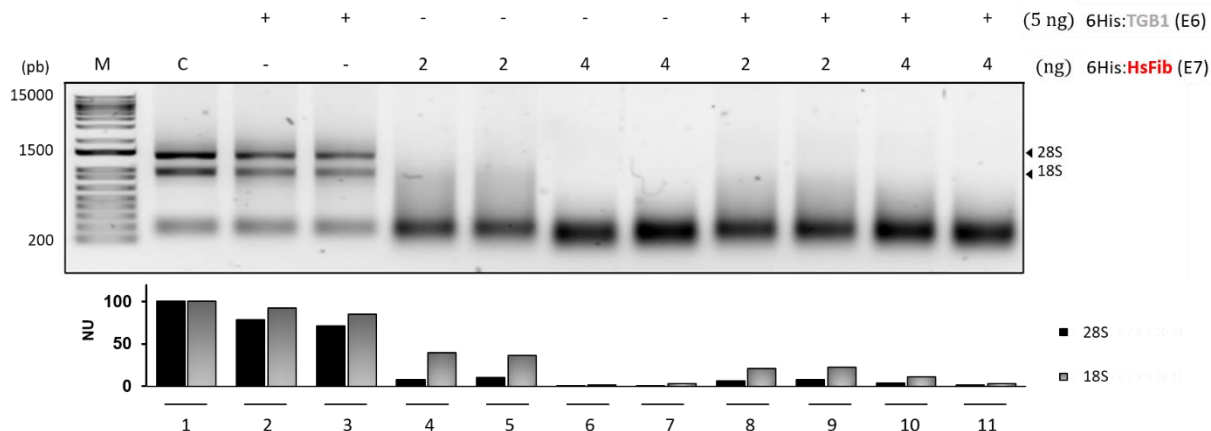


Figura 17 Ensayo de la actividad de ribonucleasa con diferentes concentraciones de 6His:HsFib en presencia de 6His:TGB1. Cuantificación de las señales 28S y 18S mediante el programa ImageJ y representado en unidades normalizadas (NU). Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe. M: Marcador de masa molecular; E: Elución; C: Control; pb: pares de bases.

DISCUSIÓN

Previo a los ensayos de ribonucleasa de manera *in vitro*, se inmunodetectó la fusión de 6His:HsFib1 con anti-HsFib y anti-6His y se confirmó su actividad de ribonucleasa. Por otro lado, dado que el dominio GAR de fibrilarina tiene actividad de ribonucleasa y se caracteriza por ser una IDR, se evaluó la capacidad de otras proteínas con IDRs de degradar rRNA, como GAR1, Lsm14 (Guillen-Chable *et al.*, 2020). De tal manera que pudieron concluir que no todas las IDRs presentan actividad de ribonucleasa. Por lo que TGB1, al poseer desorden en el dominio N-terminal, fue válido ensayar dicha actividad enzimática. Sin embargo, TGB1 tampoco fue capaz de degradar el rRNA, al menos en las condiciones ensayadas.

En la Figura 15, donde se ensayó la actividad de ribonucleasa en presencia de TGB1 en concentración ascendente y concentración constante de la FBL, se puede observar una inhibición en la degradación de las subunidades 28S y 18S, directamente proporcional a la concentración de TGB1. Para este ensayo (Figura 15) no se cuantificaron las señales de las subunidades ribosomales ya que no se diferenciaban entre una. Por otro lado, este resultado se corroboró haciendo un duplicado del carril 7 de la Figura 16, donde no hubo una diferencia significativa en la degradación de la subunidad 28S con respecto al control, pero sí una leve inhibición de la

CAPÍTULO III ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA EN PRESENCIA DE TGB1

subunidad 18S. Con estos dos resultados, se puede sugerir que TGB1 al interactuar con el dominio catalítico, inhibe la actividad de ribonucleasa de la FBL. Esto podría significar que TGB1 al interactuar con la FBL regula su procesamiento sobre el pre-rRNA, afectando la biogénesis ribosomal. La actividad de ribonucleasa de la FBL también se ha visto modulada por otros ligandos, como PI3P que la inhibe y PI5P que la aumenta. Es posible que esta modulación se deba a que la interacción de estos fosfoinosítidos generan un cambio conformacional en la FBL, afectando su habilidad de interactuar con el rRNA, como lo reportado con PIP2 (Yildirim *et al.*, 2013), de tal manera que este podría ser el caso de la interacción de TGB1 sobre la FBL.

Por otro lado, en los siguientes ensayos, donde se evaluó a concentración ascendente de la FBL, no se observó una inhibición contundente sobre la actividad de ribonucleasa de la FBL en presencia de TGB1 de BSMV. Por esto, los ensayos deben de repetirse y variar las condiciones del experimento, como agregar a la reacción componentes que afectan la actividad de ribonucleasa de la FBL, como fosfoinosítidos, U3 y NaCl (Rodríguez-Corona *et al.*, 2017; Guillen-Chable *et al.*, 2020). Además de ensayar con otras técnicas la actividad de ribonucleasa, como zimografías, pero en interacción entre TGB1 y la FBL.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones utilizadas, los resultados sugieren que TGB1 de BSMV modula negativamente la actividad de ribonucleasa de la FBL. No obstante, es necesario evaluar esta posible inhibición con diferentes condiciones (propuestas en la discusión). Este resultado atiende al segundo objetivo específico.

CAPÍTULO IV ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA CON RNA VIRAL COMO SUSTRATO

CAPÍTULO IV ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA CON RNA VIRAL COMO SUSTRATO

INTRODUCCIÓN

La FBL es una proteína nucleolar cuya principal función radica en la biogénesis ribosomal, incluyendo el procesamiento del pre-rRNA y la metilación del rRNA (Rodríguez-Corona *et al.*, 2015). Además del rRNA, la FBL al tener un sitio de unión a RNA, es capaz de unirse con distintos RNAs, como snoRNA, snRNA, siRNA y RNAs virales, de manera *in vitro*. En AtFib2 se encontró dos sitios de unión a RNA y aunque es capaz de unir a diferentes RNAs, la afinidad varía (Rakitina *et al.*, 2011). Por lo que la unión de la FBL a RNAs específicos no se debe de descartar.

Además de su función en la biogénesis de diferentes RNAs y las subunidades ribosomales, la FBL es fundamental para diversos virus de mamíferos y plantas (Decle-Carrasco *et al.*, 2021). La mayoría de ellos, poseen genomas de RNA; (-)ssRNA y (+)ssRNA. Rakitina *et al.*, (2011) determinaron de manera *in vitro* que la eficiencia de unión de los RNAs genómicos del virus del mosaico del tabaco (TMV), virus x de la papa (PVX) y GRV son similares, aunque la afinidad de AtFib2 con RNAs virales es ligeramente menor a la que tiene con rRNA. Sin embargo, de igual forma determinó que las características de unión a RNA de la FBL son similares a aquellas proteínas virales de movimiento que forman complejos RNPs con RNAs virales (Li y Palukaitis, 1996; Kalinina *et al.*, 2001). De hecho, se ha mostrado la formación de estructuras filamentosas con características helicoidales) agregando únicamente la FBL, pORF3 y RNA viral (de manera *in vitro*), similares al complejo RNP formado *in vivo* durante la infección de umbravirus (Sang *et al.*, 2007a). Así como la colocalización de la FBL con el RNA viral y su maquinaria de movimiento de BSMV, en el citoplasma (Li *et al.*, 2018). Por otro lado, en ensayos de competencia, U3 es liberado de la FBL mediante la adición del RNA genómico de TMV y 26S y 18S, aunque la competencia del 18S rRNA fue menos eficiente (Rakitina *et al.*, 2011). Esto puede ser debido a que, de las dos subunidades ribosomales, la 18S es ligeramente menos afín a la FBL. Por tanto, la FBL puede interactuar con varios RNAs de diferentes estructuras y longitudes, sin embargo, la diferencia en afinidad que tiene la FBL de una de otra, sugiere la unión a RNAs específicos.

Dado que la FBL forma RNPs virales de ciertos virus de plantas, como GRV (Sang *et al.*, 2007a) y BSMV (Li *et al.*, 2018), la actividad de ribonucleasa debe ser regulada de alguna manera, ya que degradaría el RNA genómico viral. De hecho, de manera *in vitro* se probó que la FBL junto

CAPÍTULO IV ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA CON RNA VIRAL COMO SUSTRATO

con pORF3 y RNA viral, protege el RNA genómico contra un tratamiento con RNasa (Sang *et al.*, 2007a). PMeV-Mx es un virus de genoma de (+)ssRNA, similar al umbravirus descrito en México (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015) asociado a la enfermedad conocida como meleira de la papaya. En Brasil, la enfermedad se asoció a dos virus, uno de genoma de dsRNA, llamado virus de la meleira de la papaya (PMeV) y un virus relacionado con PMeV-Mx llamado PMeV2 (Antunes *et al.*, 2016). Debido a lo anterior, se ensayó el RNA viral de PMeV-Mx como sustrato para la actividad de ribonucleasa de la FBL, así como evaluarla en competencia, donde se agregue una mezcla de rRNA de *B. oleracea* y RNA viral de PMeV-Mx.

MATERIALES Y METODOS

4.1 Plásmidos y cepas

Para los ensayos de la actividad de ribonucleasa, se utilizaron las fracciones de elución de 6His:HsFib, descritos en el Capítulo II.

4.2 Material biológico

Se utilizó RNA viral extraído del látex de frutos de *C. papaya* L. infectadas con PMeV-Mx, donado por la Dra. Luisa López Ochoa. La extracción fue realizada por el método de Tavares *et al.* (2004) y esta contiene una mezcla de dsRNA (estado replicativo del virus), ssRNA (RNA genómico de PMeV-Mx) y DNA genómico de la planta. Como control de la actividad de ribonucleasa de HsFib, se utilizó el RNA total de *B. oleracea*, descrito en el Capítulo III.

4.3 Estudio de la actividad de ribonucleasa de HsFib con RNA viral como sustrato

Se utilizó la fusión de 6His:HsFib y se incubó con la muestra de RNA del látex, más amortiguador BC200, durante 1 hora a 37°C. Además, se evaluó la actividad de ribonucleasa con el RNA viral y rRNA, bajo las mismas condiciones. Las reacciones fueron cargadas en un gel de 1% de agarosa teñido con SYBR SAFE y se corrieron en la cámara de electroforesis a 95V durante 30 min.

RESULTADOS

Se evaluó la actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib utilizando RNA viral como sustrato. 2 ng de la elución 6 de 6His:HsFib se incubó con el RNA viral extraído del látex del fruto de plantas

CAPÍTULO IV ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA CON RNA VIRAL COMO SUSTRATO

infectadas con PMeV-MX, durante 30 min a 37°C. Las reacciones se corrieron en un gel de agarosa al 1% (Figura 18). La actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib (E6) degradó de manera contundente el RNA total (carril 1 contra el carril 3), caso contrario con el RNA viral (carril 3 contra el carril 4). Sin embargo, cuando el RNA total, el RNA viral (látex) y la FBL son incubados, el RNA total se observa relativamente integro (carril 5).

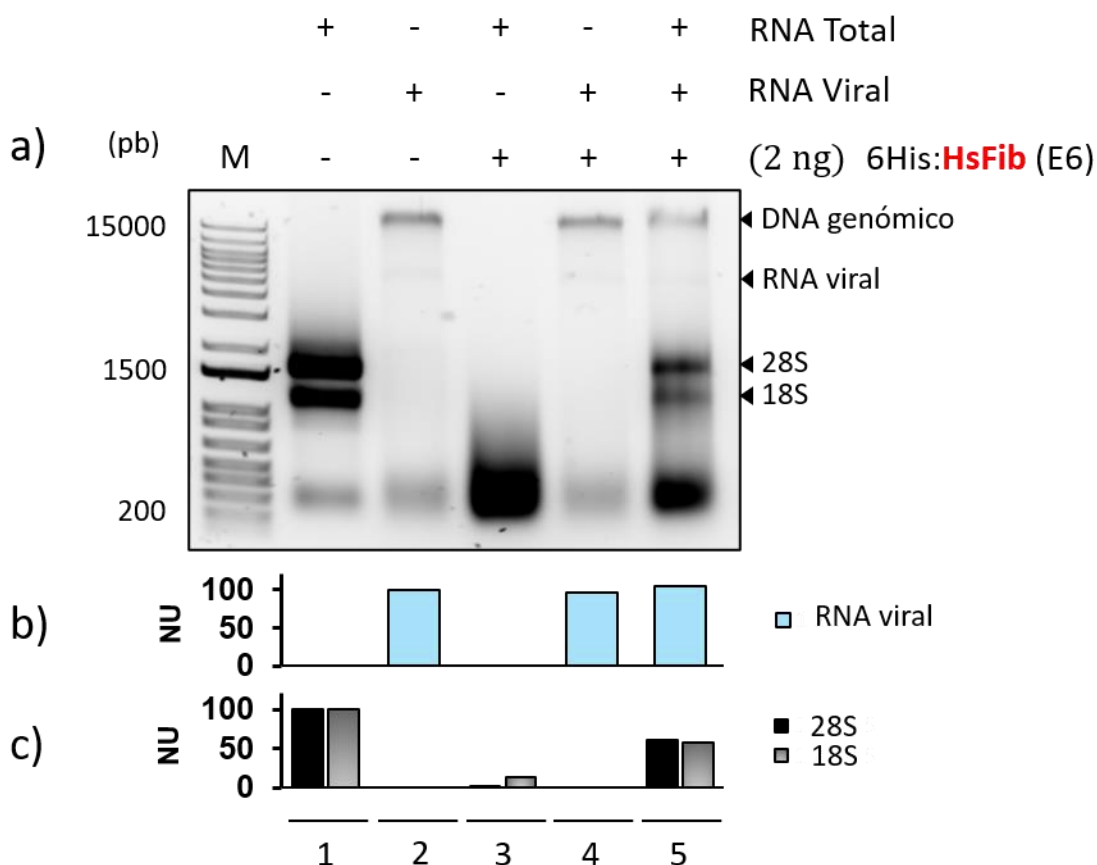


Figura 18 Ensayo de la actividad de ribonucleasa de 6His:HsFib con RNA viral. a) Ensayo de ribonucleasa de 6His:HsFib con RNA viral de PMeV-Mx (carril 4) y mezclado con rRNA (carril 5). Cuantificación de la señal del RNA viral b) y de las subunidades ribosomales 28S, 18S c) mediante el programa ImageJ y representado en unidades normalizadas (NU). Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe. M: Marcador de masa molecular; E: Elución; pb: pares de bases.

CAPÍTULO IV ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA DE FIBRILARINA CON RNA VIRAL COMO SUSTRATO

DISCUSIÓN

El estudio sobre la actividad de ribonucleasa de la FBL es reciente y por tanto queda mucho por elucidar. Aunque la FBL es capaz de unir a RNAs de diferentes tipos y longitudes, como rRNA, snoRNA, snRNA, siRNA y RNAs virales (Rakitina *et al.*, 2011), sólo se ha demostrado que las subunidades ribosomales 28S y 18S, junto con U3 snoRNA pueden ser degradados por dicha proteína (Rodriguez-Corona *et al.*, 2017; Guillen-Chable *et al.*, 2020). Lo que nuestros resultados sugieren es que, aunque la FBL pueda interaccionar con RNA viral, no lo pueda degradar. Por otro lado, la muestra de RNA viral proveniente del látex de frutos de *C. papaya* L. infectadas con PMeV-Mx, contienen otros componentes que podrían afectar de alguna manera la actividad de ribonucleasa. Por tanto, estos mismos ensayos se podrían realizar a partir de un RNA viral puro (sin ácidos nucleicos de la planta) o mediante la transcripción del RNA viral con alguna construcción que tenga la secuencia del RNA genómico viral, con el fin de eliminar ruido en los ensayos.

Por otro lado, en la reacción donde se agregó RNA viral, rRNA y la FBL, la degradación del rRNA es menor con respecto al control (FBL + rRNA), puede explicarse de las siguientes maneras. Aunque la FBL es levemente más afín al rRNA que al RNA viral (Rakitina *et al.*, 2011), una fracción del 6His:HsFib ensayado se unió al RNA viral compitiendo por su unión al rRNA y por tanto hubo una menor degradación a las subunidades ribosomales, tal y como lo indica el análisis con el programa de ImageJ. Otro escenario en dicho ensayo, es que el RNA viral al unirse a la FBL, generó un cambio conformacional distinto al adecuado para su actividad de ribonucleasa afectando la degradación de las subunidades ribosomales.

CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, la FBL no es capaz de degradar el RNA viral de PMeV-Mx. Por otro lado, el RNA viral de PMeV-Mx modula negativamente la actividad de ribonucleasa de la FBL. Estos resultados cumplen las metas del tercer y cuarto objetivo específico.

Profundizar en este tema, no sólo podría brindar más información respecto a la actividad de ribonucleasa de la FBL, sino también en los procesos virales en los que está asociada (Decler-Carrasco *et al.*, 2021), así como plantear estrategias anti-virales enfocadas en la interacción entre la FBL y RNA viral.

CAPÍTULO V FIBRILARINA Y VIRUS DE PLANTAS

Plant viral proteins and fibrillar: the link to complete the infective cycle

Molecular Biology Reports (2021) 48:4677–4686

La revisión de continuación recopila la información más relevante sobre la asociación de la FBL y virus de plantas con el fin de identificar patrones y proponer nuevas preguntas de investigación. Para la presente tesis, esta revisión fue la base para plantear la hipótesis.

Plant viral proteins and fibrillarin: the link to complete the infective cycle

Stefano Decle-Carrasco¹ · Luis Carlos Rodríguez-Zapata² · Enrique Castano¹ 

Received: 17 February 2021 / Accepted: 8 May 2021 / Published online: 25 May 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract

The interaction between viruses with the nucleolus is already a well-defined field of study in plant virology. This interaction is not restricted to those viruses that replicate in the nucleus, in fact, RNA viruses that replicate exclusively in the cytoplasm express proteins that localize in the nucleolus. Some positive single stranded RNA viruses from animals and plants have been reported to interact with the main nucleolar protein, Fibrillarin. Among nucleolar proteins, Fibrillarin is an essential protein that has been conserved in sequence and function throughout evolution. Fibrillarin is a methyltransferase protein with more than 100 methylation sites in the pre-ribosomal RNA, involved in multiple cellular processes, including initiation of transcription, oncogenesis, and apoptosis, among others. Recently, it was found that AtFib2 shows a ribonuclease activity. In plant viruses, Fibrillarin is involved in long-distance movement and cell-to-cell movement, being two highly different processes. The mechanism that Fibrillarin performs is still unknown. However, and despite belonging to very different viral families, the majority comply with the following. (1) They are positive single stranded RNA viruses; (2) encode different types of viral proteins that partially localize in the nucleolus; (3) interacts with Fibrillarin exporting it to the cytoplasm; (4) the viral protein-Fibrillarin interaction forms an RNP complex with the viral RNA and; (5) Fibrillarin depletion affects the infective cycle of the virus. Here we review the relationship of those plant viruses with Fibrillarin interaction, with special focus on the molecular processes of the virus to sequester Fibrillarin to complete its infective cycle.

Keywords GAR domain · Long-distance movement · Cell-to-cell movement · Fibrillarin · Nucleolus · Plant viruses

Introduction

The interaction of viruses and the nucleolus starts since the beginning of the 1990s. Despite that most viral families have in common is their interaction with the components of the nucleolus (Greco, 2009; Hiscox, 2002b; Hiscox *et al.*, 2010; Pederson, 2011), RNA viruses, in particular those that replicate in

CAPÍTULO V FIBRILARINA Y VIRUS DE PLANTAS

the cytoplasm arise more attention. The identification of nuclear and nucleolar localization signals (NLS and NoLS, respectively) within viral-encoded proteins sequences explain how those viruses are able to interact with the nucleus and nucleolus (Hiscox, 2007). The nucleolus is the main domain of the nucleus. In the nucleolus, functions like gene silencing, cell cycle progression, senescence, ribosomal biogenesis, biogenesis of small nucleolar RNAs, proliferation of RNA and many forms of stress response occur. This region can behave as a dynamic or stable region depending on the nature and quantity of its composed molecules (Andersen *et al.*, 2005; Boisvert *et al.*, 2007; Hinsby *et al.*, 2006; Kressler *et al.*, 1999; Shaw y Brown, 2012). The nucleolus is functionally related to Cajal bodies (CBs), a structure with viral interactions (Ding y Lozano-Durán, 2020). Fibrillarlin (Fib), the main nucleolar protein, localize in both the nucleolus and CBs (Rodriguez-Corona *et al.*, 2015). Fib is an essential protein conserved in sequence and function throughout evolution (Ochs *et al.*, 1985; Rodriguez-Corona *et al.*, 2015; Sobol *et al.*, 2013) that is responsible for the 2'-O-methylations of rRNA and histone H2A in eukaryotes (Loza-Muller *et al.*, 2015; Tessarz *et al.*, 2014). It belongs to the superfamily of the Rossmann-fold S-adenosylmethionine (SAM) methyltransferases (MTases) (H. Wang *et al.*, 2000). SAM proteins are characterized with a conserved SAM-binding motif, the catalytic triad/tetrad [K-D-K(H)] and seven-stranded β -sheet flanked by α -helices to form an α - β - α structure (Rakitina *et al.*, 2011). In addition, they have a rich site in arginine and glycine residues (GAR domain) and a specific motif to bind RNA. The protein structure can be divided into two domains: the N-terminal and the MTase domain. In plants, the N-terminal domain of *Arabidopsis thaliana* Fib (AtFib) is divided with the GAR domain and a spacer region. Several cellular and viral proteins tend to interact with the GAR domain and gives the property of Fib to retain in the nucleolus. [19] find a novel ribonuclease activity within the AtFib2 GAR domain, whilst AtFib1 do not show. Recently, similar studies find out that this novel activity is conserved in the GAR domain of Homo sapiens Fib (HsFib) (Guillen-Chable *et al.*, 2020). In both (AtFib2 and HsFib), the ribonuclease activity is affected by phosphoinositides. These findings were carried out *in vitro*, further studies are needed to elucidate the nature of this novel ribonuclease activity. Different viruses from different families require Fib to complete their infective cycle. In this review, we aim to identify possible patterns in Fib's functions exclusively in plant viruses, to expand the knowledge of this protein on plant virology and design novel strategies to control these viruses.

Fibrillarlin in viral long distance movement

Groundnut Rossette Virus – ORF3

The Groundnut Rosette Virus (GRV) is a virus (+) ssRNA belonging to umbraviruses. Umbraviruses have the peculiarity of not coding a coat protein (CP), so their viral particles are unconventional (M.

CAPÍTULO V FIBRILARINA Y VIRUS DE PLANTAS

Taliansky *et al.*, 2003; M. E. Taliansky y Robinson, 2003). GRV ORF3 compensates this deficiency by acting like a CP by associating with the major nucleolar protein, Fib (Table 1). ORF3 traffics from the cytoplasm to the nucleus through its R-rich domain generating the fragmentation of the CBs in Cajal Body-like structure (CBLs) (through a process still unknown) (Figure 1). Thereby promoting the fusion with the nucleolus and thus recruiting Fib. Although it has not been elucidated yet how ORF3 promotes the formation of CBLs and consequently, the fusion with the nucleolus, a well-documented phenomenon (Cioce y Lamond, 2005; Ogg y Lamond, 2002), it is possible that the ORF3-Fib interaction interferes with host protein-protein interactions or other processes that affect the integrity of CB (Kim *et al.*, 2007b; Sang *et al.*, 2007b). Through Far-Western Blot and mutations analysis, ORF3-Fib interaction was discovered *in vitro* through the L-rich region (and in particular L149) and the GAR domain, respectively. It is suggested that ORF3 and Fib move as a complex (Kim *et al.*, 2007b; Sang *et al.*, 2007b). ORF3-Fib complex is exported from the nucleolus to the cytoplasm with the L-rich domain of ORF3, which acts as a nuclear export signal (Ryabov *et al.*, 2004). Fib's location outside the nucleolus is an indicator of some biotic or abiotic stress. Recruitment *in vitro* of ORF3 with Fib's and the viral RNA produce filamentous RNP particles with structures and properties similar to those formed *in vivo* (Kim *et al.*, 2007; Sang *et al.*, 2007b; M. E. Taliansky y Robinson, 2003). These RNP particles are infectious and with the ability to protect viral RNA against an RNAase treatment. The binding site of Fib with RNA can serve either to interact physically with viral RNA or to allow catalysis of the RNA or assembly of other proteins with viral RNA, which is unreachable with ORF3 alone. Accordingly, the encapsidation of viral RNA with ORF3 and Fib is sufficient for the formation of infectious RNP filaments capable of LDM in the infection of GRV (Kim *et al.*, 2007b; Sang *et al.*, 2007b). The requirement of Fib for GRV LDM is the first evidence reported of a plant virus-Fib interaction. To strengthen the hypothesis that Fib plays a role in GRV LDM must be the localization of Fib itself at the phloem of GRV-infected plants.

Table 1 Plant virus-encoded proteins described to interact with Fibrillarlin

Virus name	Genome	Virus-Encoded Protein	Putative Function in Viral Infection	References
Groundnut rosette virus	(+)ssRNA	Open reading frame 3 (ORF3) protein	Systemic movement	[23, 24]
Potato virus A	(+)ssRNA	Nuclear Inclusion protein a (Nla)	Suppression of RNA silencing	[25]
Cucumber mosaic virus	(+)ssRNA	2b	Undetermined	[26]
Poa semilaten virus	(+)ssRNA	Triple gene block protein 1 (TGBp1)	Undetermined	[27]
Beet black scorch virus	(+)ssRNA	P7a	Relevant for viral infection	[28]
Rice stripe virus	(-)ssRNA	P2	Suppression of RNA silencing/Sys-	[29]
Bamboo mosaic potexvirus satRNA	(+)ssRNA	P20	Systemic movement	[30]

CAPÍTULO V FIBRILARINA Y VIRUS DE PLANTAS

Barley stripe mosaic virus	(+)ssRNA	Triple gene block protein 1 (TGBp1)	Cell-to-cell and systemic movement	[31]
Mulberry mosaic dwarf-associated virus	ssDNA	V2	Suppression of RNA silencing	[32]

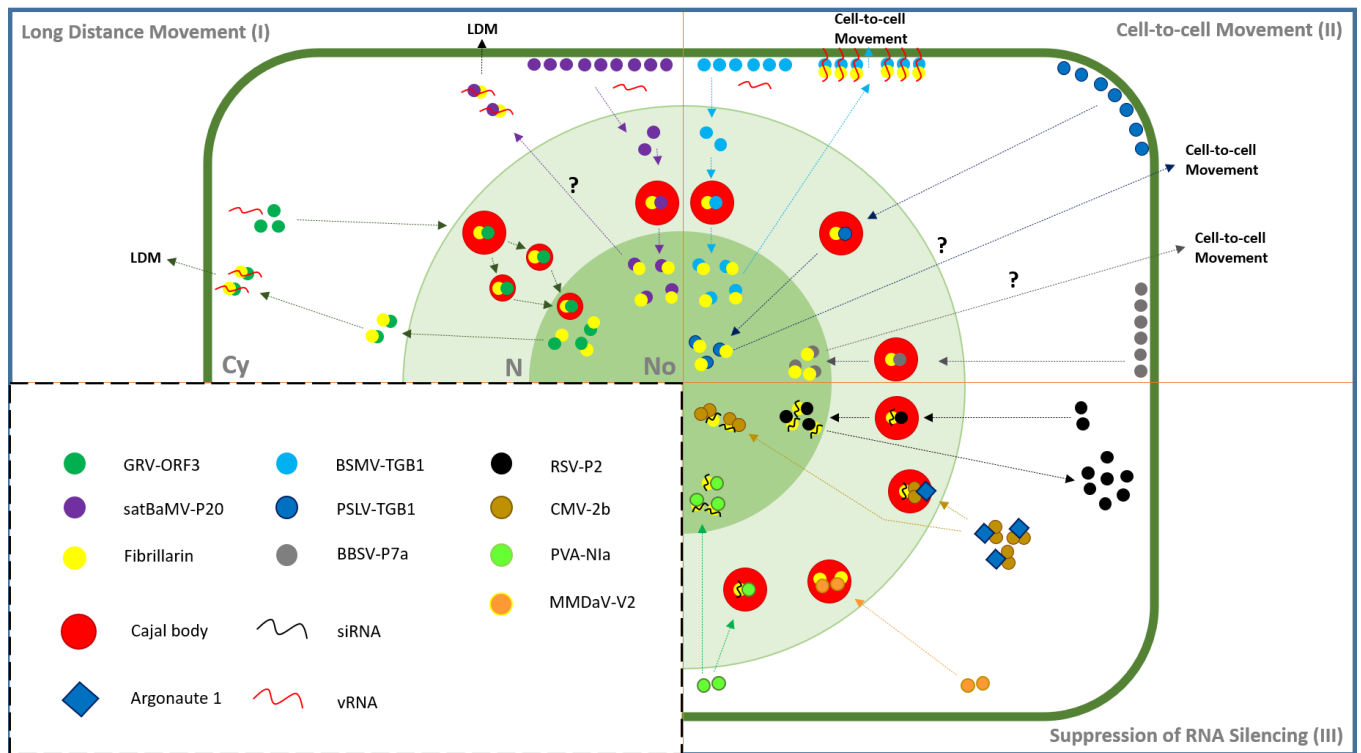


Fig. 1 Model for the role of Fibrillarin in plant viruses. Fibrillarin (Fib) is potentially involved in long distance movement (LDM), cell- to-cell movement and in the suppression of RNA silencing (SRS) of certain single-stranded positive-sense RNA plant viruses. (I) The ORF3 viral protein (VP) of *Groundnut rosette virus* (GRV), mediate its long distance movement (LDM) in part through the interaction with Fib in nucleolus (Nu), Cajal bodies (CBs) (in red circles), and finally in the cytosol (Cy) to form a viral ribonucleoprotein complex (vRNP) to traverse into the phloem. (II) The cell-to-cell movement of *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) require the interaction of TGB1 protein and Fib. The TGB1-Fib protein complex localizes in the Nu where are exported to the periphery of the cell to form a vRNP complex where it conducts cell-to-cell movement with other BSMV VPs. (III) A potential, un-described role of Fib in plant viruses might be the SRS. The viral suppressor of RNA silencing (VSR) VPg of *Potato virus A*, interacts with Fib. Fib is an RNA-binding protein in CBs, site of siRNA in plants, which regulates viral defense. The VPg-Fib interaction localizes in the N and Nu, not seen in the Cy. Dotted arrows indicate movement.

CAPÍTULO V FIBRILARINA Y VIRUS DE PLANTAS

Satellite RNA of Bamboo Mosaic Virus – P20

Satellite RNAs (satRNAs) are parasites of other viruses, referred to as helper viruses (HV) for their replication and movement. satRNAs are generally unrelated in sequence to their HV, although, depend on HV-encoded proteins for replication and encapsidation (Hu *et al.*, 2009). The *Bamboo Mosaic Virus* (BaMV)-associated satRNA (satBaMV) has a single a (+) ssRNA genome. satBaMV encodes a single non-structural protein of 20 kDa (P20) (Lin *et al.*, 1994) not related to satBaMV replication (Lin *et al.*, 1996). In fact, BaMV is required for satBaMV replication and encapsidation (Lin *et al.*, 1994; Lin y Hsu, 1994).

The satBaMV P20 localizes in the nucleus and at the cell periphery, where it formed punctate structures (Chang *et al.*, 2016). P20 protein immunoprecipitates with Fib, among other host proteins with anti-P20 IgG through a 7 dpi systemic leaves coinfecting with HV and satBaMV, and in the absence of HV. Thus, the role of Fib in satBaMV trafficking (in the absence of HV) was examined by VIGS Fib-silenced *N. benthamiana* plants. The satBaMV RNA was not detected in Fib-silenced scion plants after grafting onto the satBaMV transgenic line, at 9 days after grafting (DAG). Quantitative analysis revealed that satBaMV mRNA was greatly reduced in *Fib* RNAi scions. This evidence suggests that Fib is crucial for satBaMV LDM as in GRV infection (Kim *et al.*, 2007b; Sang *et al.*, 2007a). However, the effect of fib-silencing impaired only the LDM of satBaMV in HV and satBaMV coinfecting plants.

P20-Fib direct interaction was confirmed by yeast two-hybrid (Y2H) assays (Table 1), being consistent with co-IP results (Chang *et al.*, 2016). P20 binds to satBaMV and BaMV RNAs with a strong affinity through its arginine-rich motif (M.-S. Tsai *et al.*, 1999). In regard to P20 RNA binding property and its interaction with Fib, a potential RNP was studied. RNA extraction from total sap of plants coinfecting with HV and satBaMV were incubated with anti-P20 or anti-Fib IgG. RNA from both, HV and satBaMV were present in the total sap incubated with anti-P20 or anti-Fib IgG. These results indicate that satBaMV P20 with Fib can form RNP complexes *in vivo* (Chang *et al.*, 2016), as in GRV infection (Kim *et al.*, 2007b; Sang *et al.*, 2007b). In addition, P20 can form punctate structures localized at PD and the satBaMV-P20 RNP complexes can traffic autonomously through the phloem in satBaMV-transgenic stocks or scions (Chang *et al.*, 2016).

Fibrillarín in viral cell-to-cell movement

Barley Mosaic Virus – TGB1

CAPÍTULO V FIBRILARINA Y VIRUS DE PLANTAS

Another virus with the genome type (+) ssRNA that requires Fib, is the Barley stripe Mosaic Virus (BSMV), a member of the genus *Hordeivirus* (Table 1). The BSMV genome is segmented into three gRNAs designated as α , β and γ . The BSMV movement is orchestrated by CP and three viral MPs: TGB1, TGB2 and TGB3. Particularly, TGB1 interacts with Fib (Z. Li *et al.*, 2018). BSMV TGB1 is a protein with RNA-binding, RNA helicase and ATPase activities (Donald *et al.*, 1997; Kalinina *et al.*, 2002; Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). The C-terminus of TGB1 binds BSMV gRNAs and sgRNAs to form RNP complexes that are thought to be involved in cell-to-cell movement (Lim *et al.*, 2008b). [35] found that BSMV TGB1 localizes

partially in nucleus and nucleolus when expressed alone, or in BSMV-infected cells. TGB1 contains NLS and NoLS between 227–238 and 95-104 amino acids, respectively. TGB1 NoLS mutations reduced BSMV cell-to-cell accumulation and movement in inoculated leaves, in addition to systemic movement in *N. benthamiana* (Z. Li *et al.*, 2018). Based on the latter, the possible interaction with Fib was examined. It turned out that the BSMV TGB1 protein interacts with the *N. benthamiana* Fib 2 (NbFib2) GAR domain, while the abolition of this interaction leads to the reduction of TGB1 in nuclei and nucleoli. However, still remains to map the region of BSMV TGB1 with Fib interaction.

In addition, Fib is induced in 60-70% in BSMV-infected plants with respect to healthy plants. The mechanism of this induction has not been yet elucidated. Furthermore, silencing of NbFib2 by RNAi reduces BSMV accumulation and its cell-to-cell movement compared to wild-type plants. Finally, it was found that NbFib2 co-localizes with BSMV TGB1 protein and vRNA near the cell wall, and in conjunction with the BSMV vRNA, indicating that NbFib2 may be part of the BSMV RNP complex (Figure 1) (Z. Li *et al.*, 2018). This report provides the first evidence that Fib interactions during plant virus infection not only affects LDM, but also may be a fundamental component for cell-to-cell movement.

Poa semilatent virus – TGB1

As BSMV, *Poa semilatent virus* (PSLV) are representatives of the genus *Hordeivirus* characterized with rodshaped particles and helical structures (Jackson *et al.*, 2009). Furthermore, PSLV genome consist as well of three +ssRNAs (RNA α , RNA β and RNA γ) (Jackson *et al.*, 2009; Morozov y Solovyev, 2003). The PSLV TGB1 contains an N-terminal extension region and a C-terminal NTPase/helicase domain (HELD).

A co-localization of PSLV TGB1 (GFP-TGB1) with Fib (mRFP-AtFib) through agroinfiltration of *N. benthamiana* epidermal cells, encourage to analyze a direct protein-protein interaction. A series of Western Blot experiments with mutants of PSLV TGB1 and AtFib2 reveals that NTD of TGB1 directly

CAPÍTULO V FIBRILARINA Y VIRUS DE PLANTAS

interacts with fib *in vitro* and that the N-terminal GAR domain of Fib is necessary for this interaction (Table 1) (Semashko *et al.*, 2012). In addition, BiFC experiments exhibited an interaction between PSLV TGB1 and AtFib2 in both, the nucleolus and in the inclusions of different sizes in the cytoplasm (Semashko *et al.*, 2012). Taking as a reference of the involvement of fib in GRV LDM (Kim *et al.*, 2007b; Sang *et al.*, 2007b) and BSMV cell-to-cell movement (Z. Li *et al.*, 2018), both re-localize fib to the cytoplasm and form an RNP complex. Thus, Fib might be involved in PSLV cell-to-cell movement or LDM. In fact, PSLV TGB1 has two *in vitro* RNA-binding activities: one is associated with the extension domain and is critical for LDM and the other is associated with the NTPase/helicase domain and is relevant for the formation of cell-to-cell movement competent RNPs (Lough *et al.*, 1998; Y. Yang *et al.*, 2000). Nevertheless, the TGB1 NTD

is involved in cell-to-cell movement as well (Donald *et al.*, 1997). [45] suggests that the assembled PSLV TGB1-RNA complex be considered as a non-virion transport form of hordeiviral RNA facilitating both cell-to-cell and long-distance virus transport. Ultimately, infectivity studies must be conducted in order to elucidate the precise role of Fib in PSLV infection.

Beet black scorch virus – p7a

The *Beet black scorch virus* (BBSV) is a member of the genus *Necrovirus* (Zhao *et al.*, 2015). BBSV has a single positive-stranded RNA genome that encodes six viral proteins. Confocal microscopy analysis of *N. benthamiana* epidermal cells stained with 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide (DAPI) revealed that 87% of the P7a (fused to gfp) fluorescence accumulated in the nucleus. BiFC assays showed an intense interaction between P7a and Fib (Table 1) in the nucleolus and CBs. [47] found through P7a mutations that ⁹RRERRVR¹⁵ of the R-rich motif control the nucleolar targeting. When P7aR5A mutant was tested to interact with Fib by BiFC, fluorescence was observed only in the nucleolus. Also, the R-rich motif of P7a is predicted to have an RNA binding domain. Consequently, this motif might be essential for cell-to-cell movement. TGB1 of BSMV relocalize Fib to the cytoplasm where both co-localize with its viral RNA genome to promote cell-to-cell movement (Z. Li *et al.*, 2018). According to this, P7a of BBSV might relocalize Fib to the cytoplasm and form a RNP with gRNA for cell-to-cell movement, or P7a interacts with Fib as a strategy to localize in the nucleolus and CBs to undergo a nuclear role necessary for BBSV cell-to-cell movement. Nevertheless, Fib cytoplasmic localization needs further attention to uncover which of these two scenarios is the case or not.

Fibrillarín in virus-mediated suppression of RNA silencing

Potyvirus A – NIa

CAPÍTULO V FIBRILARINA Y VIRUS DE PLANTAS

Potyvirus is the largest genus of plant viruses with eight genera of viruses, all of them are plant-infecting (+) ssRNA viruses. The genomic RNA of potyvirids contain a single ORF that codes for a major polyprotein, which is proteolytically processed by virus-encoded proteinases. The polyprotein codes for the mature viral proteins P3–6K1–CI–6K2–VPg–NlaPro–Nlb–CP, which are processed by the proteinase NlaPro (Adams *et al.*, 2005; Revers y García, 2015).

Nla localizes primarily in the nucleus and less extensive in the cytoplasm of the infected cells (Revers y García, 2015). Nla is partially processed to produce VPg and NlaPro (Dougherty y Dawn Parks, 1991). NlaPRO has a protease activity, responsible to processed the potyviral polyprotein and a DNase activity proposed to degrade host DNA to regulate gene expression (Anindya y Savithri, 2004; Revers y García, 2015). VPg interacts not only with the majority of the potyviral proteins (Elena y Rodrigo, 2012; Jiang y Laliberté, 2011), as well with host proteins: the eukaryotic initiation factor eIF4E (A. Wang y Krishnaswamy, 2012), a RNA helicase-like protein from peach and *Arabidopsis* (AtRH8) wich is related to eIF4E (T. S. Huang *et al.*, 2010), Poly(A)-binding protein (Beauchemin y Laliberté, 2007), and Fib (Rajamäki y Valkonen, 2009). VPg is a intrinsically disordered protein, capable to interact with a several proteins, including homodimers (Oruetxebarria *et al.*, 2001), and thus to participate in multiple processes (Grzela *et al.*, 2008; Rantalainen *et al.*, 2008, 2011). As mentioned above, *Potato virus A* (PVA) Nla is mainly located in the nucleus of infected cells in systemically infected leaves of *Solanum commersonii* and *N. tabacum* [57, 62] examined by immunostaining with antibodies against VPg and Nla-Pro. The PVA Nla N-terminus contain NLSI and NLSII, located at the residues from 4 to 9 and 41 to 50, respectively, both needed for efficient nuclear and nucleolar localization (Rajamäki y Valkonen, 2009). Also, PVA Nla accumulates in CBs. However, the nucleoli and CBs localization turned out to be independently controlled by NLS II and NLS I, respectively.

The VPg domain of PVA Nla was found to interact with Fib, *in vivo* (Table 1). This interaction was subsequently studied in plant cells by BiFC (Rajamäki y Valkonen, 2009). Interestingly, VPg-Fib interaction occurred only in nucleoli and CBs but not in the cytoplasm (Figure 1). In GRV where Fib is required for LDM (Kim *et al.*, 2007b; Sang *et al.*, 2007a), and in BSMV where is part of the cell-to-cell movement (Z. Li *et al.*, 2018), the interaction in the cytoplasm is key to perform both processes. Therefore, this could mean the following scenarios: (1) In PVA infection, Fib might be involved in either LDM and cell-to-cell movement or both but in a different mechanism. (2) Fib is required for PVA in a different viral process rather than viral movement. (3) The VPg-Fib interaction signal in the cytoplasm is too weak to localize. Reduction of Fib expression by 30% to 80% in leaves by virus-induced gene silencing (VIGS) affected PVA accumulation by 50% but did not prevent LDM. By contrast, in similar experiments (Chang

CAPÍTULO V FIBRILARINA Y VIRUS DE PLANTAS

et al., 2016; Kim *et al.*, 2007b; Z. Li *et al.*, 2018; Sang *et al.*, 2007a; L. Zheng *et al.*, 2015), the depletion of Fib resulted in the inhibition of LDM and cell-to-cell movement. Thus, an additional role of Fib in PVA infection becomes a plausible scenario.

Plant viruses evolved to counteract the plant RNA silencing machinery through viral proteins (viral suppressors of RNA silencing: VSR) that inhibit various stages of this plant defence (X. Huang *et al.*, 2019). Most potyviruses encodes two viral suppressors of RNA silencing (VSRs), HCpro and VPg (Rajamäki y Valkonen, 2009). HCpro is probably the most studied protein of potyviruses, particularly on its ability to suppress RNA silencing (Hafrén y Mäkinen, 2008; Mallory *et al.*, 2002; Soitamo *et al.*, 2011). However, there is little research in VPg VSR activity. For instance, VPg of *Turnip mosaic virus* and other potyviruses mediate the degradation of SGS3, a key host protein, and its interacting and functional partner RDR6, both essential components of the RNA silencing pathway (Cheng y Wang, 2017; Rajamäki *et al.*, 2014).

Host genes are known to act as negative regulators of RNA silencing (Anandalakshmi *et al.*, 2000; Endres *et al.*, 2010; X. Huang *et al.*, 2019). The NgRBP, a glycine-rich RNA binding protein (similar to Fib in the high content of glycine and the RNA binding property) from *N. glutinosa* suppress local and systemic RNA silencing induced by sense RNA or dsRNA. Mutational analysis of NgRBP demonstrate that the RNA motif region is necessary to maintain its RNA- silencing suppression activity. Also, NgRBP was able to interact with the 3' end GFP mRNA and dsRNA, thus it is suggested that NgRBP blocks dsRNA synthesis by RdRp at the beginning of RNA silencing, and consequently, the RISC complex formation by competitive dsRNA binding (X. Huang *et al.*, 2019).

PVA VPg interacts with Fib in nucleolus and CBs, both known centers for small RNAs, including siRNAs and microRNAs that regulate gene expression posttranscriptionally (Brosnan *et al.*, 2007; Pontes *et al.*, 2006; Pontes y Pikaard, 2008). Thus, Fib may be a vehicle for VPg to undergo its VSR activity in nucleoli and CBs. Furthermore, Fib interacts with RNAs of different lengths and types including dsRNA and viral RNA *in vitro* (Rakitina *et al.*, 2011). As [70] speculate with NgRBP, Fib might impede RISC complex formation through competitive dsRNA binding. Alternately, the VPg-Fib interaction may affect host transcription or pre-mRNA processing, both processes in which Fib is involved, suggesting an explanation to the shutdown of host gene expression during potyvirus infection (D. Wang y Maule, 1995). Further studies need to explore why Fib interacts with a VSR protein.

Cucumber Mosaic Virus – 2b

Another VSR protein present in CBs and nucleoli is the Cucumber Mosaic Virus (CMV)-2b (González *et al.*, 2010). Different hosts and CMV strains confirmed that the deletion of 2b gene affected entirely or, in

CAPÍTULO V FIBRILARINA Y VIRUS DE PLANTAS

some extent, the symptoms, indicating that 2b is involved in symptom induction in these hosts rather than in LDM (Hou *et al.*, 2011; Lewsey *et al.*, 2009; Netsu *et al.*, 2008; Soards *et al.*, 2002; Y. Wang *et al.*, 2004). In addition, CMV 2b counteracts host basal defenses based on RNA silencing. 2b was shown to suppress silencing in a protoplast system (Qi *et al.*, 2004). In *A. thaliana* CMV infection, accumulation of 21-, 22- and 24-nt siRNA species were significantly reduced compared to the same strain infection lacking 2b gene (Diaz-Pendon *et al.*, 2007). Furthermore, [84] demonstrated that 2b and AGO1 proteins interacted *in vitro* and *in vivo* by transient co-expression or crosses between *A. thaliana* expressing each protein, followed by specific immunoprecipitation assays. Also, protein 2b might suppress RNA silencing in some extent by blocking AGO1, due to the evidence that protein 2b inhibit AGO1 slicer activity *in vitro* (Zhang *et al.*, 2006). In this line, 2b protein is capable of interacting with protein AGO4, mainly in the nucleus of infected cells (González *et al.*, 2010). In 2b transgenic *A. thaliana* and CMV infection affected the regulation of transposons, mimicking the AGO4 phenotype. Thus, 2b alters plant defense by interfering with AGO4-regulated transcriptional gene silencing (Hamera *et al.*, 2016).

2b protein colocalizes with Fib in nucleoli and associated bodies. Although, González *et al.* (2010) just reported a colocalization and not an interaction. PVA-NIa (Rajamäki y Valkonen, 2009) and RSV-P2 (L. Zheng *et al.*, 2015), both VSRs, interacts with Fib in nucleoli and CBs. This evidence, and that the 2b VSR activity relies significantly on the nucleoli (Du *et al.*, 2014; González *et al.*, 2010; Hamera *et al.*, 2016) suggests a possible interaction between 2b and Fib. If this is the case, Fib might play a role in 2b VSR activity, mainly due to its RNA binding ability and the pivotal movement through CBs and nucleoli (Rodríguez-Corona *et al.*, 2015).

Rice stripe virus – p2

RSV p2 is capable to interact with Fib in the nucleolus and CBs in *N. benthamiana* cells (Table 1) (L. Zheng *et al.*, 2015, 2018). [63] found that either NbFib2 or RSV p2 depletion prevents the systemic movement of RSV in *N. benthamiana* plants.

As mentioned above, p2-Fib interaction occurs in the nucleolus and CBs of *N. benthamiana* cells but not in the cytoplasm (L. Zheng *et al.*, 2015, 2018). GRV-ORF3 (Kim *et al.*, 2007b; Sang *et al.*, 2007a) and satBaMV-P20 (Chang *et al.*, 2016) export Fib from the nucleolus and CBs to the cytoplasm to form vRNPs for its LDM. The lack of a p2-Fib cytoplasmic interaction and formation of vRNPs, indicates that the mechanism of Fib for LDM in RSV infection is different from the GRV (Kim *et al.*, 2007b; Sang *et al.*, 2007a) and satBaMV infection (Chang *et al.*, 2016) or has another role necessary for RSV-LDM.

Another host protein (from *Oryza sativa*) interactor of RSV p2 is a homologue of *Arabidopsis* suppressor of gene silencing (AtSGS3), designated as OsSGS3 (Os12g09580). AtSGS3 is a cofactor of RDR6 and

CAPÍTULO V FIBRILARINA Y VIRUS DE PLANTAS

has been implicated in antiviral silencing (Dalmay *et al.*, 2000; Fukunaga y Doudna, 2009; Glick *et al.*, 2008; Mourrain *et al.*, 2000; Muangsan *et al.*, 2004). YTH and BiFC experiments demonstrated that the interaction between p2 and OsSGS3 occurred in the cytoplasm and nucleus. The expression of the RSV p2 gene enhanced infectivity and pathogenicity of *Potato virus X* in *N. benthamiana*, indicated the functional role of p2 as a silencing suppressor (Du *et al.*, 2011). The VSR activity of RSV p2 in the nucleus and the p2-Fib interaction in CBs and the nucleolus suggests a potential Fib's role in the suppression of RNA silencing.

Mulberry mosaic dwarf-associated virus – V2

Plant RNA viruses are not exclusive to show an interaction with Fib. The Mulberry mosaic dwarf-associated virus (MMDaV), a novel, unsigned species of the family *Geminiviridae*, a DNA-based genome virus, has been found to interact with Fib (D. Wang *et al.*, 2020).

[95] showed that MMDaV V2 inhibited local RNA silencing and LDM of the RNA silencing signal, but not short-range spread of the GFP silencing signal in *N. benthamiana* plants expressing GFP. In addition, V2 was spotted to both subnuclear foci and the cytoplasm (in the absence of virus infection). Deletion mutagenesis of V2 identified the basic motif (61 to 76 a.a) as crucial for V2 to form subnuclear foci and for suppression of RNA silencing. Further investigation on the V2 subnuclear localization demonstrated an interaction with NbFib2 through Y2H and BiFC in plant cells (Table 1). A V2 NLS (from amino acids 61-77) mutant was assayed and did not interact with NbFib2 (D. Wang *et al.*, 2020). Interestingly, V2 could not colocalize with NbFib2 in the nucleolus in the context of MMDaV infection, whereas V2 was found in the nucleoplasm.

MMDaV encodes five ORFs (V1-V5) and two ORFs (RepA and Rep) on the virion-sense and the complementary-sense strands, respectively (Ma *et al.*, 2015). Different agrobacteria cultures harboring each MMDaV viral proteins were infiltrated into RFP-H2B *N. benthamiana* plants leaves together with bacterium containing the construct GFP-V2. The exclusion of V2 from the nucleolus to the nucleoplasm was only possible when V2 was coinfiltrated with RepA. The plausible interaction of V2-RepA was confirmed via Y2H and through BiFC was limited to the nucleoplasm. Evenly, V2 was observed to form homodimers and RepA excluded it as well to the nucleoplasm. Furthermore, RepA mediates nucleolar exclusion of V2-NbFib2 complex verified by BiFC in RFP-H2B plant leaves (D. Wang *et al.*, 2020).

Plants evolved to limit viral replication and spread of RNA- and DNA-encoded viruses by different mechanisms. RdRp and Dicer-like (DCL) proteins target RNA viruses to generate siRNAs, and then catalyse additional cleavage of viral RNA. DNA viruses also generate small RNAs that are subject to RNA-directed DNA methylation (RdDM) (Matzke y Mosher, 2014; Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2009). Both,

CAPÍTULO V FIBRILARINA Y VIRUS DE PLANTAS

RNA- and DNA-based viruses encode silencing suppressors to limit the host plant defenses. The begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) V2 protein suppress the RdDM pathway through its localization to the CBs to interact with AGO4. TYLCV V2 protein colocalize with Fib at the nucleolus and CBs (L. Wang *et al.*, 2019), where V2 triggers its suppressor activity. MMDaV RepA protein excludes V2-NbFib2 complex from the nucleolus to the nucleoplasmic sites (D. Wang *et al.*, 2020) where Fib as a CB marker (Rodriguez-Corona *et al.*, 2015) might serve as an anchor to locate V2 and exert its function. Thus, MMDaV V2 protein might suppress RdDM at the CBs as TYLCV V2 protein. Nevertheless, it needs to elucidate whether V2-NbFib2 interaction is required for V2 to suppress RNA silencing.

Author contributions

Stefano Declé, contributed with the writing and research for the review.

Dr. Luis Carlos Contributed with the editing and managing.

Dr. Enrique Castano Defined the subject rewrite and overall management of the review and defined the model.

Funding This research was funded by CONACYT project FC 1572 and CB-2016-286730-Z-0142.

Data availability There is no additional data, Not applied.

Code availability Not applied.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Ethical approval Yes.

Consent to participate Yes, all participants give full consent for this review.

Consent for publication Yes, from all participants.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

Current research on viral proteins that interact with fibrillar

Molecular Biology Reports, 2022 (Aceptado, en proceso para publicación).

Esta segunda revisión recopila la información más relevante sobre la asociación de la FBL y virus de animales con el fin de identificar patrones y proponer nuevas preguntas de investigación. Para la presente tesis, esta revisión al igual que la primera, sirvió como pauta para formular la hipótesis.

CAPÍTULO VI FIBRILLARINA Y VIRUS DE ANIMALES

Current research on viral proteins that interact with fibrillarin

Stefano Decle-Carrasco¹, Alma Laura Rodríguez-Piña¹, Andrea Bayona Hernandez¹ Luis Carlos Rodríguez-Zapata ², Enrique Castano^{1*}

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo. Mérida, Yucatán, México.
2. Unidad de Biotecnología. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo. Mérida, Yucatán, México.

*Correspondence: enriquec@cicy.mx

Abstract

The nucleolus is a multifunctional nuclear domain, primarily dedicated to ribosome biogenesis. Certain viruses developed strategies to manipulate host nucleolar proteins to facilitate their own replication, by modulating ribosomal RNA (rRNA) processing. This association interferes with nucleolar functions resulting in overactivation or arrest of ribosome biogenesis, induction or inhibition of apoptosis and affecting stress response. The nucleolar protein, Fibrillarin (FBL), is an important target of some plant and animal viruses. FBL is an essential and evolutionary highly conserved S-adenosyl methionine (SAM) dependent methyltransferase, capable to degrade rRNA by its intrinsically disordered region (IDR), the glycine/arginine-rich (GAR) domain. It forms a ribonucleoprotein complex that directs 2'-O-methylations in more than 100 sites of pre-rRNAs. It is involved in multiple cellular processes, including initiation of transcription, oncogenesis, and apoptosis, among others. The interaction with animal viruses, including human viruses, triggered its redistribution to the nucleoplasm and cytoplasm, interfering with its role in pre-rRNA processing. Viral-encoded proteins with IDRs as nucleocapsids, matrix, Tat protein, and even a viral snoRNA, those are able to associate with FBL, forcing the nucleolar protein to undergo atypical functions. Here we review the molecular mechanisms employed by animal viruses to usurp FBL functions and the effect on cellular processes, particularly in ribosome biogenesis.

Keywords: fibrillarin, animal viruses, human viruses, nucleolus, ribosome biogenesis, intrinsic disordered region

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

Introduction

The nucleolus is the most extensive membrane-less nuclear body. Although it is physically separated from the nuclear space, it is accessible for dynamic exchange. Mammalian cell nucleoli, which are the best studied, contains three phase-separated subcompartments: the fibrillar center (FC), the dense fibrillar component (DFC) and the granular component (GC). The FC and DFC form a functional unit that is distributed in multiple copies throughout a single GC (Thiry & Lafontaine, 2005). In addition, the nucleolus is often surrounded by a ring of condensed chromatin also known as perinucleolar chromatin, enriched in specific genes to react to the environment and other stimuli (Németh *et al.*, 2010). The nucleolus' primary role are the initial steps of ribosomal biogenesis, including: RNA polymerase I (Pol I)-driven transcription, processing and modification of ribosomal RNA (rRNA) and the assembly of rRNA containing complexes (Boisvert *et al.*, 2007). Then precursor subunits move from the nucleolus to the nucleoplasm and ultimately to the cytoplasm for further maturation, thus, resulting in functional ribosomal subunits ready to participate in mRNA translation into protein. These initial steps, are proposed to be coordinated by liquid-liquid phase separation (LLPS) (this model is reviewed in (Lafontaine, 2019; Yao *et al.*, 2019)), since there is strong evidence that the multilayered architecture of the nucleolus arises from multiphase liquid immiscibility (Feric *et al.*, 2016). The nascent transcripts are synthesized in FC and directed to DFC by the interaction of the 5' end of 47S pre-rRNA and the methyl transferase domain (MD) of fibrillarin (FBL). Then, the FBL-RNA complexes translocate to the DFC by the glycine- and arginine-rich (GAR) domain of FBL, self-association. FBL self-association through its GAR domain, an intrinsically disordered region (IDR), strongly correlates with such pre-rRNA sorting, and is required for pre-rRNA processing. In fact, the methylation activity of FBL is not required for rRNA sorting (Yao *et al.*, 2019).

Most nucleolar proteins contain IDRs (Stenström *et al.*, 2020) and many IDRs have been shown to undergo LLPS *in vitro*, while IDR containing-proteins have been implicated in numerous condensates (Elbaum-Garfinkle *et al.*, 2015; Nott *et al.*, 2015). Disordered proteins increase the interaction valency, since they are capable of establishing protein-protein and RNA-protein interactions, which are key for phase separation (Lafontaine *et al.*, 2020). LLPS are condensates that allow control over the molecular environment and promote rapid exchange between elements. In addition to protein composition (IDRs), concentration plays a critical role to establish

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

LLPS (Alberti *et al.*, 2019). For instance, FBL saturation concentration depends on the presence of RNA, so nearly actively transcribing rDNA, FBL preferential condensation arises from the high RNA concentration there (Berry *et al.*, 2015). This is particularly important in nucleolar stress, where nucleolar proteins are redistributed, decreasing its concentration and affecting the LLPS in nucleolar processes. An analysis of the sequences of human and animal viruses-encoded proteins known to associate with FBL, described in Table 1 evidences one or more IDRs, an SR, and RGG-rich regions. This could be expected since viral proteomes are characterized by the dominance of short disordered segments (Xue *et al.*, 2014) as illustrated in Fig. 1. Interestingly, IDPs can bind to globular proteins, but also with other IDPs, since the GAR domain (an IDR) tends to be the binding region of viral proteins (Mészáros *et al.*, 2011).

Table 1 Animal and human virus-encoded proteins and snoRNA described to associate with FBL

Virus name	Genome	Virus-encoded protein	Putative function	References
Infectious bronchitis virus	(+)ssRNA	Nucleocapsid	Undetermined	(Chen <i>et al.</i> , 2002)
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	(+)ssRNA	Nucleocapsid	Undetermined	(Yoo <i>et al.</i> , 2003)
Mouse hepatitis virus	(+)ssRNA	Nucleocapsid	Transcription and/or translation of viral mRNAs	(Hilton <i>et al.</i> , 1986; Chen <i>et al.</i> , 2002)
White spot syndrome virus	dsDNA	Nucleocapsid (VP15)	Undetermined	(Xing y Shi, 2011)
Influenza A H3N2	(-)ssRNA	non-structural protein 1 (NS1)	Impairment of pre-rRNA processing	(Melén <i>et al.</i> , 2012)

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

Human immunodeficiency virus	(+)ssRNA	Tat protein	Impairment of pre-rRNA processing	(Ponti <i>et al.</i> , 2008)
Epstein-Barr virus	dsDNA	v-snoRNA1	Impairment of pre-rRNA processing	(Hutzinger <i>et al.</i> , 2009)
Hendra virus	(-)ssRNA	Matrix	Viral replication and IRES-dependent translation of viral mRNAs	(Deffrasnes <i>et al.</i> , 2016)

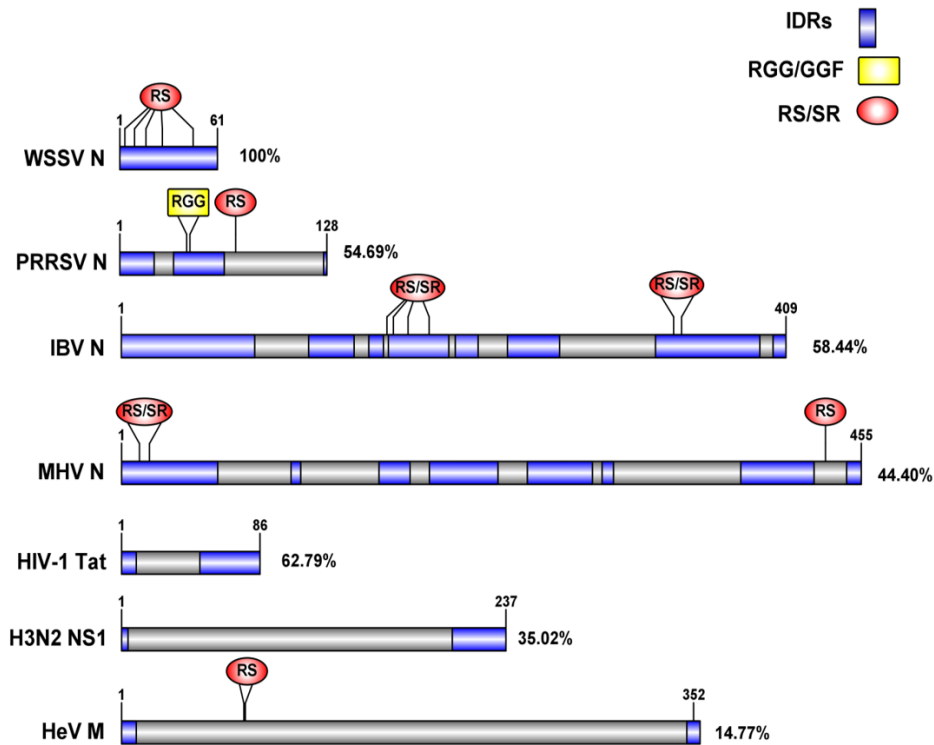


Fig. 1 IDR prediction, SR boxes, and RGG sequences of animal and human viruses-encoded proteins known to associate with FBL. Disorder percentage is indicated.

FBL is an essential protein that has been conserved in sequence and function throughout evolution (Jansen *et al.*, 1991; Ochs *et al.*, 1985; Rodriguez-Corona *et al.*, 2015). During interphase of HeLa cells, it localizes at the transition zone of FC and DFC, as well in the Cajal

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

Bodies (CBs). CBs are small nuclear organelles observed in plant and animal nuclei. CBs can be localized to the nucleolar periphery or within (Dundr *et al.*, 2004; Gall, 2000). Primarily, they are involved in the processing of small nuclear RNAs and small nuclear ribonucleoproteins (RNPs) (Gall, 2000). CBs disappear from prophase nuclei and reappear in late G1 (Gall, 2003). Thus, during prophase, FBL is directed to the chromosomal periphery until anaphase (Takata *et al.*, 2007; Uchiyama *et al.*, 2005). Then, during telophase, FBL is significantly accumulated in prenuclear bodies, which indicate its role in nucleolar assembly (Fomproix *et al.*, 1998). In early G1 phase, FBL localizes in condensed chromatin of nuclei. Depletion of *FBL* by siRNA (with a reduction of > 70% expression levels) in HeLa cells, showed nuclear morphology defects. Whereas, nucleolin depletion, another abundant nucleolar protein, did not affect nuclear morphology. Also, FBL depletion in HeLa cells, showed a decreased cell growth. This reduction is thought to arise due to a delay at the G2-M transition of the cell cycle, rather than a direct defect in DNA synthesis (Amin *et al.*, 2007). Thus, FBL is involved in nuclear maintenance and cell growth in HeLa cells.

FBL catalyzes the 2'-O-methylation (2'-O-Me) of pre-rRNA (Tollervey *et al.*, 1993), and regulates rRNA transcription by methylating histone H2A (Loza-Muller *et al.*, 2015; Tessarz *et al.*, 2014). In eukaryotes, FBL forms a RNP complex with Nop56, Nop58, and 15.5ka proteins, that is guided by one of several C/D box small nucleolar RNAs (snoRNA). This complex is responsible for more than 100 sites of methylations in pre-rRNA, depending on the organism (Dunbar *et al.*, 2000).

In eukaryotes, FBL N-terminal domain consists of: GAR domain, which is an IDR, and a spacer region. A novel ribonuclease activity for rRNA was described within the GAR domain of human FBL 1 and *Arabidopsis thaliana* FBL 2 (AtFib2) (Guillen-Chable *et al.*, 2020; Rodriguez-Corona *et al.*, 2017b). Its ribonuclease activity is affected by phosphoinositides and phosphatidic acid. The GAR domain contains a nucleolar localization signal (NoLS), and is responsible to interact with multiple cellular and viral proteins (Decle-Carrasco *et al.*, 2021; Rodriguez-Corona *et al.*, 2015). The binding of phosphoinositides and FBL may facilitate phase separation necessary for pre-rRNA processing and DFC formation. This ribonuclease activity is blocked when U3 is bound (Guillen-Chable *et al.*, 2020). The most abundant snoRNA, U3, despite to complex with FBL, does not methylates pre-rRNA, but aids in its cleavage (Granneman *et al.*, 2004; Stamm & Lodmell, 2019). On the other hand, the FBL C-terminal end has an RNA-binding motif (Aris & Blobel, 1991) and a conserved structure of β -sheets and α -helical domains, which constitute the AdoMet-

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

dependent MT domain (Deng *et al.*, 2004). The alpha-helix domain interacts with Nop56 protein, which is indispensable for the association with the C/D box snoRNPs (Lechertier *et al.*, 2009).

FBL has been targeted for distinct types of stresses. FBL is implicated in human prostatic intraepithelial neoplasia that can progress to prostate cancer (Koh *et al.*, 2011) and in human adenocarcinoma (Miller *et al.*, 2012). In breast cancer, tumors express high levels of *FBL* (Marcel *et al.*, 2013), however, low levels of *FBL* have been found as well (Nguyen Van Long *et al.*, 2022). p53 decreases the expression and protein level of FBL by interacting with *FBL* intron 1 sequence, that contains a p53 regulatory site. Reduced levels of p53 in breast cancer cells, results in an increased level of FBL, which promotes abnormal methylations in rRNA that affects translational fidelity, and an increased internal ribosomal entry sites (IRES) of key cancer genes (Marcel *et al.*, 2013). Furthermore, FBL also has been targeted by a plant viruses and animal viruses. In certain plant viruses, FBL has been reported to participate in cell-to-cell and long-distance movement (LDM), and a putative role in virus-mediated suppression of RNA silencing (for a review, see reference (Decle-Carrasco *et al.*, 2021)). The viral proteins known to associate with FBL from animal and human viruses (Table 1), differ in function but their coding sequences has common features, for example IDR, RNA-binding domains (RBDs), nuclear and nucleolar localization signals (NLS/NoLS). Such motifs may be crucial for the association with FBL (Fig. 2). Here, we review the molecular mechanisms of human and animal viruses to manipulate FBL and the implications over the host-cell processes, such as ribosome biogenesis.

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

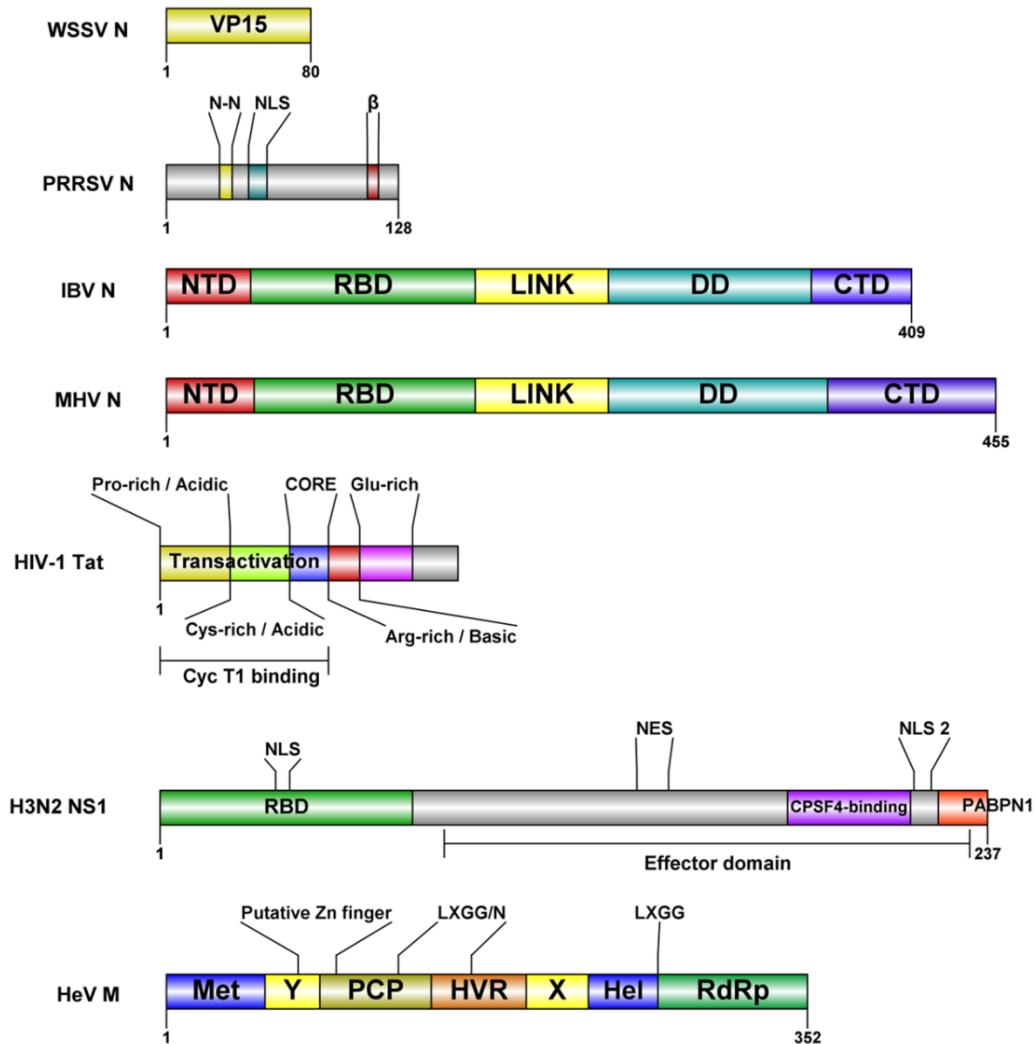


Fig. 2 Domains of viral proteins that are associated with FBL. WSSV (white spot syndrome virus) Nucleocapsid protein VP15 (Boonyakida *et al.*, 2021); PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus) Nucleocapsid domains: N-N, N protein-N protein interactive domain (Yoo *et al.*, 2003); NLS, nuclear localization signal (Rowland *et al.*, 1999); β -strand conserved among arteriviruses (Wootton *et al.*, 2002); IBV (infectious bronchitis virus) and MHV (mouse hepatitis virus) Nucleocapsid domains: NTD, predicted intrinsically disordered N-terminal domain; RBD, RNA-binding domain; LINK, predicted disordered central linker; DD, dimerization domain; CTD, predicted disordered C-terminal domain (Millet & Whittaker, 2015); HIV-1 (human immunodeficiency virus-1) Tat protein: transactivation site (Proline and Cysteine rich acidic site; CORE), arginine rich basic site (functions as a RNA-binding domain (RBD), a protein transduction domain (PTD) and nuclear localization signal (NLS), glutamine-rich region (Clark *et al.*, 2017);

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

Influenza A H3N2-NS1 protein domains: RBD, RNA binding domain; NLS, nuclear localization signal; Effector domain: NES, nuclear export signal; NLS2, nuclear localization signal; CPSF4, factor subunit 4; PABPN1, polyadenine binding protein 1 (Rosário-Ferreira *et al.*, 2020); HeV (Hendra virus) Met, methyl transferase; X and Y domains, PCP, a papain-like cysteine protease; HVR, proline-rich hypervariable region, Hel, RNA helicase; RdRp, RNA-dependent RNA polymerase (Pallerla *et al.*, 2020).

Nucleocapsid proteins tends to redistribute FBL

FBL has been shown to co-localize with the nucleocapsid of different mammalian viruses, including white spot syndrome virus (WSSV), infectious bronchitis virus (IBV), mouse hepatitis virus (MHV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) (H. Chen *et al.*, 2002; F. Q. Li *et al.*, 2005; Xing & Shi, 2011; Yoo *et al.*, 2003; You *et al.*, 2005). The infection of these viruses and the expression of the nucleocapsid without its respective virus, results in a redistribution of FBL to the perinuclear region where transcription and RNA metabolism takes place in the host cell. Such redistribution of FBL may affect the early steps of pre-rRNA processing, since the nascent transcripts emerge in the FC-DFC interface where are bound to the RBD of FBL to finally be sorted (as a complex) to the DFC to initiate the pre-rRNA processing (Fig. 3a) (Lafontaine *et al.*, 2020). Interestingly, just SARS-Cov N protein has been reported to relocalize a fraction of FBL to the cytoplasm (Fig. 3b) (F. Q. Li *et al.*, 2005). Compared to adjacent uninfected cells or mock-infected cells, FBL forms its classic “Christmas tree-like” structure (Aris & Blobel, 1991). In fact, Chen *et al.* (2002) reported that after 20 fields of view in duplicate experiments, the Christmas tree-like structure was inexistent in observed IBV-infected cells. On the other hand, the localization of nucleocapsid proteins were primarily cytoplasmic and nuclear, but in a speckled pattern. In virology, these speckled structures are formed within the nucleus, commonly functioning as a viral assembly matrix or a RNA transcription site (Pyper *et al.*, 1998). However, it seems that the subcellular localization of nucleocapsid protein depends on the infection stage. Yoo *et al.* (2003), tracked the subcellular distribution of PRRSV N protein through infection time. From 6 to 20 h p.i., the localization was mainly nuclear and nucleolar, whereas by the time of 30 to 48 h p.i., turns exclusively cytoplasmic (Wootton *et al.*, 2002). It is important to highlight that these findings were carried out in different cell lines, such as Vero or HeLa cells, and the observations were similar, indicating that the redistribution of FBL is a potential common feature and not unique for a particular cell line.

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

Just the N protein of PRRSV is known, to our knowledge, to form a physical association with FBL (Yoo *et al.*, 2003). The *in vivo* interaction of PRRSV N- FBL complex was confirmed by the mammalian two hybrid assay in HeLa cells. This result was corroborated *in vitro* by the GST-pull down assay. Furthermore, by a series of deletion mutants from both, PRRSV N protein and FBL, the authors identified that the FBL GAR domain and eight (₃₀IAQQNQSR₃₇) amino acids of PRRSV N protein, are the interactive domains (Yoo *et al.*, 2003). Unfortunately, interaction assays between the nucleocapsids mentioned above and FBL are pending to be done. Alternatively, PRRSV N is known to bind not just viral genomic RNA but also with rRNA. Yoo *et al.* (2003) investigated if the association with rRNA was involved with the FBL interaction. The addition of RNase A to an immobilized GST- FBL fusion protein on glutathione sepharose beads and incubated with radiolabeled PRRSV N protein, inhibited the interaction. In contrast, the absence of RNase A, enable the physical association. Thus, it is hypothesized that the rRNA binding makes a conformational change in N to establish a stable interaction with FBL. This might be the case, since the colocalization between both proteins did not occur in CBs, where traces of FBL exist at this subnuclear compartment but not rRNA. On the contrary, Chen *et al.* (2002) spotted the colocalization in a speckled pattern in the nucleus of Vero cells but expressing (distinct cell lines) the MHV and IBV N proteins, at what appears to be CBs. It seems that the co-localization at CBs varies from one virus to, another; even so, what remains constant is their distribution between the DFC and the FC within the nucleolus.

According to the findings of each N protein described in this section, the viral protein behaves in a similar manner with FBL. Further studies should be done in order to elucidate the precise role of this association. Another coronavirus with a possible interaction with FBL is the severe acute respiratory syndrome-2 (SARS CoV-2). SARS CoV-2 RNA interacts in the nucleolus with snoRNA U27 and is 2'-O-methylated, while 2'-O-Me levels in host RNAs decrease after SARS CoV-2 infection (S. L. Yang *et al.*, 2021). snoRNA U27 is responsible for 18S rRNA methylation and is associated with FBL, NOP56, NOP58 and NHP2L1 (Falaleeva *et al.*, 2016). These data may suggest that FBL is hijacked by the strong association between SARS CoV-2 RNA and U27 snoRNA, where U27 guide FBL to perform 2'-O-Me over SARS CoV-2 RNA. This idea corroborates the decrease 2'-O-Me levels in host RNAs, since significative amounts of FBL may be away from pre-rRNA processing. Unfortunately, there is no report for a SARS CoV-2/FBL interaction, however, it's most abundant protein, N, localizes in the cytoplasm and nucleolus (Ariumi, 2022), just as SARS CoV N (F. Q. Li *et al.*, 2005), suggesting it as a possible interactor. Nonetheless, the redistribution of FBL might affect ribosomal biogenesis, and consequently, the

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

host translation machinery. In fact, host cell translation is decreased under MHV infection, while viral mRNAs are unaffected or up-regulated (Hilton *et al.*, 1986). Therefore, N proteins might hijack FBL to disrupt their normal functions and for replication, transcription, and/or translation of viral RNAs.

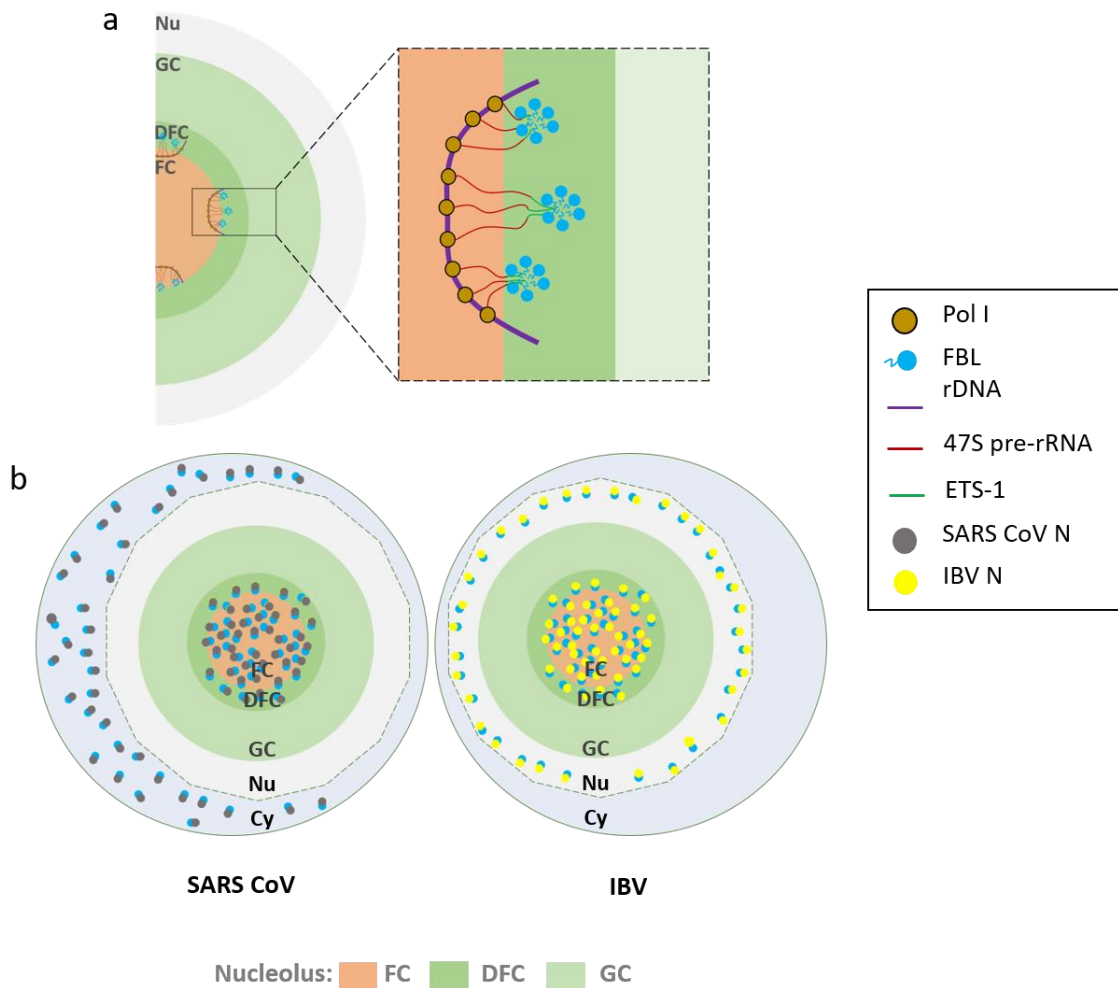


Fig. 3 Comparison of FBL redistribution by SARS CoV and IBV N proteins. (a) FBL nucleolar organization during nascent pre-rRNA sorting. Nascent transcripts synthesized in FC are pulled to the FC/DFC interface by the RBD of FBL. FBL diffuses to the DFC, where self-associates through its GAR domain. The IDR of the GAR domain establishes the DFC phase, where nascent transcripts move for initial pre-rRNA processing. See text for details. (b) Although SARS CoV and IBV binds FBL with the same viral protein (N), different redistribution of FBL occurs. While SARS CoV N (grey circles) co-localizes with FBL (blue circles) in the nucleolus and cytoplasm, IBV N (yellow circles) redistributes a fraction of FBL to the nucleus. Nu: nucleus; Cy: cytoplasm.

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

Human immunodeficiency virus-1 Tat protein hijacks FBL to impair pre-rRNA processing

The human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) encodes for two proteins that are imported to the nucleolus, Rev and Tat protein. NPM1 is reported to import both viral proteins to the nucleus which are then retained in the nucleolus through the interaction with nucleolar components (Arizala *et al.*, 2019; Kurnaeva *et al.*, 2022). Unlike the HIV-1 Rev protein, Tat protein localization depends on its expression level and so its function (Musinova *et al.*, 2016).

The HIV-1 Tat protein, regulates transcription of viral genes and manipulate diverse cellular processes, mainly nuclear, through the interaction with nuclear components (Mbonye & Karn, 2014; Romani *et al.*, 2010; van Lint *et al.*, 2013). HIV-1 Tat is classified as an intrinsically disordered protein (IDP) (Shojania & D. O'Neil, 2010), which may explain the ability to associate with several cellular components, since IDPs have greater surface area, giving the ability to bind multiple partners (Uversky *et al.*, 2005). In fact, through genome-wide occupancy of Tat protein on host cell chromatin in HIV-1-infected T-cells, 568 genes were identified to bind significantly to Tat protein. So, they might be acting as a transcriptional regulator, since Tat protein locates at the promoter of the 66% of the reported genes. This is actually the case for c-Rel, which is downregulated by the interaction of Tat with kappa B nuclear factor (NF κ B) binding sites on the promoter (Dhamija *et al.*, 2015).

Tat protein localization might depend on its cellular concentration. In Jurkat HIV-1 infected cells, the expression levels of Tat were high, the localization was nucleolar, conversely, when the levels were low, was nucleoplasmic (Coiras *et al.*, 2006). The same pattern occurred in stable transfected HeLa cells expressing Tat-GFP (Stauber & Pavlakis, 1998), meanwhile, in Tat transgenic *Drosophila melanogaster* cells, it localizes in both regions, although the concentration difference wasn't studied (Ponti *et al.*, 2008b). In addition, since Tat protein is secreted by infected cells and internalized by neighboring cells, its intranuclear concentration is lower than in infected cells, therefore the distribution is mainly nuclear, while in HIV-infected cells is nucleolar. Tat is able to modify host gene expression, indirectly or by direct interaction with the gene promoters (Dhamija *et al.*, 2015; Kukkonen *et al.*, 2014; Marban *et al.*, 2011), and according to the expression profiles of deregulated genes, a distinct subset of genes are regulated depending on its intranuclear concentration and localization. In Tat stable transfected Jurkat T cells (nucleoplasmic localization), deregulated genes are linked to viral carcinogenesis, stem cell pluripotency, B cell receptor signaling and cancers. Alternatively, nucleolar Tat in HIV-infected T

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

cells, deregulate genes involved mostly with ribosomal biogenesis (Musinova *et al.*, 2016). This is the case for *Drosophila* nurse cells expressing Tat protein, in which the levels 80S ribosome particles are reduced. Ponti *et al.* (2008), found that Tat affects at least cleavage site 1, impairing pre-rRNA maturation of *Drosophila* Tat expressing-cells. Tat protein immunoprecipitates with FBL and with U3 snoRNA. Thus, the inhibition of pre-rRNA processing by Tat might be induced through the interaction with these key nucleolar components for the early steps of pre-rRNA processing, preventing them to function in ribosomal biogenesis (Fig. 4). Therefore, Tat protein might interfere with FBL binding to the 5' end of nascent 47S pre-rRNA. In concordance with this, *FBL* knockdown in HeLa cells showed aberrant accumulation of 47S and 34S pre-rRNAs, accompanied by reduced 28S and 18S rRNAs (Yao *et al.*, 2019). Ponti *et al.* (2008) reported a co-localization of Tat protein and FBL at the nucleoplasm and nucleolus, indicating a redistribution of FBL, since during interphase, FBL localizes in the transition zone between FC and DFC, which is transcriptionally active (Rodriguez-Corona *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2019).

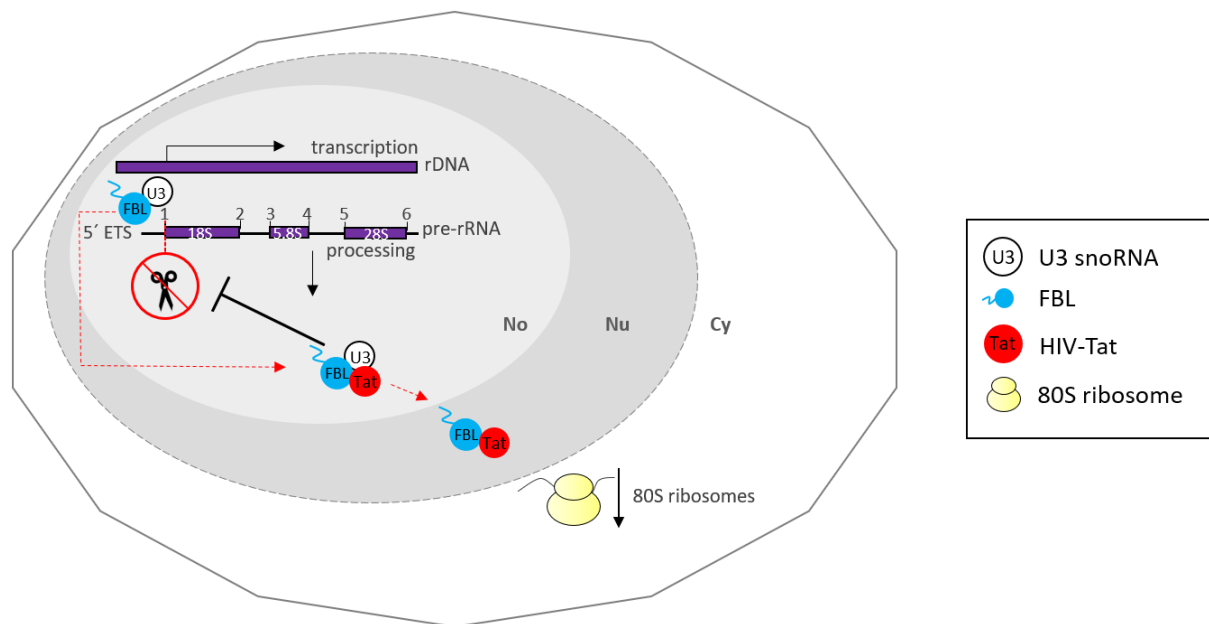


Fig. 4 Association of HIV Tat with FBL and U3 snoRNA impairs pre-rRNA processing. In HIV-infected cells, nucleolar Tat protein inhibits the processing of the pre-rRNA by subtracting (red dotted arrow indicates movement) FBL and U3 snoRNA from the initial cleavage of ETS-18S pre-rRNA. The Tat-mediated FBL redistribution to the nucleoplasm, as well, affects pre-rRNA processing, and a reduced 80S ribosome particles levels. No: nucleolus; Nu: nucleus; Cy: cytoplasm.

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

Hendra virus orchestrate FBL 2'-O-Me to influence proviral host genes and viral proteins synthesis

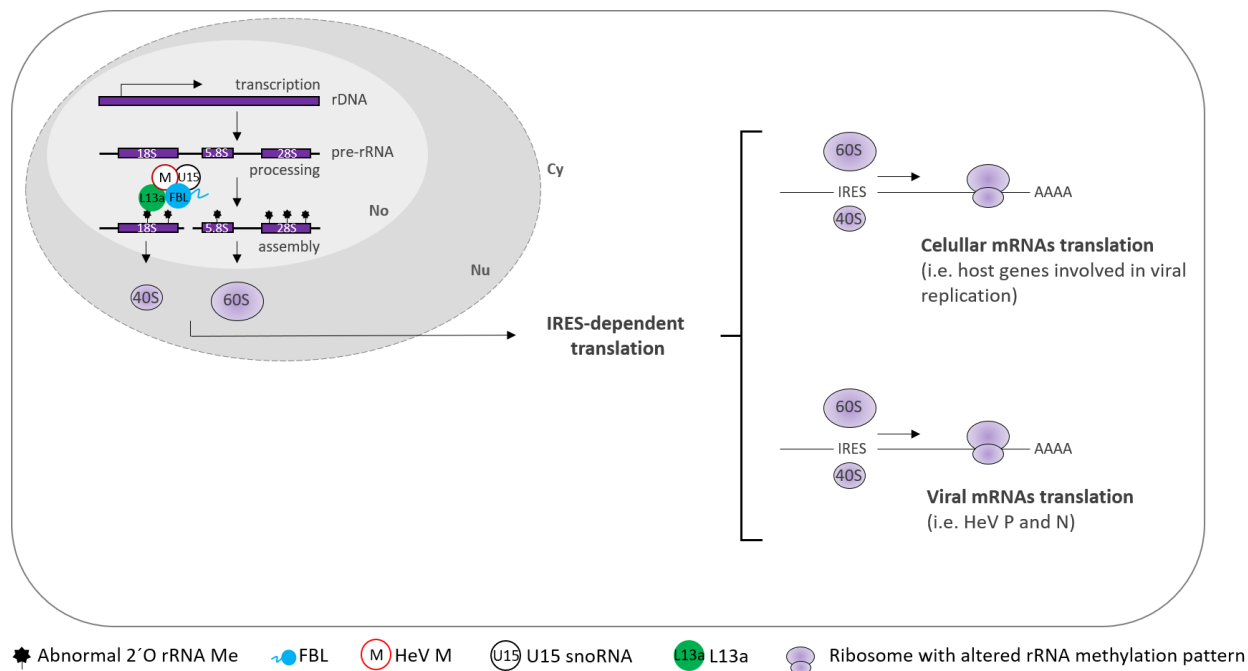
Hendra virus (HeV) and Nipa virus (NiV), both highly pathogenic viruses transmitted from bats to animals and humans, belongs to the Henipavirus genus classified in Paramyxoviridae family (Broder & Wong, 2016). Both viruses require an overlapping subset of host genes for infection. A genome-wide analysis of host genes required for henipavirus infection identified multiple genes involved in ribosomal biogenesis, nuclear export/import and transcriptional regulation. From 585 proviral genes identified, FBL exhibited the highest impact on henipavirus infection. HeV and NiV infection was inhibited more than 99.9% by *FBL* knockdown. Deffrasnes *et al.* (2016) tested the dependency to FBL of cytoplasmic replicating viruses belonging to different genera in the same subfamily: measles virus (MeV, genus Morbillivirus), mumps virus (MuV, genus Rubulavirus), respiratory syncytial virus (RSV, genus Pneumovirus), and a nuclear replicating virus: influenza A/WSN/33. Interestingly, the cytoplasmic replicating virus showed a significant reduction in titer cells transfected with siFBL, with exception of the nuclear replicating virus. In general, it seems that FBL is a key factor for paramyxovirus infection, in general.

The link between FBL and paramyxoviruses, prompted to Deffrasnes *et al.* (2016) to elucidate the precise role across the viral cycle. HeV-infected HeLa cells transfected with siFBL resulted in significant reduced levels of viral RNA. The same pattern occurred to HeV gene expression levels, since P and N (the most abundant viral proteins) synthesis was barely detected in HeV-infected cells treated with siFBL. (+)ssRNA viruses do not contain 5' cap, so its viral protein synthesis is initiated through IRESs translation initiation. IRES-dependent translation is influenced over CAP-dependent translation by rRNA 2'-O-Me (Yi *et al.*, 2021). In breast cancer cells, changes in FBL expression were correlated with alterations of rRNA 2'-O-Me levels, with efficient translational initiation of mRNAs containing IRES elements (Marcel *et al.*, 2013). Another host gene required for Henipavirus infection was L13a, a protein necessary for rRNA methylation and IRES-mediated translation (Chaudhuri *et al.*, 2007). Co-immunoprecipitation and co-localization assays demonstrate that FBL complex with L13A and U15 snoRNA (Basu *et al.*, 2011). Therefore, it is conceivable that HeV orchestrate FBL methylation to influence proviral host genes and viral protein synthesis (Fig. 5), since these viruses are known to target host translation factors to shut down translation and/or boost viral translation (Mailliot & Martin, 2018).

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

The requirement of the methylation activity of FBL for henipavirus infection was studied through a rescue experiment. HeLa cells were transfected with siFBL-2 to knock down endogenous *FBL* expression, then transfected with a plasmid encoding a yeast *FBL* (*NOP1*) E191A mutant, a mutation that impaired the methylation activity *in vitro*, followed by infection with HeV. The E191A mutant was not able to rescue HeV infection, compared to control cells. Thus, suggesting that the methylation activity of FBL is required for HeV infection. Furthermore, to corroborate if the methylation of pre-ribosomes by FBL is specifically the target of henipaviruses, Deffrasnes *et al.* (2016) reduced the expression of NOP56 and NOP58 by SMART pool siRNAs and test the impact on HeV infection. Depletion of either NOP56 or NOP58 impaired HeV infection, as measured by TCID50 assays and immunofluorescence. In summary, these findings support the idea that henipavirus infection exploit the role of FBL in pre-rRNA processing.

In addition, by confocal microscopy and reciprocal co-immunoprecipitation studies, the HeV matrix (M) was shown to colocalize with FBL in the nucleolus and in a lesser extent in the nucleoplasm, and to associate directly or indirectly, respectively (Deffrasnes *et al.*, 2016). However, the interaction still needs to be determined. Since FBL is well documented to localize in nucleoli during interphase, HeV infection might redistribute a small fraction of FBL to the nucleoplasm.



CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

Fig. 5 HeV infections orchestrate FBL 2'-O-Me to influence proviral host genes and viral proteins synthesis by IRES-dependent translation. During HeV infection, viral M proteins (by an unknown mechanism) alter pre-rRNA 2'-O-Me by physically interacting with FBL, U15 snoRNA and protein L13a in the nucleolus. HeV M manipulates FBL 2'-O-Me to induce IRES-dependent translation of proviral host genes (containing IRES elements) and HeV proteins. No: nucleolus; Nu: nucleus; Cy: cytoplasm.

Epstein-Barr virus v-snoRNA1 assemble with FBL and NOP56/58

The snoRNAs are the type of regulatory elements responsible for posttranscriptional rRNA maturation, of two different modifications, the C/D box snoRNAs and H/ACA box snoRNAs, which catalyzes 2'-O-Me and pseudouridylations, respectively (Ganot *et al.*, 1997). Particularly, C/D box snoRNAs are typically 70–90 nt long and serves as the scaffold for the assembly of snoRNP, including FBL (Henras *et al.*, 2004). Several of the known C/D box snoRNAs do not have a predicted rRNA target, so they are classified as “orphan”. Alternatively, some C/D box snoRNAs have been found to associate with proteins other than FBL, NOP56/58 and 15.5. Indicating that C/D box snoRNAs can associate into complexes lacking a methylase.

Evidence indicates that snoRNAs are crucial for viral infectivity (Stamm & Lodmell, 2019). Although, most viruses do not encode snoRNAs and mainly RNA viruses use C/D box snoRNAs, Epstein-Barr virus (EBV) (dsDNA genome) is the exception. EBV belongs to the γ -subfamily of herpesvirus and infects approximately 95% of the world's population (Peng *et al.*, 2020). EBV encodes a viral-specific v-snoRNA1. In fact, v-snoRNA1 is conserved within various EBV strains and among evolution. It is suggested that v-snoRNA1 serve in both the latent and lytic mode of infection, but with different functions (Hutzinger *et al.*, 2009). Interestingly, v-snoRNA1 was shown to co-localize and assemble in the nucleolus with NOP56/58 and FBL while U3 snoRNA, co-localized in the nucleolus with v-snoRNA1 as well. FBL is present in the U3 complex; however, U3 does not methylate pre-rRNA, but aids in its cleavage (Granneman *et al.*, 2004). *In vitro* studies determined that human FBL has a ribonuclease activity for rRNA, and this second activity is blocked when U3 is bound (Guillen-Chable *et al.*, 2020). Hence, v-snoRNA1 might compete for FBL and NOP56/58 against U3 snoRNA, affecting pre-rRNA maturation and, in the process, affect efficient protein synthesis. Hutzinger *et al.* (2009), classified v-snoRNA1 as an “orphan” snoRNA, since neither ribosomal or spliceosomal RNA were determined as targets. Also, by comparing a null mutant of v-snoRNA1 against its wild type version, it was concluded that the Δ v-snoRNA1

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

mutant remained indistinguishable from its wild type counterparts in terms of lytic replication, infection and B cell transformation. However, the increment up to 30-fold expression levels upon induction of the lytic replication cycle, undoubtedly assure the relevance of v-snoRNA1 particularly at this stage of infection. Studies may be conducted in order to establish the precise role of EVB v-snoRNA1.

Influenza A H3N2 NS1 arrests rRNA transcription by the interaction with nucleolin, B23 and FBL

Influenza virus A (IAV) is a (-)ssRNA virus capable of translating viral mRNAs while attenuating host protein synthesis (Yángüez & Nieto, 2011). IAV has evolved a mechanism where the 5'-m⁷G cap is excised from host mRNAs and snoRNAs, which serves as a primer to synthesize the viral (+)-sense mRNA, and ultimately the synthesis of a 3' poly(A) tail from a poly(U) stretch. Once the viral mRNAs are exported to the cytoplasm, the mechanism of translation remains elusive. Just as in poliovirus and encephalomyocarditis virus infection, IAV is proposed to induce mTOR pathway and activate the 4E binding proteins (4EBP). 4EBP sequester eIF4E preventing the interaction with eIF4G, inhibiting canonical cap-dependent translation initiation. Thus, it is believed that the viral mRNAs translation might be independent of 5' cap recognition by eIF4E.

The genome of IAV is segmented in eight RNAs that encode for 12 viral structural and nonstructural proteins (Jagger *et al.*, 2012). Among those viral proteins, the non-structural protein 1 (NS1), is one of the major virulence factors. IAV NS1 is a multi-functional protein, with a N-terminal dsRNA-binding domain and a C-terminal effector domain. It plays essential roles to counteract immune responses of the infected hosts (Z. Chen *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2007; Min & Krug, 2006; Nemeroff *et al.*, 1998; Opitz *et al.*, 2007). All types of NS1 have an N-terminal nuclear localization signal 1 (NLS1), but particularly the H3N2 NS1 has an additional NLS2 within the C-terminal domain, which also functions as a NoLS. Thus, only the NS1 protein of IAV H3N2 subtype virus is characterized to distribute inside the nucleolus (Melén *et al.*, 2007, 2012). Interestingly, the NS1 protein of the human H3N2 virus interacts through the NLS2/NoLS and in a minor extent the NLS1 with the main nucleolar proteins; nucleolin, B23 and FBL. Moreover, confocal laser microscopy revealed that the NS1 protein co-localizes with nucleolin in the nucleolus and nucleoplasm, while with B23 and FBL only in the nucleolus of IAV/Udorn/72 virus-infected A549 cells (Melén *et al.*, 2012; Murayama *et al.*, 2007). B23/nucleophosmin is a nucleolar phosphoprotein involved in 28S rRNA processing and ribosome assembly that localized in the

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

GC. Knocking down B23 inhibits the processing of pre-rRNA leading to cell death. On the contrary, the overexpression promotes S-phase entry in cells lacking p53 (Itahana *et al.*, 2003). Nucleolin, a multifactorial protein involved in several cellular processes, is also implicated in the transcription and maturation of rRNA, and ribosome assembly and transport (Cong *et al.*, 2012). Nucleolin inactivation induces nucleolar disruption, which leads to apoptosis (Ugrinova *et al.*, 2007). H3N2 NS1 protein represses RNA Pol I-dependent transcription through nucleolin interaction, by hypermethylation in the UCE of rRNA gene promoter. In NS1 expressed cells, an increased association of ribosomal proteins with MDM2, and p53 accumulation, suggests an induced nucleolar stress that would promote apoptosis (Yan *et al.*, 2017). These findings imply that H3N2 NS1 mediate depletion of rRNA which in turn triggers nucleolar stress, resulting in p53-dependent apoptosis.

The Pol I repressor, p53, also represses the expression of *FBL*. *FBL* expression is inversely associated with p53 activity in human breast cancer cells (Marcel *et al.*, 2013). Ribosome biogenesis is overactivated in p53-inactivated cancer cells (Bywater *et al.*, 2012). In IAV H3N2 infection context, both, the accumulation of p53 might regulate *FBL* expression and the interaction with NS1, may prevent it to establish its physiological processes. In general, the role of H3N2 NS1 by targeting nucleolin, B23 and FBL strongly suggests the impairment of ribosomal biogenesis and its above-mentioned consequences (Fig. 6).

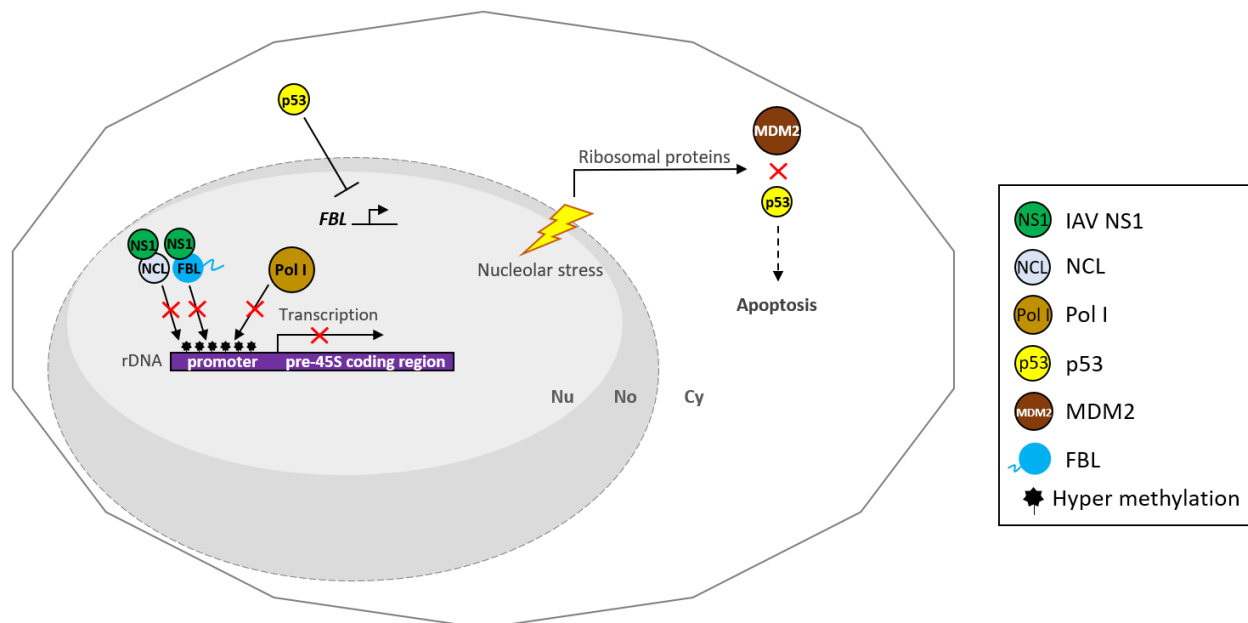


Fig. 6 IAV H3N2 NS1 blocks rRNA transcription resulting in nucleolar stress and p53-dependent apoptosis. H3N2 NS1 binds to nucleolin and FBL in the nucleolus. NS1/nucleolin association

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

disrupts the ability of nucleolin to bind rDNA, which promotes hyper-methylation state of UCE region of rDNA promoter. Thus, recruitment of RNA Pol I to hyper-methylated rDNA promoter is compromised, which leads to nucleolar stress. Depletion of rRNA leads to the release of ribosomal proteins and their interaction with MDM2, which blocks p53-degradation. Accumulated p53 leads to apoptosis of IAV-infected cells. In addition, unregulated p53 represses *FBL* transcription and residual FBL is targeted by NS1, blocking FBL to conduct its role in pre-rRNA processing. No: nucleolus; Nu: nucleus; Cy: cytoplasm.

Conclusions and future directions

The nucleolus is the largest nuclear compartment. It contains more than 4500 proteins, which functions are distributed in controlling the cell cycle; DNA replication and repairing; pre-rRNA processing; assembling signal recognition particles; detecting and responding to different kinds of stress stimuli; and more (Andersen *et al.*, 2005b; Bensaddek *et al.*, 2016). Thus, the nucleolus as a multifunctional compartment, serves as an interface for the interaction between pathogens and the host cell. Viruses as obligate intracellular parasites, often encode viral proteins that target to the nucleolus to take over host-cell functions, and hijack nucleolar proteins to facilitate an effective infection process (Hiscox, 2002a, 2007; M. E. Taliany *et al.*, 2010).

In plant viruses, FBL is involved in LDM and cell-to-cell movement, and has been involved in virus-mediated suppression of RNA silencing. The redistribution of FBL is a constant phenomenon in plant and animal viruses. Regardless, cytoplasmic FBL redistribution has been reported only in plants virus infections. This supports the idea that particularly animal viruses targets FBL for its nucleolar functions in rRNA processing. In summary, at least from the described viruses in this review, comply with the following: (1) FBL knockdown impairs viral infection; (2) ribosomal biogenesis is blocked by different mechanisms; and (3) viral proteins with FBL interaction possesses in their sequence IDRs, RBDs and NLS/NoLS.

Most of the viruses described here, reported a co-localization with FBL, but just a few were explored to form a physical interaction. It is important to establish whether there is an interaction or not. Considering that the FBL GAR domain has been reported to be the binding site for viral proteins from plant (Decle-Carrasco *et al.*, 2021) and animal viruses, and this domain has a ribonuclease activity (Guillen-Chable *et al.*, 2020; Rodriguez-Corona *et al.*, 2017b) and an important role in the early steps of pre-rRNA processing (Lafontaine *et al.*, 2020), it is possible that these viral interactions may affect these particular roles of FBL. Thus, do these interactions

CAPÍTULO VI FIBRILARINA Y VIRUS DE ANIMALES

affect the methyl transferase and/or the ribonuclease activity of FBL? Can disrupt the ability of FBL to form RNPs complexes? The viral protein-mediated redistribution of FBL affects the nascent pre-rRNA sorting via phase separation? Answers of these questions may contribute to a more detailed understanding of the precise role of FBL in virology, consequently facilitating the design of novel anti-viral therapies.

Funding

This research was funded by CONACYT project FC 1572, and CB-2016-286730-Z-0142.

Availability of data and material

There is no additional data, Not applied.

Code availability

Not applied.

Authors' contributions

Stefano Decle-Carrasco contributed with the writing and research for the review.

Alma Laura Rodríguez-Piña contributed with the writing and research for the review.

Dr. Luis Carlos Rodríguez-Zapata contributed with the editing and managing.

Dr. Enrique Castano defined the subject, rewrite and overall management of the review and defined the model.

CAPÍTULO VII DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

CAPÍTULO VII DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

DISCUSIÓN

FBL es una proteína esencial conservada durante la evolución. Esta participa en diferentes procesos celulares, siendo el principal la biogénesis ribosomal (Rodríguez-Corona *et al.*, 2015). Su silenciamiento, sobreexpresión o relocalización afecta la arquitectura nucleolar y por tanto el correcto procesamiento de los ribosomas que, a su vez, altera el proceso de traducción de proteínas (Sang *et al.*, 2007a; Marcel *et al.*, 2013; Lafontaine *et al.*, 2020; Nguyen Van Long *et al.*, 2022). Ciertos virus de animales y plantas han mostrado alterar la localización de FBL, a través de la interacción de proteínas virales. En virus de plantas, se ha reportado que FBL participa en el movimiento sistémico y célula a célula mediante la formación de complejos RNP virales, así como una posible relación en la supresión del silenciamiento de RNA (Decle-Carrasco *et al.*, 2021). Por otro lado, los reportes que hay sobre la interacción entre virus de plantas y FBL, se enfocan en cómo utiliza el virus a dicha proteína, dejando a un lado la implicación que debe haber en el nucléolo a partir de la relocalización de FBL y en sus actividades enzimáticas. La actividad de ribonucleasa radica en el dominio GAR (Rodríguez-Corona *et al.*, 2017; Guillen-Chable *et al.*, 2020) y este siendo el sitio de unión de proteínas virales, sumado a los antecedentes que se tienen sobre FBL de formar complejos RNP virales con genomas de RNA (Decle-Carrasco *et al.*, 2021), sugiere que dicha actividad enzimática sea modulada por estos componentes virales. De hecho, durante la infección de ciertos virus de animales que requieren de FBL, como Hendra virus (Deffrasnes *et al.*, 2016), el virus de la inmunodeficiencia humana (Ponti *et al.*, 2008) e Influenza A H3N2 (Melén *et al.*, 2012), se ha encontrado que la biogénesis ribosomal es afectada. Por tanto, es posible que la actividad de ribonucleasa de FBL es modulada negativamente mediante la interacción de proteínas virales, afectando el procesamiento del pre-rRNA.

El mapeo de los sitios de interacción entre proteínas permite conocer las características de tal unión y así diseñar estrategias para regularla (Dhayalan *et al.*, 2008). En la interacción proteína-proteína entre virus-hospedador, el mapeo de los sitios de interacción puede generar información necesaria para diseñar estrategias anti-virales que interfieran en alguna interacción vital para el virus en cuestión (Mori *et al.*, 2011). En este trabajo se estableció que el dominio N-terminal es el que interactúa con el dominio GAR de FBL (Li *et al.*, 2018).

CAPÍTULO VII DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

En general, los resultados obtenidos en la presente tesis sugieren que, tanto TGB1 de BSMV como el dsRNA de PMeV-MX inhiben la actividad de ribonucleasa de FBL. Es necesario corroborar estos resultados con otras técnicas, como zimografías, donde se cargue en condiciones nativas a TGB1 y FBL a un gel de poliacrilamida con RNA total, con el fin de demostrar la formación del complejo (TGB1-FBL) y la inhibición de la actividad de ribonucleasa. Dicha inhibición puede ser sometida a diferentes tratamientos como: (1) NaCl, que aumenta la actividad de ribonucleasa; (2) fosfoinosítidos, que la activan o la inhiben; (3) con el complejo C/D snoRNP, entre otros (Rodríguez-Corona *et al.*, 2017; Guillen-Chable *et al.*, 2020). Todo esto, con el fin de entender el mecanismo de la posible inhibición de la actividad de ribonucleasa de FBL por TGB1. Además de realizar tres replicas para cada ensayo de ribonucleasa con el fin de poder generar un análisis estadístico sobre los resultados obtenidos.

La actividad de ribonucleasa de FBL sugiere que su papel estaría en el procesamiento del rRNA, ya que de manera *in vitro* se demostró la degradación de las subunidades ribosomales 28S y 18S (Rodríguez-Corona *et al.*, 2017; Guillen-Chable *et al.*, 2020). En el contexto viral, FBL forma complejos con RNA viral e incluso lo protege de RNasa (Sang *et al.*, 2007a). Este antecedente corrobora que, FBL no es capaz de degradar RNA viral. De tal manera que su actividad de ribonucleasa no depende únicamente de la interacción con RNAs. Es necesario corroborar este resultado, pero con RNA viral transcrito, para así eliminar ruido proveniente de los componentes adicionales presentes en la extracción de ácidos nucleicos a partir del látex infectado con PMeV-MX. De igual forma, ensayar la actividad enzimática con ssRNA viral.

CONCLUSIONES GENERALES

1. De acuerdo al primer objetivo específico, se identificó al dominio N-terminal de TGB1 como el sitio de interacción con la fibrilarina.
2. Los resultados sugieren que TGB1 de BSMV y el RNA viral de PMeV-MX inhiben la actividad de ribonucleasa de la fibrilarina, atendiendo al segundo y cuarto objetivo específico, respectivamente.
3. Respondiendo al tercer objetivo específico, la fibrilarina no es capaz de degradar el RNA viral de PMeV-MX, bajo las condiciones utilizadas.

CAPÍTULO VII DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

La hipótesis que se planteó al iniciar esta investigación es que la proteína viral TGB1 del virus del mosaico estriado de la cebada al igual que el RNA viral de Papaya meleira virus México modulan negativamente la actividad de ribonucleasa de la fibrilarina, ha sido ha sido aceptada.

PERSPECTIVAS

- Probar la actividad de ribonucleasa de FBL con RNA viral previamente transcrito de manera *in vitro*.
- Determinar si la interacción de TGB1 de BSMV con FBL afecta la interacción con otros ligandos, como la formación del complejo C/D snoRNP, la unión con PIP2, snoRNAs, entre otros.
- Determinar el efecto de componentes que modulan la actividad de ribonucleasa de FBL, como NaCl, PIP2, PIP3 y PIP5, en presencia de TGB1 de BSMV.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. J., Antoniw, J. F., & Beaudoin, F. (2005). Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. In *Molecular Plant Pathology* (Vol. 6, Issue 4, pp. 471–487). Mol Plant Pathol. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00296.x>
- Alberti, S., Gladfelter, A., & Mittag, T. (2019). Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell*, 176(3), 419–434. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.12.035>
- Amin, M. A., Matsunaga, S., Ma, N., Takata, H., Yokoyama, M., Uchiyama, S., & Fukui, K. (2007). Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360(2), 320–326. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.06.092>
- Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L., & Vance, V. B. (2000). A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 290(5489), 142–144. <https://doi.org/10.1126/science.290.5489.142>
- Andersen, J. S., Lam, Y. W., Leung, A. K. L., Ong, S. E., Lyon, C. E., Lamond, A. I., & Mann, M. (2005a). Nucleolar proteome dynamics. *Nature*, 433(7021), 77–83. <https://doi.org/10.1038/nature03207>
- Andersen, J. S., Lam, Y. W., Leung, A. K. L., Ong, S. E., Lyon, C. E., Lamond, A. I., & Mann, M. (2005b). Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 2004 433:7021, 433(7021), 77–83. <https://doi.org/10.1038/nature03207>
- Anindya, R., & Savithri, H. S. (2004). Potyviral NIa proteinase, a proteinase with novel deoxyribonuclease activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32159–32169. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404135200>
- Antunes, T. F. S., Amaral, R. J. V., Ventura, J. A., Godinho, M. T., Amaral, J. G., Souza, F. O., Zerbini, P. A., Zerbini, F. M., & Fernandes, P. M. B. (2016). The dsRNA Virus Papaya Meleira Virus and an ssRNA Virus Are Associated with Papaya Sticky Disease. *PloS One*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0155240>

BIBLIOGRAFÍA

- Aris, J. P., & Blobel, G. (1991). cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(3), 931–935. <https://doi.org/10.1073/PNAS.88.3.931>
- Ariumi, Y. (2022). Host Cellular RNA Helicases Regulate SARS-CoV-2 Infection. *Journal of Virology*, 96(6). <https://doi.org/10.1128/JVI.00002-22>
- Arizala, J. A. C., Chomchan, P., Li, H., Moore, R., Ge, H., Ouellet, D. L., & Rossi, J. J. (2019). Identification of Nucleolar Factors During HIV-1 Replication Through Rev Immunoprecipitation and Mass Spectrometry. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2019(148). <https://doi.org/10.3791/59329>
- Basu, A., Das, P., Chaudhuri, S., Bevilacqua, E., Andrews, J., Barik, S., Hatzoglou, M., Komar, A. A., & Mazumder, B. (2011). Requirement of rRNA Methylation for 80S Ribosome Assembly on a Cohort of Cellular Internal Ribosome Entry Sites. *Molecular and Cellular Biology*, 31(22), 4482. <https://doi.org/10.1128/MCB.05804-11>
- Beauchemin, C., & Laliberté, J.-F. (2007). The Poly(A) Binding Protein Is Internalized in Virus-Induced Vesicles or Redistributed to the Nucleolus during Turnip Mosaic Virus Infection. *Journal of Virology*, 81(20), 10905–10913. <https://doi.org/10.1128/jvi.01243-07>
- Belin, S., Kindbeiter, K., Hacot, S., Albaret, M. A., Roca-Martinez, J. X., Thérizols, G., Grosso, O., & Diaz, J. J. (2010). Uncoupling ribosome biogenesis regulation from RNA polymerase I activity during herpes simplex virus type 1 infection. *RNA*, 16(1), 131. <https://doi.org/10.1261/RNA.1935610>
- Bensaddek, D., Nicolas, A., & Lamond, A. I. (2016). Quantitative proteomic analysis of the human nucleolus. *Methods in Molecular Biology*, 1455, 249–262. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3792-9_20/FIGURES/3
- Berry, J., Weber, S. C., Vaidya, N., Haataja, M., Brangwynne, C. P., & Weitz, D. A. (2015). RNA transcription modulates phase transition-driven nuclear body assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(38), E5237–E5245. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1509317112>

BIBLIOGRAFÍA

- Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., & Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 8, Issue 7, pp. 574–585). *Nat Rev Mol Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/nrm2184>
- Boonyakida, J., Xu, J., Satoh, J., Nakanishi, T., Mekata, T., Kato, T., & Park, E. Y. (2021). Identification of antigenic domains and peptides from VP15 of white spot syndrome virus and their antiviral effects in *Marsupenaeus japonicus*. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92002-8>
- Bragg, J. N., & Jackson, A. O. (2004). The C-terminal region of the Barley stripe mosaic virus γ protein participates in homologous interactions and is required for suppression of RNA silencing. *Molecular Plant Pathology*, 5(5), 465–481. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2004.00246.X>
- Broder, C. C., & Wong, K. T. (2016). Henipaviruses. *Neurotropic Viral Infections*, 45. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33133-1_3
- Brosnan, C. A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N. A., Waterhouse, P. M., & Carroll, B. J. (2007). Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37), 14741–14746. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706701104>
- Bywater, M. J., Poortinga, G., Sanij, E., Hein, N., Peck, A., Cullinane, C., Wall, M., Cluse, L., Drygin, D., Anderes, K., Huser, N., Proffitt, C., Bliesath, J., Haddach, M., Schwaebe, M. K., Ryckman, D. M., Rice, W. G., Schmitt, C., Lowe, S. W., ... Hannan, R. D. (2012). Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell*, 22(1), 51–65. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2012.05.019>
- Canetta, E., Kim, S. H., Kalinina, N. O., Shaw, J., Adya, A. K., Gillespie, T., Brown, J. W. S., & Taliansky, M. (2008). A plant virus movement protein forms ringlike complexes with the major nucleolar protein, fibrillarin, in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 376(4), 932–937. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2007.12.039>
- Chang, C. H., Hsu, F. C., Lee, S. C., Lo, Y. S., Wang, J. da, Shaw, J., Taliansky, M., Chang, B. Y., Hsu, Y. H., & Lin, N. S. (2016). The nucleolar fibrillarin protein is required for helper virus-

BIBLIOGRAFÍA

- independent long-distance trafficking of a subviral satellite RNA in plants. *Plant Cell*, 28(10), 2586–2602. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00071>
- Chaudhuri, S., Vyas, K., Kapasi, P., Komar, A. A., Dinman, J. D., Barik, S., & Mazumder, B. (2007). Human ribosomal protein L13a is dispensable for canonical ribosome function but indispensable for efficient rRNA methylation. *RNA (New York, N.Y.)*, 13(12), 2224–2237. <https://doi.org/10.1261/RNA.694007>
- Chen, H., Wurm, T., Britton, P., Brooks, G., & Hiscox, J. A. (2002). Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell. *Journal of Virology*, 76(10), 5233–5250. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.10.5233-5250.2002>
- Chen, Z., Li, Y., & Krug, R. M. (1999). Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *The EMBO Journal*, 18(8), 2273. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/18.8.2273>
- Cheng, X., & Wang, A. (2017). The Potyvirus Silencing Suppressor Protein VPg Mediates Degradation of SGS3 via Ubiquitination and Autophagy Pathways. *Journal of Virology*, 91(1), e01478-16.
- Cho, W. K., Lian, S., Kim, S. M., Park, S. H., & Kim, K. H. (2013). Current insights into research on Rice stripe virus. *Plant Pathology Journal*, 29(3), 223–233. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.10.2012.0158>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 2006 1:2, 1(2), 581–585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
- Christensen, M. E., Beyer, A. L., Walker, B., & LeSturgeon, W. M. (1977). Identification of NG, NG-dimethylarginine in a nuclear protein from the lower eukaryote physarum polycephalum homologous to the major proteins of mammalian 40S ribonucleoprotein particles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 74(2), 621–629. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)90348-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(77)90348-5)

BIBLIOGRAFÍA

- Cioce, M., & Lamond, A. I. (2005). Cajal bodies: A long history of discovery. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 21, pp. 105–131). Annu Rev Cell Dev Biol. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.103738>
- Clark, E., Nava, B., & Caputi, M. (2017). Tat is a multifunctional viral protein that modulates cellular gene expression and functions. *Oncotarget*, 8(16), 27569–27581. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15174>
- Coiras, M., Camafeita, E., Ureña, T., López, J. A., Caballero, F., Fernández, B., López-Huertas, M. R., Pérez-Olmeda, M., & Alcamí, J. (2006). Modifications in the human T cell proteome induced by intracellular HIV-1 Tat protein expression. *PROTEOMICS*, 6(S1), S63–S73. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200500437>
- Cong, R., Das, S., Ugrinova, I., Kumar, S., Mongelard, F., Wong, J., & Bouvet, P. (2012). Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription. *Nucleic Acids Research*, 40(19), 9441–9454. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS720>
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., & Baulcombe, D. C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, 101(5), 543–553. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80864-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80864-8)
- Decle-Carrasco, S., Rodríguez-Zapata, L. C., & Castano, E. (2021). Plant viral proteins and fibrillarín: the link to complete the infective cycle. *Molecular Biology Reports*, 48(5), 4677–4686. <https://doi.org/10.1007/S11033-021-06401-1/TABLES/1>
- Defrasnes, C., Marsh, G. A., Foo, C. H., Rootes, C. L., Gould, C. M., Grusovin, J., Monaghan, P., Lo, M. K., Tompkins, S. M., Adams, T. E., Lowenthal, J. W., Simpson, K. J., Stewart, C. R., Bean, A. G. D., & Wang, L. F. (2016). Genome-wide siRNA Screening at Biosafety Level 4 Reveals a Crucial Role for Fibrillarín in Henipavirus Infection. *PLOS Pathogens*, 12(3), e1005478. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005478>
- Deng, L., Starostina, N. G., Liu, Z. J., Rose, J. P., Terns, R. M., Terns, M. P., & Wang, B. C. (2004). Structure determination of fibrillarín from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus*

BIBLIOGRAFÍA

- furiosus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(3), 726–732. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.01.114>
- Dhamija, N., Choudhary, D., Ladha, J. S., Pillai, B., & Mitra, D. (2015). Tat predominantly associates with host promoter elements in HIV-1-infected T-cells – regulatory basis of transcriptional repression of c-Rel. *The FEBS Journal*, 282(3), 595–610. <https://doi.org/10.1111/FEBS.13168>
- Dhayalan, A., Jurkowski, T. P., Laser, H., Reinhardt, R., Jia, D., Cheng, X., & Jeltsch, A. (2008). Mapping of protein-protein interaction sites by the “absence of interference” approach. *Journal of Molecular Biology*, 376(4), 1091–1099. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2007.12.032>
- Diaz-Pendon, J. A., Li, F., Li, W. X., & Ding, S. W. (2007). Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell*, 19(6), 2053–2063. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047449>
- Ding, Y., & Lozano-Durán, R. (2020). The cajal body in plant-virus interactions. *Viruses*, 12(2), 21–28. <https://doi.org/10.3390/v12020250>
- Donald, R. G., Lawrence, D. M., & Jackson, A. O. (1997). The barley stripe mosaic virus 58-kilodalton beta(b) protein is a multifunctional RNA binding protein. *Journal of Virology*, 71(2), 1538–1546. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.2.1538-1546.1997>
- Dougherty, W. G., & Dawn Parks, T. (1991). Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: Identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology*, 183(2), 449–456. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90974-G](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90974-G)
- Du, Z., Chen, A., Chen, W., Liao, Q., Zhang, H., Bao, Y., Roossinck, M. J., & Carr, J. P. (2014). Nuclear-Cytoplasmic Partitioning of Cucumber Mosaic Virus Protein 2b Determines the Balance between Its Roles as a Virulence Determinant and an RNA-Silencing Suppressor. *Journal of Virology*, 88(10), 5228–5241. <https://doi.org/10.1128/jvi.00284-14>

BIBLIOGRAFÍA

- Du, Z., Xiao, D., Wu, J., Jia, D., Yuan, Z., Liu, Y., Hu, L., Han, Z., Wei, T., Lin, Q., Wu, Z., & Xie, L. (2011). p2 of Rice stripe virus (RSV) interacts with OsSGS3 and is a silencing suppressor. *Molecular Plant Pathology*, 12(8), 808–814. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00716.x>
- Dunbar, D. A., Wormsley, S., Lowe, T. M., & Baserga, S. J. (2000). Fibrillarin-associated box C/D small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei*. Sequence conservation and implications for 2'-O-ribose methylation of rRNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(19), 14767–14776. <https://doi.org/10.1074/JBC.M001180200>
- Dundr, M., Hebert, M. D., Karpova, T. S., Stanek, D., Xu, H., Shpargel, K. B., Meier, U. T., Neugebauer, K. M., Matera, A. G., & Misteli, T. (2004). In vivo kinetics of Cajal body components. *The Journal of Cell Biology*, 164(6), 831–842. <https://doi.org/10.1083/JCB.200311121>
- Elbaum-Garfinkle, S., Kim, Y., Szczepaniak, K., Chen, C. C. H., Eckmann, C. R., Myong, S., & Brangwynne, C. P. (2015). The disordered P granule protein LAF-1 drives phase separation into droplets with tunable viscosity and dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(23), 7189–7194. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1504822112>
- Elena, S. F., & Rodrigo, G. (2012). Towards an integrated molecular model of plant-virus interactions. In *Current Opinion in Virology* (Vol. 2, Issue 6, pp. 719–724). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.09.004>
- Endres, M. W., Gregory, B. D., Gao, Z., Foreman, A. W., Mlotshwa, S., Ge, X., Pruss, G. J., Ecker, J. R., Bowman, L. H., & Vance, V. (2010). Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathogens*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000729>
- Falaleeva, M., Pages, A., Matuszek, Z., Hidmi, S., Agranat-Tamir, L., Korotkov, K., Nevo, Y., Eyraş, E., Sperling, R., & Stamm, S. (2016). Dual function of C/D box small nucleolar RNAs in rRNA modification and alternative pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(12), E1625–E1634. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1519292113>

BIBLIOGRAFÍA

- Fatica, A., & Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(3), 313–318. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00336-8](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00336-8)
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T. S., Mitrea, D. M., Zhu, L., Richardson, T. M., Kriwacki, R. W., Pappu, R. v., & Brangwynne, C. P. (2016). Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments. *Cell*, 165(7), 1686–1697. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.04.047>
- Fomproix, N., Gébrane-Younès, J., & Hernandez-Verdun, D. (1998). Effects of anti-fibrillarin antibodies on building of functional nucleoli at the end of mitosis. *Journal of Cell Science*, 111 (Pt 3)(3), 359–372. <https://doi.org/10.1242/JCS.111.3.359>
- Fukunaga, R., & Doudna, J. A. (2009). dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *EMBO Journal*, 28(5), 545–555. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.2>
- Gall, J. G. (2000). Cajal bodies: the first 100 years. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 273–300. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.16.1.273>
- Gall, J. G. (2003). The centennial of the Cajal body. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(12), 975–980. <https://doi.org/10.1038/NRM1262>
- Ganot, P., Bortolin, M. L., & Kiss, T. (1997). Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell*, 89(5), 799–809. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80263-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80263-9)
- Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, D., Belausov, E., Citovsky, V., & Gafni, Y. (2008). Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1), 157–161. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709036105>
- González, I., Martínez, L., Rakitina, D. V., Lewsey, M. G., Atencio, F. A., Llave, C., Kalinina, N. O., Carr, J. P., Palukaitis, P., & Canto, T. (2010). Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular targets and interactions: Their significance to RNA silencing suppressor activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(3), 294–303. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-3-0294>

BIBLIOGRAFÍA

- Gopinath, K., & Kao, C. C. (2007). Replication-independent long-distance trafficking by viral RNAs in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell*, 19(4), 1179–1191. <https://doi.org/10.1105/TPC.107.050088>
- Granneman, S., Vogelzangs, J., Lührmann, R., van Venrooij, W. J., Pruijn, G. J. M., & Watkins, N. J. (2004). Role of pre-rRNA base pairing and 80S complex formation in subnucleolar localization of the U3 snoRNP. *Molecular and Cellular Biology*, 24(19), 8600–8610. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.19.8600-8610.2004>
- Greco, A. (2009). Involvement of the nucleolus in replication of human viruses. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 19, Issue 4, pp. 201–214). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/rmv.614>
- Grzela, R., Szolajska, E., Ebel, C., Madern, D., Favier, A., Wojtal, I., Zagorski, W., & Chroboczek, J. (2008). Virulence factor of potato virus Y, genome-attached terminal protein VPg, is a highly disordered protein. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 213–221. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705666200>
- Guillen-Chable, F., Corona, U. R., Pereira-Santana, A., Bayona, A., Rodríguez-Zapata, L. C., Aquino, C., Šebestová, L., Vitale, N., Hozak, P., & Castano, E. (2020). Fibrillar Ribonuclease Activity is Dependent on the GAR Domain and Modulated by Phospholipids. *Cells*, 9(5), 1–22. <https://doi.org/10.3390/cells9051143>
- Hafrén, A., & Mäkinen, K. (2008). Purification of viral genome-linked protein VPg from potato virus A-infected plants reveals several post-translationally modified forms of the protein. *Journal of General Virology*, 89(6), 1509–1518. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83649-0>
- Hamera, S., Yan, Y., Song, X., Chaudhary, S. U., Murtaza, I., Su, L., Tariq, M., Chen, X., & Fang, R. (2016). Expression of Cucumber mosaic virus suppressor 2b alters FWA methylation and its siRNA accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Biology Open*, 5(11), 1727–1734. <https://doi.org/10.1242/bio.017244>
- Harries, P. A., Palanichelvam, K., Yu, W., Schoelz, J. E., & Nelson, R. S. (2009). The cauliflower mosaic virus protein P6 forms motile inclusions that traffic along actin microfilaments and stabilize microtubules. *Plant Physiology*, 149(2), 1005–1016. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131755>

BIBLIOGRAFÍA

- Henras, A. K., Dez, C., & Henry, Y. (2004). RNA structure and function in C/D and H/ACA s(no)RNPs. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(3), 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.05.006>
- Hilton, A., Mizzen, L., Macintyre, G., Cheley, S., & Anderson, R. (1986). Translational control in murine hepatitis virus infection. *The Journal of General Virology*, 67 (Pt 5)(5), 923–932. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-5-923>
- Hinsby, A. M., Kiemer, L., Karlberg, E. O., Lage, K., Fausbøll, A., Juncker, A. S., Andersen, J. S., Mann, M., & Brunak, S. (2006). A Wiring of the Human Nucleolus. *Molecular Cell*, 22(2), 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.012>
- Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V., & Revers, F. (2013). Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 4, Issue MAY). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00154>
- Hiscox, J. A. (2002a). The nucleolus - A gateway to viral infection? *Archives of Virology*, 147(6), 1077–1089. <https://doi.org/10.1007/s00705-001-0792-0>
- Hiscox, J. A. (2002b). The nucleolus - A gateway to viral infection? *Archives of Virology*, 147(6), 1077–1089. <https://doi.org/10.1007/s00705-001-0792-0>
- Hiscox, J. A. (2007). RNA viruses: Hijacking the dynamic nucleolus. *Nature Reviews Microbiology*, 5(2), 119–127. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1597>
- Hiscox, J. A., Whitehouse, A., & Matthews, D. A. (2010). Nucleolar proteomics and viral infection. *Proteomics*, 10(22), 4077–4086. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000251>
- Hou, W. N., Duan, C. G., Fang, R. X., Zhou, X. Y., & Guo, H. S. (2011). Satellite RNA reduces expression of the 2b suppressor protein resulting in the attenuation of symptoms caused by Cucumber mosaic virus infection. *Molecular Plant Pathology*, 12(6), 595–605. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00696.x>
- Hu, C. C., Hsu, Y. H., & Lin, N. S. (2009). Satellite RNAs and satellite viruses of plants. In *Viruses* (Vol. 1, Issue 3, pp. 1325–1350). Viruses. <https://doi.org/10.3390/v1031325>

BIBLIOGRAFÍA

- Huang, T. S., Wei, T., Laliberté, J. F., & Wang, A. (2010). A host RNA helicase-like protein, AtRH8, interacts with the potyviral genome-linked protein, VPg, associates with the virus accumulation complex, and is essential for infection. *Plant Physiology*, *152*(1), 255–266. <https://doi.org/10.1104/pp.109.147983>
- Huang, X., Yu, R., Li, W., Geng, L., Jing, X., Zhu, C., & Liu, H. (2019). Identification and characterisation of a glycine-rich RNA-binding protein as an endogenous suppressor of RNA silencing from *Nicotiana glutinosa*. *Planta*, *249*(6), 1811–1822. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03122-5>
- Hutzinger, R., Feederle, R., Mrazek, J., Schiefermeier, N., Balwierz, P. J., Zavolan, M., Polacek, N., Delecluse, H. J., & Hüttenhofer, A. (2009). Expression and Processing of a Small Nucleolar RNA from the Epstein-Barr Virus Genome. *PLOS Pathogens*, *5*(8), e1000547. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000547>
- Itahana, K., Bhat, K. P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R., & Zhang, Y. (2003). Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Molecular Cell*, *12*(5), 1151–1164. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00431-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00431-3)
- Jackson, A. O., Lim, H. S., Bragg, J., Ganesan, U., & Lee, M. Y. (2009). Hordeivirus replication, movement, and pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, *47*, 385–422. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081733>
- Jagger, B. W., Wise, H. M., Kash, J. C., Walters, K. A., Wills, N. M., Xiao, Y. L., Dunfee, R. L., Schwartzman, L. M., Ozinsky, A., Bell, G. L., Dalton, R. M., Lo, A., Efstathiou, S., Atkins, J. F., Firth, A. E., Taubenberger, J. K., & Digard, P. (2012). An Overlapping Protein-Coding Region In Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response. *Science (New York, N.Y.)*, *337*(6091), 199. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1222213>
- Jansen, R. P., Hurt, E. C., Kern, H., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., Lapeyre, B., & Tollervey, D. (1991). Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast. *The Journal of Cell Biology*, *113*(4), 715–729. <https://doi.org/10.1083/JCB.113.4.715>

BIBLIOGRAFÍA

- Jiang, J., & Laliberté, J. F. (2011). The genome-linked protein VPg of plant viruses - A protein with many partners. In *Current Opinion in Virology* (Vol. 1, Issue 5, pp. 347–354). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.09.010>
- Kalinina, N. O., Rakitina, D. A., Yelina, N. E., Zamyatnin, J., Stroganova, T. A., Klinov, D. v., Prokhorov, V. v., Ustinova, S. v., Chernov, B. K., Schiemann, J., Solovyev, A. G., & Morozov, S. Y. (2001). RNA-binding properties of the 63 kDa protein encoded by the triple gene block of poa semilatifolius hordeivirus. *The Journal of General Virology*, 82(Pt 10), 2569–2578. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2569>
- Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Solovyev, A. G., Schiemann, J., & Morozov, S. Y. (2002). RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the triple gene block. *Virology*, 296(2), 321–329. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1328>
- Kass, S., Tyc, K., Steitz, J. A., & Sollner-Webb, B. (1990). The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell*, 60(6), 897–908. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90338-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90338-F)
- Kim, S. H., Ryabov, E. v., Kalinina, N. O., Rakitina, D. v., Gillespie, T., MacFarlane, S., Haupt, S., Brown, J. W. S., & Taliansky, M. (2007a). Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO Journal*, 26(8), 2169–2179. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601674>
- Kim, S. H., Ryabov, E. V., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Gillespie, T., MacFarlane, S., Haupt, S., Brown, J. W. S., & Taliansky, M. (2007b). Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO Journal*, 26(8), 2169–2179. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601674>
- Koh, C. M., Iwata, T., Zheng, Q., Bethel, C., Yegnasubramanian, S., & de Marzo, A. M. (2011). Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Oncotarget*, 2(9), 669–683. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.327>
- Kragler, F. (2013). Plasmodesmata: intercellular tunnels facilitating transport of macromolecules in plants. *Cell and Tissue Research*, 352(1), 49–58. <https://doi.org/10.1007/S00441-012-1550-1>

BIBLIOGRAFÍA

- Kressler, D., Linder, P., & de la Cruz, J. (1999). Protein trans-Acting Factors Involved in Ribosome Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 19(12), 7897–7912. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.12.7897>
- Kukkonen, S., Martinez-Viedma, M. D. P., Kim, N., Manrique, M., & Aldovini, A. (2014). HIV-1 Tat second exon limits the extent of Tat-mediated modulation of interferon-stimulated genes in antigen presenting cells. *Retrovirology*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-11-30/FIGURES/6>
- Kurnaeva, M. A., Zalevsky, A. O., Arifulin, E. A., Lisitsyna, O. M., Tvorogova, A. v., Shubina, M. Y., Bourenkov, G. P., Tikhomirova, M. A., Potashnikova, D. M., Kachalova, A. I., Musinova, Y. R., Golovin, A. v., Vassetzky, Y. S., & Sheval, E. v. (2022). Molecular Coevolution of Nuclear and Nucleolar Localization Signals inside the Basic Domain of HIV-1 Tat. *Journal of Virology*, 96(1). <https://doi.org/10.1128/JVI.01505-21>
- Lafontaine, D. L. J. (2019). Birth of Nucleolar Compartments: Phase Separation-Driven Ribosomal RNA Sorting and Processing. *Molecular Cell*, 76(5), 694–696. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2019.11.015>
- Lafontaine, D. L. J., Riback, J. A., Bascetin, R., & Brangwynne, C. P. (2020). The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 22:3, 22(3), 165–182. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0272-6>
- Lechertier, T., Grob, A., Hernandez-Verdun, D., & Roussel, P. (2009). Fibrillarin and Nop56 interact before being co-assembled in box C/D snoRNPs. *Experimental Cell Research*, 315(6), 928–942. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2009.01.016>
- Leung, A. K. L., Andersen, J. S., Mann, M., & Lamond, A. I. (2003). Bioinformatic analysis of the nucleolus. *The Biochemical Journal*, 376(Pt 3), 553–569. <https://doi.org/10.1042/BJ20031169>
- Lewsey, M., Surette, M., Robertson, F. C., Ziebell, H., Choi, S. H., Ryu, K. H., Canto, T., Palukaitis, P., Payne, T., Walsh, J. A., & Carr, J. P. (2009). The role of the Cucumber mosaic virus 2b protein in viral movement and symptom induction. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 22(6), 642–654. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-6-0642>

BIBLIOGRAFÍA

- Li, F. Q., Xiao, H., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2005). Sumoylation of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *FEBS Letters*, *579*(11), 2387–2396. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2005.03.039>
- Li, Q., & Palukaitis, P. (1996). Comparison of the nucleic acid- and NTP-binding properties of the movement protein of cucumber mosaic cucumovirus and tobacco mosaic tobamovirus. *Virology*, *216*(1), 71–79. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1996.0035>
- Li, Z., Zhang, Y., Jiang, Z., Jin, X., Zhang, K., Wang, X., Han, C., Yu, J., & Li, D. (2018). Hijacking of the nucleolar protein fibrillarin by TGB1 is required for cell-to-cell movement of Barley stripe mosaic virus. *Molecular Plant Pathology*, *19*(5), 1222–1237. <https://doi.org/10.1111/mpp.12612>
- Lim, H.-S., Bragg, J. N., Ganesan, U., Lawrence, D. M., Yu, J., Isogai, M., Hammond, J., & Jackson, A. O. (2008a). Triple Gene Block Protein Interactions Involved in Movement of Barley Stripe Mosaic Virus. *Journal of Virology*, *82*(10), 4991–5006. <https://doi.org/10.1128/jvi.02586-07>
- Lim, H.-S., Bragg, J. N., Ganesan, U., Lawrence, D. M., Yu, J., Isogai, M., Hammond, J., & Jackson, A. O. (2008b). Triple Gene Block Protein Interactions Involved in Movement of Barley Stripe Mosaic Virus. *Journal of Virology*, *82*(10), 4991–5006. <https://doi.org/10.1128/jvi.02586-07>
- Lin, N. S., & Hsu, Y. H. (1994). A Satellite RNA Associated with Bamboo Mosaic Potexvirus. *Virology*, *202*(2), 707–714. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1392>
- Lin, N. S., Lee, Y. S., Lin, B. Y., Lee, C. W., & Hsu, Y. H. (1996). The open reading frame of bamboo mosaic potexvirus satellite RNA is not essential for its replication and can be replaced with a bacterial gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(7), 3138–3142. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.7.3138>
- Lin, N. S., Lin, B. Y., Lo, N. W., Hu, C. C., Chow, T. Y., & Hsu, Y. H. (1994). Nucleotide sequence of the genomic RNA of bamboo mosaic potexvirus. *Journal of General Virology*, *75*(9), 2513–2518. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-9-2513>

BIBLIOGRAFÍA

- Lough, T. J., Shash, K., Xoconostle-Czars, B., Hofstra, K. R., Beck, D. L., Balmori, E., Forster, R. L. S., & Lucas, W. J. (1998). Molecular dissection of the mechanism by which potexvirus triple gene block proteins mediate cell-to-cell transport of infectious RNA. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *11*(8), 801–814. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.8.801>
- Loza-Muller, L., Rodríguez-Corona, U., Sobol, M., Rodríguez-Zapata, L. C., Hozak, P., & Castano, E. (2015). Fibrillarin methylates H2A in RNA polymerase I trans-active promoters in *Brassica oleracea*. *Frontiers in Plant Science*, *6*(NOVEMBER), 976. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00976>
- Ma, Y., Navarro, B., Zhang, Z., Lu, M., Zhou, X., Chi, S., Di Serio, F., & Li, S. (2015). Identification and molecular characterization of a novel monopartite geminivirus associated with mulberry mosaic dwarf disease. *Journal of General Virology*, *96*(8), 2421–2434. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000175>
- Mailliot, J., & Martin, F. (2018). Viral internal ribosomal entry sites: four classes for one goal. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *9*(2), e1458. <https://doi.org/10.1002/WRNA.1458>
- Makarov, V. V., Makarova, S. S., Makhotenko, A. V., Obratsova, E. A., & Kalinina, N. O. (2015). In vitro properties of hordeivirus TGB1 protein forming ribonucleoprotein complexes. *Journal of General Virology*, *96*(11), 3422–3431. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000252>
- Mallory, A. C., Reinhart, B. J., Bartel, D., Vance, V. B., & Bowman, L. H. (2002). A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(23), 15228–15233. <https://doi.org/10.1073/pnas.232434999>
- Marban, C., Su, T., Ferrari, R., Li, B., Vatakis, D., Pellegrini, M., Zack, J. A., Rohr, O., & Kurdistani, S. K. (2011). Genome-Wide Binding Map of the HIV-1 Tat Protein to the Human Genome. *PLOS ONE*, *6*(11), e26894. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0026894>
- Marcel, V., Ghayad, S. E., Belin, S., Therizols, G., Morel, A. P., Solano-González, E., Vendrell, J. A., Hacot, S., Mertani, H. C., Albaret, M. A., Bourdon, J. C., Jordan, L., Thompson, A., Tafer, Y., Cong, R., Bouvet, P., Saurin, J. C., Catez, F., Prats, A. C., ... Diaz, J. J. (2013). p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer Cell*, *24*(3), 318–330. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2013.08.013>

BIBLIOGRAFÍA

- Matzke, M. A., & Mosher, R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 15, Issue 6, pp. 394–408). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3683>
- Mbonye, U., & Karn, J. (2014). Transcriptional control of HIV latency: Cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure. *Virology*, *454–455*(1), 328–339. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2014.02.008>
- Melén, K., Kinnunen, L., Fagerlund, R., Ikonen, N., Twu, K. Y., Krug, R. M., & Julkunen, I. (2007). Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *Journal of Virology*, *81*(11), 5995–6006. <https://doi.org/10.1128/JVI.01714-06>
- Melén, K., Tynell, J., Fagerlund, R., Roussel, P., Hernandez-Verdun, D., & Julkunen, I. (2012). Influenza A H3N2 subtype virus NS1 protein targets into the nucleus and binds primarily via its C-terminal NLS2/NoLS to nucleolin and fibrillarin. *Virology Journal*, *9*. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-167>
- Meng, F., Uversky, V., & Kurgan, L. (2017). Computational Prediction of Intrinsic Disorder in Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, *88*. <https://doi.org/10.1002/CPPS.28>
- Mészáros, B., Erdős, G., & Dosztányi, Z. (2018). IUPred2A: Context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W329–W337. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY384>
- Mészáros, B., Simon, I., & Dosztányi, Z. (2011). The expanding view of protein-protein interactions: complexes involving intrinsically disordered proteins. *Physical Biology*, *8*(3). <https://doi.org/10.1088/1478-3975/8/3/035003>
- Miller, D. M., Thomas, S. D., Islam, A., Muench, D., & Sedoris, K. (2012). c-Myc and Cancer Metabolism. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *18*(20), 5546. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0977>
- Millet, J. K., & Whittaker, G. R. (2015). Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research*, *202*, 120–134. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2014.11.021>

BIBLIOGRAFÍA

- Min, J. Y., & Krug, R. M. (2006). The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(18), 7100–7105. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0602184103/ASSET/4FCD07B8-7804-4543-B8C4-2C8583541BD4/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ0180620620005.JPEG>
- Min, J. Y., Li, S., Sen, G. C., & Krug, R. M. (2007). A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology*, *363*(1), 236–243. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2007.01.038>
- Mori, M., Manetti, F., & Botta, M. (2011). Targeting protein-protein and protein-nucleic acid interactions for anti-HIV therapy. *Current Pharmaceutical Design*, *17*(33), 3713–3728. <https://doi.org/10.2174/138161211798220972>
- Morozov, S. Y., & Solovyev, A. G. (2003). Triple gene block: Modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology*, *84*(6), 1351–1366. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18922-0>
- Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N., Rémoúé, K., Sanial, M., Vo, T. A., & Vaucheret, H. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, *101*(5), 533–542. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80863-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80863-6)
- Muangsan, N., Beclin, C., Vaucheret, H., & Robertson, D. (2004). Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants. *Plant Journal*, *38*(6), 1004–1014. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02103.x>
- Murayama, R., Harada, Y., Shibata, T., Kuroda, K., Hayakawa, S., Shimizu, K., & Tanaka, T. (2007). Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *362*(4), 880–885. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.08.091>

BIBLIOGRAFÍA

- Musinova, Y. R., Sheval, E. v., Dib, C., Germini, D., & Vassetzky, Y. S. (2016). Functional roles of HIV-1 Tat protein in the nucleus. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 73(3), 589–601. <https://doi.org/10.1007/S00018-015-2077-X>
- Nemeroff, M. E., Barabino, S. M. L., Li, Y., Keller, W., & Krug, R. M. (1998). Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Molecular Cell*, 1(7), 991–1000. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80099-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80099-4)
- Németh, A., Conesa, A., Santoyo-Lopez, J., Medina, I., Montaner, D., Péterfia, B., Solovei, I., Cremer, T., Dopazo, J., & Längst, G. (2010). Initial genomics of the human nucleolus. *PLoS Genetics*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000889>
- Netsu, O., Hiratsuka, K., Kuwata, S., Hibi, T., Ugaki, M., & Suzuki, M. (2008). Peanut stunt virus 2b cistron plays a role in viral local and systemic accumulation and virulence in *Nicotiana benthamiana*. *Archives of Virology*, 153(9), 1731–1735. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0166-y>
- Nguyen Van Long, F., Lardy-Cleaud, A., Carène, D., Rossoni, C., Catez, F., Rollet, P., Pion, N., Monchiet, D., Dolbeau, A., Martin, M., Simioni, V., Bray, S., le Beherec, D., Mosele, F., Bouakka, I., Colombe-Vermorel, A., Odeyer, L., Diot, A., Jordan, L. B., ... Marcel, V. (2022). Low level of Fibrillarin, a ribosome biogenesis factor, is a new independent marker of poor outcome in breast cancer. *BMC Cancer*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-022-09552-X>
- Nott, T. J., Petsalaki, E., Farber, P., Jervis, D., Fussner, E., Plochowietz, A., Craggs, T. D., Bazett-Jones, D. P., Pawson, T., Forman-Kay, J. D., & Baldwin, A. J. (2015). Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles. *Molecular Cell*, 57(5), 936–947. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2015.01.013>
- Ochs, R. L., Lischwe, M. A., Spohn, W. H., & Busch, H. (1985). Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biology of the Cell*, 54(2), 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1768-322X.1985.tb00387.x>

BIBLIOGRAFÍA

- Ogg, S. C., & Lamond, A. I. (2002). Cajal bodies and coilin - Moving towards function. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 159, Issue 1, pp. 17–21). J Cell Biol. <https://doi.org/10.1083/jcb.200206111>
- Oldfield, C. J., & Dunker, A. K. (2014). Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions. *Annual Review of Biochemistry*, 83, 553–584. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-072711-164947>
- Omer, A. D., Ziesche, S., Ebhardt, H. A., & Dennis, P. P. (2002). In vitro reconstitution and activity of a C/D box methylation guide ribonucleoprotein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 5289–5294. <https://doi.org/10.1073/PNAS.082101999>
- Opitz, B., Rejaibi, A., Dauber, B., Eckhard, J., Vinzing, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N., & Wolff, T. (2007). IFN β induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cellular Microbiology*, 9(4), 930–938. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2006.00841.X>
- Oruetebarria, I., Guo, D., Merits, A., Mäkinen, K., Saarma, M., & Valkonen, J. P. T. (2001). Identification of the genome-linked protein in virions of Potato virus A, with comparison to other members in genus Potyvirus. *Virus Research*, 73(2), 103–112. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00216-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00216-1)
- Pallerla, S. R., Harms, D., Johne, R., Todt, D., Steinmann, E., Schemmerer, M., Wenzel, J. J., Hofmann, J., Kuo Shih, J. W., Wedemeyer, H., Bock, C. T., & Velavan, T. P. (2020). Hepatitis E Virus Infection: Circulation, Molecular Epidemiology, and Impact on Global Health. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(10), 1–21. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9100856>
- Pederson, T. (2011). The nucleolus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(3), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000638>
- Peng, Q., Wang, L., Qin, Z., Wang, J., Zheng, X., Wei, L., Zhang, X., Zhang, X., Liu, C., Li, Z., Wu, Y., Li, G., Yan, Q., & Ma, J. (2020). Phase Separation of Epstein-Barr Virus EBNA2 and Its Coactivator EBNA1 Controls Gene Expression. *Journal of Virology*, 94(7). <https://doi.org/10.1128/JVI.01771-19>

BIBLIOGRAFÍA

- Pontes, O., Li, C. F., Nunes, P. C., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S. E., & Pikaard, C. S. (2006). The Arabidopsis Chromatin-Modifying Nuclear siRNA Pathway Involves a Nucleolar RNA Processing Center. *Cell*, 126(1), 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.031>
- Pontes, O., & Pikaard, C. S. (2008). siRNA and miRNA processing: new functions for Cajal bodies. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 18, Issue 2, pp. 197–203). Curr Opin Genet Dev. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.01.008>
- Ponti, D., Troiano, M., Bellenchi, G., Battaglia, P. A., & Gigliani, F. (2008a). The HIV Tat protein affects processing of ribosomal RNA precursor. *BMC Cell Biology*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-9-32/FIGURES/5>
- Ponti, D., Troiano, M., Bellenchi, G., Battaglia, P. A., & Gigliani, F. (2008b). The HIV Tat protein affects processing of ribosomal RNA precursor. *BMC Cell Biology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-9-32>
- Pyper, J. M., Clements, J. E., & Zink, M. C. (1998). The nucleolus is the site of Borna disease virus RNA transcription and replication. *Journal of Virology*, 72(9), 7697–7702. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.9.7697-7702.1998>
- Qi, Y., Zhong, X., Itaya, A., & Ding, B. (2004). Dissecting RNA silencing in protoplasts uncovers novel effects of viral suppressors on the silencing pathway at the cellular level. *Nucleic Acids Research*, 32(22). <https://doi.org/10.1093/nar/gnh180>
- Rajamäki, M. L., Streng, J., & Valkonen, J. P. T. (2014). Silencing suppressor protein VPg of a potyvirus interacts with the plant silencing-related protein SGS3. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(11), 1199–1210. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-14-0109-R>
- Rajamäki, M. L., & Valkonen, J. P. T. (2003). Localization of a potyvirus and the viral genome-linked protein in wild potato leaves at an early stage of systemic infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(1), 25–34. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.1.25>
- Rajamäki, M. L., & Valkonen, J. P. T. (2009). Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like potato virus a in nicotiana species. *Plant Cell*, 21(8), 2485–2502. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064147>

BIBLIOGRAFÍA

- Rakitina, D. v., Taliansky, M., Brown, J. W. S., & Kalinina, N. O. (2011). Two RNA-binding sites in plant fibrillarin provide interactions with various RNA substrates. *Nucleic Acids Research*, 39(20), 8869–8880. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr594>
- Rantalainen, K. I., Eskelin, K., Tompa, P., & Makinen, K. (2011). Structural Flexibility Allows the Functional Diversity of Potyvirus Genome-Linked Protein VPg. *Journal of Virology*, 85(5), 2449–2457. <https://doi.org/10.1128/jvi.02051-10>
- Rantalainen, K. I., Uversky, V. N., Permi, P., Kalkkinen, N., Dunker, A. K., & Mäkinen, K. (2008). Potato virus A genome-linked protein VPg is an intrinsically disordered molten globule-like protein with a hydrophobic core. *Virology*, 377(2), 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.025>
- Reichow, S. L., Hamma, T., Ferré-D'Amaré, A. R., & Varani, G. (2007). The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Research*, 35(5), 1452–1464. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKL1172>
- Revers, F., & García, J. A. (2015). Molecular biology of potyviruses. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 92). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.006>
- Rodriguez-Corona, U., Pereira-Santana, A., Sobol, M., Rodriguez-Zapata, L. C., Hozak, P., & Castano, E. (2017a). Novel ribonuclease activity differs between fibrillarins from arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, 8(October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01878>
- Rodriguez-Corona, U., Pereira-Santana, A., Sobol, M., Rodriguez-Zapata, L. C., Hozak, P., & Castano, E. (2017b). Novel ribonuclease activity differs between fibrillarins from arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, 8(October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01878>
- Rodriguez-Corona, U., Sobol, M., Rodriguez-Zapata, L. C., Hozak, P., & Castano, E. (2015). Fibrillarin from Archaea to human. *Biology of the Cell*, 107(6), 159–174. <https://doi.org/10.1111/boc.201400077>

BIBLIOGRAFÍA

- Romani, B., Engelbrecht, S., & Glashoff, R. H. (2010). Functions of Tat: The versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology*, *91*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.016303-0/CITE/REFWORKS>
- Rosário-Ferreira, N., Preto, A. J., Melo, R., Moreira, I. S., & Brito, R. M. M. (2020). The Central Role of Non-Structural Protein 1 (NS1) in Influenza Biology and Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS21041511>
- Rowland, R. R., Kervin, R., Kuckleburg, C., Sperlich, A., & Benfield, D. A. (1999). The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence. *Virus Research*, *64*(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(99\)00048-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(99)00048-9)
- Ruiz-Ferrer, V., & Voinnet, O. (2009). Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual Review of Plant Biology*, *60*, 485–510. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092111>
- Ryabov, E. V., Kim, S. H., & Taliansky, M. (2004). Identification of a nuclear localization signal and nuclear export signal of the umbraviral long-distance RNA movement protein. *Journal of General Virology*, *85*(5), 1329–1333. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79854-0>
- Sadagopan, S., Sharma-Walia, N., Veettil, M. V., Bottero, V., Levine, R., Vart, R. J., & Chandran, B. (2009). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus upregulates angiogenin during infection of human dermal microvascular endothelial cells, which induces 45S rRNA synthesis, antiapoptosis, cell proliferation, migration, and angiogenesis. *Journal of Virology*, *83*(7), 3342–3364. <https://doi.org/10.1128/JVI.02052-08>
- Sang, H. K., MacFarlane, S., Kalinina, N. O., Rakitina, D. v., Ryabov, E. v., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J. W. S., & Taliansky, M. (2007a). Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(26), 11115–11120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704632104>
- Sang, H. K., MacFarlane, S., Kalinina, N. O., Rakitina, D. v., Ryabov, E. v., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J. W. S., & Taliansky, M. (2007b). Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proceedings of*

BIBLIOGRAFÍA

- the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(26), 11115–11120.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0704632104>
- Semashko, M. A., González, I., Shaw, J., Leonova, O. G., Popenko, V. I., Taliansky, M. E., Canto, T., & Kalinina, N. O. (2012). The extreme N-terminal domain of a hordeivirus TGB1 movement protein mediates its localization to the nucleolus and interaction with fibrillarin. *Biochimie*, 94(5), 1180–1188. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.005>
- Shaw, P., & Brown, J. (2012). Nucleoli: Composition, function, and dynamics. *Plant Physiology*, 158(1), 44–51. <https://doi.org/10.1104/pp.111.188052>
- Shojania, S., & D. O'Neil, J. (2010). Intrinsic disorder and function of the HIV-1 Tat protein. *Protein and Peptide Letters*, 17(8), 999–1011. <https://doi.org/10.2174/092986610791498993>
- Shubina, M. Y., Musinova, Y. R., & Sheval, E. v. (2016). Nucleolar methyltransferase fibrillarin: Evolution of structure and functions. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 81, Issue 9). <https://doi.org/10.1134/S0006297916090030>
- Snaar, S., Wiesmeijer, K., Jochemsen, A. G., Tanke, H. J., & Dirks, R. W. (2000). Mutational Analysis of Fibrillarin and Its Mobility in Living Human Cells. *Journal of Cell Biology*, 151(3), 653–662. <https://doi.org/10.1083/JCB.151.3.653>
- Soards, A. J., Murphy, A. M., Palukaitis, P., & Carr, J. P. (2002). Virulence and differential local and systemic spread of Cucumber mosaic virus in tobacco are affected by the CMV 2b protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(7), 647–653. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.7.647>
- Sobol, M., Yildirim, S., Philimonenko, V. V., Marášek, P., Castaño, E., & Hozák, P. (2013). UBF complexes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in nucleolar organizer regions regardless of ongoing RNA polymerase I activity. *Nucleus (United States)*, 4(6). <https://doi.org/10.4161/nucl.27154>
- Soitamo, A. J., Jada, B., & Lehto, K. (2011). HC-Pro silencing suppressor significantly alters the gene expression profile in tobacco leaves and flowers. *BMC Plant Biology*, 11(1), 68. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-68>

BIBLIOGRAFÍA

- Stamm, S., & Lodmell, J. S. (2019). C/D box snoRNAs in viral infections: RNA viruses use old dogs for new tricks. *Non-Coding RNA Research*, 4(2), 46–53. <https://doi.org/10.1016/J.NCRNA.2019.02.001>
- Stauber, R. H., & Pavlakis, G. N. (1998). Intracellular Trafficking and Interactions of the HIV-1 Tat Protein. *Virology*, 252(1), 126–136. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1998.9400>
- Stenström, L., Mahdessian, D., Gnann, C., Cesnik, A. J., Ouyang, W., Leonetti, M. D., Uhlén, M., Cuylen-Haering, S., Thul, P. J., & Lundberg, E. (2020). Mapping the nucleolar proteome reveals a spatiotemporal organization related to intrinsic protein disorder. *Molecular Systems Biology*, 16(8). <https://doi.org/10.15252/MSB.20209469>
- Takata, H., Uchiyama, S., Nakamura, N., Nakashima, S., Kobayashi, S., Sone, T., Kimura, S., Lahmers, S., Granzier, H., Labeit, S., Matsunaga, S., & Fukui, K. (2007). A comparative proteome analysis of human metaphase chromosomes isolated from two different cell lines reveals a set of conserved chromosome-associated proteins. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 12(3), 269–284. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2443.2007.01051.X>
- Taliansky, M. E., Brown, J. W. S., Rajamäki, M. L., Valkonen, J. P. T., & Kalinina, N. O. (2010). Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections. Parallels with animal pathosystems. *Advances in Virus Research*, 77(C), 119–158. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385034-8.00005-3>
- Taliansky, M. E., & Robinson, D. J. (2003). *Molecular biology of umbraviruses : phantom warriors*. 2, 1951–1960. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19219-0>
- Taliansky, M., Roberts, I. M., Kalinina, N., Ryabov, E. V, Raj, S. K., Robinson, D. J., & Oparka, K. J. (2003). *An Umbraviral Protein , Involved in Long-Distance RNA Movement , Binds Viral RNA and Forms Unique , Protective Ribonucleoprotein Complexes*. 77(5), 3031–3040. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.5.3031>
- Tavares, E. T., Tatagiba, J. S., Ventura, J. A., & Souza Jr., M. T. (2004). Two new systems of early diagnosis of papaya sticky disease. *Fitopatologia Brasileira*, 29(5), 563–566. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000500018>

BIBLIOGRAFÍA

- Tessarz, P., Santos-Rosa, H., Robson, S. C., Sylvestersen, K. B., Nelson, C. J., Nielsen, M. L., & Kouzarides, T. (2014). Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. *Nature*, *505*(7484), 564–568. <https://doi.org/10.1038/nature12819>
- Thiry, M., & Lafontaine, D. L. J. (2005). Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends in Cell Biology*, *15*(4), 194–199. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2005.02.007>
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., & Hurt, E. C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell*, *72*(3), 443–457. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90120-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90120-F)
- Tsai, M.-S., Hsu, Y.-H., & Lin, N.-S. (1999). Bamboo Mosaic Potexvirus Satellite RNA (satBaMV RNA)-Encoded P20 Protein Preferentially Binds to satBaMV RNA. *Journal of Virology*, *73*(4), 3032–3039. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.4.3032-3039.1999>
- Tsai, R. Y. L., & Pederson, T. (2014). Connecting the nucleolus to the cell cycle and human disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *28*(8), 3290–3296. <https://doi.org/10.1096/FJ.14-254680>
- Uchiyama, S., Kobayashi, S., Takata, H., Ishihara, T., Hori, N., Higashi, T., Hayashihara, K., Sone, T., Higo, D., Nirasawa, T., Takao, T., Matsunaga, S., & Fukui, K. (2005). Proteome analysis of human metaphase chromosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(17), 16994–17004. <https://doi.org/10.1074/JBC.M412774200>
- Ugrinova, I., Monier, K., Ivaldi, C., Thiry, M., Storck, S., Mongelard, F., & Bouvet, P. (2007). Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Molecular Biology*, *8*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-66/FIGURES/6>
- Uversky, V. N., Oldfield, C. J., & Dunker, A. K. (2005). Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, *18*(5), 343–384. <https://doi.org/10.1002/JMR.747>

BIBLIOGRAFÍA

- van Lint, C., Bouchat, S., & Marcello, A. (2013). HIV-1 transcription and latency: An update. *Retrovirology*, *10*(1), 1–38. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-67/FIGURES/3>
- Verchot-Lubicz, J., Torrance, L., Solovyev, A. G., Morozov, S. Y., Jackson, A. O., & Gilmer, D. (2010). Varied movement strategies employed by triple gene block-encoding viruses. In *Molecular Plant-Microbe Interactions* (Vol. 23, Issue 10, pp. 1231–1247). <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-10-0086>
- Vidovic, I., Nottrott, S., Hartmuth, K., Lührmann, R., & Ficner, R. (2000). Crystal structure of the spliceosomal 15.5kD protein bound to a U4 snRNA fragment. *Molecular Cell*, *6*(6), 1331–1342. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00131-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00131-3)
- Wang, A., & Krishnaswamy, S. (2012). Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. In *Molecular Plant Pathology* (Vol. 13, Issue 7, pp. 795–803). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00791.x>
- Wang, D., & Maule, A. J. (1995). Inhibition of host gene expression associated with plant virus replication. *Science*, *267*(5195), 229–231. <https://doi.org/10.1126/science.267.5195.229>
- Wang, D., Sun, S., Ren, Y., Li, S., Yang, X., & Zhou, X. (2020). RepA Promotes the Nucleolar Exclusion of the V2 Protein of Mulberry Mosaic Dwarf-Associated Virus. *Frontiers in Microbiology*, *11*(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01828>
- Wang, H., Boisvert, D., Kim, K. K., Kim, R., & Kim, S. H. (2000). Crystal structure of a fibrillar homolog from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution. *EMBO Journal*, *19*(3), 317–323. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.3.317>
- Wang, L., Ding, Y., He, L., Zhang, G., Zhu, J.-K., & Lozano-Duran, R. (2019). A virus-encoded protein suppresses methylation of the viral genome in the Cajal body through its interaction with AGO4. *BioRxiv*, 811091. <https://doi.org/10.1101/811091>
- Wang, X., Zhang, Y., Xu, J., Shi, L., Fan, H., Han, C., Li, D., & Yu, J. (2012). The R-rich motif of Beet black scorch virus P7a movement protein is important for the nuclear localization, nucleolar targeting and viral infectivity. *Virus Research*, *167*(2), 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.05.001>

BIBLIOGRAFÍA

- Wang, Y., Tzfira, T., Gaba, V., Citovsky, V., Palukaitis, P., & Gal-On, A. (2004). Functional analysis of the Cucumber mosaic virus 2b protein: Pathogenicity and nuclear localization. *Journal of General Virology*, *85*(10), 3135–3147. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80250-0>
- Watkins, N. J., Ségault, V., Charpentier, B., Nottrott, S., Fabrizio, P., Bachi, A., Wilm, M., Rosbash, M., Branlant, C., & Lührmann, R. (2000). A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. *Cell*, *103*(3), 457–466. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00137-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00137-9)
- Wootton, S. K., Rowland, R. R. R., & Yoo, D. (2002). Phosphorylation of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein. *Journal of Virology*, *76*(20), 10569–10576. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.20.10569-10576.2002>
- Wright, P. E., & Dyson, H. J. (2014). Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2015* *16*:1, *16*(1), 18–29. <https://doi.org/10.1038/nrm3920>
- Xing, Y., & Shi, Z. (2011). Nucleocapsid protein VP15 of White spot syndrome virus colocalizes with the nucleolar proteins nucleolin and fibrillarin. <https://doi.org/10.1139/W11-061>, *57*(9), 759–764. <https://doi.org/10.1139/W11-061>
- Xue, B., Blocquel, D., Habchi, J., Uversky, A. v., Kurgan, L., Uversky, V. N., & Longhi, S. (2014). Structural disorder in viral proteins. *Chemical Reviews*, *114*(13), 6880–6911. <https://doi.org/10.1021/CR4005692>
- Yan, Y., Du, Y., Wang, G., & Li, K. (2017). Non-structural protein 1 of H3N2 influenza A virus induces nucleolar stress via interaction with nucleolin. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-18087-2>
- Yang, S. L., DeFalco, L., Anderson, D. E., Zhang, Y., Aw, J. G. A., Lim, S. Y., Lim, X. N., Tan, K. Y., Zhang, T., Chawla, T., Su, Y., Lezhava, A., Merits, A., Wang, L. F., Huber, R. G., & Wan, Y. (2021). Comprehensive mapping of SARS-CoV-2 interactions in vivo reveals functional virus-host interactions. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-25357-1>

BIBLIOGRAFÍA

- Yang, X., Ren, Y., Sun, S., Wang, D., Zhang, F., Li, D., Li, S., & Zhou, X. (2018). Identification of the Potential Virulence Factors and RNA Silencing Suppressors of Mulberry Mosaic Dwarf-Associated Geminivirus. *Viruses*, *10*(9), 472. <https://doi.org/10.3390/v10090472>
- Yang, Y., Ding, B., Baulcombe, D. C., & Verchot, J. (2000). Cell-to-cell movement of the 25K protein of Potato virus X is regulated by three other viral proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *13*(6), 599–605. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.6.599>
- Yángüez, E., & Nieto, A. (2011). So similar, yet so different: Selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. *Virus Research*, *156*(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2010.12.016>
- Yao, R. W., Xu, G., Wang, Y., Shan, L., Luan, P. F., Wang, Y., Wu, M., Yang, L. Z., Xing, Y. H., Yang, L., & Chen, L. L. (2019). Nascent Pre-rRNA Sorting via Phase Separation Drives the Assembly of Dense Fibrillar Components in the Human Nucleolus. *Molecular Cell*, *76*(5), 767–783.e11. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2019.08.014>
- Ye, K., Jia, R., Lin, J., Ju, M., Peng, J., Xu, A., & Zhang, L. (2009). Structural organization of box C/D RNA-guided RNA methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(33), 13808–13813. https://doi.org/10.1073/PNAS.0905128106/SUPPL_FILE/0905128106SI.PDF
- Yi, Y., Li, Y., Meng, Q., Li, Q., Li, F., Lu, B., Shen, J., Fazli, L., Zhao, D., Li, C., Jiang, W., Wang, R., Liu, Q., Szczepanski, A., Li, Q., Qin, W., Weiner, A. B., Lotan, T. L., Ji, Z., ... Cao, Q. (2021). A PRC2-independent function for EZH2 in regulating rRNA 2'-O methylation and IRES-dependent translation. *Nature Cell Biology*, *23*(4), 341–354. <https://doi.org/10.1038/S41556-021-00653-6>
- Yildirim, S., Castano, E., Sobol, M., Philimonenko, V. v., Dzajak, R., Venit, T., & Hozák, P. (2013). Involvement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in RNA polymerase I transcription. *Journal of Cell Science*, *126*(Pt 12), 2730–2739. <https://doi.org/10.1242/JCS.123661>
- Yoo, D., Wootton, S. K., Li, G., Song, C., & Rowland, R. R. (2003). Colocalization and interaction of the porcine arterivirus nucleocapsid protein with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *Journal of Virology*, *77*(22), 12173–12183. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.22.12173-12183.2003>

BIBLIOGRAFÍA

- You, J., Dove, B. K., Enjuanes, L., DeDiego, M. L., Alvarez, E., Howell, G., Heinen, P., Zambon, M., & Hiscox, J. A. (2005). Subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *The Journal of General Virology*, *86*(Pt 12), 3303–3310. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.81076-0>
- Zamudio-Moreno, E., Ramirez-Prado, J. H., Moreno-Valenzuela, O. A., & Lopez-Ochoa, L. A. (2015). Early diagnosis of a Mexican variant of Papaya meleira virus (PMeV-Mx) by RT-PCR. *Genetics and Molecular Research: GMR*, *14*(1), 1145–1154. <https://doi.org/10.4238/2015.FEBRUARY.6.18>
- Zhang, X., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., Patel, D. J., & Chua, N. H. (2006). Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes and Development*, *20*(23), 3255–3268. <https://doi.org/10.1101/gad.1495506>
- Zhao, X., Wang, X., Dong, K., Zhang, Y., Hu, Y., Zhang, X., Chen, Y., Wang, X., Han, C., Yu, J., & Li, D. (2015). Phosphorylation of Beet black scorch virus coat protein by PKA is required for assembly and stability of virus particles. *Scientific Reports*, *5*. <https://doi.org/10.1038/srep11585>
- Zheng, L., Du, Z., Lin, C., Mao, Q., Wu, K., Wu, J., Wei, T., Wu, Z., & Xie, L. (2015). Rice stripe tenuivirus p2 may recruit or manipulate nucleolar functions through an interaction with fibrillarin to promote virus systemic movement. *Molecular Plant Pathology*, *16*(9), 921–930. <https://doi.org/10.1111/mpp.12220>
- Zheng, L., He, J., Ding, Z., Zhang, C., & Meng, R. (2018). Identification of Functional Domain(s) of Fibrillarin Interacted with p2 of Rice stripe virus. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, *2018*(Cmv). <https://doi.org/10.1155/2018/8402839>
- Zheng, L. L., Li, C., Ping, J., Zhou, Y., Li, Y., & Hao, P. (2014). The domain landscape of virus-host interactomes. *BioMed Research International*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/867235>