

Tesis doctoral

Estudio de la sumoilación en el papel de la proteína Rep en el replisoma viral



Blanca Sabarit Peñalosa

Director: Eduardo Rodríguez Bejarano

Programa de Doctorado en Biotecnología Avanzada
Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga
2023



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Blanca Sabarit Peñalosa

 <https://orcid.org/0000-0003-0614-3347>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



Tesis doctoral

Estudio de la sumoilación en el papel de la proteína Rep en el replisoma viral

Memoria para optar al Grado de Doctor
presentada por
Blanca Sabarit Peñalosa

Director
Dr. Eduardo Rodríguez Bejarano

Programa de Doctorado en Biotecnología Avanzada

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”.
Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Universidad de Málaga
(IHSM-UMA-CSIC).

Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Celular, Genética y
Fisiología.

2023



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña BLANCA SABARIT PEÑALOSA

Estudiante del programa de doctorado BIOTECNOLOGÍA AVANZADA de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: ESTUDIO DE LA SUMOILACIÓN EN EL PAPEL DE LA PROTEÍNA REP EN EL REPLISOMA VIRAL.

Realizada bajo la tutorización de EDUARDO RODRÍGUEZ BEJARANO y dirección de EDUARDO RODRÍGUEZ BEJARANO (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 24 de MAYO de 2023

Fdo.: BLANCA SABARIT PEÑALOSA Doctorando/a	Fdo.: EDUARDO RODRÍGUEZ BEJARANO Tutor/a
Fdo.: EDUARDO RODRÍGUEZ BEJARANO Director/es de tesis	





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Facultad de Ciencias

Departamento de Biología celular, Genética y Fisiología

Dr. **Eduardo Rodríguez Bejarano**, Catedrático de Genética de la Universidad de Málaga,

INFORMA:

Que Dña. **Blanca Sabarit Peñalosa** ha realizado bajo mi dirección y supervisión el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral titulada “**Estudio de la sumoilación en el papel de la proteína Rep en el replisoma viral**” con la cual aspira a la obtención del grado de Doctor en Biotecnología Avanzada.

Y para que así conste, y tenga los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, se extiende el presente informe.

En Málaga, a 24 de mayo de 2023.

Dr. Eduardo Rodríguez Bejarano



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga y en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” CSIC. Ha sido financiada con la beca de Formación del Personal Investigador (FPI) BES-2014-069064 del Ministerio de Economía y Competitividad, dentro del proyecto “Emergencia viral y mosca blanca: interacciones multitróficas en el patosistema Geminivirus/Crinivirus-*Bemisia tabaci*-tomate” (AGL2013-48913-C2-2-R) concedido al Dr. Eduardo Rodríguez Bejarano.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

“La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia la verdad”

Julio Verne



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	I
LISTADO DE TABLAS	V
ABREVIATURAS.....	VII
SUMMARY	XI
INTRODUCCIÓN	1
GEMINIVIRUS: CUANDO MENOS ES MÁS.....	3
El género <i>Begomovirus</i>	5
Estructura del genoma: genes solapados y proteínas multifuncionales	6
Rep, la proteína esencial para la replicación	10
Ciclo de vida, replicación y movimiento.....	13
Tomando el control de la célula vegetal	17
Reprogramación del ciclo celular	17
Contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta	19
Diversidad y especiación: Mutación y Recombinación	20
Mutación	20
Recombinación homóloga	22
MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES.....	24
Ubiquitinación: una visión general.....	24
Componentes del sistema de ubiquitinación en plantas	25
El código ubiquitina	27
Papel de la ubiquitinación en plantas.....	28
Papel de la ubiquitinación en la respuesta frente a patógenos.....	29
Ubiquitinación y geminivirus	30
Sumoilación	31
La ruta de sumoilación.....	32
Componentes de la maquinaria de sumoilación en plantas	34
SUMO: el pequeño modificador similar a la ubiquitina	34
E1: Enzima activadora de SUMO.....	36
E2: Enzima conjugadora de SUMO	37
E3: Ligasas de SUMO	39
Proteasas de SUMO	41

Motivos para conjugar SUMO	42
Más allá de la SIMple sumoilación: interacción no covalente con SUMO	42
Papel de la sumoilación en plantas.....	43
SUMO, un peso pesado en la respuesta frente a estrés abiótico en las plantas	44
SUMO en la respuesta inmune.....	44
La sumoilación como diana en la patogénesis: efectores bacterianos	45
Interacción entre los virus y la ruta de sumoilación	46
Los virus y los niveles de SUMO	47
Los virus y la enzima activadora de SUMO	48
Los virus y la enzima conjugadora de SUMO.....	48
Los virus y las ligasas de SUMO	49
Algunas proteínas virales como las ligasas de SUMO	50
Los virus y las proteasas de SUMO	51
Virus de plantas y sumoilación	52
Papel SIMultáneo de SUMO y ubiquitina	53
DIANAS DE SUMO EN PLANTAS: PROTEÍNAS ESENCIALES PARA LA CÉLULA	55
PCNA: el director de orquesta en la horquilla de replicación	55
Papel de PCNA en la célula: un anillo para dominarlos a todos.....	57
Regulación de las funciones de PCNA en la célula: modificaciones postraduccionales.....	58
Ubiquitinación de PCNA: control de la vía de tolerancia al daño en el DNA (DDT).....	60
Sumoilación de PCNA: preservando la estabilidad del genoma.....	63
Srs2: <i>Supresor of RAD6 mutant</i>	64
Papel multifuncional de Srs2	67
Mecanismos de reparación de las roturas del DNA de doble cadena (DSBs)	67
Actividad de Srs2 en la horquilla de replicación	70
Papel de Srs2 en la reparación de la rotura del DSB	71
Papel de las modificaciones postraduccionales de Srs2.....	72
Funciones adicionales de Srs2	73
OBJETIVOS	75

MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
MÉTODOS GENERALES	81
MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	81
<i>Escherichia coli</i>	81
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	82
MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	82
Cultivo de <i>A. thaliana</i>	82
Líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i>	83
Cultivo de <i>N. benthamiana</i>	83
CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS	83
Clonación de los sistemas de sumoilación y ubiquitinación en <i>E. coli</i>	83
Dianas y genes virales	83
Sistema de sumoilación.....	86
Sistema de ubiquitinación.....	87
Plásmidos utilizados en ensayos en plantas.....	88
Ensayo de sumoilación en <i>N. benthamiana</i>	88
Localización subcelular en <i>N. benthamiana</i>	88
Complementación fluorescente bimolecular (BiFC).....	89
Genotipado de las líneas de <i>A. thaliana</i> generadas	90
Expresión inducible de Rep de geminivirus en <i>A. thaliana</i>	90
ENSAYOS EN BACTERIAS.....	91
Ensayo de sumoilación con el sistema reconstituido en <i>E. coli</i>	91
Ensayo de ubiquitinación con el sistema reconstituido en <i>E. coli</i>	91
Ensayo de expresión de AtSRS2 en <i>E. coli</i>	91
Extracción de proteínas de <i>E. coli</i>	92
ENSAYOS EN PLANTAS	92
Ensayo de sumoilación en <i>N. benthamiana</i>	92
Expresión transitoria de proteínas en <i>N. benthamiana</i> : localización subcelular y ensayos de complementación fluorescente bimolecular (BiFC).....	93
Extracción de proteínas a partir de tejido vegetal	94
Western blot.....	94
Microscopía confocal.....	95
Expresión de C1 y AC1 en <i>A. thaliana</i>	95
Extracción de RNA.....	96
Síntesis de cDNA	96

PCR cuantitativa (qPCR).....	97
Extracción de DNA genómico de plantas	97

RESULTADOS 1: Análisis de la interferencia de las proteínas de los geminivirus implicadas en su replicación con las modificaciones postraduccionales de PCNA de tomate 105

Rep reduce la sumoilación de PCNA.....	107
La interacción de Rep con la enzima conjugadora de SUMO no participa en la reducción de la sumoilación de PCNA.....	111
PCNA de tomate se sumoila en las lisinas 164 y 254	113
El sistema de sumoilación de <i>A. thaliana</i> también modifica PCNA de tomate <i>in bacteria</i>	115
SIPCNAs se sumoila en las lisinas 164 y 254 con el sistema de <i>A. thaliana</i>	118
Rep también interfiere en la modificación de PCNA por SUMO usando el sistema de sumoilación de <i>Arabidopsis</i> reconstituido en bacteria	119
Rep también reduce la sumoilación de PCNA de tomate <i>in planta</i>	120
REn también reduce la sumoilación de PCNA	123
REn no se sumoila utilizando el sistema de sumoilación de <i>Arabidopsis</i> reconstituido en bacteria.....	124
PCNA de tomate se ubiquitina en la lisina K164.....	126
Rep no interfiere en la ubiquitinación de PCNA de tomate.....	130
Rep favorece la localización de SIPCNAs en áreas concretas del nucleoplasma.....	131
La unión a AtSUMO1 activa la localización de PCNA de tomate en foci en el núcleo	133
La mutación de las lisinas 164 y 254 de PCNA de tomate no alteran su interacción con AtSUMO1	136
PCNA también interacciona con SUMO de forma no covalente	138
PCNA de tomate contiene dos motivos potenciales de interacción con SUMO	140

RESULTADOS 2: Análisis de la helicasa de DNA SRS2 de *Arabidopsis* 143

SRS2 es una proteína conservada en plantas.....	145
SRS2 de <i>A. thaliana</i> se sumoila utilizando un sistema reconstituido en <i>E. coli</i>	152
SRS2 de <i>A. thaliana</i> se localiza en el núcleo y nucleolo	157
AtSRS2 colocaliza con AtPCNA y AtSUMO1 en el núcleo	158

AtSRS2 interacciona con PCNA y SUMO, pero no consigo mismo.....	158
AtSRS2 interacciona con enzimas de la ruta de sumoilación pero no con Rep	159
Caracterización de la interacción de AtSRS2 con SIPCNA y AtSUMO1..	162
DISCUSIÓN.....	165
¿Qué efecto/s tienen Rep y ren sobre las modificaciones postraduccionales de PCNA?.....	167
PCNA de tomate se sumoila	167
PCNA y SUMO interaccionan de forma covalente y no covalente en el núcleo y el citoplasma	169
Rep y REn reducen la sumoilación pero no la ubiquitinación de PCNA..	170
Modelo teórico de la interacción de Rep y PCNA.....	172
La conjugación de SUMO y la expresión de Rep aceleran la localización temprana de PCNA en subáreas nucleares.....	176
¿Cuáles son las posibles consecuencias biológicas del efecto de Rep y REn sobre las modificaciones postraduccionales de PCNA?	177
Rep y REn en la sumoilación de PCNA en la planta durante el proceso de infección.....	177
SRS2 es una proteína conservada en plantas.....	177
Hipótesis	180
Consecuencias biológicas de la no interferencia de Rep sobre la ubiquitinación de PCNA en la planta	181
Impacto de Rep en en el funcionamiento de PCNA como plataforma para regular el metabolismo del DNA	183
CONCLUSIONS	185
APÉNDICE: Desarrollo de herramientas para el análisis de los cambios producidos por Rep en el sumoiloma de la planta.....	189
INTRODUCCIÓN	191
Definiendo el sumoiloma de <i>Arabidopsis</i>	191
Estudios proteómicos para determinar el sumoiloma de <i>Arabidopsis</i>	191
La aplicación de estrés aumenta el número de conjugados en la planta....	199
RESULTADOS.....	201
Generación de líneas de <i>Arabidopsis</i> para la expresión inducible de Rep de geminivirus y la detección optimizada de conjugados de SUMO1	201
Ensayos de expresión de C1 y AC1.....	204

DISCUSIÓN	209
ANEXO	213
BIBLIOGRAFÍA	222

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de la cápside de geminivirus y síntomas comunes en plantas infectadas	4
Figura 2	Organización del genoma del género <i>Begomovirus</i>	7
Figura 3	Dominios y motivos identificados en Rep	13
Figura 4	Ciclo de vida de los geminivirus	14
Figura 5	Modelos de los mecanismos de replicación de los geminivirus	16
Figura 6	Ciclo de conjugación de la ubiquitina	26
Figura 7	Clases de ligasas de ubiquitina E3 en plantas	28
Figura 8	Ciclo de conjugación de SUMO	33
Figura 9	Consecuencias funcionales de la sumoilación	34
Figura 10	Modelos estructurales de SUMO1 y ubiquitina de <i>A. thaliana</i>	35
Figura 11	Representación esquemática de los tres tipos de ligasas de SUMO E3 presentes en plantas	40
Figura 12	Proteínas β <i>clamp</i> de diferentes organismos	56
Figura 13	Comparación de PCNA modificado por SUMO y ubiquitina	58
Figura 14	Mecanismos de tolerancia a daño del DNA	61
Figura 15	Regulación de las vías de tolerancia al daño del DNA mediante la modificación postraducciona de PCNA	62
Figura 16	Organización de la proteína Srs2 de <i>S. cerevisiae</i>	65
Figura 17	Mecanismos de reparación de la rotura de DNA de doble cadena (DSB)	69
Figura 18	Mecanismos de acción de Srs2	72
Figura 19	Rep modula la sumoilación de PCNA utilizando un sistema reconstituido en bacteria	109
Figura 20	Rep interfiere de forma específica con la sumoilación de PCNA	111
Figura 21	La interacción entre Rep y SCE no es esencial para suprimir la sumoilación de PCNA <i>in bacteria</i>	112
Figura 22	PCNA de tomate se sumoila en las lisinas 164 y 254	115
Figura 23	El sistema de sumoilación de <i>A. thaliana</i> también modifica PCNA de tomate <i>in bacteria</i>	117
Figura 24	SUMO 1 de <i>A. thaliana</i> modifica los mismos residuos de PCNA de tomate en un sistema reconstituido en bacterias	118
Figura 25	Rep interfiere en la sumoilación de PCNA de tomate en un sistema de <i>Arabidopsis</i> reconstituido en bacteria	119
Figura 26	Rep compromete la sumoilación de PCNA de tomate <i>in planta</i>	121

Figura 27	REn también reduce la sumoilación de PCNA de tomate con el sistema reconstituido en bacteria	124
Figura 28	Identificación de un residuo de lisina (K130) como sitio putativo de sumoilación en REn de TGMV y su conservación en diferentes begomovirus	125
Figura 29	REn no se sumoila usando el sistema de sumoilación reconstruido en <i>E. coli</i>	126
Figura 30	PCNA de tomate se ubiquitina en la lisina 164	128
Figura 31	Rep no interfiere en la ubiquitinación de PCNA de tomate utilizando un sistema reconstituido en bacteria	130
Figura 32	La presencia de Rep de los virus TGMV y TYLVC acelera la localización subcelular de GFP-PCNA en foci	132
Figura 33	La mutación de las principales lisinas sumoilables de SIPCNA no altera su distribución subnuclear, pero la unión covalente de SUMO acelera su localización en foci	135
Figura 34	Ensayo de interacción por BiFC de SUMO1 y los mutantes de PCNA de tomate	137
Figura 35	Ensayo de interacción por BiFC de PCNA con las variantes de SUMO1	140
Figura 36	Localización de los motivos de interacción con SUMO identificados en PCNA de tomate	142
Figura 37	Esquema de la organización de los dominios y motivos identificados en SRS2	145
Figura 38	Motivos helicasa conservados en UvrD de <i>E. coli</i> , Srs2 de levaduras y plantas	150
Figura 39	Modelos de la estructura tridimensional del dominio helicasa de EcUvrD (1-646 aa), ScSrs2 (246-915 aa) y AtSRS2 (246-915 aa)	151
Figura 40	Ensayos de sobreexpresión de AtSRS2 en <i>E. coli</i>	154
Figura 41	Ensayo de sumoilación de AtSRS2 con el sistema de conjugación de SUMO reconstituido en <i>E. coli</i>	156
Figura 42	AtSRS2 se localiza en el núcleo y el nucleolo	157
Figura 43	AtSRS2 interacciona con AtPCNA1 y AtSUMO1 en el núcleo de la célula vegetal	158
Figura 44	AtSRS2 interacciona con SIPCNA y AtSUMO1 en el nucleoplasma y en cuerpos nucleares	159
Figura 45	AtSRS2 interacciona con las enzimas de la ruta de sumoilación SCE1 y SIZ1 de <i>Arabidopsis</i>	160
Figura 46	AtSRS2 no interacciona con Rep	161
Figura 47	AtSRS2 interacciona con SIPCNA de forma independiente a su sumoilación	163
Figura 48	AtSRS2 interacciona con AtSUMO1 de forma covalente y no covalente	164

Figura 49	Modelo hexamérico de Rep “cerrado” y “abierto”	174
Figura 50	Modelo de interacción de Rep con PCNA	175
Figura A1	Versión optimizada de SUMO1 de <i>Arabidopsis</i> para su purificación y detección por espectrometría de masas	195
Figura A2	Comparación del número total de conjugados de SUMO1 detectados por espectrometría de masas con la línea <i>sum1-1 sum2-1 6xHis-SUM1 H89R</i> en varios estudios proteómicos	193
Figura A3	Histograma de las categorías principales de la ontología de genes (GO) asociadas a la función molecular, los procesos biológicos y los componentes celulares de los genes que codifican las proteínas identificadas como dianas de SUMO en los distintos estudios proteómicos	197
Figura A4	Genotipado de las líneas de <i>Arabidopsis</i> generadas	202
Figura A5	Amplificación de los genes AC1 y C1 en las líneas generadas	204
Figura A6	Niveles de expresión relativa de AC1 en las líneas HSTG24 y HSTG25.3 a las 24, 48 y 72 horas	206
Figura A7	Niveles de expresión relativa de C1 en las líneas HSTS2 y HSTS1.3 a las 24, 48 y 72 horas	207
Figura A8	Niveles de expresión relativa de C1 en la línea HSTS1.3 a las 24, 48 y 72 horas tras la adición repetida de β -estradiol	208
Figura S1	Alineamiento múltiple de la secuencia proteica de PCNA de diferentes especies	215
Figura S2	Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de UvrD de <i>E. coli</i> , Srs2 de levaduras y los homólogos presentes en diferentes especies de plantas	220
Figura S3	Listado de las proteínas sumoiladas de <i>Arabidopsis</i> identificadas por espectrometría de masas en los diferentes estudios mencionados.	221

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	Géneros de la familia <i>Geminiviridae</i>	5
Tabla 2	Listado de las proteínas interactoras de Rep más conocidas	11
Tabla 3	Componentes del sistema de sumoilación de <i>A. thaliana</i>	38
Tabla 4	Anticuerpos usados en este trabajo	95
Tabla 5	Lista de vectores utilizados en esta tesis doctoral	102
Tabla 6	Lista de oligonucleótidos usada en este trabajo	104
Tabla 7	Motivos SIM identificados para distintos homólogos de PCNA	141
Tabla 8	Listado de homólogos de Srs2 en varias especies de plantas	146
Tabla 9	Dominio helicasa identificado en UvrD, Srs2 y homólogos de Srs2	147
Tabla 10	Potenciales motivos SIM identificados en los homólogos de SRS2	152
Tabla 11	Potenciales sitios de sumoilación identificados en los homólogos de SRS2 estudiados	153
Tabla A1	Resumen de los estudios proteómicos llevados a cabo para identificar los componentes del sumoiloma de <i>Arabidopsis</i>	194
Tabla A2	Proteínas sumoiladas destacadas en estudios proteómicos en <i>Arabidopsis</i>	199
Tabla A3	Resumen de las líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> generadas	201
Tabla A4	Prueba de χ^2 para la selección de líneas homocigotas	205



ABREVIATURAS

A

AAA⁺: (de *ATPases associated with diverse cellular activities*), ATPasas asociadas a diversas actividades celulares

APIM: (de *AlkB homologue 2 PCNA-interacting motif*), motivo de interacción con PCNA homólogo de AlkB 2

B

BIR: (de *break-induced replication*), replicación inducida por replicación

C

CDS: (de *coding DNA sequence*), secuencia codificante de DNA

CELO: *chicken embryo lethal orphan*

CMT3: (de *chromomethylase 3*), cromometilasa 3

COP1: (de *constitutive photomorphogenetic 1*), proteína fotomorfogenética constitutiva 1

CP: (de *coat protein*), proteína de la cápside

CLR: (de *cullin-RING Ligases*), ligasas de culin-RING

CR: (de *common region*), región común;

CRA: (de *common región A*), región común A

CRB: (de *common región B*), región común B

CREES: (de *circular Rep encoding single-stranded DNA*), Rep codificada por ssDNA

CS: (de *complementary sense*), en sentido complementario

CSN: (de *COP9 signalosome*), complejo del señalosoma COP9

CSS: (de *complementary strand synthesis*), síntesis de la cadena complementaria

CTD: (de *C-terminus domain*), dominio C-terminal

D

DCL: (de *dicer-like protein*), proteína tipo Dicer

DDT: (de *DNA damage tolerance*), tolerancia al daño en el DNA

DeSI: (de *desumoylating isopeptidase*), isopeptidasa desumoiladora

dHJ: (*double Holliday Junction*), unión Holliday doble

dpi: días post-infección

DSB: (de *double-strand break*), rotura del DNA de doble cadena

DSBR: (de *double-strand break repair*), reparación de la rotura del DNA de doble cadena

dsDNA: (de *double-stranded DNA*), DNA de doble cadena

DSP: (de *deSUMOylating protease*), proteasa desumoiladora

dsRNA: (de *double-stranded RNA*), RNA de doble cadena

DUB: (de *desubiquitinating enzyme*), enzima desubiquitinadora

E

ELS1: (de *ESD4-like SUMO protease 1*), proteasa de SUMO similar a ESD4

ESD4: *early in short days 4*

ETI: (de *effector-triggered immunity*), inmunidad inducida por efectores

F

FUG1: (de *fourth ULP gene class 1*), cuarto gen ULP de clase 1

G

GC: (de *gene conversión*), conversión génica

GRAB: (geminivirus Rep-A *binding protein*), proteína de unión a RepA

GRS: (de geminivirus Rep *sequence*), secuencia de Rep de geminivirus

GRIK: (de geminivirus Rep *interacting kinase*), quinasa interactor de Rep

GRIMP: (de geminivirus Rep *interacting motor protein*), proteína motora interactor de Rep

H

HECT: (de *homologous to E6-associated protein C-Terminus*), homólogo al C-terminal de la proteína asociada a E6

HJ: (de *Holliday Junction*), unión Holliday

HPY2: *high ploidy-2*

HR: (de *homologous recombination*), recombinación homóloga

HR: (de *hipersensitivity response*), respuesta de hipersensibilidad

HUB1: (de *histone ubiquitination 1*), proteína ubiquitinadora de histonas 1

I

ICTV: (de *International Committee on Taxonomy of Viruses*), Comité Internacional sobre la taxonomía de los virus

IDCL: (de *interdomain connector loop*), bucle de conexión entre dominios

IR: (de *intergenic region*), región intergénica

L

LANA: (de *latency-associated nuclear antigen*), antígeno nuclear asociado a la latencia

LMP1: (de *latent membrane protein-1*), proteína latente de membrana

M

MAPK: (de *mitogen-activated protein kinase*), proteína quinasa activada por mitógeno

MCM2: (*minichromosome maintenance protein 2*), proteína de mantenimiento de minicromosomas 2

MES: ácido 2-N-morfolino-etanosulfónico

MET1: (de *cytosine DNA-methyltransferase 1*), metiltransferasa 1

MMS21: *methyl methanesulfonate-sensitive-21*,

MP: (de *movement protein*), proteína de movimiento

MS: medio de Murashige y Skoog

N

ND: no descrito

NDSM: (*negatively charged amino acid-dependent SUMO motifs*), motivos SUMO dependientes de aminoácidos cargados negativamente

NHEJ: *non-homologous end joining*

NLS: (de *nuclear localization sequence*), secuencia de localización nuclear

NPR1: *nonexpressor of PR genes 1*

NSP: (de *nuclear shuttle protein*), proteína lanzadera nuclear

NW: (de *New World*), nuevo mundo

O

ORF: (de *open reading frame*), marco abierto de lectura

OTS: *overly tolerant to salt*

OW: (de *Old World*), viejo mundo

P

PAMP: (de *pathogen-associated molecular pattern*), patrón molecular asociado a patógenos

PARI: (de *PCNA-associated recombination inhibitor*),

PCNA: (de *proliferating cell nuclear antigen*), antígeno nuclear de la célula proliferante

PCR: (de *polymerase chain reaction*), reacción en cadena de la polimerasa

PDSM: (de *phosphorylation-dependent SUMO motifs*), motivos SUMO dependientes de fosforilación

PHD: (de *plant homeodomain*), homeodominio de plantas

PIAS: (*protein inhibitor of activated STAT*), proteína inhibidora de STAT activado

PIM: (de *PCNA interacting motif*), motivo de interacción con PCNA

PIP: (de *PCNA interacting protein*), proteína interactora de PCNA

PML: (de *promyelocytic leukaemia*), proteína de la leucemia promielocítica

Pol: polimerasa

PR: (de *pathogenesis related-genes*), genes relacionadas con patogénesis

PRR: (de *pattern-recognition receptor*), receptor de reconocimiento de patrones

PRR: (de *post replication repair*), reparación postreplicativa

PTGS: (de *post-transcriptional gene silencing*), silenciamiento génico post-transcripcional

PTI: (de *pattern-triggered immunity*), inmunidad activada por patrones

PTM: (de *post-translational modification*), modificación postraducciona

R

RanBP2: (de *Ran-binding protein 2*), proteína de unión a Ran 2

RBR: (de *Retinoblastoma-related protein*), proteína relacionada con el retinoblastoma

RBR: (de *RING between RING*), RING entre RING

RCR: (de *rolling circle replication*), replicación por círculo rodante

RDR: (de *recombinant-dependent replication*), replicación dependiente de recombinación

Rep: (de *replication protein*), proteína asociada a la replicación

REn: (de *replication enhancer protein*), proteína potenciadora de la replicación

RF: (de *replicative form*), forma replicativa

RFC: (de *replication factor C*), factor de replicación C

RING: *really interesting new gene*

RPA: (de *replication protein A*), proteína de replicación A

RUB: (de *related to ubiquitin*), relacionado con la ubiquitina

S

SA: (de *salicylic acid*), ácido salicílico

SAE: (de *SUMO activating enzyme*), enzima activadora de SUMO

SAMDC1: (de *S-adenosyl-methionine decarboxylase 1*), descarboxilasa de S-adenosil-metionina 1

SAR: (de *systemic acquired resistance*), resistencia sistémica adquirida

SAS: (de *SUMO attachment sites*), sitios de unión a SUMO

SCE: (de *SUMO-conjugating enzyme*), enzima conjugadora de SUMO

SCF: (de *SKP1, CUL1, F-box protein complex*), complejo de proteínas SKP1, CUL1 y caja F

SCJ: (de *sister chromatid junctions*), de uniones de cromátidas hermanas

SDSA: (de *synthesis-dependent strand-annealing pathway*)

SF: superfamilia

SIM: (de *SUMO interacting motif*), motivo de interacción con SUMO

SIR: (de *small intergenic region*), región intergénica pequeña

SLD: (de *SUMO-like domain*), dominio similar a SUMO

SLiM: (de *short linear motif*), motivo linear corto

SPF: (de *SUMO protease related to fertility*), proteasa de SUMO relacionada con la fertilidad

SR: (de *salvage recombination*), recombinación de salvamento

SRS2: (de *suppressor of rad 6 mutant*), supresor del mutante *rad6*

SSA: (de *single strand annealing*), recocido de la cadena sencilla

ssDNA: (de *single-stranded DNA*), DNA de doble cadena

STR: Sgs1/Top3/Rmi1

STUbL: (de *SUMO targeted ubiquitin ligases*), ligasas de ubiquitina dirigidas por SUMO

SUMO: (de *small ubiquitin-like modifier*), pequeño modificador similar a la ubiquitina

T

T3E: (de *type three effector*), efector de tipo III

TF: (de *transcription factor*), factor de transcripción

TGS: (de *transcriptional gene silencing*), silenciamiento génico transcripcional

TIR-NB-LRR: *toll interleukin-1 receptor-nucleotide binding-leucine-rich repeat*

TLS: (de *translesion synthesis*), síntesis de translesión

TrAp: (*transcriptional activator protein*), proteína activadora de la transcripción

TS: (*template switching*), cambio de molde

U

UBA: (*ubiquitin-activating enzyme*), enzima activadora de ubiquitina

UBC: (de *ubiquitin-conjugating enzyme*), enzima conjugadora de ubiquitina

UEP: (de *ubiquitin extension protein*), proteína de extensión de ubiquitina

UFD: (de *ubiquitin-fold domain*), dominio de plegamiento de ubiquitina

ULP: (de *ubiquitin-like protease*), proteasa

UPS: (de *ubiquitin proteasome system*), sistema ubiquitina-proteosoma

USLP1: (de *ubiquitin-specific protease-like*), proteasa específica similar a la ubiquitina

USP: (de *ubiquitin-specific peptidase*), peptidasa específica de ubiquitina

V

v-ori: origen de replicación en la cadena del virión

VIM5: (de *variant in methylation 5*), variante en metilación 5

VS: (de *virion sense*), en sentido del virión

SUMMARY

Introduction

Geminiviruses are important plant-infecting insect-transmitted viruses that causes substantial crop losses in a wide range of economically important plant species in most tropical and subtropical regions of the world. Typical symptoms associated with geminivirus infection consist of chlorotic, leaf curling, yellow mosaic/mottle pattern, vein swelling and a drastic reduction in plant height because of the shortened internodes.

The *Geminiviridae* is a family of circular DNA viruses named based on their nature of twinned quasicosahedral particles. They have small genomes comprising one (monopartites) or two (bipartites) single-stranded DNA molecules (2.5-3.2 Kb) with limited coding capacities. Based on the insect vector, genome organization, genome-wide pairwise sequence identities and host range, this viral family is divided in fourteen genera: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Citlodavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Maldovirus*, *Mastrevirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus*, *Topilevirus*, *Topocuvirus* and *Turncurtovirus*. The genus *Begomovirus* encompasses the largest number of recognized virus species (445). Members of this genus infect dicotyledonous plants and are exclusively transmitted by whiteflies of the *Bemisia tabaci* cryptic species complex. The genome can be either monopartite, with a single genomic configuration (DNA-A like molecule) or bipartite (two genomic components, designated DNA-A and DNA-B). The DNA-A and DNA-like components encode from four to eight proteins through bidirectional and partially overlapping open reading frames (ORFs) located in both virion and complementary strands. The complementary strand encodes Rep (AC1/C1 gene), so-called the replication protein; TrAp (AC2/C2), which functions as a transcriptional activator protein; REn (AC3/C3), the replication enhancer protein; C4 (AC4/C4), a pathogenicity determinant; and C5 (AC5), not identified in all geminivirus genomes. The virion strand encodes the coat protein, CP (AV1/V1); V2 (AV2/V2), which exhibits movement and silencing suppressor functions; and V3 (V3), present in some geminivirus genomes. The DNA-B component of bipartite viruses encode a movement protein, MP (BC1), and a nuclear shuttle protein, NSP (BV1). A non-coding region called intergenic region

(IR) ~300 bp in size, separates the bidirectional transcription units. A portion of IR, called the common region (CR), is shared by DNA-A and DNA-B in bipartite begomoviruses. The CR contains a conserved stem loop-structured nonanucleotide (TAATATTAC) which acts as a cleavage site for Rep to initiate viral replication. Begomoviruses are also found to be associated with DNA satellites, classified into three types: alphasatellite, betasatellite, and deltasatellite. All the viral genes encode multifunctional, fast-evolving proteins that are involved in the replication, gene expression, virus movement, virus encapsidation, vector transmission and suppression of plant immunity.

Rep plays a central and indispensable role in viral replication, involved in initiation, elongation, and termination steps during the course of the process by virtue of its modular nature. It binds to DNA in a site specific manner at the iterons present in the intergenic region and initiates viral replication by creating a nick at the conserved nonanucleotide sequence. Rep also possesses ligase, ATPase, ATP-dependent topoisomerase I and DNA helicase activities. Among Rep interactors, there are many host factors, including retinoblastoma-related protein (RBR), a regulator of cell division; proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a DNA clamp and processivity factor of DNA polymerases; replication factor C (RFC), a DNA clamp loader; replication protein A (RPA), a single-stranded nucleic acid binding protein and SUMO-conjugating enzyme (SCE), an enzyme that transfers SUMO peptide to target proteins. Besides replication, Rep also plays an important role in transcription of the other viral genes and acts as a silencing suppressor.

Geminivirus infection modify the expression level of a number of plant genes, many of which regulate biological processes like cell cycle, nucleotide metabolism, DNA repair and DNA recombination. They need to hijack the host cell machinery to accomplish vital functions, since every described step in the infection process depends on plant proteins.

Geminiviruses infect terminally differentiated cells, which means that they have to reprogram the cell cycle, making the microenvironment suitable for its own replication. Rep protein has the capacity to promote cell cycle re-entry at least largely depends on its interaction with the Retinoblastoma-related Protein (RBR), a central negative regulator of cell cycle progression, further disrupting E2F-RBR

binding. This leads to activation of the expression of DNA polymerases and other replication related host factors which are regulated by E2F transcription factor.

Geminivirus replicates in nucleus of the infected plant cell mainly through rolling-circle mechanism (RCR) but also recombination-dependent mechanism (RDR). Geminivirus do not encode any DNA polymerase and rely entirely on the infected cell machinery to replicate their circular ssDNA genomes through double-stranded DNA (dsDNA) replicative forms (RFs). Host nucleosomes pack the dsDNA forming minichromosomes that reside in host nucleus and can act as a template for virus transcription. Virus transcription occurs bidirectionally from promoters within the IR, and produces transcripts from both the complementary and virion sense strands. Later replication, the synthesized viral genome (ssDNA) accumulates to high levels and shuttles to neighboring cells to expand the infection circle. This ssDNA genome is then available for encapsidation and acquisition by the insect vector.

To establish a productive infection, geminiviral-encoded proteins must overcome the multilayered antiviral immune system of the plant cell: RNA silencing, also designated RNA interference (RNAi), pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity (PTI), and effector-triggered immunity (ETI), autophagy, ubiquitin-mediated proteasomal degradation system and hormone-mediated response pathways. Against this wide range of defence mechanisms, geminiviruses deploy strategies for suppressing or modulating the plant immune response, hijacking ubiquitin-proteasome pathways, altering hormonal responses, deregulating the cell cycle and exploiting signalling cascades.

The diversification of geminiviruses suggests their evolutionary history and capability to reemerge as new species through genomic evolution. Genomic changes through mutations, recombination and pseudorecombination are crucial mechanisms for the evolution of all viruses, including geminiviruses, promoting the development of new species/strains/variants, which have the ability to evolve quickly and infect new hosts.

Post-translational modifications (PTMs)

Post-translational modifications (PTMs) refer to enzyme-mediated covalent addition of functional groups to proteins during or after biosynthesis. There are

more than 400 different types of PTMs having a significant impact on the structure and function of proteins, expanding the coding capacity of a genome to generate the highly diversified and expanded proteomes.

Protein post-translational modifications by small peptides, as ubiquitin and the ubiquitin-like family protein modifiers (Ubls) like SUMO (small ubiquitin-like modifier) constitute a key regulatory mechanisms that controls diverse aspects of plant biology. Ubiquitination (or ubiquitylation) and SUMOylation involves the covalently attachment of ubiquitin or SUMO peptides to a lysine residue of a substrate protein in a stepwise cascade catalyzed by an E1 activating enzyme, an E2 conjugating enzyme, and an E3 ligase. An E4 ligase may also be involved in the elongation of polyubiquitin chains. Both post-translational modifications are dynamic and reversible by specific Ub proteases. The ubiquitinated and SUMOylated proteins can rapidly induce subcellular redistribution, modulate protein–protein interactions, promote conformational changes or tagged substrates for degradation by the proteasome, subsequently altering their function.

In *Arabidopsis*, two enzymes have been identified that carry out E1 function, UBA1 and UBA2, while 37 E2 enzymes are predicted to be encoded in the genome and ~1500 genes are coding for components of E3 ligases. Once ubiquitin has been conjugated to a lysine residue, the ubiquitin moiety itself can also be ubiquitylated on one of its seven lysine residues or on its N-terminal methionine (Met1), resulting in polyubiquitin chains. Distinct ubiquitin chains (and distinctly modified ubiquitin chains: monoubiquitylation, multimono-ubiquitylation, homotypic and heterotypic polyubiquitylation) have been shown to encode different cellular functions, what is known as the ubiquitin code.

Ubiquitination can target substrates to the proteasome but also acts as a non-proteolytic signal, implicated in several biological processes. The ubiquitin proteasome system (UPS) is a rapid, adaptive mechanism for selective protein degradation, crucial for proper plant growth and development and an integral part of plant responses to stresses, including plant defence against pathogens. Proteasomal degradation pathways play a central role in regulating a variety of protein functions by controlling not only their turnover but also the physiological behaviour of the cell.

In the pathogen-host interactions, both tap into the rich source of versatile ubiquitination code in order to compete, combat, and co-evolve. Pathogens have

developed molecular strategies to subvert and/or co-opt ubiquitin signalling for their own purposes. They encode multifunctional proteins or secrete effectors that function as deubiquitinating enzymes (DUBs), E3 ubiquitin ligases or enzymes that modify ubiquitin and UbIs, either blocking or altering normal ubiquitin conjugation to substrates in cells.

RNA and DNA viruses are found to exploit the system in every imaginable manner at every stage of the viral life cycle, involving both ubiquitination and deubiquitination and the UPS system. They can adopt an existing ubiquitin regulatory pathway to hitchhike, or they can usurp the ubiquitin system for selective advantage towards them. Viruses are able to change the specificity of host ubiquitin enzymes, E3s or DUBs, to modulate a network of protein targets, or encode their own ubiquitin enzymes to modify a whole new set of substrates.

Geminivirus interact with ubiquitination pathway and UPS-related mechanisms to promote viral replication and propagation. Viral protein as TrAp, C4, Rep and β C1 have been described to interact with ubiquitin enzymes as ubiquitin conjugation enzymes and components of ubiquitin ligase complex to alter hormone signalling, skip immune response and promote viral replication and transcription.

In *Arabidopsis*, the SUMO conjugation machinery is composed of the SUMO isoforms (SUMO1-9); the E1 enzyme subunits SAE2, SAE1a and SAE1b; the E2 SCE1 (named Ubc9 in many organisms including yeast and mammals); the E3 ligases SIZ1, MMS21/HPY2 and PIAL1-2; and several SUMO-specific proteases (SENPs). SUMO1/2 isoforms are essential for the plant viability, SUMO3 is only present in some brassicas and it seems to be restricted to defense responses and SUMO5 is the less efficient isoform. The existence of distinctive SUMO isoforms and their attachment to substrates as monomers, in single or multiple positions, or as polymers by building polySUMO chains, contribute to the high complexity of the molecular consequences of SUMOylation. Once covalently conjugated to a substrate, SUMO often regulates the target protein's function by recruiting other cellular proteins. These protein interactors establish a non-covalent bond with SUMO through a SUMO-interacting motif (SIM).

In general, members of the SUMO conjugation/deconjugation machinery are enriched in the nucleus consistent with the massive accumulation of SUMO

conjugates in this compartment. In *Arabidopsis*, it is well established that the abundance of SUMO conjugates increases in response to exposure to different abiotic stresses and there is growing evidence that this link is conserved in many crop species such as maize, soybean or rice. In plants, as well as in animals, SUMO conjugation is essential during embryo development, modulates plant hormone signaling, root stem cell maintenance, the circadian clock, light signaling, plant immunity, tolerance to a wide range of abiotic and biotic stress and virtually any aspect of plant development.

Viruses can exploit the host SUMO system for their benefit and, by contrast, SUMOylation can eliminate viral infection by regulating host antiviral immune components. There are multiple mechanisms by which viruses manipulate the process of SUMOylation. They can inhibit or induce the global or specific conjugation of SUMO to host proteins by targeting different components of SUMOylation machinery and controlling SUMO expression levels. These intracellular pathogens can also encode their own SUMO E3 ligase or SUMO protease.

In animals, many families of viruses, specially DNA viruses, were shown to interact with the SUMO machinery. In contrast, only few examples of an interaction between viral proteins and the SUMOylation machinery have been described for plants so far. NIb protein from *Turnip mosaic virus* (TuMV) and begomoviral Rep have been reported to interact with SUMO conjugating enzyme (SCE1), which is required for viral infections. This interaction does not alter the host global SUMOylation pattern during geminiviral infection, but rather may specifically influence SUMO conjugation of a selected subset of host proteins. Besides, the stability of β C1 protein of *Synedrella yellow vein clearing virus* (SyYVCV), a newly identified begomovirus, is shown to be modulated by mutually antagonistic SUMOylation and SIM interactions.

PCNA: the maestro of the replication fork

PCNA is a member of the conserved β clamp family that acts as a processivity factor for replicative DNA polymerases. It forms a ring-shaped homotrimer in a closed head-to-tail ring structure. The inner surface, which encircles DNA, is formed by α hélices and it is positively charged, where as the

outer surface is composed of β sheets. Each PCNA monomer has two similar globular domains linked by the interdomain connecting loop (IDCL).

PCNA functions as a molecular platform for a plethora of cellular proteins involved in DNA replication, DNA repair and other fundamental processes of DNA metabolism. Many of the PCNA interactors exhibit a short linear motif (SLiM) involved in binding PCNA, the PCNA interacting protein box (PIP-box) or PCNA interacting motif (PIM).

Post-translational modifications of PCNA play a crucial role in regulating PCNA cellular function, such as channeling DNA damage tolerance (DDT) mechanisms to bypass unrepaired lesions and promote optimal fork replication restart, mainly by determining the interacting proteins to be recruited. Three main DDT pathways can be involved, which are as follows: the translesion synthesis (TLS), template switch (TS) and salvage recombination (SR) pathways.

PCNA ubiquitination processes trigger two main DDT sub-pathways: Rad6/Rad18-dependent PCNA monoubiquitination induces the switch from Pol δ to TLS polymerases for error-prone TLS damage bypass, and Ubc13-Mms2/Rad5-mediated PCNA polyubiquitination promotes error-free TS pathway. In contrast, PCNA SUMOylation by Ubc9-Siz1 enzymes impedes the homologous recombination (HR)-mediated SR pathway alternatively to TS or TLS, either at stalled replication forks (RFs) or at gaps left behind replication forks. The main PCNA target lysine modified by SUMO and ubiquitin is the conserved K164.

Suppressor of Rad 6 mutant 2 (Srs2)

Srs2 is a SF1a (Superfamily 1a) ATP-dependent DNA helicase that shares homology with the bacterial helicases UvrD, Rep and PcrA. Srs2 is capable of unwinding DNA with 3'-5' polarity and translocating on ssDNA. It can also unwind a variety of substrates containing forks, flaps, D-loops, Holliday junctions as well as 5' ssDNA overhangs and blunt end dsDNA substrates.

The UvrD helicase domain of Srs2 resides at the amino terminus (aa 1–776), that includes the conserved helicase motifs. The C-terminal region mediates many protein–protein interactions and residues targeted for post-translational



modifications. The Srs2 carboxy-terminal domain harbours tandem receptor motifs that interact independently with PCNA and SUMO and a Rad51-interaction region. Over a hundred proteins have been identified as Srs2 interactors, including HR-related and repair factors.

The Srs2 protein is conserved in fungi, and a clearly definable SRS2 homolog, as a single copy gene, have been identified throughout all members of the Viridiplantae, Heterokonts and Metazoa except mammals and fish. However, functional analogs of Srs2 have been described in mammals and birds. Nowadays there is no much information available on plant homologous proteins, reported mainly from studies on model organisms: *Arabidopsis*, where a functional DNA helicase with 3'-5' directionality has been confirmed, and *Physcomitrella patens*.

Srs2 fulfil important roles in DNA replication, recombination and repair to preserve genome integrity. In *S. cerevisiae*, it acts as a regulator of homologous recombination, involved in both DNA replication and repair. In replication, Srs2 prevents unscheduled recombination at ongoing replication forks, what is considered to be an anti-recombination role.

SUMOylated PCNA recruits Srs2 to sites of replication. PCNA-SUMO interacts with Srs2 through two interaction sites, the SUMO-specific and the PCNA-specific. Two mechanisms have been proposed to explain how Srs2 can prevent homologous recombination events: dismantling Rad51-ssDNA nucleoprotein filaments, a recombination intermediate, and dissociation of Pol δ -PCNA-SUMO complex, which limits DNA synthesis and thus the extension of the 3' end of the invading strand.

In dsDNA repair, Srs2 also promotes the non-crossover synthesis-dependent strand-annealing (SDSA) pathway, thus avoiding the potential for chromosomal rearrangements and loss of heterozygosity. It has been suggested that Srs2 promotes the SDSA pathway (pro-SDSA function) by regulating RAD51 binding during strand exchange or disrupting extended D-loops, a critical intermediate in determining crossover/non-crossover outcome.

Srs2 functions are regulated by post-translational modifications, mainly SUMOylation and phosphorylation. In yeast, Srs2 also plays a critical role during meiosis by resolving Rad51-ssDNA nucleoprotein strands and is involved in the

activation of replication checkpoints, as well as in the recovery and adaptation of the cell in response to cell cycle arrest.

Aims

The main aims of this thesis are:

1. To study the interference of viral proteins involved in geminivirus replication on the post-translational modifications of tomato PCNA.
2. To characterise the *Arabidopsis* SRS2 homologue protein and to study its possible role in geminivirus replication.
3. To develop tools to improve the identification of plant proteins whose SUMOylation is altered by geminiviral Rep.

RESULTS 1: Analysis of the interference of geminivirus replication proteins with post-translational modifications of tomato PCNA

Geminiviral Rep expression disrupt the SUMOylation pattern of specific plant proteins. However, the identity of these plant targets has not been determined, and proteins that both interact with Rep and are known to be SUMOylated have been proposed as primary candidates. One such protein is the conserved sliding clamp PCNA. It has been reported the SUMOylation of PCNA homologues from yeast to mammals, including the plant model *Arabidopsis*, as well as the binding of tomato PCNA to Rep from several begomoviruses.

In order to assess if tomato PCNA is SUMOylated and if Rep alters its SUMO modification, we used a mammalian and *Arabidopsis* SUMOylation system reconstituted *in bacteria*. This strategy was previously used to describe the SUMOylation of *Arabidopsis* PCNA homologues (APCNA1 and AtPCNA2) by Strzalka and coworkers (2012). All components of the SUMOylation pathway (SAE1/2, SCE1, and different isoforms of SUMO) and the potential substrate were expressed in *Escherichia coli* together using an inducible system based on T7 promoters. Total protein extracts from induced bacteria cells were analyzed with Western blots. A double band of the expected size of monoSUMOylated form of PCNA was detected when the plant substrate was expressed together with the

complete SUMOylation machinery. Next, to establish whether tomato PCNA also contains multiple SUMO acceptor sites, several candidate lysines residues, with K164 and K254 being the prime candidates, were picked for site-directed mutagenesis. Single and double mutants were generated for residues K164, K168, K190 and K254 and analyzed using our SUMOylation system in *E. coli*. These assays confirmed that double band represent tomato PCNA monomers monoSUMOylated at two different positions, K164 and K254 (upper and lower band, respectively) and that both residues can be conjugated to SUMO1 with similar efficiencies. Besides, we confirmed that PCNA can be posttranslationally modified by AtSUMO1 and AtSUMO2 but to a lesser extent, AtSUMO3. The coexpression of PCNA and Rep resulted, instead, in a strongly decrease in the intensity of the double band. Together, these results demonstrate that tomato PCNA is SUMOylated and that this post-translational modification is drastically reduced in the presence of the viral replication protein.

To go further into the mechanism of Rep-mediated suppression of PCNA SUMOylation, we analyzed the physical interaction of Rep with SCE1. Using the same strategy in *E. coli*, we coexpressed the Rep K68A/102A double mutant, impaired in its interaction with SCE1 together with PCNA and reconstituted SUMOylation system. The intensity of the double band identified as PCNA monoSUMOylated at two different lysines was similarly reduced, ruling out that Rep-mediated suppression of PCNA SUMOylation is not dependent of the direct SCE1-Rep interaction. Using the same strategy in *E. coli*, it was also confirmed that the impairment of PCNA SUMOylation is strictly due to coexpression of Rep, since its replacement of the viral protein by the C2 protein from the begomovirus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) did not reduce the SUMO covalent attachment to PCNA.

As the viral protein REn is also a PCNA and Rep interactor and it is involved in geminiviral replication, we also tested if REn coexpression is impairing PCNA SUMOylation. As described above, the Western blot analysis showed a decrease in the intensity of the two SUMOylated PCNA bands.

The SUMOylation of PCNA and Rep mediated suppression of the plant protein modification were subsequently corroborated *in planta* by Western blot. For this purpose, we transiently coexpressed PCNA-Flag and mature AtSUMO1, together with or without Rep in young *N. benthamiana* leaves. The plant leaves were

subjected to a heat shock at 37°C for 45 min to increase the levels of SUMO conjugates before total protein extraction.

To test whether tomato PCNA is also ubiquitinated, the lysines residues targeted by the modifier peptide and the effect of Rep coexpression, we performed ubiquitination assays in *E. coli*. The *Arabidopsis* ubiquitination machinery cloned into vectors for bacterial expression were kindly provided by Strzalka and coworkers. A single band identified as PCNA ubiquitinated at K164 was detected by western blotting. However, Rep did not impair PCNA-ubiquitin conjugation, in contrast to previously reported results for SUMOylation.

Since Rep promotes PCNA accumulation and it is required to restore DNA replication competency to differentiated host cells, we studied if Rep expression alter the subnuclear localization of tomato PCNA, which accumulates in the nucleus and the cytoplasm of plant cell. GFP-SIPCA and Rep from the begomoviruses TYLCV or TGMV were coinfiltrated in young leaves of *N. benthamiana*. GFP-SIPCA signals were visualized 2 and 3 dpi in nuclei of epidermal cells and they were classified into three distinct patterns namely I, II and III. They were characterized by an uniform, dotted signals or speckled signals of SIPCA in the nucleoplasm, respectively. Dotted and speckled signals were referred as foci. The simultaneously expression of Rep and GFP-SIPCA dynamically accelerated SIPCA redistribution in foci in nucleoplasm. A similar result was observed when expressing AtSUMO1 fused to SIPCA (SIPCA-AtSUMO1), a protein version generated to mimic a constantly SUMOylated state of the protein.

Finally, to characterize the interaction among SIPCA and SUMO, we expressed the proteins as bimolecular fluorescence complementation (BiFC) pairs. We combined different SUMO mutants, impaired in covalent and/or non covalent attachment to substrates together with PCNA wild type and K164R and K254R single and double mutants. We observed that tomato PCNA interacts both covalently and non-covalently with the *Arabidopsis* modifier peptide. We also detected the assembly of nuclear bodies (NBs) when mature form of AtSUMO1 was expressed as a BiFC pair. Two different sequences as potential SIM motifs (SIM1 and SIM2) were identified in SIPCA, which could be responsible for the non-covalent binding to the small peptide.

RESULTS 2: Analysis of the Arabidopsis DNA helicase SRS2

During chromosome replication, yeast PCNA is SUMOylated at its conserved residue K164 and, to a lesser extent, K127. PCNA SUMOylation leads to the recruitment of the DNA helicase Srs2 to sites of replication, thus preventing unscheduled recombination at ongoing replication forks.

To assess if AtSRS2 protein conserves the main features related to PCNA and SUMO previously described for the yeast homologue Srs2, we aligned several putative protein sequences of different plant species (*S. lycopersicum*, *N. benthamiana*, *O. sativa*, *Z. mays* and *P. patens*) pairwise to the known yeast sequences of *S. cerevisiae*, *S. pombe* and *E. coli* UvrD. The conserved helicase domain (UvrD domain) and mostly of so-called helicase motifs of the proteins could be clearly aligned and showed that plant SRS2 helicases are really homologous to Srs2. In addition, several putative SIM motifs were predicted along all protein sequences using GPS-SUMO and JASSA-SUMO software tools. However, as analyser programmes to predict putative PIP boxes and Rad51 interaction sequences have not been developed, PCNA and Rad51 interaction sites were not identified. We also modeled the structure of UvrD helicase domain of ScSrs2 and AtSRS2 and UvrD protein using the popular structural modeling service I-TASSER. The three models showed a very similar structure.

Using the SUMOylation system reconstituted in *E. coli*, we also confirmed that AtSRS2 is monoSUMOylated by AtSUMO1 and 2 and, less efficiently, by AtSUMO3. However, the lysine acceptor site/s were not identified and AtSRS2 polySUMOylation were not detected. To perform *in bacteria* assays, we generated a new DNA sequence of AtSRS2 optimized for expression in *E. coli*, as the native plant gene employs tandem rare codons that reduce the efficiency of translation.

We analyzed the cellular localization of AtSRS2 expressing it as GFP fusion in *N. benthamiana*. GFP-AtSRS2 resides in the nucleus, both in nucleoplasm and nucleolus. We also performed a BiFC assay expressing AtSRS2 with SIPCNA, AtSUMO1, SUMOylation enzymes AtSCE1 and AtSIZ1, Rep and AtSRS2 as BiFC pairs. Expression of Venus^N-AtSRS2 with SCFPC-SIPCNA, SCFPC-AtSUMO1, SCFPC-AtSCE1 and AtSIZ1-SCFPC yielded fluorescent reconstitution in the nucleus for each of the four combinations. Venus^N-AtSRS2/SCFP-SIPCNA and Venus^N-AtSRS2/SCFPC-AtSUMO pairs also aggregates in NBs and Venus^N-AtSRS2/ AtSIZ1-SCFPC rather resided in small

nuclear speckles spread across the nucleus. Since NBs were absent for BiFC combinations with SCFPC-SUMO1 Δ GG and SCFPC-SUMO1 Δ GG SIM, we suggest that loading of mature SUMO is essential for NB assembly. No interaction among AtSRS2 with Rep from begomovirus and itself was detected.

Discussion

The SUMOylation assays using an *in bacteria* reconstituted *Arabidopsis* SUMOylation system confirmed that tomato PCNA is SUMOylated at lysines residues 164 and 254 by AtSUMO1 and -2 but it is a poor substrate for AtSUMO3 conjugation. The difference in SUMOylation with AtPCNA1/2, which can be covalently attached to AtSUMO1, 2, 3 and 5 with similar efficiencies at different lysines residues, must be due to the PCNAs origin. However, the ubiquitin conjugation to conserved lysine 164 has been reported in both PCNA homologues.

Tomato PCNA is efficiently SUMOylated at two acceptor residues in an alternate fashion, as PCNA monomers simultaneously modified with two SUMO molecules were not detected. Therefore, the inhibition of multiSUMOylation and polySUMOylation of PCNA could be due to the absence of an additional SUMO E3 ligase or the biochemical characteristics of the SUMOylation systems when expressed in *E. coli*.

In planta analysis of SI-PCNA and AtSUMO1 interaction showed that this tomato substrate can be covalently attached to SUMO and also bind non-covalently to SUMO peptide in the nucleus but also in the cytoplasm. The non-covalent binding between SUMO and PCNA could be established through a putative SIM motif (SIM1 and/or SIM2) identified in the tomato monomer. It was also found here that coexpression of SI-PCNA and the mature AtSUMO1 variant promote the emergence of nuclear bodies, so they seem to be formed in response to active SUMOylation. However, they were also observed when expressing SI-PCNA K164R and K254R mutants, another target lysine or another SUMOylated protein must be involved in their formation.

GFP-SI-PCNA exhibited a foci localization pattern similar to the pattern described for AtPCNA1-sGFP. This result suggests that SI-PCNA overexpression alters the cell cycle of differentiated cells and promotes its entry into S-phase

(endoreduplication), an effect previously described in human cells. Furthermore, PCNA-SUMO binding (SICNA-SUMO1 fusion) and PCNA co-expression together with Rep from begomovirus accelerates PCNA localization at foci in the nucleoplasm. We suggest that these foci probably indicate replication foci, which might be associated with SUMOylation activity.

The interference of Rep and REN with the SUMOylation of SICNA suggests that deSUMOylation of PCNA must be an important step in geminivirus replication. We suggest that PCNA-Rep binding, and probably PCNA-REN binding, would interfere with the access of the SUMOylation enzymes to specific residues, a scenario that would fit with our model of protein-protein interaction.

Modification of yeast PCNA by SUMO controls recombination on ongoing replication fork by providing access for the Srs2 helicase to DNA. We postulate that viral protein Rep will impair, possibly by its interaction with PCNA, with the ability of SCE1 to conjugate SUMO to PCNA. Consequently, the recruitment of Srs2 to ongoing replication fork would be reduced, which in turn will cause an increase in the level of HR. Furthermore, as it has been suggested that PCNA SUMOylation is also critical for the tuning of the SDSA function of Srs2, we propose that the reduction of SUMOylated PCNA could promote the processing of DNA lesions through different pathways that lead crossovers products.

To go further into the biological role of the Rep effect on PCNA SUMOylation, we studied whether the *Arabidopsis* DNA helicase SRS2 protein conserves the features described for the *S. cerevisiae* Srs2 homologue. Blanck and co-workers showed that AtSRS2 is a functional DNA helicase capable to disrupt recombinogenic DNA intermediates and to process branched structures that occur during SDSA mechanism repair. In this work, we provided that: 1) AtSRS2 interacts with SICNA, AtSUMO1 and the *Arabidopsis* SUMOylation enzymes SCE1 and SIZ1, 2) it is monoSUMOylated, using the modification system reconstituted *in bacteria*, and) it localizes to the nucleus and nucleolus, where it forms nuclear bodies in a SUMOylation-dependent manner. All these data suggest that *Arabidopsis* SRS2 conserves several activities previously reported in yeast.

Finally, we suggest that PCNA ubiquitination may promote an increase of the efficiency and a decrease of the fidelity of viral DNA replication. In *S. pombe*, PCNA ubiquitination at lysine 164 plays a role in ensuring the completion of DNA replication. In *S. cerevisiae*, PCNA-Ub allows for replication of damaged DNA by

recruiting translesion DNA polymerases. Therefore, plant PCNA conjugated to ubiquitin could ensure viral DNA replication and promote DNA lesions bypass by TLS pathway.

Appendix

To further understand the scope of the cellular processes regulated by SUMOylation, it is imperative to define the catalog of SUMOylated substrates. Last decades, several methods and strategies have been developed to study the *Arabidopsis* SUMOylome. Particularly informative have been proteomic studies, which combined : (1) a fully functional SUMO1 variant that can be exploited for affinity purification and subsequent MS analyses (HisSUMO H89R), (2) a stringent method to isolate SUMO-protein conjugates, (3) sensitive tandem MS techniques, and (4) a heat shock stress treatment.

In *Arabidopsis*, several proteomic studies identified over 1300 SUMO targets modified by the SUMO1/SUMO2 isoforms, many of which appear to be dynamically regulated. Most SUMOylated proteins are localized to the nucleus and have functions related to DNA modification, chromatin assembly and structure, RNA metabolism, transcription, translation and many metabolic processes involved in regulation of development and cellular homeostasis and abiotic and biotic stress response. The most abundant targets of SUMO were transcription factors, which act by modulating their binding to DNA, their localization, abundance and association with chromatin. Comparative analysis of SUMOylome changes after heat shock, ethanol and H₂O₂ treatments, as well as *Pseudomonas syringae* infection and induction of the autoimmune response exhibit massive increase in basal SUMO1/2-conjugates. It has been suggested that plants, as described in humans, modify specific groups of functionally related SUMO targets, depending on the nature of the stress/stimulus.

In order to assess the impact of Rep expression on the plant SUMOylome, a proteomic strategy has been proposed. This strategy combines the development of a new *Arabidopsis* transgenic line, the application of a stringent three-step purification protocol of SUMO conjugates developed by Miller *et al* (2010) and MS analysis. In this work, we have developed a new *Arabidopsis* transgenic line for inducible Rep gene expressing and enriching for SUMO1 conjugates. The SUMO-

conjugate purification line (6xHis-SUMO1(H89R) *sumo1-1 sumo2-1*), as described by Miller *et al.* (2010), was transformed with a transgene containing the full-length Rep open reading frame from begomoviruses of TYLCV (C1 ORF) or TGMV (AC1 ORF), whose expression was driven by the strong constitutive promoter G10-90, strictly regulated by estrogen. Following transformation by the floral dip method, F1 seedlings harboring the Rep transgen were identified by hygromycin resistance followed by genomic PCR. Homozygous plants expressing the transgenes were selected in the F2 generation by genomic PCR.

For inducible C1 and AC1 expression assays, 10 days-old seedling were grown as above at 22°C and placed into liquid MS medium supplemented with 0.2 µM DMSO (negative control) or β-estradiol for 24, 48 or 72 hours. *Arabidopsis* AF24 and RC10B lines, which contain a transgene for AC1 and C1 inducible expression from the promoter G10-90, respectively, and a wild-type background, were used as positive controls. Several homozygous T2 and T3 lines named HSP2.3 (negative control line), HSTS1.3, and HSTG25.3 (T3 lines), and HSTS2 and HSTG24 (T2 lines) were selected for characterization of C1/AC1 gene expression. Relative transcript levels of C1 and AC1 were determined by RT-qPCR. All the lines exhibited a similar C1/AC1 expression pattern, detecting the highest transcript accumulation at 24 hours, which progressively decreases at 48 and 72 hours after β-estradiol addition. We observed a relative transcript level reduction of 88% and 83% for AC1 gene in HSTG24 and HSTG25.3 lines, respectively, compared with control plants at 24 hours (AF24 line). In HSTS2 and HSTS1.3 plants, C1 accumulation was reduced in 55% and increased 3 times, respectively, when compared with AF24 control plants, at 24 hours too. Since no transcripts were detected from negative control plants, we concluded that expression of C1 and AC1 is not leaky. Additionally, we evaluated if re-addition of β-estradiol at 24 and 48 hours avoid the decrease of transcript levels of C1/AC1. We performed a new assay using HSTS1.3 seedlings. At 48 and 72 hours, relative transcript levels of C1 was increased compared to measurement at 48 and 72 hours, respectively.

The results obtained with the generated HSTS and HSTG *Arabidopsis* transgenic lines indicate that they could be exploited for MS analysis to identify SUMO targets affected by Rep expression. Previous results showed ectopic Rep expression alters the SUMOylation status of specific host proteins. However, the

depth and breadth of processes under the control of SUMOylation, the multifunctional role of Rep, its interaction with SCE and the capacity of Rep from TYLCV to form a complex with SCE1 and SUMO1 (Francesca Maio thesis, 2019), suggest that this geminiviral protein could also facilitate the conjugation of SUMO to different substrates. This raises a very complex scenario of modulation of SUMOylation, probably a key part of the infection process, that can be deciphered by mass spectrometry analyses.

However, some limitations must be considered about this strategy, as a large number of seedlings would be required to enrich for SUMO conjugates. As an alternative, we propose to perform an *in vitro* SUMOylation assays with total protein extracts from the generated transgenic lines seedlings. Finally, for further evaluation of the role of SUMOylation and Rep modulation, we could consider analysing the SUMO3 substrates, since SUMO3 is involved in defence responses against pathogens.

INTRODUCCIÓN

GEMINIVIRUS: CUANDO MENOS ES MÁS

Los virus fitopatógenos son los responsables de alrededor del 47% de las epifitias de los cultivos, que producen importantes pérdidas en el rendimiento agrícola (Palukaitis *et al.*, 2013; Randles y Ogle, 1997; Strange y Scott, 2005). Estos patógenos constituyen la mayor fuente de enfermedades emergentes (Anderson *et al.*, 2004) debido a alteraciones en la distribución de los insectos vectores provocadas por el movimiento global de mercancías, el cambio climático y la disminución de la eficacia de los insecticidas químicos (Anderson *et al.*, 2004; Canto *et al.*, 2009). Alrededor del 80% de todos los virus de plantas son virus de RNA (Mandahar, 2006), pero existe una familia de virus de DNA cuyo impacto en los cultivos es de los más devastadores, encontrándose representada en la lista de las diez especies de virus más importantes desde el punto de vista científico y económico: los geminivirus (Fauquet *et al.*, 2008; Rybicki, 2015; Scholthof *et al.*, 2011; Zerbini *et al.*, 2017).

Los geminivirus son virus de DNA circular de cadena sencilla que reciben su nombre por la morfología de la cubierta externa del virión, compuesta por dos hemisferios icosaédricos fusionados (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2019) (**Figura 1**). Éstos constituyen una de las familias de virus de plantas más extensa y diversa, con 520 especies distribuidas por las regiones del mundo con clima tropical y subtropical, favorables para sus insectos vectores (Gibbs y Ohshima, 2010; *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV; Rojas *et al.*, 2018; Scholthof *et al.*, 2011; Zerbini *et al.*, 2017). Los síntomas típicos asociados a la infección consisten en malformaciones de los órganos reproductores, rizado en las hojas acompañado de mosaicos, moteados amarillos o clorosis y, en ocasiones, hinchazón de las venas, y una reducción drástica de la altura de la planta debido al acortamiento de los entrenudos (Briddon, 2009; Mansoor *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2005) (**Figura 1**).

Los geminivirus comparten algunas características comunes: (1) poseen genomas muy reducidos (2,5-3,2 Kb) constituidos por una (monopartitos) o dos (bipartitos) moléculas circulares de DNA de cadena sencilla, y (2) contienen una única proteína esencial para su replicación, Rep, que inicia la copia del DNA viral a partir de (3) una estructura en forma de lazo situada en la zona intergénica o IR

(*intergenic region*), donde se localizan los promotores (Jeske *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2005). No obstante, los miembros de esta familia presentan una gran variabilidad en términos de secuencia, el rango de hospedador, el tipo de insecto vector, la organización del genoma y las relaciones filogenéticas. Utilizando como criterio estas características, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus ha dividido a la familia *Geminiviridae* en catorce géneros (**Tabla 1**). El género *Begomovirus* es el más numeroso en cuanto al número de especies (445), seguido de *Mastrevirus* (45), mientras que el resto no contiene más de 5. *Begomovirus* y *Mastrevirus*, junto con *Curtovirus* y *Grablovirus*, son los responsables de las enfermedades de mayor importancia económica en todo el mundo (algunas revisiones recientes sobre geminivirus se pueden encontrar en Aguilar *et al.*, 2020; Devendran *et al.*, 2022, Gupta *et al.*, 2021; Rojas *et al.*, 2018; Teixeira *et al.*, 2021).

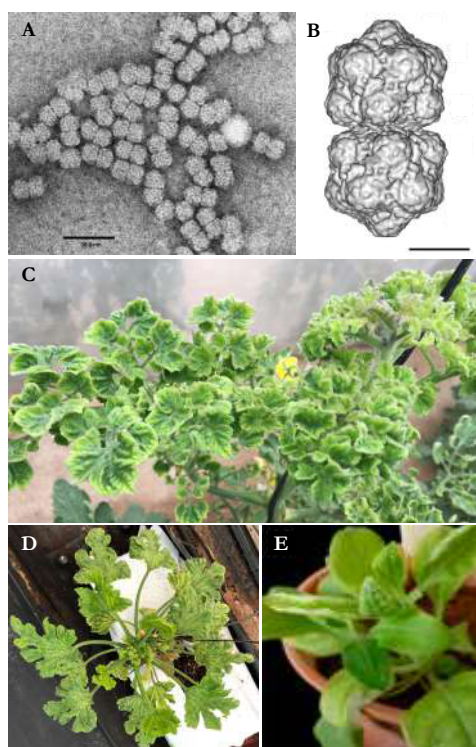


Figura 1. Estructura de la cápside de geminivirus y síntomas comunes en plantas infectadas. **A.** Viriones del euphorbia caput-medusae latent virus (EcmLV) purificados de plantas de *N. bentamiana* agroinfectadas (Roumagnac *et al.*, 2015). **B.** Estructura de la cápside del virión del African cassava mosaic virus (ACMV). El modelo se realizó por criomicroscopía electrónica (Hipp *et al.*, 2017). Escala: 10 nm. **C, D y E.** Síntomas de la infección por geminivirus en diferentes huéspedes: **C.** Rizado y clorosis apical en tomate causada por Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). **D.** Enanismo y mosaicismo provocado por Tomato Leaf Curl New Delhi Virus (ToLCNDV) en calabacín. **E.** Clorosis internervial y rizado apical inducidos por Beet curly top virus (BCTV) en petunia (imagen adaptada de Anabestani *et al.*, 2017).

El género *Begomovirus*

Los miembros del género *Begomovirus* presentan las siguientes características: (1) tienen genomas monopartitos o bipartitos, (2) son transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci*, un complejo de especies crípticas (De Barro *et al.*, 2011; Gilbertson *et al.*, 2005), e (3) infectan a un amplio número de dicotiledóneas en todo el mundo, aunque cada especie posee, generalmente, un número limitado de especies hospedadoras.

Tabla 1. Géneros de la familia *Geminiviridae*.

Género	Especie tipo	Rango de huésped	Vector	Genoma	Nº de especies
<i>Becurtovirus</i>	<i>Beet curly top Iran virus</i> (BCTIV)	Dicot	<i>Circulifer haematocephus</i>	Monop	3
<i>Begomovirus</i>	<i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV)	Dicot	<i>Bemisia tabaci</i>	Monop y bipartito	445
<i>Capulavirus</i>	<i>Euphorbia caput-medusae latent virus</i> (EcmLV)	Dicot	<i>Aphis craccivora</i> y <i>Dysaphis plantaginea</i>	Mono	4
<i>Citlodavirus</i>	<i>Citrus chlorotic dwarf associated virus</i> (CCDaV)	Dicot	ND	Monop	4
<i>Curtovirus</i>	<i>Beet curly top virus</i> (BCTV)	Dicot	Familia <i>Cicadelidae</i>	Monop	3
<i>Eragrovirus</i>	<i>Eragrostis curvula streak virus</i> (ECSV)	Monocot	ND	Monop	1
<i>Grablovirus</i>	<i>Grapevine red blotch virus</i> (GRBV)	Dicot	<i>Spissistilus festinus</i>	Monop	3
<i>Maldovirus</i>	<i>Grapevine geminivirus A</i> (GGVA)	Monocot y dicot	ND	Monop	3
<i>Mastrevirus</i>	<i>Maize streak virus</i> (MSV)	Monocot y dicot	Familia <i>Cicadelidae</i>	Monop	45
<i>Mulcrilevirus</i>	<i>Mulberry crinkle leaf virus</i> (MCLV)	Dicot	<i>Tantoneura mori</i>	Monop	2
<i>Opunvirus</i>	<i>Opuntia virus 1</i> (OpV1)	Dicot	<i>Dactylopius</i> sp	Monop	1
<i>Topilevirus</i>	<i>Tomato apical leaf curl virus</i> (ToALCV)	Dicot	ND	Monop	2
<i>Topocuvirus</i>	<i>Tomato pseudocurly top virus</i> (TPCTV)	Dicot	<i>Micrutalis malleifera</i>	Monop	1
<i>Turncurtovirus</i>	<i>Turnip curly top virus</i> (TCTV)	Dicot	<i>Circulifer haematocephus</i>	Monop	3

ND: No descrito; Monocot: monocotiledónea; Dicot: dicotiledónea. Monop: Monopartito.

Los genomas de los begomovirus bipartitos están compuestos por dos moléculas de tamaño similar (2,5-2,6 Kb) denominadas DNA-A y DNA-B. Ambas moléculas contienen genes diferentes y comparten únicamente una secuencia de ~200 pb dentro de la región intergénica, la región común (*common region* A y B, CRA y CRB) (**Figura 2**). Solo el componente A, homólogo del genoma de los begomovirus monopartitos, puede replicarse de forma autónoma y producir viriones, pero requiere del componente B para llevar a cabo la infección sistémica. Tanto el DNA-A como el DNA-B se encapsidan individualmente y son esenciales para llevar a cabo el proceso de infección (Rojas *et al.*, 2005).

En base a su distribución geográfica se reconocen dos grandes grupos filogenéticos de begomovirus: los del Nuevo Mundo (*New World*, NW, en América) y los del Viejo Mundo (*Old World*, OW, en Europa, Asia, África y Oceanía) (Briddon *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2015). La mayoría de los begomovirus NW tienen genomas bipartitos, a excepción de algunos monopartitos identificados recientemente, y carecen de uno de los marcos abiertos de lectura característicos de los begomovirus OW (V2/AV2) (Brown *et al.*, 2015; Ha *et al.*, 2006; Macedo *et al.*, 2018; Melgarejo *et al.*, 2013; Romay *et al.*, 2019; Sánchez-Campos *et al.*, 2013; Rybicki *et al.*, 1994). Los begomovirus del Viejo Mundo pueden ser mono o bipartitos, con predominancia de los primeros, y suelen estar asociados a moléculas extras de DNA más pequeñas denominadas satélites (Briddon *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2015) (**Figura 2**).

Estructura del genoma: genes solapados y proteínas multifuncionales

Los geminivirus contienen en su genoma de cuatro a ocho genes solapados, total o parcialmente, organizados en dos unidades transcripcionales (derecha, R, e izquierda, L) separadas por la región intergénica, donde se localizan los elementos claves para iniciar la replicación (Borah *et al.*, 2016).

Los genomas de los curtovirus, topocuvirus, tumcurtovirus, maldovirus, begomovirus monopartitos y el DNA-A de los begomovirus bipartitos presentan una organización similar. La cadena en sentido del virión (cadena VS, unidad R) contiene dos o tres marcos abiertos de lectura (*open reading frames*, ORFs): V1/AV1, V2/AV2 y V3, mientras que la cadena en sentido complementario (cadena CS,

unidad L) abarca cuatro o cinco ORFs: C1/AC1, C2/AC2, C3/AC3, C4/AC4 y A5/C5 (**Figura 2**). El componente B de los begomovirus bipartitos incluye dos ORFs, BC1 y BV1. Todos estos genes codifican proteínas multifuncionales implicadas en la replicación, el movimiento, la transmisión y la patogénesis viral. No obstante, este escenario de expresión génica es más complejo de lo que se esperaba, ya que se están descubriendo nuevos ORFs (como V3 en begomovirus monopartitos), cuyas proteínas resultantes presetan actividades y localizaciones subcelulares específicas durante la infección (Gong *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022).

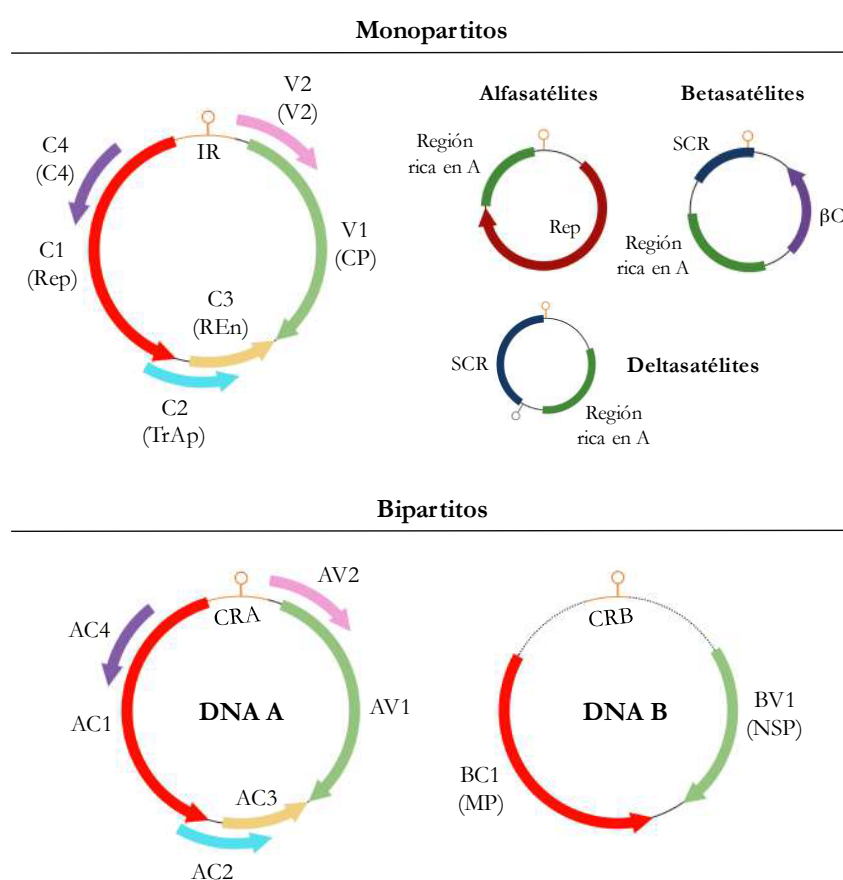


Figura 2. Organización del genoma del género *Begomovirus*. Monopartitos y bipartitos. Para cada molécula se indica el nombre de cada ORF y, entre paréntesis, el de la proteína codificante. Rep: *replication protein* o proteína asociada a la replicación; REn: *replication enhancer protein* o proteína potenciadora de la replicación; TrAp: *transcriptional activator protein* o proteína activadora de la transcripción; CP: *coat protein* o proteína de la cápside; MP: *movement protein* o proteína de movimiento; NSP: *nuclear shuttle protein* o proteína lanzadera nuclear; CR: *common region* o región común; CRA: *common region* DNA-A o región común del DNA-A; CRB: *common region* DNA-B o región común del DNA-B. La horquilla, incluida en el origen de la replicación, se ha resaltado en color naranja (modificado de Zerbini *et al.*, 2017).

Rep, codificada por AC1/C1, es la proteína viral esencial para la replicación de los geminivirus, ya que media su inicio y su finalización, promueve el reclutamiento de las proteínas del hospedador implicadas e induce un entorno celular adecuado al reprogramar el ciclo celular (los distintos papeles de las proteínas virales se han revisado en Devendran *et al.*, 2022). En la copia del genoma viral también participa REn, codificada por AC3/C3, que potencia la acumulación de DNA viral, el silenciamiento génico en algunos virus y el desarrollo de síntomas en plantas infectadas por begomovirus y curtovirus (Pasumarthi *et al.*, 2011; Stanley *et al.*, 1992; Sung y Coutts, 1995; Sunter *et al.*, 1990). Esta proteína, de localización nuclear, puede formar oligómeros a través de su región central, e interacciona con Rep (Pasumarthi *et al.*, 2010) y otras proteínas del huésped como PCNA (*proliferating nuclear antigen*) (Castillo *et al.*, 2003; Settlage *et al.*, 1996; Settlage *et al.*, 2005), RBR (*plant retinoblastoma-related protein*, homólogo en plantas de la proteína del retinoblastoma), el factor de transcripción NAC1 (Selth *et al.*, 2001; Settlage *et al.*, 2005) y las subunidades reguladoras POLA2 y POLD2 de las polimerasas de DNA replicativas α y δ , respectivamente (Wu *et al.*, 2021). La proteína TrAP, codificada por el gen AC2/C2, funciona como factor de transcripción para la expresión de genes del hospedador y los genes virales tardíos AV1/V1 y BC1, participa en la supresión del silenciamiento génico, tanto a nivel transcripcional (*transcriptional gene silencing*, TGS) como post-transcripcional (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS), altera el sistema ubiquitina-proteosoma (*ubiquitin proteasome system*, UPS) y las vías de señalización hormonales y suprime la respuesta de hipersensibilidad (*hypersensitivity response*, HR) (Guerrero *et al.*, 2020; Veluthambi y Sunitha, 2021). AC4/C4 está involucrada en la alteración del ciclo celular, el movimiento del virión, el desarrollo de síntomas y la manipulación de las defensas, incluyendo la supresión del silenciamiento génico, la señalización y síntesis hormonal y la cascada de las quinasas MAP (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK) (Medina-Puche *et al.*, 2021). AV2/V2 actúa principalmente supresor del silenciamiento génico (TGS y PTGS) y en el movimiento del virión (Devendran *et al.*, 2022). La proteína CP (codificada por el gen AV1/V1) es la única con una función estructural, y lleva a cabo la encapsidación de los viriones (Bennett y Agbandje-McKenna, 2020), juega un papel crucial en el transporte del DNA viral en begomovirus y curtovirus (Devendran *et al.*, 2022) y participa en el proceso de infección sistémica y en la especificidad y transmisión a través del insecto vector (Briddon *et al.*, 1990; Caciagli *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2001; Noris *et al.*, 1998). V3,

presente en curtovirus y, recientemente, descrita en begomovirus monopartitos, actúa como supresor del silenciamiento génico (Gong *et al.*, 2021). La proteína AC5/C5 no se conoce tan bien como otros factores virales, pero se ha comprobado que actúa como factor de virulencia y supresor del silenciamiento génico (Li *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022). En los begomovirus bipartitos, los elementos NSP y MP, codificados por los genes BV1 y BC1, respectivamente, son necesarios para la infección sistémica y actúan de forma cooperativa para mediar en el transporte intra e intercelular del DNA viral (Gafni y Epel, 2002; Lazarowitz y Beachy, 1999; Sanderfoot *et al.*, 1996). NSP, además, actúa suprimiendo la inmunidad antiviral del hospedador (Martins *et al.*, 2020).

Asociados a los begomovirus, se han descrito tres clases de satélites, moléculas extras de ssDNA circular con un tamaño inferior al del virus acompañante: alfasatélites, betasatélites (previamente denominado DNA- β), y deltasatélites (Briddon *et al.*, 2018; Gnanasekaran *et al.*, 2019, Lozano *et al.*, 2016) (**Figura 2**). Los alfasatélites están relacionados con los nanovirus y contienen un único gen que codifica una proteína Rep (α Rep), algunas de las cuales poseen actividad supresora del silenciamiento (Abbas *et al.*, 2019; Nawaz-Ul-Rehman *et al.*, 2010), por lo que son capaces de replicarse de forma autónoma. Aunque no se conoce mucho acerca de su contribución al ciclo de infección, se ha visto que incrementa la acumulación del virus acompañante y la severidad de los síntomas, y reduce la transmisión del virus al insecto vector (Mar *et al.*, 2017) y la acumulación de las moléculas de betasatélites con las que van asociadas (Idris *et al.*, 2011). Los betasatélites comparten poca similitud de secuencia con sus virus acompañantes, y contienen un único ORF, β C1, que codifica una proteína que lleva el mismo nombre (Briddon y Stanley, 2006). β C1 actúa como determinante de patogenicidad, promueve el desarrollo de síntomas y suprime las respuestas de defensa del huésped mediadas por PTGS y TGS, además de contribuir al transporte intracelular y sistémico del virus y facilitar las interacciones en el sistema tripartito virus-vector-huésped (Gnanasekaran *et al.*, 2019). Los deltasatélites son los de menor tamaño (0,7 Kb) y no contienen ningún marco abierto de lectura. Su presencia se ha asociado con una reducción en la acumulación del DNA viral y el desarrollo de síntomas (Ferro *et al.*, 2021). Tanto los betasatélites como los deltasatélites son dependientes de los virus acompañantes para su replicación, encapsidación, movimiento y transmisión al insecto vector (Briddon *et al.*, 2008; Mansoor *et al.*, 2003).

Rep, la proteína esencial para la replicación

Rep es una proteína muy conservada en los geminivirus y la única esencial para su replicación, aunque no presenta actividad de polimerasa de DNA (Elmer *et al.*, 1988). De carácter multifuncional, conferido por diferentes dominios y motivos identificados y mapeados en la secuencia proteica de diferentes especies de geminivirus (Rizvi *et al.*, 2015; Ruhel y Chakraborty, 2019; Wang *et al.*, 2017) (**Figura 3**), desempeña múltiples actividades en el núcleo de las células infectadas y es capaz de interaccionar con numerosos factores virales y del huésped (**Tabla 2**).

Como proteína temprana localizada en el núcleo, donde presenta una distribución altamente dinámica, cumple una función esencial en el inicio y durante la replicación del genoma geminiviral. Rep es el encargado de reclutar y ensamblar el replisoma viral, un complejo formado por factores del virus y de la planta huésped implicados en la replicación, así como de llevar a cabo el inicio, la elongación y la terminación de la misma al actuar como endonucleasa, topoisomerasa, helicasa y ligasa (Ruhel y Chakraborty, 2019) (Rep pertenece a las familias de endonucleasas HUH, a la superfamilia SF3 de helicasas y es una topoisomerasa de tipo I). Para dar comienzo a la replicación a través del mecanismo conocido como círculo rodante (*rolling circle replication*, RCR), esta proteína se une a zonas específicas y repetidas del DNA localizadas en la región intergénica (denominadas iterones), donde genera un corte en la secuencia nonanucleotídica altamente conservada 5' TAATATT↓AC 3' presente en una estructura en forma de horquilla en la cadena del virión (Laufs *et al.*, 1995). Este corte genera un grupo fosfato en el extremo 5', que se une covalentemente a un residuo tirosina presente en Rep, y un grupo hidroxilo en el extremo 3' libre que actúa como cebador de la nueva hebra (Laufs *et al.*, 1995). Cuando el ssDNA recién sintetizado presenta la secuencia nonanucleotídica mencionada anteriormente, la proteína viral la reconoce y la escinde, ligando los extremos 3' y 5' de la cadena viral naciente y liberando nuevas unidades de ssDNA circular del tamaño del genoma, que pueden volver al ciclo de replicación. La capacidad de Rep de formar oligómeros, a través de su región central, resulta esencial para su unión al dsDNA y para el desempeño de su actividad helicasa (Choudhury *et al.*, 2006; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000) y, por tanto, durante la copia del genoma viral.

Tabla 2. Listado de las proteínas interactoras de Rep más conocidas. Modificado de Ruhel y Chakraborty, 2019.

Proteína interactora	Implicación	Referencia
Proteínas virales		
REn	Aumenta la actividad ATPasa de Rep <i>in vitro</i>	Settlage <i>et al.</i> , 1996
CP	Reduce la actividad endonucleasa y ligasa sobre el DNA viral de Rep	Malik <i>et al.</i> , 2005
Proteínas del huésped		
Ciclo celular		
RBR	Se requiere para la replicación viral	Colin <i>et al.</i> , 1996; Kong <i>et al.</i> , 2000; Xie <i>et al.</i> , 1995
Estructura de la cromatina, replicación y recombinación		
Histona H3	Ayudan a la transcripción y replicación mediante la remodelación de los minicromosomas virales	Kong y Hanley-Bowdoin, 2002
MCM2 (<i>minichromosome maintenance protein 2</i>)	Se requiere para la replicación viral	Suyal <i>et al.</i> , 2013 ^b
PCNA	Reduce la actividad endonucleasa y ATPasa de Rep. Esencial para la replicación viral	Bagewadi <i>et al.</i> , 2004; Castillo <i>et al.</i> , 2003
RFC (<i>replication factor C</i>)	Se requiere para la replicación viral a través de la formación del complejo de preiniciación	Luque <i>et al.</i> , 2002
RPA (<i>replication protein A</i>)	Reduce la actividad endonucleasa y aumenta la actividad ATPasa de Rep	Singh <i>et al.</i> , 2007
RAD51	Promueve la replicación viral	Suyal <i>et al.</i> , 2013
RAD54	Promueve la replicación viral	Kaliappan <i>et al.</i> , 2014
Modificaciones postraduccionales		
NbHUB1	Estimula la transcripción viral por monoubiquitinación de H2B y trimetilación de H3K4	Kushawa <i>et al.</i> , 2017
NbUBC2	Estimula la transcripción viral por monoubiquitinación de H2B y trimetilación de H3K4	Kushawa <i>et al.</i> , 2017
SCE	Requerido para la replicación viral	Castillo <i>et al.</i> , 2004
Factores de transcripción		
NAC083	Requerido para la replicación viral	Suyal <i>et al.</i> , 2014
GRAB1 y GRAB2 (<i>geminivirus Rep-A binding protein 1 y 2</i>)	Inhibir la replicación viral	Xie <i>et al.</i> , 1999
Otros		
GRIK (<i>geminivirus Rep interacting kinase</i>)	Impide la entrada de la célula en la fase mitótica	Kong y Hanley-Bowdoin, 2002
GRIMP/kinesina (<i>geminivirus Rep interacting motor protein</i>)	Impide la entrada de la célula en la fase mitótica	Kong y Hanley-Bowdoin, 2002

Además de su papel en la replicación viral, Rep cumple otras funciones importantes durante el ciclo de vida de los geminivirus. Por un lado, promueve la reprogramación del ciclo celular al inhibir a la proteína relacionada con el retinoblastoma (*Retinoblastoma-related*, RBR), interrumpiendo su unión al factor de transcripción E2F y activando la expresión de elementos del huésped relacionados con la replicación, como las polimerasas de DNA (Egelkroun *et al.*, 2001; Kong *et al.*, 2000). Rep también actúa sobre la transcripción de los genes virales: regula negativamente su propia expresión al unirse a los iterones en la región intergénica (Eagle *et al.*, 1994; Sunter *et al.*, 1993), promueve la expresión de los genes tardíos C2 y C3 al reprimir su propia transcripción (Shung y Sunter, 2007), y activa la transcripción viral al atraer a la maquinaria de ubiquitinación a la cromatina viral (Kushwaha *et al.*, 2017). Esta última función la lleva a cabo al fomentar el reclutamiento de las enzimas ligasa E3 y conjugadora E2 de ubiquitina HUB1 (*histone ubiquitination 1*) y UBC2 (*ubiquitinating-conjugating enzyme 2*), respectivamente, lo que conduce a la ubiquitinación de la histona H2B y, consecuentemente, a la trimetilación de la lisina 4 de H3, marcas de activación transcripcional (Kushwaha *et al.*, 2017). Además, Rep actúa como supresor del silenciamiento génico transcripcional al reducir la expresión de las metiltransferasas de DNA MET1 (*cytosine DNA methyltransferase 1*) y CMT3 (*chromomethylase 3*) (Liu *et al.*, 2014; Rodríguez-Negrete *et al.*, 2013), y, al menos en mastrevirus, también el silenciamiento génico post-transcripcional (Liu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Recientemente, se ha demostrado que esta proteína viral colocaliza con SUMO y la enzima conjugadora de SUMO SCE1 (*SUMO conjugating enzyme 1*) en estructuras nucleares, designadas como cuerpos nucleares, las cuales colocalizan a su vez con la ligasa de ubiquitina E3 COP1 (*constitutive photomorphogenetic 1*) y otras proteínas involucradas en la fotomorfogénesis (Tesis Francesca Maio, 2019). Estos datos sugieren que Rep posiblemente manipula esta vía de crecimiento para lograr un "estado replicativo del DNA" en las células huésped. Sin embargo, su unión con la enzima conjugadora de SUMO no parece afectar al sumoiloma general de la planta, sino el estado modificado de dianas específicas (Arroyo-Mateos *et al.*, 2018; Sánchez-Durán *et al.*, 2011).

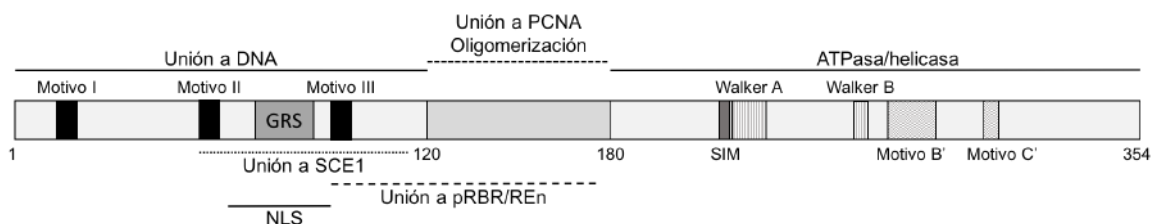


Figura 3. Dominios y motivos identificados en Rep de geminivirus. Desde el extremo amino al carboxilo terminal de esta proteína se disponen: los motivos I, II y III, involucrados en la unión al dsDNA, a metales y en las actividades endonucleasa y ligasa, necesarios para el inicio y la terminación de la replicación; el motivo GRS (geminivirus Rep *sequence*), que participa en el inicio de la replicación; regiones de interacción con las proteínas de plantas PCNA, RBR, la quinasa GRIK, SCE y la viral REn; el dominio de oligomerización; una secuencia de localización nuclear (*nuclear localization sequence*, NLS); los motivos Walker A y Walker B, involucrados en la actividad ATPasa y helicasa; los motivos B' y C, que participan en la unión y el desenrollado del DNA y un motivo de unión a SUMO (SUMO *interacting motif*, SIM), conservado en los begomovirus monopartitos y necesario para la amplificación del DNA viral (Tesis de Francesca Maio, 2019) (revisado en Ruhel y Chakraborty, 2019). Modificado de Maio *et al.*, 2019.

Ciclo de vida, replicación y movimiento

Debido al pequeño tamaño de su genoma, los geminivirus codifican un número limitado de proteínas. Ello requiere que puedan cumplir con sus propias funciones vitales y establecer una infección exitosa valiéndose de su pequeño pero multifuncional arsenal, capaz de apoderarse de la maquinaria celular. Por un lado, al no codificar sus propias polimerasas, los geminivirus tienen que subvertir la maquinaria de replicación del DNA del hospedador y, además, reprogramar el ciclo celular de las células infectadas, ya diferenciadas, para disponer de las proteínas necesarias. Por otro lado, deben moverse de una célula a otra y propagarse por toda la planta para llevar a cabo la infección sistémica. Ello requiere desarrollar un mecanismo que permita el tráfico del material genómico o de los viriones a través de los sistemas de comunicación intercelular, abriendo a la vez la puerta para el transporte a larga distancia por la corriente floemática y su adquisición por los insectos vectores. Para poder llevar a cabo todo el proceso de infección y transmisión, resulta esencial que los geminivirus sean capaces de suprimir o evadir los mecanismos de defensa de la planta activados al detectar la presencia del patógeno.

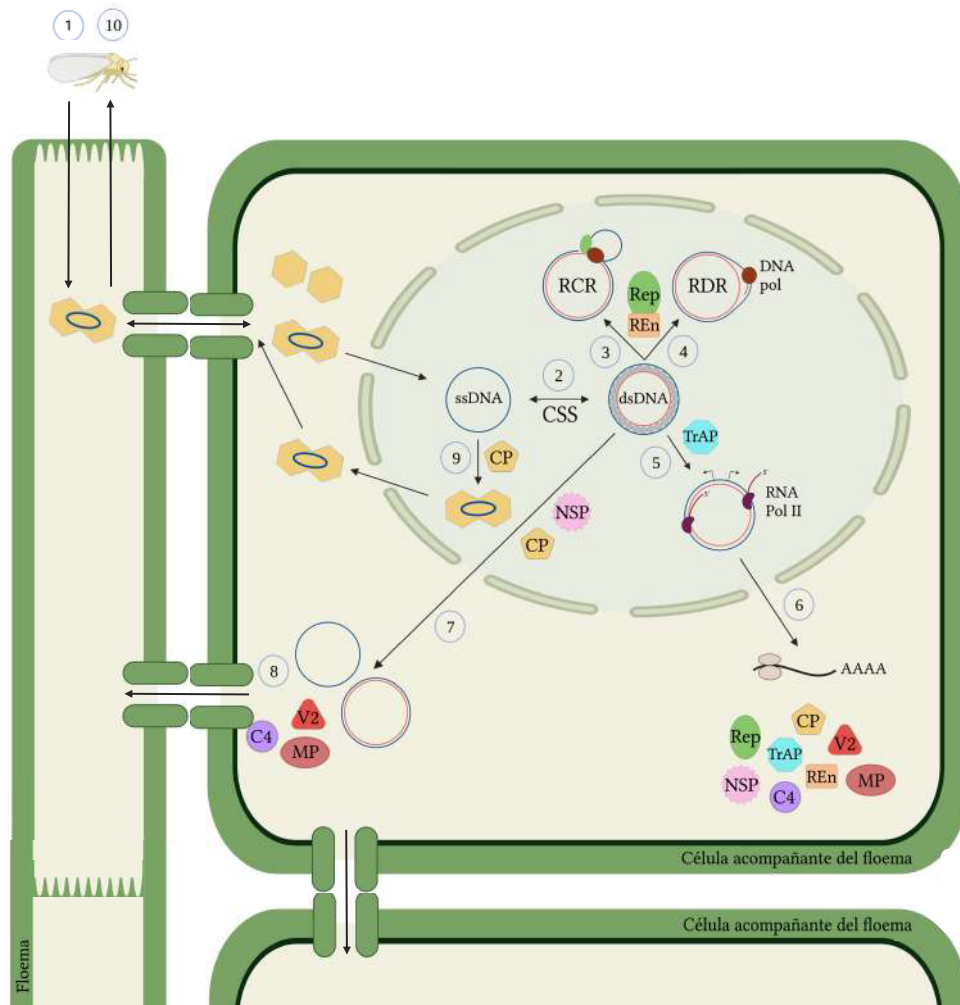


Figura 4. Ciclo de vida de los geminivirus. La infección comienza cuando el insecto vector virulífero se alimenta de la savia elaborada transportada por el floema de una hoja sana y transmite los viriones, que alcanzan las células asociadas al floema (1). Una vez en el citoplasma, el ssDNA se libera de la cápside y alcanza el núcleo, donde se sintetiza la cadena complementaria (CSR) y se origina el intermediario de dsDNA, que se ensambla formando nucleosomas (2). El dsDNA es transcrito por la polimerasa de RNA II de la planta (5) y traducido posteriormente, lo que da lugar a todas las proteínas virales (6). Una vez sintetizada, Rep reconoce una secuencia específica en la región intergénica e inicia la replicación, que se lleva a cabo a través de dos mecanismos: replicación por círculo rodante (RCR) (3) y replicación dependiente de recombinación (RDR) (4), produciéndose nuevas moléculas de ssDNA. A continuación, el ssDNA puede convertirse de nuevo en dsDNA y reentrar en el ciclo, ser empaquetado por CP (9) y transportado al floema, donde puede ser adquirido por el insecto vector (10) o bien trasladarse al citoplasma unido a CP o NSP (7), donde V2 o MP lo conduce a la célula vecina a través de los plasmodesmos (8). Figura modificada de Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013.

La entrada de los geminivirus a la planta huésped se produce a través del insecto vector, que introduce los viriones directamente al floema al alimentarse de la savia elaborada (**Figura 4**). Una vez en el sistema vascular, las partículas víricas

se mueven hasta alcanzar las células acompañantes del floema o del parénquima, donde se produce la liberación del genoma viral (ssDNA) y su entrada en el núcleo acompañado de CP (Guerra-Peraza *et al.*, 2005; Jeske, 2009). En este orgánulo, una polimerasa de DNA de la planta lleva a cabo la síntesis de la cadena complementaria (*complementary strand synthesis*, CSS) y forma el intermediario de doble cadena de DNA (forma replicativa o *replicative form*, RF), que sirve de sustrato para el inicio de los ciclos de replicación y para la transcripción bidireccional de los genes virales a cargo de la polimerasa de RNA II (Donson *et al.*, 1984; Saunders *et al.*, 1992). Esta forma replicativa puede ensamblarse con histonas y formar minicromosomas. Una vez sintetizada, Rep recluta los componentes necesarios para la formación del replisoma viral (REn, PCNA, RFC, RPA y polimerasas de DNA, entre otros) (Castillo *et al.*, 2003; Luque *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2007; Rizvi *et al.*, 2015) e inicia la replicación del DNA, que puede llevarse a cabo a través de dos mecanismos: replicación por círculo rodante (RCR) (Saunders *et al.*, 1991; Stenger *et al.*, 1991) y replicación dependiente de recombinación (*recombinant-dependent replication*, RDR) (Jeske *et al.*, 2001; Preiss y Jeske, 2003) (**Figura 5**). El que acontece en primer lugar, la replicación por círculo rodante comienza cuando Rep produce un corte en la secuencia conservada 5' TAATATT↓AC 3' en la cadena del virión del intermediario de dsDNA, situada en la region intergénica (Pant *et al.*, 2005). Este corte genera un extremo 3' en la cadena del virión que es extendido por una polimerasa de DNA del hospedador, utilizando la cadena complementaria como molde. Resultados recientes muestran que la polimerasa de DNA α (Pol α) es esencial para generar el intermediario de dsDNA viral y que Pol δ , reclutada selectivamente por REn, media la síntesis de nuevas copias del genoma geminiviral (ssDNA) (Wu *et al.*, 2021). El ssDNA recién sintetizado se libera tras un nuevo corte de Rep, que también liga los dos extremos de la cadena. El segundo mecanismo de replicación del genoma viral, dependiente de recombinación, tiene lugar cuando fragmentos lineales de ssDNA viral, que pueden proceder de una síntesis incompleta o de un ataque nucleolítico, invaden una secuencia homóloga del dsDNA circular y actúan como cebadores para la replicación de dsDNA lineal. Como consecuencia, se producen, potencialmente, muchas copias heterogéneas de dsDNA lineal, cada una de las cuales puede funcionar como plantilla. Las nuevas copias de ssDNA pueden entrar de nuevo en el ciclo de replicación por RCR o RDR o encapsidarse para dar lugar a nuevos viriones (Jeske, 2009; Pooggin, 2013). La proteína REn también es importante en la replicación de los geminivirus,

ya que actúa como amplificador del proceso, aunque se desconoce su mecanismo de acción. Un examen genético reciente ha identificado una serie de factores adicionales que afectan a la replicación de geminivirus en *S. cerevisiae*, relacionados con otros procesos biológicos como la síntesis de RNA, el transporte y la secreción de proteínas (Li *et al.*, 2020).

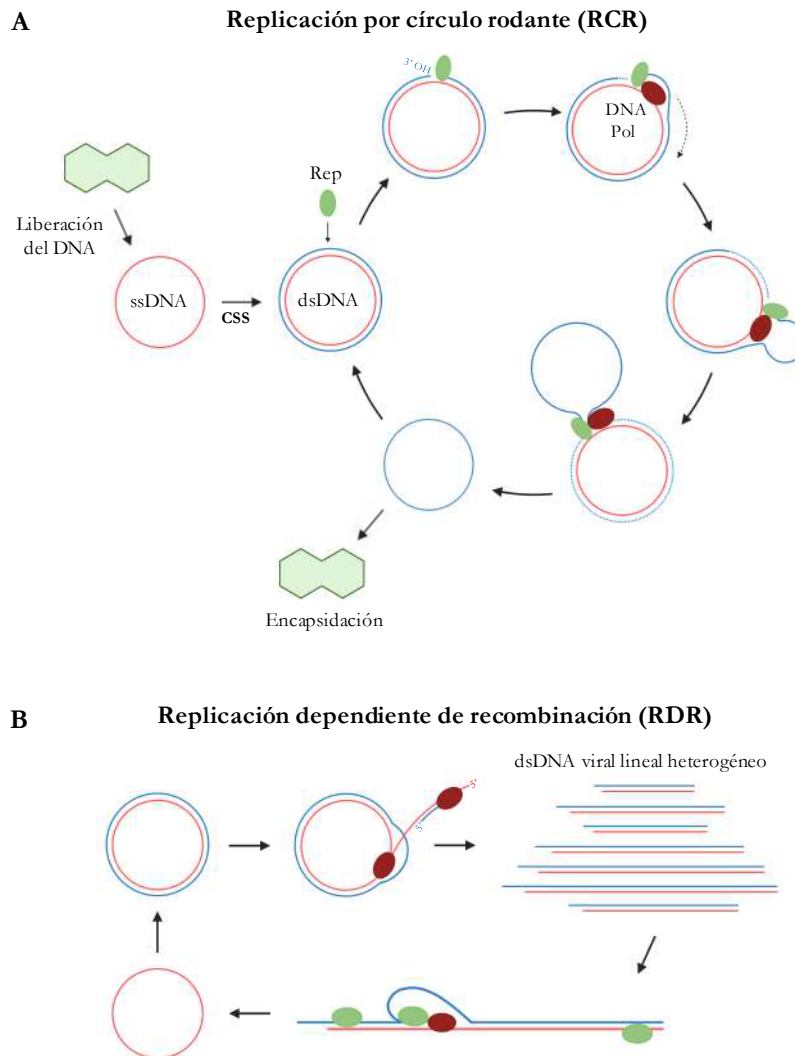


Figura 5. Modelos de los mecanismo de replicación de los geminivirus. **A.** Replicación por círculo rodante (RCR). Tras la liberación del ssDNA del virión, una polimerasa de DNA del huésped (¿polimerasa α ?), lleva a cabo la síntesis de la cadena complementaria (CSS), dando lugar a la forma replicativa (dsDNA) que sirve como plantilla para la transcripción bidireccional y la traducción de las proteínas virales. Una vez sintetizada, Rep inicia la replicación por círculo rodante del DNA viral al cortar la cadena del virión (línea azul) en la región intergénica, y recluta los componentes del replisoma viral, que incluye a una polimerasa de DNA del huésped (¿polimerasa δ ?) que extiende el extremo 3' utilizando la hebra complementaria como plantilla (línea roja). A medida que avanza la extensión, la cadena del virión, a cuyo extremo 5' se encuentra unido covalentemente Rep, es desplazada. Después de una o varias rondas de replicación, Rep libera una o varias copias de ssDNA,

Figura 5. (continuación) que pueden volver a entrar en el ciclo de replicación o ser empaquetadas en viriones. **B.** Replicación dependiente de recombinación (RDR). El dsDNA circular es invadido por un fragmento corto de ssDNA que actúa como cebador, el cual es extendido por una polimerasa de DNA del huésped. Tras (o durante) una o más rondas de replicación, el ssDNA lineal recién sintetizado se convierte total o parcialmente en dsDNA lineal por la misma u otra enzima de la planta, dando lugar a una población heterogénea de dsDNA lineales que albergan dos o más orígenes de replicación y son transcritos en ambas direcciones y, posteriormente, traducidos. Rep inicia la replicación del dsDNA lineal y libera las nuevas copias de ssDNA, que pueden entrar en el ciclo de RCR o en la RDR o bien ser empaquetadas. Modificado de Poogin, 2013.

Conforme la infección avanza, Rep reduce su propia expresión y se activa la de TrAP, lo que a su vez promueve la transcripción de CP y NSP. El ssDNA puede ser entonces empaquetado por CP y transportado al floema para ser adquirido de nuevo por el insecto vector, o bien, viajar a la célula vecina para producir una infección sistémica. Se cree que este transporte tiene lugar a través de los plasmodesmos (Frischmuth *et al.*, 2007; Hehnle *et al.*, 2004; Sanderfoot y Lazarowitz, 1995; Zhang *et al.*, 2002) y está mediado por las proteínas V2 o C4 (en begomovirus monopartitos) o MP (begomovirus bipartitos), una vez el ssDNA viral ha sido trasladado desde el núcleo al citoplasma por CP (monopartitos) o NSP (bipartitos) (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Priyadarshini *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 2001) (**Figura 4**).

Tomando el control de la célula vegetal

A pesar del limitado tamaño de su genoma, los geminivirus son capaces de tomar el control de la célula vegetal e inducir un entorno celular adecuado para llevar a cabo la infección viral (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013). Sin duda, la competencia para subvertir la célula es el resultado de una coevolución prolongada entre el parásito y su huésped, seleccionándose a lo largo del tiempo la capacidad del virus para modular la homeostasis celular en su propio beneficio sin generar excesivos daños al hospedador.

Reprogramación del ciclo celular

El ejemplo mejor estudiado de subversión viral de la célula huésped es el control del ciclo celular ejercido por los geminivirus. Como se ha mencionado,

estos virus infectan células diferenciadas, donde la maquinaria de replicación no está disponible, por lo que es necesario reprogramar el ciclo celular para constituir el replisoma viral (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004). La infección por geminivirus se ha asociado con la inducción de genes expresados durante la fase S/G2 del ciclo y la inhibición de aquellos activos en la fase M/G1 (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2008; Nagar *et al.*, 1995; Nagar *et al.*, 2002). Esta manipulación de la regulación de genes del hospedador permite la transición de la célula infectada hacia la fase S, en la que tiene lugar la replicación. La primera pista sobre la capacidad de reprogramación del ciclo celular se obtuvo al observar que Rep colocalizaba con PCNA, una proteína esencial para la replicación del DNA, en el núcleo de células infectadas e inducía su expresión (Egelkrout *et al.*, 2001; Nagar *et al.*, 1995). Diferentes estudios han demostrado que los geminivirus son capaces de activar la replicación del DNA mediante la regulación de las ciclinas, en la levadura de fisión (Hipp *et al.*, 2014), y la interacción con los reguladores transcripcionales del ciclo celular de las plantas (Kong *et al.*, 2000).

Un regulador clave del ciclo celular, en plantas y animales, es la proteína RBR (Xie *et al.*, 1996), que forma un complejo con el factor de transcripción E2F y suprime la expresión de los genes de la fase S (Desvoyes *et al.*, 2006). Rep y RepA del mastrevirus *Wheat dwarf virus* (WDV) interactúan físicamente con RBR, y poseen el motivo de unión a esta proteína (LXCXE) (Xie *et al.*, 1995) presente en oncoproteínas de virus de mamíferos y en la proteína Clink (*cell cycle link*) de nanovirus (Lageix *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1999). También Rep de *Tomato Golden mosaic virus* (TGMV) interacciona con RBR, pero su unión se produce a través de un distintivo y novedoso motivo *helix* 4, formado por un núcleo hidrofóbico flanqueado por residuos cargados (Arguello-Astorga *et al.*, 2004). La interacción de Rep con RBR provoca la interrupción del complejo RBR-E2F, lo que permite la activación de genes involucrados en la replicación reprimidos por este factor de transcripción, entre los que se encuentra PCNA (Egelkrout *et al.*, 2001; Kong *et al.*, 2000). La proteína REn de los begomovirus TGMV y TYLCSV (*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*) también se une a RBR, por lo que podría participar en la formación y regulación del complejo Rep-RBR (Settlage *et al.*, 2001; Settlage *et al.*, 2005).

Rep también interacciona con algunos miembros de la familia de factores de transcripción NAC, NAC083 (Suyal *et al.*, 2004), y, en el caso de RepA de

mastrevirus, GRAB1 y GRAB2 (geminivirus Rep A *binding*) (Xie *et al.*, 1999), lo que podría facilitar la replicación viral o suprimir la inmunidad antiviral del huésped. La proteína C4 de varios geminivirus también contribuye al establecimiento de un entorno permisivo para la amplificación del virus mediante la manipulación de varios reguladores de la diferenciación celular (ATHB7, ATHB12, CYCD1;1, y TRN1, entre otros), lo que conlleva la división celular ectópica y la expansión de las células infectadas (Lai *et al.*, 2009; Mandal *et al.*, 2015; Mei *et al.*, 2018; Mills-Lujan y Deom, 2010).

Aunque los geminivirus se apoderan de la maquinaria de replicación de la célula hospedadora y emplean múltiples estrategias para regular la división y el ciclo celular, las consecuencias de esta regulación difiere entre distintos géneros. Los begomovirus no inducen proliferación celular e impulsan a las células a reentrar en el endociclo, una variación del ciclo celular que se caracteriza por un incremento de la ploidía y del tamaño de las células sin que haya división (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2008; Lageix *et al.*, 2007; Nagar *et al.*, 2002). Sin embargo, los curtovirus promueven la entrada de la célula en ciclo mitótico (Bass *et al.*, 2000), lo que provoca hinchazón en las venas y engrosamientos (Briddon, 2003; Park *et al.*, 2004).

Contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta

Las plantas han desarrollado mecanismos y estrategias de defensa muy complejas contra la invasión de los virus, que incluyen la inmunidad mediada por receptores, la maquinaria de silenciamiento del RNA (TGS, que lleva a cabo la metilación del genoma viral, y PTGS, que media la degradación de los mRNAs virales), autofagia, degradación proteosomal de proteínas mediada por ubiquitinación y vías de respuesta mediadas por hormonas (Ferreira *et al.*, 2021; Gosh y Chakraborty, 2021; Gupta *et al.*, 2021; Teixeira *et al.*, 2021). Contra esta amplia gama de mecanismos de defensa, los geminivirus despliegan estrategias capaces de suprimir o modular la respuesta inmune de la planta, secuestrar las vías ubiquitina-proteosoma, alterar las respuestas hormonales, desregular el ciclo celular y explotar las cascadas de señalización (Kumar *et al.*, 2019).

Entre los diferentes mecanismos de defensa antiviral destaca el silenciamiento génico, que ha evolucionado como la primera línea frente a los

ácidos nucleicos invasores, incluyendo los virus (Baulcombe, 2004; Shabalina y Koonin, 2008; Voinnet, 2005). La importancia de este mecanismo se refleja en la actividad supresora del silenciamiento que han adquirido la mayoría de las proteínas virales (Loriato *et al.*, 2020).

Diversidad y especiación: Mutación y Recombinación

La notable capacidad de los virus para adaptarse a nuevos huéspedes y entornos depende en gran medida de su capacidad para generar diversidad genética en un corto periodo de tiempo (Sanjuán y Domingo-Calap, 2021). La mutación y la recombinación actúan como principales fuentes de variabilidad genética, estando restringidas y estructuradas por la selección natural, la deriva genética y el flujo genético (Rubio *et al.*, 2020). Los geminivirus presentan una alta tasa de diversidad genética tanto por la acumulación de mutaciones como por los eventos de recombinación, siendo este último esencial en el proceso de adaptación y la emergencia viral (Elena *et al.*, 2014).

Mutación

La mutación constituye la principal fuente de variación genética en las poblaciones virales. La tasa de mutación representa el número medio de errores por nucleótido copiado y por unidad de tiempo, generación o por ronda de replicación genómica (Chao *et al.*, 2002; Drake *et al.*, 1998; Ge *et al.*, 2007). En el contexto de los virus, a menudo, esta tasa se refiere al número de cambios que se producen en el genoma viral durante un ciclo de infección, y depende de diversos factores como la fidelidad de la polimerasa, el contexto de la secuencia, la estructura secundaria del DNA molde, el microambiente celular, los mecanismos de replicación y de corrección de errores y el acceso a la reparación post-replicativa. Todas las variantes producidas durante la replicación viral forman un enorme reservorio genético, denominado cuasiespecie viral (Lauring y Andino, 2010).

La tasa de mutación de los virus varía según la composición (RNA o DNA), el tamaño y la estructura (monocatenario o bicatenario) de su genoma. En general, los virus de RNA presentan una alta tasa de mutación, ya que utilizan para su replicación las polimerasas de RNA codificadas en su genoma, que carecen de

actividad correctora (Domingo *et al.*, 1996; Drake y Holland, 1999; Gago *et al.*, 2009). Los virus de DNA, aunque en muchos casos dependen de la maquinaria de replicación del hospedador, presentan tasas de mutación similares a los virus de RNA (Sanjuán *et al.*, 2010). El origen de este alto número de errores está por determinar, pero podría atribuirse a las polimerasas que llevan a cabo la replicación del genoma viral o a los mecanismos de reparación que participan durante la síntesis del intermediario de dsDNA (Duffy *et al.*, 2008; Sanjuán y Domingo-Calap, 2016).

Los geminivirus presentan frecuencias de mutación de aproximadamente 10^{-4} mutaciones/nucleótido, así como tasas de sustitución similares a las detectadas en virus de RNA (Duffy y Holmes, 2008, 2009; Ge *et al.*, 2007; Harkins *et al.*, 2009; Isnard *et al.*, 1998; Sanz *et al.*, 1999; Urbino *et al.*, 2008; van der Walt *et al.*, 2008). Los trabajos realizados con poblaciones naturales de varias especies de begomovirus (TYLCV, *Tobacco leaf curl virus* –TLCV–, *Cotton leaf curl virus* –CLCuV–, y *East African cassava mosaic virus* –EACMV), el curtovirus BCTV o el mastrevirus MSV, dieron valores medios de $\sim 1,5 \times 10^{-3}$ a $4,6 \times 10^{-4}$ sustituciones/sitio/año, detectándose una alta diversidad de nucleótidos en posiciones sinónimas ($\sim 0,2-0,5$) para diferentes genes (Duffy y Holmes, 2008; Duffy y Holmes, 2009; Isnard *et al.*, 1998; Ooi *et al.*, 1997; Sanz *et al.*, 1999; Stenger y McMahon, 1997). Inicialmente, se propuso que las polimerasas de translesión (Pol TLS) podrían ser las encargadas de llevar a cabo la replicación del DNA viral, ya que carecen de actividad exonucleasa 3'-5' o correctora de errores. Sin embargo, análisis con mutantes de *Arabidopsis* para distintas polimerasas TLS mostraron que la falta de función de estas enzimas no altera significativamente el proceso de infección (Richter *et al.*, 2016a), y un estudio reciente sugiere, además, que son las polimerasas replicativas Pol α y Pol δ las que participan en la síntesis del intermediario de dsDNA y en la producción de nuevas copias de ssDNA, respectivamente (Wu *et al.*, 2021). En este último trabajo también se explica que la elevada tasa de mutación que presentan estos virus podría deberse a una disminución en la fidelidad de Pol δ , que en levaduras actúa durante la reparación de roturas de DNA de doble cadena (proceso en el que es propenso a errores), y a la falta de actividad correctora de Pol α (Wu *et al.*, 2021).

Recombinación homóloga

La recombinación contribuye significativamente a la evolución de los virus, ya que fomenta la diversidad al combinar las mutaciones existentes en distintos genomas para producir nuevos haplotipos (Pagán, 2018). Ésta puede producirse entre distintas moléculas (recombinación intercromosómica o "pseudo-recombinación") o bien dentro de un mismo minicromosoma (recombinación intracromosómica) (Martin *et al.*, 2011), y se ha asociado a la expansión de los rangos de hospedadores virales, la aparición de nuevos virus, la alteración de las especificidades de los vectores de transmisión, el aumento de la virulencia y la patogénesis, la modificación de los tropismos tisulares, la evasión de la inmunidad del hospedador y la evolución de la resistencia a los antivirales (Martin *et al.*, 2011; Simon-Loriere y Holmes, 2011).

En los geminivirus, la recombinación desempeña un papel esencial en su diversificación y evolución, contribuyendo a una mayor adaptabilidad, la aparición de nuevos géneros y especies y un aumento del potencial epidémico (Crespo-Bellido *et al.*, 2021; Díaz-Pendón *et al.*, 2019; Lefeuvre y Moriones, 2015; Rodelo-Urrego *et al.*, 2015). Este papel lo cumple principalmente al facilitar la transferencia de información genética, incluso entre especies distantes (Martin *et al.*, 2011). Tanto la organización de su genoma como la replicación por círculo rodante tienen el potencial de inducir la recombinación, siendo este mecanismo, además, el desencadenante de la replicación dependiente de recombinación (García-Andrés *et al.*, 2007; Lefeuvre *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2011). Varios mecanismos podrían ser los responsables de los patrones de recombinación observados, como los orígenes de replicación (Stenger *et al.*, 1994), la similitud de secuencias (Lefeuvre *et al.*, 2011), la estructura secundaria del ssDNA (Martin *et al.*, 2011), los conflictos transcripción-replicación (Lett *et al.*, 2009) y los grados diferenciales de exposición del ssDNA dentro de los minicromosomas (Lefeuvre *et al.*, 2007; Pilartz y Jeske, 2003).

Los estudios realizados revelan que los sitios de ruptura a partir de los cuales se inicia la recombinación no se distribuyen al azar, sino que existen puntos calientes y fríos de recombinación conservados, y que hay una tendencia significativa a que ésta se produzca fuera o en las periferias de los genes (Lefeuvre *et al.*, 2007; Lefeuvre *et al.*, 2009). Concretamente, los puntos calientes de recombinación se concentran en el límite de los genes que codifican para Rep, CP

y MP, así como en las regiones intergénicas cortas (*small intergenic región*, SIR), presentes en algunos virus, y en el v-ori (origen de replicación en la cadena del virión, donde se localiza la estructura en forma de lazo) (Varsani *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2015).

Los recombinantes detectados, a partir de experimentos o de poblaciones naturales, demuestran que su viabilidad y capacidad adaptativa depende de la conservación de las redes de interacción, tanto entre las proteínas virales como entre los dominios de las proteínas (Lefeuvre *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2011; Monjane *et al.*, 2014). Resultados obtenidos por Urbino y colaboradores (2020) para recombinantes entre TYLCV y TYLCSV capaces de superar la resistencia conferida por el gen *Ty-1* (Belabess *et al.*, 2016; Belabess *et al.*, 2018; Panno *et al.*, 2018) apoyan que la ventaja adaptativa es promovida por interacciones beneficiosas intragenómicas inducidas por la recombinación interespecífica.

Se ha descrito que los geminivirus incrementan la expresión de genes que codifican factores implicados en la reparación y recombinación del DNA (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2008), y que estos virus son capaces de promover la recombinación homóloga de transgenes, de manera selectiva, en el tejido asociado al floema (Richter *et al.*, 2014). Aunque se desconoce el mecanismo por el que los geminivirus inducen la maquinaria de recombinación, se ha propuesto que podría estar mediado por la proteína Rep (Baltes *et al.*, 2014). Rep del virus *Mungbean yellow mosaic Indian virus* (MYMIV) interacciona con dos de los principales participantes del proceso de recombinación: RAD54, una ATPasa dependiente de dsDNA y remodelador de la cromatina, y RAD51, que cataliza la búsqueda de homología y el intercambio de cadenas (Kaliappan *et al.*, 2012, Suyal *et al.*, 2013). Aunque estas proteínas no son esenciales para la replicación del DNA del virus *euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) (Richter *et al.*, 2016; Richter y Jeske, 2014), los resultados obtenidos con uno de los parálogos de RAD51, RAD51D, indicaron que esta proteína promueve la replicación viral en la etapa temprana de la infección y que es requerida para la recombinación, ya que su ausencia produjo una disminución significativa de las moléculas recombinantes intra e intermoleculares entre los dos componentes de DNA del EuYMV. Además, este estudio indicó que la vía de reparación de la rotura del DNA de doble cadena (*double-strand break*, DSB), SSA (*single strand annealing*), podría ser uno de los mecanismos que llevan a cabo la síntesis de la cadena complementaria (Richter *et al.*, 2016).

MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

Las modificaciones postraduccionales (*post-translational modifications*, PTMs) son mecanismos esenciales utilizados por las células eucarióticas para diversificar las funciones de sus proteínas y regular numerosos procesos celulares. Estos cambios consisten en la alteración de las proteínas mediante la adición de grupos funcionales (lípidos, carbohidratos, o péptidos), o bien por la eliminación o la modificación de ciertos aminoácidos (Capadoccia y Lima, 2018; Uversky, 2013). Los cambios introducidos pueden alterar de forma reversible o irreversible la estructura de la diana, modificando el conjunto de interactores de la proteína, su actividad o su localización subcelular.

Se han descrito alrededor de 300 modificaciones postraduccionales diferentes. Dependiendo de las condiciones celulares, las diversas PTMs pueden competir directamente por un sitio determinado o interrelacionarse funcionalmente, como ocurre entre la fosforilación y la ubiquitinación o la sumoilación y la acetilación, entre otros ejemplos (Snider y Omary, 2014).

Un tipo de modificación postraducciona consiste en la unión covalente de pequeños péptidos como la ubiquitina (Ub) o similares, entre los que destaca SUMO (*small ubiquitin-like modifier*), a una proteína diana. Este tipo de PTM regula muchas redes de señalización, incluyendo el control de la diferenciación, la apoptosis, el ciclo celular y las respuestas a estrés (Gareau *et al.*, 2010; Geiss-Friedlander y Melchior, 2007; Kirkin *et al.*, 2007).

Ubiquitinación: una visión general

La ubiquitinación consiste en la unión covalente del péptido ubiquitina a, principalmente, un residuo de lisina de una proteína diana (McDowell y Philpott, 2013). Conocida por su papel en la degradación de proteínas por la vía proteosoma, esta modificación también juega un papel esencial en la regulación de procesos celulares independientes de esta vía (Uversky, 2013).

La unión del péptido ubiquitina se produce a través de la actividad secuencial de enzimas que catalizan la maduración, activación, conjugación, unión y liberación del péptido (Uversky, 2013) (**Figura 6**). En primer lugar, la ubiquitina, sintetizada como una proteína de fusión, es procesada y liberada por enzimas

desubiquitinadoras (*desubiquitinating enzymes*, DUBs). A continuación, es activada de manera dependiente de ATP por una enzima activadora (E1), que forma un enlace tioéster entre el carboxilo terminal del pequeño péptido y el residuo de cisteína catalítica de E1. Una vez la ubiquitina es activada, se transfiere a la cisteína catalítica de una enzima conjugadora (E2). En el cuarto paso de la cascada, el conjugado E2-ubiquitina coopera con una ligasa (E3) para transferir la ubiquitina al sustrato, formando un enlace isopeptídico entre la glicina terminal del pequeño péptido y el grupo ϵ -amino de la lisina diana. La actividad de la cascada E1-E2-E3 da lugar a la unión de una única ubiquitina a la proteína diana, pero pueden producirse ciclos iterados sobre un mismo sustrato. Esto conlleva la conjugación del pequeño péptido a múltiples sitios adicionales, lo que se conoce como multiubiquitinación, o la formación de una cadena de poliubiquitina (poliubiquitinación). Una cuarta enzima, conocida como ligasa E4, puede participar en la elongación de las cadenas de poliubiquitina (Koegl *et al.*, 1999). Finalmente, esta modificación puede revertirse mediante la acción de las enzimas DUBs (Turcu *et al.*, 2009), que rompen específicamente el enlace peptídico entre la glicina del C-terminal de la ubiquitina y la proteína diana.

Componentes del sistema de ubiquitinación en plantas

El genoma de las plantas codifica de dos a cuatro E1, docenas de E2 y más de mil E3 (Callis, 2014; Miricescu *et al.*, 2018). *Arabidopsis* contiene 12 ubiquitinas funcionales, 2 enzimas activadoras, al menos 37 enzimas conjugadoras, más de 1500 ligasas E3, una ligasa E4 y, aproximadamente 50 enzimas DUBs (Callis, 2014). La abundancia de las enzimas implicadas en la ubiquitinación, y especialmente el elevado número de ligasas, es indicativo de la importancia del sistema de ubiquitina en las plantas en comparación con otros eucariotas como los humanos o la levadura de fusión, que codifican aproximadamente 600 y 100 ligasas, respectivamente (Finley *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2008; Zheng y Shabek, 2017).

La ubiquitina (o ubicuitina) es un péptido de 76 aminoácidos muy conservado en los eucariotas y ampliamente expresado en todas las células, lo que condujo a atribuirle dicho nombre (Callis y Vierstra, 1989). Este péptido es sintetizado como una fusión traduccional, que contiene una única ubiquitina unida al N-terminal de una proteína ribosomal UEP (*ubiquitin extension protein*) o como un

polímero compuesto por repeticiones en tándem de moléculas unidas cabeza-cola con uno o más aminoácidos adicionales en el C-terminal (Callis *et al.*, 1995). Además, en las plantas, pero no en levaduras o animales, los genes de la ubiquitina también se expresan fusionados a un péptido similar a la ubiquitina denominado RUB (*related to ubiquitin*) (Callis *et al.*, 1995).

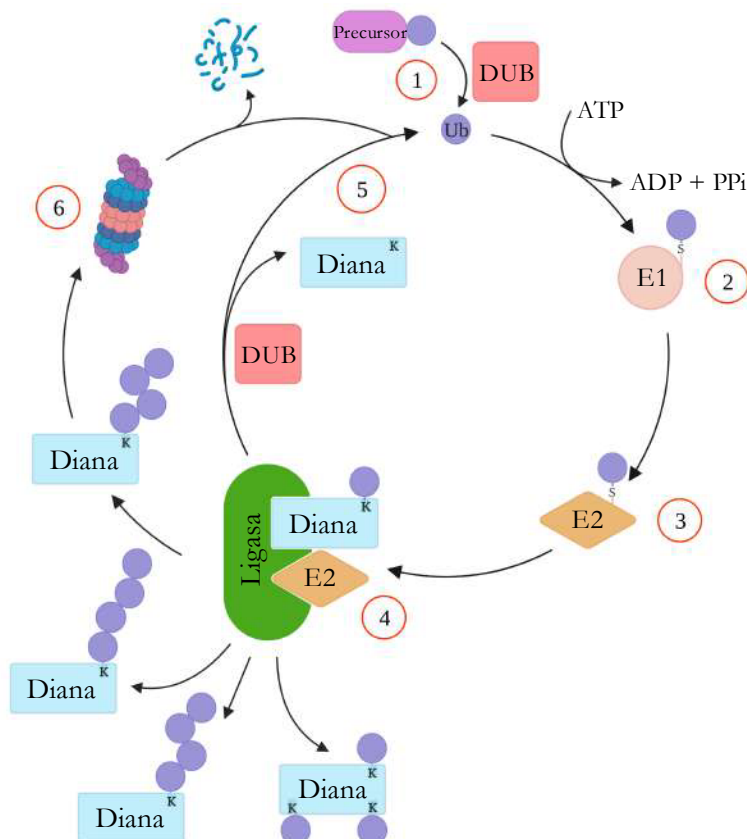


Figura 6. Ciclo de conjugación de la ubiquitina. La ubiquitina es sintetizada como una fusión traduccional junto a proteínas ribosomales o como una cadena de poliubiquitina, y es procesada por una enzima desubiquitinadora (DUB) para su liberación y entrada en el ciclo (1). En el primer paso, el grupo carboxilo de la glicina terminal de la ubiquitina (Ub) es activado por la enzima activadora E1 (2). En este proceso, el residuo de cisteína catalítica de E1 se une al péptido por un enlace tioéster, con la consiguiente liberación de AMP. A continuación, la ubiquitina activada se transfiere a la enzima conjugadora (E2) mediante una reacción de transacilación (3). En el último paso, la E2 transfiere la ubiquitina al sustrato con la ayuda de una ligasa específica E3, que cataliza la formación de un enlace isopeptídico entre el grupo carboxilo de la glicina de la ubiquitina y el grupo e-amino de un residuo de lisina de la diana (4). Ciclos iterados dan lugar a la unión de varias moléculas a lisinas diferentes (multiubiquitinación) o la formación de cadenas de poliubiquitina (poliubiquitinación) (4), lo que puede servir como señal de degradación por el proteasoma 26S (6) o regular otras funciones, dependiendo del residuo de lisina a través del cual se establezca la cadena; tras la protólisis del sustrato, la ubiquitina queda disponible para un nuevo ciclo de modificación (6). La ubiquitinación es un proceso reversible y las enzimas DUB pueden romper el enlace entre el péptido modificador y el sustrato, permitiendo el reciclado de la ubiquitina (5).

Las enzimas activadoras (E1) de *Arabidopsis* están codificadas por dos genes, *AtUBA1* y *AtUBA2*, que se expresan de manera similar en casi todos los tejidos (Hatfield *et al.*, 1997). Las proteínas AtUBA1 y AtUBA2 comparten una identidad de secuencia del 81% y contienen un residuo de cisteína en el sitio activo que forma el enlace tio-éster con extremo C-terminal de la ubiquitina. Las enzimas conjugadoras (E2) contienen un núcleo catalítico común de 150 aminoácidos que incluye también un residuo de cisteína conservado necesario para interactuar con el pequeño péptido y formar el intermediario E2-ubiquitina (Hurley *et al.*, 2006; Kraft *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2003).

Las ligasas (E3) son las principales enzimas responsables de la especificidad del sustrato en el proceso de modificación (Vierstra, 2012). En plantas, las ligasas de ubiquitina E3 pueden clasificarse en cuatro familias en base a sus características estructurales y mecanismos de acción: RING (*really interesting new gene*), que incluye los complejos multisubunidad CRL (*cullin-RING ligases*), U-box, RBR (RING *between* RING) y HECT (*homologous to E6-associated protein C-Terminus*) (Callis, 2014) (**Figura 7**).

El código ubiquitina

La forma más básica de conjugación de la ubiquitina es la monoubiquitinación, que puede producirse en múltiples lisinas de una proteína diana (multimonoubiquitinación). Esta modificación puede generar la degradación de la diana por la vía proteosomal (Braten *et al.*, 2016) o bien actuar modificando su funcionalidad (Feng y Shen, 2014; Kodadek *et al.*, 2006; Salghetti *et al.*, 2001). Sin embargo, la ubiquitinación se asocia clásicamente a la formación de cadenas de ubiquitina (poliubiquitinación). Una vez la ubiquitina se ha conjugado a la proteína diana, este péptido también puede ubiquitinarse en una de sus siete lisinas altamente conservadas (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) o en su metionina N-terminal (M1), lo que da lugar a la formación de cadenas de poliubiquitina. Estas cadenas pueden ser homotípicas, si cada ubiquitina se une a través de la misma lisina con la ubiquitina consecutiva, o heterotípicas, si combinan la unión de las moléculas a distintos residuos (mixtas), pudiendo incluso interactuar una misma ubiquitina con otras dos (ramificadas) (Haakonsen y Rape, 2019; Nakasone *et al.*, 2013; Stolz y Dikic, 2018). Además, la ubiquitina puede ser a su vez alterada por

otras modificaciones postraduccionales como la acetilación (Ohtake *et al.*, 2015), la fosforilación (Herhaus y Dikic, 2015) o la ribosilación (Vivelo *et al.*, 2019), o por otros péptidos similares como SUMO o NEDD8 para formar cadenas híbridas (Pérez-Berrocal *et al.*, 2019). Todo ello constituye un lenguaje único conocido como el código ubiquitina, un sistema de señalización con una extraordinaria especificidad y versatilidad que la célula traduce para regular el destino de las proteínas diana (Komander y Rape, 2012).

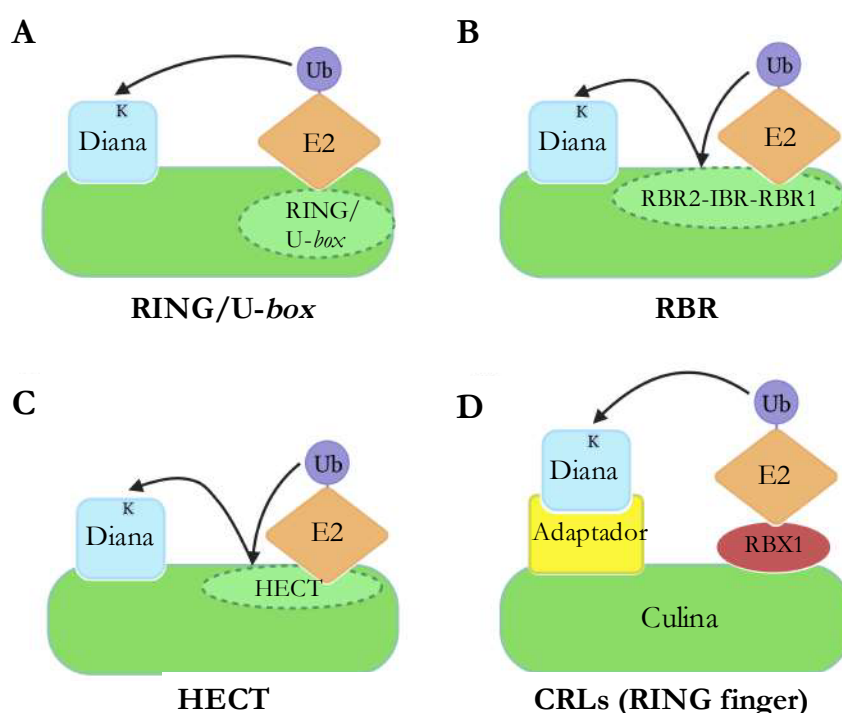


Figura 7. Clases de ligasas de ubiquitina E3 en plantas. Las ligasas de ubiquitina E3 se pueden dividir en 3 tipos en función de su mecanismo de transporte y transferencia de ubiquitina. **A.** Las ligasas monoméricas RING y U-box (de estructura similar) interactúan directamente con sus sustratos y el complejo E2-Ub a través del dominio conservado RING o U-box, respectivamente, transfiriendo el pequeño péptido directamente a la lisina diana. **B.** Las ligasas RBR interactúan con la E2-Ub como las ligasas RING/U-box, pero requieren, como las ligasas HECT (**C**) un residuo de cisteína medie la transferencia de la ubiquitina al sustrato a través de un enlace tioéster. **D.** Los complejos CRLs (ligasas E3 de tipo RING-finger) se componen de una proteína de andamiaje (culina), la proteína RING-finger RBX1, que acopla al complejo E2-Ub, y una proteína adaptadora, encargada del reconocimiento del sustrato. Cys: cisteína catalítica; CRLs: *cullin*-RING ligases.

Papel de la ubiquitinación en plantas

La ubiquitinación regula casi todos los aspectos de la biología de las plantas, siendo esencial en múltiples etapas del desarrollo como la latencia, la germinación

de las semillas, el crecimiento de las raíces, el control del tiempo de floración, la autoincompatibilidad, el desarrollo del cloroplasto, el tráfico vesicular, la senescencia, la autofagia, la respuesta a estreses abióticos y bióticos (Callis *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2016; Feng y Shen, 2014; Hu *et al.*, 2014; Kirkin *et al.*, 2009; Sadanandom *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2015; Zou *et al.*, 2014).

Papel de la ubiquitinación en la respuesta frente a patógenos

Los intrincados mecanismos moleculares que rigen las respuestas inmunitarias de las plantas implican un alto grado de plasticidad proteómica, al que contribuye de manera crucial la ubiquitinación. Los hallazgos en las últimas dos décadas han revelado que la modificación por ubiquitina y, concretamente, muchas ligasas E3, están involucradas en la inmunidad de las plantas, desde la percepción del patógeno hasta la transducción de señales y las consiguientes respuestas de defensa (Cheng *et al.*, 2012; Jian y Chen, 2012; Li *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2006). Algunas de estas enzimas participan degradando a través del proteosoma 26S componentes implicados en las respuestas inmunitarias innatas desencadenadas por patrones o efectores, denominadas PTI (*pattern-triggered immunity*) y ETI (*effector-triggered immunity*), respectivamente, como por ejemplo los inmunoreceptores PRRs (*pattern-recognition receptors*), los cuales reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) (Macho y Zipfel, 2014; Monaghan y Zipfel, 2012; Yuan *et al.*, 2021).

Además, el sistema ubiquitina-proteosoma también actúa a nivel de la señalización hormonal, regulando los niveles de las principales proteínas activadoras o represoras, esenciales para la integración eficiente de las señales de estrés biótico (Pieterse *et al.*, 2009; Santner y Estelle, 2009). Aquí destaca el papel del complejo ligasa CRL, que controla la actividad de los factores de transcripción que actúan como reguladores maestros de las diferentes vías de señalización de las fitohormonas como el ácido salicílico, el jasmonato y el etileno (Adie *et al.*, 2007; Miricescu *et al.*, 2018; Tamaoki *et al.*, 2013).

Ubiquitinación y geminivirus

Dado que el sistema de ubiquitina es indispensable para que las células eucariotas regulen diversas respuestas inmunitarias, muchos patógenos han desarrollado múltiples mecanismos para subvertirlas y favorecer su propia supervivencia y proliferación. Algunos virus son capaces de interferir con el sistema de ubiquitinación en varios momentos de su ciclo vital, como la entrada en la célula huésped, el ensamblaje, la replicación y el movimiento, utilizándolo para mejorar su proliferación y evadir la respuesta inmune (Dubiella y Serrano, 2021; Valerdi *et al.*, 2021).

Los geminivirus manipulan la maquinaria de la ubiquitinación para completar su ciclo de infección. Una de las dianas principales son los complejos ligasa SCF, cuya alteración les permite modular diferentes eventos de la señalización hormonal y evadir la respuesta inmune. Lozano-Durán y colaboradores mostraron que las proteínas TrAP de los geminivirus TYLCV y BCTV se unen a la subunidad CSN5 del complejo del señalosoma COP9 (CSN) y alteran la derivilación de CUL1, parte del complejo SCF (Lozano-Durán *et al.*, 2011). Alternativamente, la proteína β C1 del betasatélite del virus *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMuV) interactúa con la proteína SKP1, afectando al ensamblaje de SCF. Esta unión dificulta la función biológica de los complejos SCF^{COI1} y SCF^{SYL1}, que involucran las vías del ácido jasmónico y del ácido giberélico, respectivamente (Jia *et al.*, 2016). También se conoce que la sobreexpresión de β C1, que interacciona con la enzima conjugadora de ubiquitina UBC3, da lugar a una reducción de la poliubiquitinación global de las proteínas (Eini *et al.*, 2009). En las plantas infectadas, esta interacción ayuda a inducir síntomas específicos de los betasatélites, posiblemente mediante la perturbación de varias vías hormonales y del desarrollo.

Además, la proteína C2 de TYLCV parece promover la interacción de la mosca blanca y la planta infectada al interactuar directamente con el motivo de ubiquitina de la proteína ribosomal 40S S27a (RPS27a). Aunque todavía no se conoce el mecanismo directo, se postula que dicha interacción bloquea la ubiquitinación y posterior degradación por la vía del proteasomal 26S de JAZ1, que bloquea la expresión dependiente de MYC2 de genes relacionados con la defensa (Li *et al.*, 2019).

Los geminivirus también interfieren con el sistema ubiquitina-proteosoma del huésped para regular el ciclo celular o la transcripción viral. La proteína Rep del *Chilli leaf curl virus* (ChiLCV) interactúa con UBC2 y HUB1 y dirige la monoubiquitinación de la histona H2B (Kushwaha *et al.*, 2017). Esta modificación promueve la trimetilación de la histona 3 en la lisina 4 (H3K4me3) en los minicromosomas del ChiLCV y mejora la transcripción de los genes virales (Kushwaha *et al.*, 2017). Por otra parte, la proteína TrAP de BSCTV impide el silenciamiento transcripcional al interactuar con SAMDC1 (*S-adenosyl-methionine decarboxylase* 1) y atenuar su degradación mediada por el proteosoma (Zhang *et al.*, 2011). Recientemente, se ha demostrado que la activación temprana de los genes C2 y C3 del *Beet severe curly top virus* (BSCTV) está correlacionada con la expresión de *VIM5* (*variant in methylation 5*), un gen expresado en el endospermo y regulado por *imprinting* genómico que se conserva en diversas especies de plantas. VIM5, una ligasa de ubiquitina E3, se dirige directamente a las metiltransferasas de DNA MET1 y CMT3 para su degradación por el proteosoma, y reduce la metilación simétrica en el promotor C2-3 (Chen *et al.*, 2020). También se ha descrito que la proteína C4 de BSCTV induce la transcripción de *related to KPC1* (RKP), un gen que codifica una ligasa de ubiquitina E3 que regula la degradación de las proteínas inhibidoras del ciclo celular KRPs (*KIP-related proteins*), lo que mejora la transición del ciclo celular y crea un entorno favorable para la replicación del virus (Lai *et al.*, 2009).

Para contrarrestar la infección vírica, las plantas también aprovechan la degradación por la vía ubiquitina-proteosoma para inactivar los factores de virulencia codificados por los virus. Por ejemplo, una proteína de tipo RING-*finger* codificada por *Nicotiana tabacum*, NtRFP1, media la degradación de β C1 del TYLCCNV a través de esta vía (Shen *et al.*, 2016). Las plantas que sobreexpresan NtRFP1 desarrollaron síntomas atenuados contra la infección viral, probablemente al disminuir la supresión de JA mediada por β C1, mientras que las plantas esta ligasa silenciada mostraron síntomas graves (Shen *et al.*, 2016).

Sumoilación

La sumoilación consiste en la unión covalente y reversible del péptido SUMO a residuos de lisina de una proteína diana (Geiss-Friedlander y Melchior,

2007; Melchior, 2000) (**Figura 8**). Esta modificación puede afectar a la función, la actividad, la localización subcelular y/o la vida media de su sustrato, lo que se debe en gran medida a la alteración del conjunto de interactores de la proteína sumoilada: (i) evitándolas, al enmascarar los sitios de unión con el interactor o (ii) creando nuevas interacciones e impulsando la formación de complejos (Hecker *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2016; Pichler *et al.* 2005; Song *et al.*, 2004) (**Figura 9**).

La ruta de sumoilación

La sumoilación implica la unión covalente de SUMO a residuos de lisina de una proteína diana a través de una cascada enzimática análoga a la de la ubiquitinación en la que participan diversas enzimas que catalizan la maduración, activación, conjugación, ligación y desconjugación del pequeño péptido (**Figura 7**) (Miura *et al.*, 2007; Pichler *et al.*, 2017). Las proteínas SUMO son sintetizadas como propéptidos y procesadas por isopeptidasas específicas (*deSUMOylating proteases*, DSPs) que eliminan varios residuos de su extremo C-terminal para exponer el motivo diglicina (GG) que interviene en su conjugación a las enzimas de la ruta y la proteína diana (Smith *et al.* 2004).

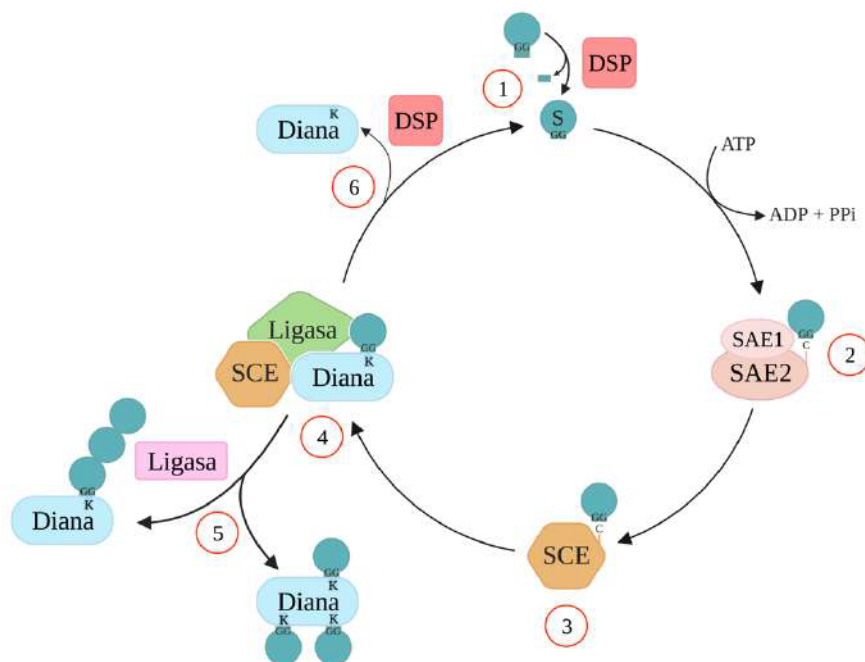


Figura 8. Ciclo de conjugación de SUMO. La unión covalente de SUMO a la proteína diana tiene lugar por la acción secuencial de una tríada enzimática, E1, E2 y E3, y de proteasas que permiten la entrada y el reciclaje de la proteína modificadora. (1) El péptido SUMO (S) es sintetizado como un precursor, procesado en su forma madura por la acción de serin-proteasas específicas de SUMO (DSP) que eliminan varios aminoácidos del extremo carboxilo terminal del pequeño péptido para exponer el motivo esencial diGly (GG). (2) Una vez maduro, SUMO es activado por el heterodímero SAE1/2 (E1), con el que establece un enlace tioéster entre el motivo diGly y la cisteína catalítica (C) de SAE2. (3) SUMO se transfiere a continuación a la C catalítica de SCE (E2), que conjuga SUMO a un residuo de lisina (K) específico de la proteína diana de forma directa o (4) a través de una ligasa de SUMO (E3). (5) Los sustratos pueden modificarse con un solo péptido (monosumoilación), con múltiples (multisumoilación) o con una cadena de SUMOs (polisumoilación), lo que conlleva diferentes consecuencias funcionales. (6) Esta modificación es revertida por proteasas específicas (DSP) (desconjugación), liberando a la diana y a SUMO, que puede volver a entrar en el ciclo de sumoilación.

El péptido SUMO ya maduro es activado por la enzima activadora E1 (SAE1/SAE2) a través de una reacción dependiente de ATP, en la que cataliza la formación de un enlace tioéster entre el motivo diglicina de SUMO y un residuo de cisteína de SAE2. Una vez activado, SUMO es transferido a la cisteína catalítica de la enzima conjugadora E2 (SCE) y, finalmente, conjugado al grupo amino- ϵ de un residuo de lisina de la proteína diana, de forma directa o a través de una ligasa de SUMO E3. Como paso adicional, tal y como sucede en la ubiquitinación, las proteínas pueden ser modificadas por varios péptidos SUMO formando una cadena (polisumoilación) o unidos a diferentes lisinas (multisumoilación) a través de ligasas específicas (Augustine *et al.*, 2016; Hendriks y Vertegaal, 2016; Hickey *et al.*, 2012). Al tratarse de una modificación reversible, las proteínas también pueden desumoilarse; este paso lo llevan a cabo las proteasas encargadas de la maduración de SUMO (DSPs), que rompen el enlace isopeptídico entre el pequeño péptido y el sustrato (Yates *et al.*, 2016). De este modo, SUMO puede ser reciclado, quedando disponible para un nuevo ciclo de modificación postraduccional (**Figura 8**). Las proteínas están sometidas a ciclos rápidos de sumoilación/desumoilación y tan sólo entre el 5% y el 10% se encuentra en su forma sumoilada en un momento dado (Jentsch y Psakhye, 2013; Wilkinson y Henley, 2010).

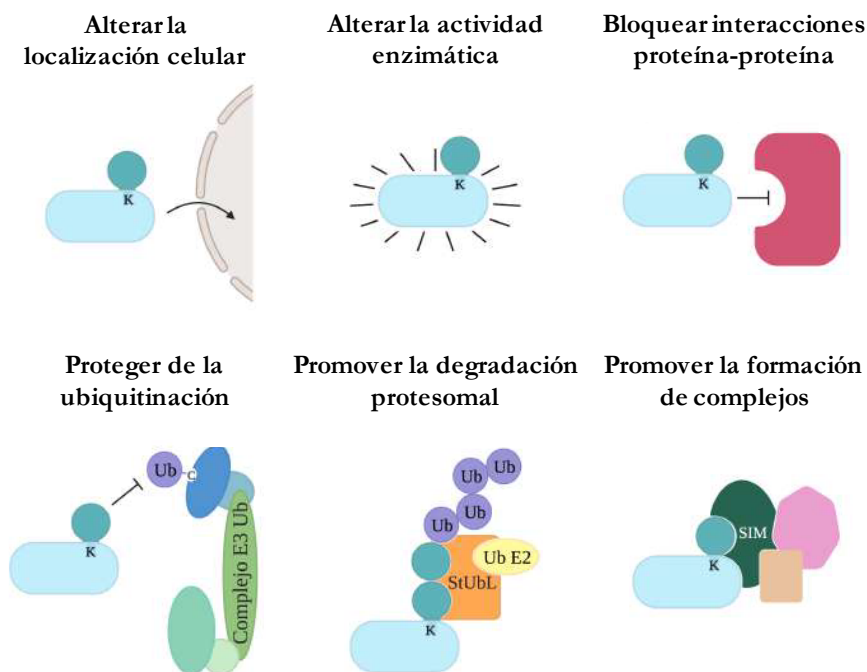


Figura 9. Consecuencias funcionales de la sumoilación. La conjugación de SUMO a una proteína puede alterar su localización subcelular, su actividad enzimática y su interacción con otras proteínas, ya sea evitándola por un cambio en su conformación o enmascarando el sitio de unión y/o promoviendo la formación de complejos a través de la unión no covalente de SUMO con proteínas que contienen motivos SIM. La sumoilación también puede preservar la estabilidad de la proteína al proteger los residuos de lisina que pueden ser ubiquitinados o bien, una vez formada la cadena de poliubiquitina, promover su degradación proteosómica al facilitar el reconocimiento y la subsiguiente ubiquitinación por las STUbL (*SUMO targeted ubiquitin ligases*) (adaptado de Augustine y Vierstra, 2018).

Componentes de la maquinaria de sumoilación en plantas

SUMO: el pequeño modificador similar a la ubiquitina

SUMO es una proteína de aproximadamente 100 aminoácidos relacionada estructuralmente con la ubiquitina y conservada en todos los eucariotas (Vierstra, 2012). Al igual que otros miembros de la familia de la ubiquitina, SUMO adopta la estructura tridimensional común, compuesta por una serie de láminas β que envuelven una hélice α (*β -grasp domain*) (Bayer *et al.*, 1998; Vierstra, 2012). Su característica más distintiva es una extensión flexible e intrínsecamente desordenada de 10-30 residuos en el extremo N-terminal que contiene las lisinas que participan en la formación de cadenas de poliSUMO (**Figura 10**) (Bayer *et al.*, 1998).

Todos los eucariotas contienen al menos un gen que codifica para SUMO, como sucede en *S. cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*. En vertebrados y plantas, sin embargo, existe una familia de genes que amplía el número de isoformas de este péptido hasta cerca de la decena. En humanos, se han descrito cinco parálogos (HsSUMO1-5); HsSUMO1, 2 y 3 se expresan de forma ubicua y HsSUMO4 y 5 en determinados tejidos (Geiss-Friedlander *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2014). HsSUMO2 y HsSUMO3 son casi idénticos (97% de homología), por lo que comúnmente se nombran como HsSUMO2/3.

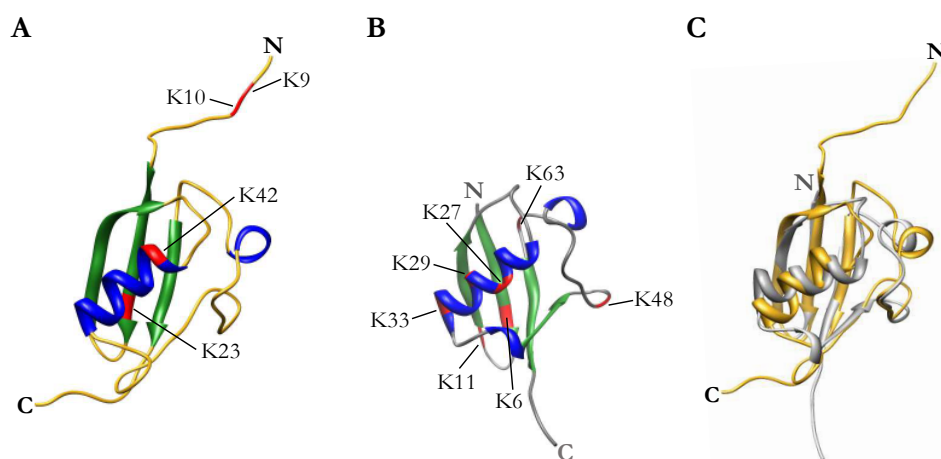


Figura 10. Modelos estructurales de SUMO1 y ubiquitina de *A. thaliana*. Las estructuras tridimensionales de ambos péptidos modificadores se generaron con SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) usando la estructura cristalizada de SUMO1 (1a5R) (A) y ubiquitina (5af6) (B) de humano como molde. En azul, rojo y verde se resaltan las hélices α , las láminas β y los residuos de lisina, respectivamente. Las lisinas destacadas son sitios conocidos de interacción SUMO-SUMO (K9/10/23/42) o SUMO-Ub (K23) (A) y ubiquitina-ubiquitina (B). En C se muestra el solapamiento de las estructuras A y B.

El genoma de *Arabidopsis* codifica ocho isoformas de SUMO, pero sólo se han detectado niveles de expresión significativos para AtSUMO1, 2, 3 y 5 (Hammoudi *et al.*, 2016; Kurepa *et al.*, 2003; Novatchkova *et al.*, 2004) (Tabla 3). AtSUMO1 y AtSUMO2 son las isoformas más estrechamente relacionadas, compartiendo un 83% de identidad de secuencia de aminoácidos, mientras que AtSUMO3 y AtSUMO5 muestran un 42% y un 30% de identidad de secuencia con AtSUMO1, respectivamente (Kurepa *et al.*, 2002). De manera similar a cómo

se ha descrito en humanos, AtSUMO1 y 2 son, aparentemente, los únicos capaces de formar cadenas de poliSUMO, mientras que AtSUMO3 y AtSUMO5 se conjugan principalmente como monómeros (Colby *et al.*, 2006). Las distintas isoformas de SUMO difieren en sus patrones de expresión espacio-temporales y en sus funciones durante el desarrollo y la defensa (Saracco *et al.*, 2007; van den Burg *et al.*, 2010). Las isoformas 1 y 2 son las únicas que muestran niveles altos de expresión (Castaño-Miquel *et al.*, 2011) y acaparan el mayor número de conjugados de la planta. Su ausencia provoca la detención del desarrollo embrionario en las primeras etapas, por lo que el mutante *sum1/sum2* no es viable (Saracco *et al.*, 2007). AtSUMO 5 es la isoforma menos eficiente y de función desconocida (Hammoudi *et al.*, 2016) y AtSUMO 3, a pesar de su baja expresión, participa en las respuestas de defensa desencadenadas por patógenos o por aplicación de ácido salicílico (SA) (Cheng *et al.*, 2017; Ingole *et al.*, 2021; van den Burg *et al.*, 2010). AtSUMO3 sólo está presente en algunas *Brassicaceas*, lo que sugiere que la modulación de las respuestas de defensa por sumoilación incluiría mecanismos evolutivamente divergentes.

E1: Enzima activadora de SUMO

En *S. cerevisiae*, humanos y *Arabidopsis*, la enzima activadora de SUMO es un heterodímero formado por una subunidad grande, SAE2 o Uba2, y otra de menor tamaño, SAE1 o Aos1. La subunidad grande está organizada en cuatro dominios funcionales: dominio de adenilación, cisteína catalítica, UFD (*ubiquitin-fold domain*) y dominio C-terminal (Lois y Lima, 2005). El dominio de adenilación es el responsable del reconocimiento y la formación del intermediario AMP-SUMO, en la que también contribuye la subunidad pequeña. La cisteína catalítica facilita la formación del enlace tioéster con el pequeño péptido (Olsen *et al.*, 2010). SUMO es transferido a la enzima conjugadora tras el reconocimiento de ambas enzimas a través del dominio UFD y la cisteína catalítica (Lois y Lima, 2005; Wang *et al.*, 2007). El dominio C-terminal no es requerido para la activación de SUMO *in vitro* (Lois y Lima, 2005), pero contiene las señales moleculares que determinan su localización subcelular (Castaño-Miquel *et al.*, 2013; Moutty *et al.*, 2011; Truong *et al.*, 2012).

En *Arabidopsis*, la enzima activadora está codificada por una variante del gen *AtSAE2* y tres copias del gen *AtSAE1*: *AtSAE1a*, *AtSAE1b1* y *AtSAE1b2*

(**Tabla 3**). Los dos genes *AtSAE1b* son idénticos, por lo que sólo se pueden encontrar las isoformas AtSAE1a y AtSAE1b. Ambas isoformas confieren distintas tasas de conjugación *in vitro*, lo que sugiere que no cumplen actividades redundantes y sí un papel regulador durante la conjugación de SUMO (Castaño-Miquel *et al.*, 2013). La inactivación del gen *AtSAE2* resulta letal, ya que impide el desarrollo del embrión (Saracco *et al.*, 2007).

E2: Enzima conjugadora de SUMO

Mientras que la ubiquitina emplea múltiples enzimas conjugadoras alternativas, en la ruta de sumoilación de vertebrados, levaduras y la mayoría de las plantas solo existe una proteína conjugadora denominada Ubc9 o SCE. Se trata de uno de los miembros más conservados de la maquinaria de sumoilación, compartiendo la proteína de *Arabidopsis* el 63% de identidad de secuencia con su ortólogo humano (**Tabla 3**).

Esta enzima contiene, al igual que la activadora E1, un dominio UFD y una cisteína catalítica que forma el enlace tioéster con SUMO (Michelle *et al.*, 2009; Olsen y Lima, 2013). Su función principal consiste en la transferencia del pequeño péptido al residuo de lisina del sustrato, de forma directa o con la participación de ligasas (Tomanov *et al.*, 2018; Wrigth *et al.*, 2019).

La enzima conjugadora también puede sumoilarse (en la lisina 15 en SCE1 de *Arabidopsis*) e interaccionar no covalentemente con SUMO a través de un motivo SIM, situado en la hélice del extremo N-terminal. La sumoilación mejora su unión y la conjugación de SUMO a sustratos que contienen un motivo SIM (Knipscheer *et al.*, 2008; Tomanov *et al.*, 2018), mientras que el sitio SIM le permite interaccionar con proteínas ya unidas a SUMO (Capili y Lima, 2007; Duda *et al.*, 2007; Knipscheer *et al.*, 2007). En levaduras y humanos, tanto la sumoilación como la interacción no covalente con SUMO participan en la formación de cadenas de poliSUMO, al mediar la unión de una enzima conjugadora sumoilada, que actúa como cofactor, con otra cargada con SUMO (Klug *et al.*, 2013; Knipscheer *et al.*, 2007; Knipscheer *et al.*, 2008). En cambio, en las plantas, la polisumoilación de los sustratos parece ser dependiente del extremo amino-terminal de SCE pero no de la modificación de la lisina 15 (Tomanov *et al.*, 2018).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

mostrando una localización nuclear junto a AtSUMO1/2 (Lois, 2003). Su ausencia impide el desarrollo embrionario, por lo que resulta letal (Saracco *et al.*, 2007). En otras especies de plantas, se han encontrado al menos dos genes que codifican SCE (Kurepa *et al.*, 2003; Novachtkova *et al.*, 2012); la patata contiene nueve genes *StSCE* confirmados (Ghimire *et al.*, 2020), en arroz se han identificado tres, *OsSCE1a*, *OsSCE1b* y *OsSCE1c*, que pueden considerarse como un subgrupo específico de las monocotiledóneas (Novachtkova *et al.*, 2012) y están implicados en diferentes procesos celulares (Joo *et al.*, 2019), y en maíz se han encontrado siete genes *SCE1* (*SCE1a-SCE1g*) que se agrupan en tres subfamilias distintas, clase I, clase II y clase III, siendo las dos últimas específicas de monocotiledóneas (Wang *et al.*, 2020).

E3: Ligasas de SUMO

Las ligasas catalizan la transferencia de SUMO desde la enzima conjugadora a la proteína diana al interactuar con ambos componentes y provocar su acercamiento. Su participación en esta ruta de modificación confiere una mayor tasa de conjugación y especificidad al sustrato, aunque algunas proteínas pueden ser modificadas sin la presencia de esta enzima. En eucariotas, se han identificado varias ligasas de SUMO, siendo las más conservadas las pertenecientes a la familia SIZ/PIAS. Esta familia se caracteriza por la presencia de un dominio SP-RING (SIZ/PIAS RING), similar al dominio RING presente en la mayoría de las ligasas de ubiquitina (Johnson, 2004), que resulta esencial para su actividad e interacción con la enzima conjugadora (García-Domínguez *et al.*, 2008) (**Figura 11**). En animales, las ligasas de SUMO mejor caracterizadas son PIAS1 a 4 (*protein inhibitor of activated STAT*) y RanBP2 (*Ran-binding protein 2*), mientras que otras familias importantes son ZNF451 y Pc2.

En *Arabidopsis*, se han identificado cuatro ligasas pertenecientes a la familia SIZ/PIAS: SIZ1 (de SAP y MIZ 1) (Cheong *et al.*, 2009; Miura *et al.*, 2005), MMS21 o HPY2 (*methyl methanesulfonate-sensitive-21* o *high ploidy-2*) (Huang *et al.*, 2009; Ishida *et al.*, 2009) y PIAL1/2 (*protein inhibitors of activated stat-like*) (Tomanov *et al.*, 2014) (**Tabla 3**). AtSIZ1 es la ligasa más estudiada y presenta una gran similitud con SIZ de levadura y los ortólogos PIAS de animales (Miura *et al.*, 2014). Entre otros procesos, esta ligasa regula numerosos estreses como la deficiencia de fosfatos (Miura *et al.*, 2005), la termotolerancia basal (Yoo *et al.*, 2006), la sequía (Catala *et*

al., 2007), la tolerancia a la congelación (Miura *et al.*, 2007), la tolerancia al cobre (Chen *et al.*, 2011), así como también la asimilación de nitrógeno (Park *et al.*, 2011), la señalización de azúcares (Castro *et al.*, 2015), la inmunidad innata (Lee *et al.*, 2007), la germinación (Kim *et al.*, 2016), la floración (Jin *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2014) y el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de la regulación del ácido salicílico (Miura *et al.*, 2010). Los mutantes nulos de SIZ1 muestran una estatura de roseta enana ligada a la reducción de la división y expansión celular (Catala *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2010). MMS21 participa en la regulación del ciclo celular (Huang *et al.*, 2009; Ishida *et al.*, 2009), el mantenimiento de las células madre (Xu *et al.*, 2013), la sequía (Zhang *et al.*, 2013), el desarrollo de gametos (Liu *et al.*, 2014) y la floración (Kwak *et al.*, 2016). SIZ1 y MMS21, no se complementan funcionalmente entre sí, de modo que el doble mutante *siz1-2/mms21* confieren letalidad durante la embriogénesis (Ishida *et al.*, 2012). Finalmente, PIAL1/2 son las únicas que promueven la formación de la cadena de SUMO (ligasa E4) y actúan en respuesta a estreses abióticos (Tomanov *et al.*, 2014), además de desempeñar otras funciones independientemente de su actividad ligasa como mediar durante el silenciamiento transcripcional (Han *et al.*, 2016).

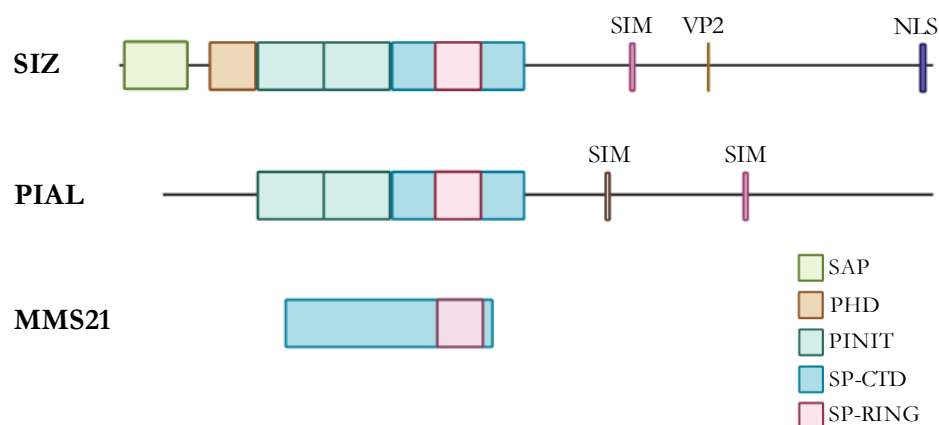


Figura 11. Representación esquemática de los tres tipos de ligasas de SUMO E3 presentes en plantas. Como miembros representativos de cada clase, se han escogido SIZ1 (884 aminoácidos), PIAL2 (760 aas) y MMS21 (247 aas) de *A. thaliana*. Los dominios se ilustran con recuadros y los motivos con líneas verticales. Todas las ligasas E3 de SUMO de las plantas incluyen un dominio SP-RING (SIZ/PIAS RING) y un dominio SP-CTD (SIZ/PIAS *C-terminus domain*), que rodea al primero de ellos. Las ligasas PIAL1/2 contienen, además, dos dominios PINIT (Pro-Ile-Asn-Ile-Thr) y las ligasas SIZs un dominio PHD (*plant homeodomain*), único en plantas, y un dominio SAP (SAF-A/B, Acinus y PIAS). Los motivos SIMs están presentes en las proteínas PIALs y SIZs. El motivo SIM de SIZ1 se ha denominado históricamente motivo SXS (Ser-X-Ser) y corresponde a una extensión C-terminal del SIM que contiene un doblete de serinas separado por un aminoácido (Minty *et al.*, 2000)

Figura 11. (continuación) (Park *et al.*, 2011), que pueden ser objeto de fosforilación y aumentar la fuerza de la interacción SUMO-SIM (Anamika y Spyropoulos, 2015; Cappadocia *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2011). La ligasa SIZ1 también presenta una señal de localización nuclear (NLS) y motivos VP (valina-prolina), que median su interacción con la ligasa de ubiquitina E3 COP1 (Mazur *et al.*, 2018). Modificado de Jmii y Capadoccia, 2021.

Proteasas de SUMO

El primer y último paso de la ruta de sumoilación es llevado a cabo por las proteasas de SUMO, por lo que constituyen elementos reguladores clave del equilibrio entre la conjugación y desconjugación del péptido modificador (Johnson, 2004). Estas enzimas se encargan de la maduración y la separación de SUMO de su sustrato, a través de su actividad endo- e isopeptidasa, respectivamente (Colby *et al.*, 2006). Las isopeptidasas constituyen la familia más numerosa entre los componentes de la maquinaria de sumoilación y son específicas para la isoforma de SUMO y la proteína diana (Chosed *et al.*, 2006; Colby *et al.*, 2006). De hecho, se piensa que la especificidad de la sumoilación puede estar determinada por el gran número de estas enzimas codificadas en el genoma.

Todas las proteasas/isopeptidasas de SUMO (DSPs) son proteasas de cisteína, que reciben su nombre del residuo del sitio catalítico que actúa como nucleófilo, capaz de romper el enlace isopeptídico entre SUMO y la proteína diana (Rawlings *et al.*, 2008). Se han descrito tres tipos diferentes de DSPs, pertenecientes a las familias de proteasas de cisteína C48, C97 y C98: Ulp/SENp (*ubiquitin-like protease/sentrin-specific protease*), DeSI (*desumoylating isopeptidase*) y USLP1 (*ubiquitin-specific protease-like 1*) (Hickey *et al.*, 2012; Nayak y Muller, 2014). A su vez, estas proteasas de cisteína se agrupan en tres clanes o grupos diferentes, CE, CP y CA, respectivamente, en función de la posición de los aminoácidos que componen la tríada o díada catalítica: cisteína, histidina, y un tercer aminoácido adicional, asparagina/ glutamina (clan CE) o asparagina/aspartato (clan CA), ausentes en el clan CP (Rawlings *et al.*, 2018; Suh *et al.*, 2012).

Las proteasas de SUMO mejor caracterizadas son las Ulp/SENp, identificadas por su similitud con las proteínas Ulp1 y Ulp2 de *S. cerevisiae* (Hickey *et al.*, 2012; Mukhopadhyay y Dasso, 2007). En humanos, la familia Ulp (anotada como SENp) consta de siete miembros: SENP1, SENP2, SENP3, SENP5, SENP6, SENP7 y SENP8 (Hickey *et al.*, 2012; Mukhopadhyay y Dasso, 2007; Yeh *et al.*, 2000), aunque esta última muestra especificidad por Nedd8, proteína similar

a la ubiquitina, y no por SUMO. De los otros dos tipos de DSPs, que carecen de homología de secuencia y estructura con las proteínas Ulp/SENp, se han descrito DesI1/2 (Shin *et al.*, 2012) y una única proteasa, USPL1, una enzima desubiquitinadora de la familia USP (*ubiquitin-specific peptidases*) específica para SUMO (Schulz *et al.*, 2012).

En *Arabidopsis* existen ocho proteasas de SUMO pertenecientes a la familia ULP, de las cuales se han caracterizado seis: ESD4 (*early in short days 4*), ULP1a (también denominada ELS1, por ESD4-*like* SUMO protease 1), ULP1b (o ESD4-*like* SUMO protease 2, ELS2), ULP1c (o OST1, *overly tolerant to salt 1*), ULP1d (u OST2, *overly tolerant to salt 2*), SPF1 (ASP1), SPF2 (SUMO protease related to fertility 2, ASP2) y FUG1 (*fourth ULP gene class 1*) (Morrel y Sadanandom, 2019) (**Tabla 3**). Recientemente, se han identificado otras ocho supuestas proteasas DeSI basándose en la similitud de secuencia con las proteínas DesI1/2 de humanos, y se ha caracterizado funcionalmente una de ellas, DeSI3a (Morrel y Sadanandom, 2019; Orosa *et al.*, 2018) (**Tabla 3**). Sin embargo, hasta el momento no se han identificado homólogos de USPL1.

Motivos para conjugar SUMO

En plantas se han identificado 71 sitios aceptores de SUMO (SUMO attachment sites, SAS), de los cuales el 65% corresponden al motivo consenso canónico Ψ KXD/E y el resto a sitios no canónicos (Rytz *et al.*, 2018). Entre estos últimos destacan motivos de SUMO consenso invertidos (Matic *et al.*, 2010), dependientes de fosforilación (*phosphorylation-dependent* SUMO motifs, PDSM) (Hietakangas *et al.*, 2006) y de aminoácidos cargados negativamente (*negatively charged amino acid-dependent* SUMO motifs, NDSM) (Yang *et al.*, 2006) o de acetilación (Ullmann *et al.*, 2012).

Más allá de la SIMple sumoilación: interacción no covalente con SUMO

Además de modificar los sustratos mediante su unión covalente, SUMO también puede regular la función de las proteínas mediante su unión no covalente, ya sea en su forma libre o conjugada. Esta interacción tiene lugar a través de los

motivos específicos de interacción con SUMO, SIM, que típicamente se componen de un núcleo de tres o cuatro aminoácidos hidrofóbicos (V, I o L) adyacente a residuos ácidos o fosforilables de serina o treonina (Hecker *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2004; Stehmeier y Muller, 2009). Estos motivos se unen a una zona entre la hélice α y una hoja β de la proteína SUMO a través de dos orientaciones, paralela y antiparalela, hacia la lámina β del pequeño péptido (Baba *et al.* 2005; Kerscher, 2007).

Para aumentar aún más la complejidad de las interacciones no covalentes con SUMO, tanto este péptido como los aminoácidos que componen el SIM pueden ser modificaciones postraduccionales, lo que altera sus características y las redes de interacción de proteínas. Por ejemplo, la acetilación de una lisina de SUMO, modula las interacciones SUMO-SIM al neutralizar las cargas positivas de los aminoácidos que rodean el sitio de acoplamiento del SIM (Ullmann *et al.*, 2012). En cambio, la fosforilación de los residuos de serina adyacentes al núcleo hidrofóbico del SIM introduce una carga negativa que mejora las interacciones no covalentes de la proteína interactora con el péptido SUMO (Amamika *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2011; Hecker *et al.*, 2006; Mascle *et al.*, 2013; Stehmeier y Muller *et al.*, 2009).

Papel de la sumoilación en plantas

En las plantas, como sucede en los animales, esta modificación se ha asociado con numerosos procesos celulares, siendo esencial durante el desarrollo del embrión (Nacerddine *et al.*, 2005; Saracco *et al.*, 2007), la señalización hormonal (Campanaro *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2015; Lois *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2010), el mantenimiento de las células madre de la raíz (Xu *et al.*, 2013), el reloj circadiano (Hansen *et al.*, 2017), la señalización luminosa (Lin *et al.*, 2016; Sadanandom *et al.*, 2015), la inmunidad (Lee *et al.*, 2007; Hammoudi *et al.*, 2018), la respuesta a estrés abiótico (Castro *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2015; Ghimire *et al.*, 2018; Miller *et al.*, 2013) y prácticamente cualquier aspecto del desarrollo, como el crecimiento vegetativo y la floración (Elrouby, 2015; Ishida *et al.*, 2012; Ling *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014).

En los siguientes apartados, nos centramos en el papel de la sumoilación en la respuesta de la planta a estreses abióticos y bióticos.

SUMO, un peso pesado en la respuesta frente a estrés abiótico en las plantas

La sumoilación ha emergido como una de las modificaciones postraduccionales más importantes al mediar la tolerancia de las plantas a una amplia gama de estreses abióticos (Augustine y Vierstra, 2018; Castro *et al.*, 2012; Lois, 2010; Suzuki *et al.*, 2014; van den Burg *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2018). Durante estas condiciones de estrés, el perfil de las proteínas sumoiladas cambia drásticamente, produciéndose un gran aumento de los niveles de conjugados y una disminución del conjunto de SUMO libre (Miller *et al.*, 2013). Los estudios sobre el papel que juega esta modificación postraducciona en el estrés abiótico en plantas (Castro *et al.*, 2012; Saracco *et al.*, 2007) sitúan a la ligasa SIZ1 como un elemento central en la regulación de las respuestas al aumento de la temperatura, la sequía, la salinidad y de las especies reactivas de oxígeno (Saracco *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2006) y, en *Arabidopsis*, también tras la exposición a condiciones de frío, toxicidad por metales pesados, tratamiento con etanol y déficit de fosfato y nitrógeno (Castaño-Miquel *et al.*, 2017; Catala *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011; Conti *et al.*, 2008; Kurepa *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2010; Miura *et al.*, 2005; Miura *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2011; Tomanov *et al.*, 2014; Yoo *et al.*, 2006). Además de esta ligasa de SUMO, también se han identificado proteasas que participan en la regulación de la respuesta frente a estreses abióticos, poniendo de relevancia el papel del proceso reverso. Las más estudiadas son OTS1 y OTS2, que regulan, de forma redundante, la respuesta frente a estrés salino (Conti *et al.*, 2008), osmótico (Orosa-Puente *et al.*, 2018), sequía (Srivastava *et al.* 2017), lumínico (Sadanandom *et al.*, 2015) y participan en la tolerancia frente al cobre (Zhan *et al.*, 2018).

La sumoilación también ha demostrado ser una importante modificación postraducciona durante diversas situaciones de estrés abiótico en otras especies de plantas tales como el arroz (Mishra *et al.* 2017; Srivastava *et al.* 2017), el tomate (Zhang *et al.* 2016), el maíz, el tabaco (Wang *et al.* 2019), el algodón (Mishra *et al.* 2017), la manzana (Zhang *et al.*, 2018) y la soja (Li *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019).

SUMO en la respuesta inmune

La sumoilación, y con ello la modulación de los niveles de conjugados de SUMO, entre los que se encuentran proteínas remodeladoras de la cromatina, de

reparación del DNA y factores de transcripción que intervienen en las respuestas de defensa, ha emergido como un regulador clave de la inmunidad de las plantas (Castaño-Miquel *et al.*, 2017; Elrouby y Coupland, 2010; Gou *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2010; van den Burg *et al.*, 2010).

De todos los componentes de la maquinaria de sumoilación, la ligasa de SUMO SIZ1 es el mejor caracterizado, estableciéndose como un elemento regulador negativo de la inmunidad mediada por el ácido salicílico (SA) (Lee *et al.*, 2007). La pérdida de su función provoca una disminución en el crecimiento de la planta y un aumento de los niveles de SA, lo que conlleva la expresión constitutiva de los genes PR (*pathogenesis related-genes*) y una mayor resistencia frente a bacterias (Bowling *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2000; Stokes *et al.*, 2002). La inmunidad mediada por *Siz1* depende tanto de rutas dependientes como independientes de NPR1 (*nonexpressor of PR genes 1*), un regulador esencial de la resistencia sistémica adquirida (*systemic acquired resistance*, SAR) que funciona aguas abajo del SA. NPR1 se conjuga a SUMO 3, produciendo un cambio en el grupo de interactores de la proteína y conduciendo a su degradación proteosómica, lo que conlleva que la respuesta inmune inducida sea transitoria (Saleh *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha descrito que SIZ1 regula negativamente la inmunidad de la planta a través de una vía mediada por SNC1, un receptor de tipo TIR-NB-LRR (*toll interleukin-1 receptor nucleotide binding-leucine-rich repeat*) (Gou *et al.*, 2017; Hammoudi *et al.*, 2018).

La sumoilación como diana en la patogénesis: efectores bacterianos

Durante la patogénesis, la sumoilación no solo modula la actividad de los componentes de defensa de las plantas, sino que también sirve como diana de los efectores bacterianos, permitiendo a los patógenos modular diferentes rutas celulares (Sharma *et al.*, 2021; Srikanth y Verma, 2017). El proceso de desumoilación ha resultado ser un objetivo central para socavar la inmunidad de las plantas, al tratarse de un paso regulador clave de las respuestas de defensa a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional y un factor determinante de la especificidad de la sumoilación (Hotson *et al.*, 2003; Orth *et al.*, 2000). Una de las primeras pruebas del papel de la desconjugación de SUMO en la infección por fitopatógenos proviene de la identificación de proteínas efectoras bacterianas que funcionan como proteasas de cisteína con especificidad por ciertos sustrato

sumoilados de la planta (Bartetzko *et al.*, 2009; Deslandes *et al.*, 2003; Hotson *et al.*, 2003; Hotson y Mudget, 2004; Kim *et al.*, 2013; Orth *et al.*, 1999; Orth *et al.*, 2000; Roden *et al.*, 2004). Un ejemplo es la proteína XopD, un efector de tipo III (T3E) de *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), que muestra una eficiente actividad peptidasa e isopeptidasa sobre dianas de SUMO localizadas en el núcleo, como el factor de transcripción MYB30, para suprimir las defensas de la planta (Canonne *et al.*, 2011; Hotson *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2011). Este efector es capaz de desconjugar SUMO1/2 y SUMO3 (Chosed *et al.*, 2007; Colby *et al.*, 2006), apoyando a su vez la especialización de SUMO3 en los mecanismos de defensa (Saleh *et al.*, 2015; van den Burg *et al.*, 2010). También el factor de avirulencia AvrXV4 de *X. campestris* presenta actividad isopeptidasa de SUMO y, al expresarse en la planta, da lugar a una reducción de las proteínas conjugadas, que podrían participar en subvertir la defensa en las células huésped (Roden *et al.*, 2004).

Interacción entre los virus y la ruta de sumoilación

En las últimas dos décadas se han llevado a cabo numerosos estudios que evidencian que la sumoilación es clave en el proceso de infección de una amplia gama de virus con replicación nuclear, y que estos patógenos manipulan esta ruta de modificación para modular las respuestas antivirales, la replicación y la patogénesis viral (Imbert y Langford, 2021; Lowrey *et al.*, 2017; Wilson, 2017). La mayoría de los datos obtenidos sobre la interacción entre la sumoilación y los virus proceden de estudios con virus de animales, que muestran cómo el proceso de infección genera cambios generales o específicos en el sumoiloma del hospedador (Wilson, 2017). Esta remodelación de los patrones de sumoilación puede consistir en la reducción, el aumento o ambos del nivel global de dianas modificadas o bien de sustratos específicos.

La disminución de la conjugación de SUMO a proteínas celulares antivirales se ha observado durante la infección por diversos virus. Uno de ellos es el virus del herpes simple-1 (HSV-1), que reduce la modificación por SUMO-2/3 de más de cien proteínas celulares implicadas en la regulación de la transcripción, el ensamblaje y modificación de la cromatina, incluyendo PML (*promyelocytic leukaemia* o proteína de la leucemia promielocítica) y Sp100 (Sloan *et al.*, 2015). Esta disminución depende del factor viral ICP0, que actúa como ligasa de ubiquitina y

dirige a las dianas modificadas por SUMO-2/3 al proteosoma para su degradación (Boutell *et al.*, 2002).

Otros virus, como el de la gripe (Influenza virus, tipo A y tipo B; IAV y IBV) y el Eipsten-Barr virus (EBV), conducen a una alteración global de la sumoilación, aumentando y disminuyendo de forma paralela la modificación de centenares de proteínas celulares (Bentz *et al.*, 2012; Bentz *et al.*, 2015; Domingues *et al.*, 2015; Pal *et al.*, 2011). En el caso del EBV, dos de sus proteínas, la quinasa BGLF4 y la principal oncoproteína LMP1 (*latent membrane protein-1*), producen una reducción y un aumento de la sumoilación para facilitar la replicación lítica o contribuir al mantenimiento del periodo de latencia del virus, respectivamente (Bentz *et al.*, 2015).

Los datos disponibles hasta la fecha indican que los virus utilizan diferentes estrategias para modular la sumoilación de proteínas propias y del hospedador: (1) la modificación de los niveles de SUMO; (2) la interacción con algunos de los componentes de la ruta o con proteínas sumoiladas; (3) su actuación como dianas o (4) como enzimas de la ruta. A continuación, se muestran varios ejemplos de virus de animales, ya que los datos sobre virus de plantas aún es muy reducido y se ha recopilado en un apartado.

Los virus y los niveles de SUMO

Con frecuencia, los niveles de *sumo*/SUMO son alterados de forma transcripcional o postranscripcional durante el proceso de infección, a través de varios mecanismos: (i) la regulación de los promotores de los genes que codifican SUMO (ii) la inhibición de los niveles de microRNA de la familia let-7 para aumentar la traducción de SUMO y (iii) la regulación postraduccional de las reservas intracelulares de SUMO al inducir su remodelación (Lowrey *et al.*, 2017). Ejemplos de cada uno de estos mecanismos son (i) la proteína LMP1 del EBV, que activa los promotores de *sumo*, lo que provoca un aumento de las reservas de SUMO y una mayor sumoilación, (ii) los virus HSV e HIV, los cuales, al inhibir la expresión de los microRNAs let-7, provocan un aumento de la sumoilación y suprimen la replicación viral, y (iii) la polimerasa de RNA del virus de la gripe (Influenza virus), que también aumenta los niveles de SUMO y su remodelación.

Los virus y la enzima activadora de SUMO

Los virus han desarrollado mecanismos que afectan a la activación de SUMO, al impedir la formación del intermediario E1-SUMO. Por ejemplo, la proteína viral Gam1 del adenovirus aviar CELO (chicken embryo lethal orphan) provoca una reducción del dímero SAE1/SAE2 al promover el reclutamiento de las ligasas de ubiquitina CLR, que inducen la degradación de SAE1 por la vía del proteosoma (Boggio *et al.*, 2004; Boggio *et al.*, 2007). La degradación de SAE1 conlleva un aumento de SAE2 libre, lo que conduce a su posterior degradación por el proteosoma. El resultado final es la reducción de sustratos sumoilados y, consecuentemente, una mayor acumulación de SUMO libre en el citoplasma, y la destrucción de los cuerpos nucleares PML, lo que contribuye a una mayor propagación viral (Colombo *et al.*, 2002).

Los virus y la enzima conjugadora de SUMO

Dada la importancia de la única enzima conjugadora de SUMO, Ubc9 es una diana importante para manipular la ruta de sumoilación, ya sea promoviendo la sumoilación de proteínas virales o del hospedador o bien induciendo la degradación o alterando la localización de la enzima.

Algunos factores virales son capaces de secuestrar a la enzima conjugadora. La oncoproteína E1A del adenovirus humano interacciona con el extremo N-terminal de Ubc9, lo que resulta en la inhibición de la polisumoilación de algunos sustratos como PML, y la alteración de su localización (Hateboer *et al.*, 1996; Yousef *et al.*, 2010). Otro factor viral, LMP1 del EBV, secuestra a Ubc9 durante el período de latencia de la infección, dando lugar al aumento de la sumoilación de otras proteínas celulares importantes en la modulación de las respuestas inmunitarias innatas (Bentz *et al.*, 2012; Bentz *et al.*, 2015).

Otros virus promueven la sumoilación de sus proteínas al interactuar con la enzima conjugadora, y consecuentemente, su actividad o localización. Éste es el caso de la proteína E2 del virus del papiloma humano (human papilloma virus, HPV), la cual participa en la replicación viral y regula la expresión de los genes oncogénicos E6 y E7 (Wu *et al.*, 2008). La inhibición de su sumoilación disminuye la actividad transcripcional de la proteína viral y suprime su represión sobre la expresión de E6/7, lo que sugiere que la modificación de E2 tiene un efecto

inhibidor sobre los promotores virales pero activador sobre algunos promotores celulares (Wu *et al.*, 2008). También la subunidad UL44 de la polimerasa de DNA del citomegalovirus humano (human cytomegalovirus, HCMV) (ortólogo viral de PCNA) se une a Ubc9 y es sumoilada en múltiples lisinas tanto por SUMO1 como por SUMO2/3, lo que altera su distribución intranuclear y reduce su localización en los compartimentos de replicación del DNA viral (Sinigalia *et al.* 2012). Aunque se desconoce qué función lleva a cabo UL44 sumoilado, dado que esta modificación alcanza su punto máximo en momentos tardíos de la replicación del virus, sería diferente al de conferir procesividad a la DNA polimerasa viral. Al igual que UL44, la unión a Ubc9 y la posterior sumoilación de la proteína de la nucleocápside (NP) del Hantavirus altera su localización subcelular e influye en la replicación viral (Alfadhli *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2003). Otros factores virales, como las proteínas tempranas inmediatas del herpesvirus, también interaccionan con la enzima conjugadora de SUMO y son sumoiladas (Wilson, 2017).

Por último, algunos virus inducen la degradación de Ubc9 por el proteosoma, como sucede con la proteína E6 del HPV (Heaton *et al.*, 2011). De forma similar, la proteína temprana Gam1 de CELO interacciona con Ubc9 y reduce su estabilidad, induciendo su degradación y provocando una activación de la transcripción y la inducción de un entorno favorable para la replicación viral (Boggio *et al.*, 2004).

Los virus y las ligasas de SUMO

Existen numerosos ejemplos de la capacidad de los virus para manipular las ligasas de SUMO E3, especialmente las familias STATs (PIAS) y RanBP2. La infección por algunos virus como el virus simple del herpes-1 (Herpes simplex virus type 1, HSV-1), el de la hepatitis C (Hepatitis C virus, HCV), el parvovirus B19 o el virus de la gripe aviar altamente patógena (Highly pathogenic avian influenza virus, HPAIV) inducen un aumento de la expresión de proteínas de la familia PIAS, lo que da lugar a una desregulación de las respuestas inmunitarias antivirales (Conn *et al.*, 2016; Duechting *et al.*, 2008; Ehrmann *et al.*, 2006; Zu *et al.*, 2020). Aunque menos estudiada, la manipulación de la proteína RanBP2 por parte de los virus parece regular la respuesta antiviral y también el movimiento de los genomas y las proteínas virales dentro y fuera del núcleo. Esta alteración se ha descrito en infecciones con virus como el de la encefalitis japonesa, HVS, y HIV-

1 (human immunodeficiency virus-1) (Di Nunzio *et al.*, 2012; Hofemeister *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013).

Otros virus pueden inhibir la actividad de las ligasas de SUMO E3. La proteína E6 del papilomavirus HPV se dirige a PIASy para inhibir la sumoilación de p53 y prevenir la senescencia celular (Bischof *et al.*, 2006). De forma similar, la proteína IE-2 del CMV secuestra a PIAS1 para impedir la sumoilación de IE-1, lo que conlleva una mayor represión de los genes estimulados por el interferón (Kim *et al.*, 2014).

Alternativamente, los virus pueden regular la actividad de las ligasas alterando su localización, como es el caso de la proteína de adenovirus E4-ORF3 y el factor ICP0 del herpesvirus HSV-1. E4-ORF3 dirige a PIAS3 a los dominios de replicación del genoma viral, lo que sugiere que la sumoilación participa en este proceso (Higginbotham *et al.*, 2015), mientras que ICP0 media la interrupción de los cuerpos nucleares PML, conduce a las proteínas sumoiladas a su degradación a través de su actividad como StUbL (Boutell *et al.*, 2013) e interrumpe el reclutamiento de la ligasa PIAS1 a los dominios de replicación viral, permitiendo que continúe el ciclo lítica (Brown *et al.*, 2016). Otras proteínas virales, como VP35 (*viral protein 35*) del virus del Ébola (EBOV), aumentan la actividad de PIAS1 y suprime la producción de interferones de tipo I (expresados en respuesta a la infección viral), promoviendo así la replicación viral. Esta función la lleva a cabo al interaccionar con los factores de transcripción reguladores de los interferones -3 y -7 (*interferon regulatory factors*, IRFs) y promover su sumoilación al reclutar a Ubc9 y a PIAS1 (Zhang *et al.*, 2013), lo que conduce a la represión transcripcional de la expresión de estas proteínas involucradas en la respuesta inmune.

Algunas proteínas virales como las ligasas de SUMO

Quizás el mecanismo más llamativo por el que un virus puede regular la función de una ligasa de SUMO E3 es codificando su propia ligasa. Este es el caso del herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) y los adenovirus (Chang *et al.*, 2010; Penella *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2015). La proteína K-bZIP de KSHV actúa como una ligasa específica para SUMO 2/3, lo que sugiere que puede tener un papel en la mediación de la polisumoilación de proteínas diana (Chang *et al.*, 2010). K-bZIP se autosumoilaa y cataliza la sumoilación de las proteínas con las

que interactúa, como p53 y Rb (Chang *et al.*, 2010), lo que en última instancia inhibe la activación de los interferones y regula la reactivación del KSHV y la replicación lítica (Chang *et al.*, 2013; Lefort *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015). Durante la latencia del KSHV, la proteína viral LANA (*latency-associated nuclear antigen*) también actúa como una ligasa de SUMO E3 reclutando el intermediario SUMO-Ubc9 e induciendo la sumoilación de las histonas celulares (Campbell *et al.*, 2012). En los adenovirus, también se han descrito dos proteínas que actúan como ligasa de SUMO E3: (i) E1B-55 K, que induce específicamente la sumoilación de p53 y su localización en los cuerpos nucleares PML, lo que resulta en su degradación por la vía proteosomal, y (ii) E4-ORF3, que induce específicamente la modificación de TIF-1γ por SUMO 3 y ayuda a la elongación de la cadena de poli-SUMO, lo que finalmente conduce a su degradación por el proteosoma (Sohn *et al.*, 2016).

Los virus y las proteasas de SUMO

Aunque las proteasas SENPs son el elemento central de la maquinaria de sumoilación, existen pocos datos sobre los efectos de la manipulación viral de estas enzimas.

En las células infectadas por el virus de la hepatitis B (HBV), la proteína X (HBx) promueve la desumoilación del factor de transcripción Sp110, reprogramando así la expresión génica del huésped y promoviendo la proliferación viral (Sengupta *et al.*, 2017). La oncoproteína LMP1 del EBV induce la sumoilación de SENP2, lo que resulta en la reducción de la función, el tráfico y la estabilidad de la enzima y la acumulación de proteínas sumoiladas (Selby *et al.*, 2019). En el caso del KSHV, la proteína LANA, la cual se sumoila e interacciona con proteínas sumoiladas con SUMO2/3, se une al promotor de SENP6 y reprime su expresión (Lin *et al.*, 2017), lo que sugiere un complejo mecanismo para regular su propia sumoilación y los niveles de expresión como medio para mantener la latencia del virus.

Además, se cree que existen proteínas virales con actividad de proteasas de SUMO. El virus Vaccinia y el fowlvirus codifican una proteasa (I7) cuya región C-terminal muestra similitudes estructurales con las SENPs (Wimmer y Schreiner, 2015), y el virus de la peste porcina africana una proteasa de cisteína, pS273R, que tiene los residuos catalíticos conservados característicos de las SENPs y que actúa

escindiendo específicamente las poliproteínas virales siguiendo un motivo de diglicina (Andres *et al.*, 2001).

Virus de plantas y sumoilación

La información disponible sobre la interacción de los virus de plantas con la ruta de sumoilación es, en cambio, mucho más limitada. Hasta la fecha, sólo se han identificado la interacción de cuatro proteínas de virus fitopatógenos con el sistema de sumoilación: Rep y β C1 de begomovirus, NIb del potivirus *Turnip mosaic virus* (TuMV) y ORF4 del umbravirus *Carrot mottle virus* (CMoV).

La proteína Rep de begomovirus interacciona con la enzima conjugadora de SUMO, SCE1, y SUMO a través de su extremo N-terminal y de un motivo SIM en su extremo C-terminal, respectivamente (Castillo *et al.*, 2004; Sánchez-Durán *et al.*, 2011; Tesis de Francesca Maio, 2019) (**Figura 3**). Estas tres proteínas se unen en el núcleo en estructuras punteadas denominadas cuerpos nucleares, donde forman un complejo ternario (Rep-SCE1-SUMO) dependiente de la actividad conjugadora de SUMO (Tesis de Francesca Maio, 2019). Tanto la unión a la enzima conjugadora de SUMO como el motivo SIM de Rep resultan esenciales para la replicación del DNA viral, pero no tienen un impacto en el patrón global de sumoilación en la planta (Sánchez-Durán *et al.*, 2011; Tesis de Francesca Maio, 2019).

En un trabajo reciente se ha mostrado que la proteína β C1 codificada por el betasátélite asociado al begomovirus monopartito *Synedrella yellow vein clearing virus* (SyYVCV), se sumoila en varios residuos de lisina e interacciona con NbSUMO1 a través de tres motivos SIMs (Nair *et al.*, 2020). La sumoilación de β C1 afecta a su localización subcelular y es esencial para la estabilidad de dicha proteína en la planta, mientras que sus motivos de unión a SUMO son responsables de su degradación, mediando su poliubiquitinación y posterior degradación por la vía del proteosoma. No obstante, ambos elementos son necesarios para la función de la proteína β C1 como determinante de patogenicidad y para el movimiento sistémico del virus. También se ha observado que la expresión de este factor viral induce un aumento de la sumoilación de las proteínas celulares (Nair *et al.*, 2020).

Al igual que se ha descrito para Rep de begomovirus, la proteína NIb del TuMV interacciona con SCE1, lo que resulta crucial para la infección del virus

(Xiong y Wang, 2013). Además, esta polimerasa de RNA dependiente de RNA es sumoilada exclusivamente por SUMO3 de forma dependiente a su motivo SIM, lo que facilita su transporte desde el núcleo al citoplasma, es esencial para la replicación e infectividad del virus y suprime la respuesta antiviral del huésped (Cheng *et al.*, 2017). No obstante, se ha visto que tanto la mutación como la sobreexpresión de esta isoforma de SUMO inhiben la replicación de TuMV, lo que sugiere una regulación dinámica de la infección potyviral y la respuesta de defensa de la planta a través de la sumoilación de NIB y de NPR1, respectivamente (Cheng *et al.*, 2017).

La proteína de movimiento del CMoV, ORF4, interactúa con AtSUMO1/2 y NbSCE1 a través de dos motivos SIMs, lo que resulta en la sumoilación del residuo K78 (Jiang *et al.*, 2021). Tanto la lisina como los motivos SIM son necesarios para la localización de la proteína en los plasmodesmos y para el movimiento sistémico del virus, lo que, junto al requerimiento de SCE1 y SUMO para la infección eficiente del virus en la planta, confirma el papel relevante de la sumoilación en dicho proceso (Jiang *et al.*, 2021).

Papel SIMultáneo de SUMO y ubiquitina

La modificación postraduccional de residuos de lisina mediante la unión covalente de SUMO o ubiquitina están íntimamente relacionados. Mediante espectrometría de masas de alta resolución, se ha identificado que, en células humanas, casi una cuarta parte de las lisinas aceptoras de SUMO también se utilizan para la conjugación de ubiquitina (Hendriks *et al.*, 2014; Tammsalu *et al.*, 2014), lo cual no implica necesariamente la competencia entre ambos péptidos. Dado que la ubiquitina, y especialmente SUMO, sólo se conjugan a un pequeño subconjunto de una proteína determinada, puede suceder que ambos modificadores estén presentes en la misma lisina al mismo tiempo pero en diferentes subpoblaciones o que la conjugación de ambos péptidos a un mismo sustrato se lleve a cabo de forma secuencial, controlando cooperativamente diferentes funciones del sustrato en el tiempo y el espacio. Además, más allá de la ocupación exclusiva de un sitio aceptor por ubiquitina o SUMO, ambos péptidos son capaces de unirse y formar cadenas híbridas. De este modo, la interacción entre ambos modificadores puede tener un resultado antagónico, sinérgico o múltiple (Liebelt y Vertegaal, 2016).

En la literatura se encuentran muchos ejemplos del cruce entre SUMO y ubiquitina, implicados en diferentes procesos que van desde la reparación del DNA y la estabilidad del genoma hasta la regulación de la localización subcelular de las proteínas o la actividad enzimática. Un caso muy destacado es el de PCNA, en el cual la interacción entre ambos péptidos se produce de forma secuencial en lugar de ser antagonista (Papouli *et al.*, 2005). En cuanto a la formación de las cadenas híbridas, destaca la participación de una familia específica de ligasas de ubiquitina dirigidas por SUMO, las StUbl (SUMO *targeted ubiquitin ligases*), las cuales actúan como reguladores globales de los niveles de sumoilación, y descritas en levaduras, *Drosophila*, mamíferos y plantas (Abed *et al.*, 2018). Estas enzimas reconocen las proteínas sumoiladas a través de múltiples SIM, lo que indica su preferencia por sustratos polisumoilados, además de contener un dominio RING que le permite reclutar E2-ubiquitina (Sriramachandran *et al.*, 2014; Tatham *et al.*, 2008; Uzunova *et al.*, 2007). Una vez unidas, las StUbl median la ubiquitinación de la proteína sumoilada, en muchos casos apuntando a su degradación proteosómica (Sriramachandran *et al.*, 2014), aunque también se ha asociado al mantenimiento de la estabilidad del genoma (Garza y Pillus, 2013) y a la reparación del DNA (Hopfler *et al.*, 2019; Horigome *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2017; Sriramachandran *et al.*, 2019; Thomas *et al.*, 2016; Thu *et al.*, 2016). Esta modificación heterotípica también es reversible, y las enzimas DUB pueden recortar o invertir la ubiquitinación en las cadenas híbridas SUMO-Ub para modular las respuestas celulares asociadas (Hendriks *et al.*, 2015). Las cadenas híbridas pueden, además, ser reconocidas por una variedad de receptores que contienen motivos SIM en tándem y UBD. Así pues, la interacción entre la ubiquitinación y la sumoilación se asemeja a una estrategia eficaz para conferir tanto especificidad como una mayor afinidad a las proteínas diana (Aillet *et al.*, 2012; Guzzo *et al.*, 2012), aunque la comprensión de las funciones celulares afectadas está todavía en sus inicios.

En plantas, dos estudios han permitido la identificación de un gran número de proteínas que son co-modificadas por SUMO y ubiquitina (Cuijpers *et al.*, 2017; Lamoliatte *et al.*, 2017). Un ejemplo representativo implica a SIZ1 y a la ligasa de ubiquitina COP, un regulador negativo clave de la fotomorfogénesis y con un papel importante en la inmunidad (Hoecker, 2017; Hofmann, 2015; LauandDeng, 2012; Lim *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2015). SIZ1 puede sumoilar COP1 y mejorar su actividad de trans-ubiquitinación (Lin *et al.*, 2016) y COP1 puede poliubiquitinar a

SIZ1, lo que probablemente conduce a su degradación (Kim *et al.*, 2016). Otro ejemplo muy conocido es el de los represores de la vía de señalización de las giberelinas, DELLA, que restringen el crecimiento promovido por la hormona (Sun *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos indican que la no sumoilación o desumoilación de DELLA media su ubiquitinación y degradación y permite el crecimiento de la planta, mientras que la conjugación de SUMO la protege de la ubiquitinación y reprime el crecimiento. Este es un ejemplo de cómo SUMO mantiene el equilibrio entre crecimiento y defensa modificando los reguladores de crecimiento durante una situación de estrés (Conti *et al.*, 2014).

DIANAS DE SUMO EN PLANTAS: PROTEÍNAS ESENCIALES PARA LA CÉLULA

PCNA: el director de orquesta en la horquilla de replicación

PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) es una proteína de la familia β clamp o de abrazaderas deslizantes del DNA, las cuales desempeñan un papel fundamental en numerosos procesos relacionados con el metabolismo del DNA (Dieckman y Washington, 2013; Moldovan *et al.*, 2007; Reynolds *et al.*, 2010). Aunque los miembros de esta familia están muy conservados estructural y funcionalmente, tanto en procariotas como en eucariotas, la identidad de secuencia entre grupos filogenéticamente distantes es baja (solo un 35% entre levaduras y humanos) (Bloom, 2009). Todos ellos poseen una estructura común toroidal, o en forma de anillo (homodímeros en eubacterias, homotrímeros en eucariotas y bacteriófago T4, heterotrímeros u homotrímeros en arqueas), con una simetría pseudohexamérica que rodea al DNA de doble cadena y les permite deslizarse en ambas direcciones (**Figura 12**).

PCNA de eucariotas forma un homotrímero, en el que cada uno de los monómeros (o protómeros) contiene dos dominios globulares similares y topológicamente relacionados (dominios I y II) que se conectan por una región intrínsecamente desordenada, larga y flexible, denominada bucle de conexión entre dominios o IDCL (*interdomain connector loop*) (residuos 118-134) (**Figura 12**) (Dieckman *et al.*, 2012). Estos monómeros se disponen cabeza-cola, formando un anillo con dos zonas diferenciadas: una interna compuesta por hélices α y otra

externa de láminas β (**Figura 12**). Aunque la carga neta de PCNA es negativa, el anillo interno está cargado positivamente debido a su riqueza en residuos de arginina y lisina, hecho que garantiza un agarre eficiente entre la abrazadera y la doble cadena de DNA (Freudenthal *et al.*, 2011). Esta estructura presenta, además, dos caras bien diferenciadas: una frontal o anterior (cara C) que apunta a la dirección de síntesis del DNA y contiene los IDCL y los extremos C-terminal de los monómeros, y otra posterior (cara B) que incluye los sitios de regulación mediante modificaciones postraduccionales (**Figura 12**) y, con una menor conservación entre especies, diversos bucles prominentes como el bucle J (*loop J*) y el bucle P (*loop P*) (Freudenthal *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2021). A través de los IDCL y los bolsillos hidrofóbicos subyacentes, en la cara frontal, PCNA se une a un conjunto de ligandos muy diverso (Prestel *et al.*, 2019), aunque algunas proteínas también interaccionan con el bucle P, el bucle J y la cola C-terminal.

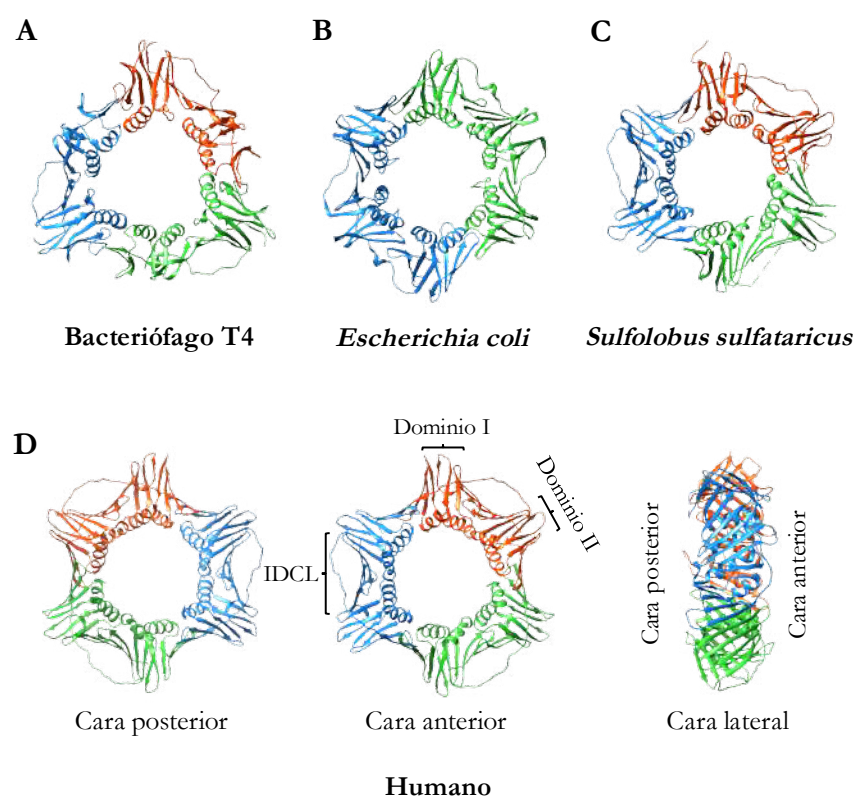


Figura 12. Proteínas β clamp de diferentes organismos. Las abrazaderas deslizantes están constituidas por dos o tres monómeros que forman la estructura toroidal. **A.** Heterodímero, proteína gp45 del bacteriófago T4 (PDB: 1CZD; Moarefi *et al.*, 2000). **B.** Homodímero, de *E. coli* (PDB: 3D1F; Georgescu *et al.*, 2008). **C.** Heterotrímero de la arquea *Sulfolobus sulfataricus* (PDB: 2IX2; Williams *et al.*, 2006). **D.** Homotrímero de PCNA de humano (PDB: 6GIS; De March *et al.*, 2017). Cada monómero se ha coloreado de rojo, azul o verde.

Papel de PCNA en la célula: un anillo para dominarlos a todos

Las numerosas funciones que PCNA desempeña en la célula radican en su capacidad para interaccionar coordinadamente con múltiples factores que ejercen su función de forma concomitante con el DNA, ya que carece de actividad enzimática *per se* (Boehm *et al.*, 2016; González-Magaña y Blanco, 2020). De este modo, PCNA actúa como una plataforma móvil que media el reclutamiento de proteínas implicadas en la replicación y la reparación del DNA, destacando su papel como factor de procesividad de las polimerasas, el control del ciclo celular, el ensamblaje de la cromatina y la correcta segregación de las cromátidas hermanas (Choe y Moldovan, 2017; González-Mañaga y Blanco, 2020; Mailand *et al.*, 2013). Para realizar estas funciones es esencial la carga y descarga de esta abrazadera en el DNA, mediada por el complejo pentamérico tipo chaperona RFC o por otros similares a RFC (RFC-*like*) (Arbel *et al.*, 2021; Bellí *et al.*, 2022).

Muchas de las proteínas interactoras de PCNA poseen un motivo de unión linear corto (*short linear motif*, SLiM) característico denominado PIM (PCNA *interacting motif*) o caja PIP (PCNA *interacting protein box* o PIP *box*), para el que se definió la secuencia canónica QxxΨxxθθ (Ψ: residuo hidrofóbico alifático; θ: residuo aromático, a menudo Y o F; x: cualquier aminoácido) (Prestel *et al.*, 2019). Además de este motivo, se ha descrito una variante de mayor extensión, denominada PIP-*degron*, que media la degradación de la proteína interactora, y otros alternativos como los APIM (*AlkB homologue 2 PCNA-interacting motif*) y la caja KA (Liang *et al.*, 2011; Prestel *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2001). Todos estos motivos se localizan predominantemente en regiones intrínsecamente desordenadas y presentan secuencias muy diversas, lo que sugiere que los bolsillos de unión en el monómero de PCNA no son muy específicos, permitiéndoles unir a un amplio número de interactores. Recientemente, se ha visto que las propiedades electrostáticas de las regiones que flanquean las cajas PIP y sus múltiples variantes son esenciales y pueden modular su afinidad con PCNA hasta en cuatro órdenes de magnitud (Prestel *et al.*, 2019).

En resumen, PCNA presenta un interactoma amplio y diverso, compuesto por numerosas proteínas que compiten por unirse a su superficie. El control de estas interacciones, esencial para mantener la integridad del genoma, se lleva a cabo a través de modificaciones postraduccionales, tanto de PCNA como de sus

interactores, la degradación selectiva de algunas proteínas y la participación de factores asociados a la abrazadera.

Regulación de las funciones de PCNA en la célula: modificaciones postraduccionales

En la regulación de las funciones de PCNA, las modificaciones postraduccionales juegan un papel esencial al aumentar o modular el repertorio de interactores o impedir su degradación. Se ha descrito que este factor de procesividad puede ser ubiquitinado, sumoilado, ISGilado, acetilado, fosforilado y metilado (Leung *et al.*, 2019).

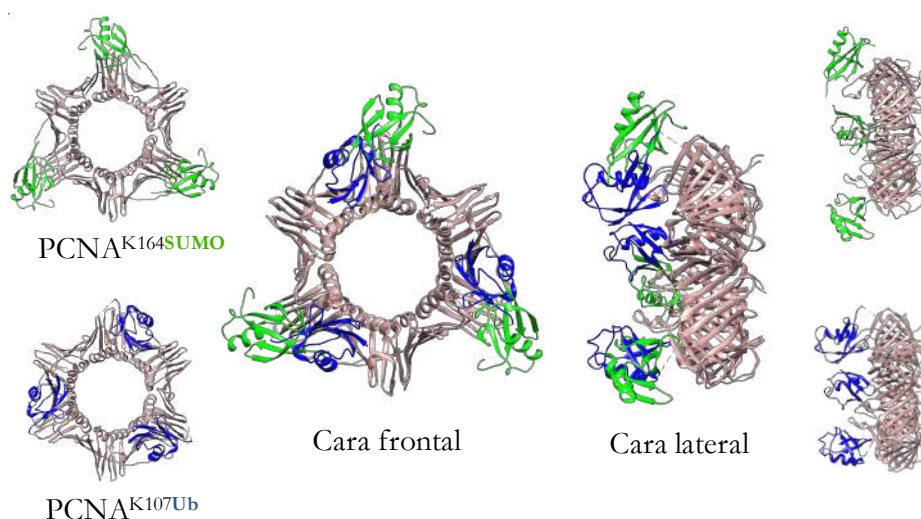


Figura 13. Comparación de PCNA modificado por SUMO y ubiquitina. Estructura tridimensional del trímero de PCNA de *S. cerevisiae* conjugado a SUMO en la lisina 164 (verde; código PDB: 3V60), a ubiquitina en la lisina 107 (azul; PDB: 3L10) y la superposición de ambas modificaciones. Se muestra la vista frontal y la vista lateral. Adaptado de Freudenthal *et al.*, 2011.

La ubiquitinación y la sumoilación de PCNA se han estudiado ampliamente por su participación durante la replicación y la reparación del DNA, ya que desempeñan un papel crucial en la derivación de los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA (DNA *damage tolerance*, DDT) (Bellí *et al.*, 2022; Fan *et al.*, 2020). Estos péptidos, una vez unidos a PCNA, adquieren conformaciones diferentes que generan distinta accesibilidad a la superficie de interacción, por lo que actúan regulando el interactoma de la abrazadera; mientras la ubiquitina puede,

dinámicamente, adoptar múltiples conformaciones discretas, SUMO presenta una disposición extendida y flexible, sin interaccionar con la superficie del anillo (Tsutakawa *et al.*, 2015) (**Figura 13**).

Cuando se produce una lesión en el DNA que bloquea el avance de la horquilla de replicación, la helicasa y las polimerasas de DNA pueden desacoplarse, lo que origina una larga zona de ssDNA que es cubierta por RPA. La acumulación de esta proteína dispara la ubiquitinación de PCNA y, con ello, los mecanismos de tolerancia al daño del DNA (también denominados de derivación del daño o de reparación postreplicativa del DNA –*post replication repair*, PRR) (Davies *et al.* 2008; Karras y Jentsch, 2010). La vía DDT hace frente a las lesiones que se producen en el DNA como resultado de procesos endógenos o agentes dañinos exógenos, los cuales constituyen una fuente constante de estrés que desafía la integridad del genoma (Ciccía y Elledge, 2010). Ésta puede actuar durante o tras la replicación del DNA, y se subdivide en dos ramas diferentes, dirigidas por los genes del grupo epistático Rad6: i) la síntesis de translesión (*translesion synthesis*, TLS), catalizada por polimerasas de translesión (Pol TLS), que pueden replicar a través de daños en el DNA generalmente de forma propensa a errores (Zhao y Washington, 2017), y ii) el intercambio de cadenas o cambio de molde (*template switching*, TS), un mecanismo similar a la recombinación que utiliza la cromátida hermana recién sintetizada como molde para la reparación de la cadena dañada (Bellí *et al.*, 2022; Bi, 2015) (**Figura 14**). La subvía TLS es promovida por la monoubiquitinación de PCNA, mientras que la reparación por TS depende de la poliubiquitinación de esta proteína. Alternativamente, existe una tercera vía de reparación del daño en el DNA por recombinación homóloga, denominada en este contexto como recombinación o vía de salvamento (*salvage recombination*, SR) (Branzei y Szakal, 2016) (**Figura 14**). Este mecanismo es inhibido por la sumoilación de PCNA e independiente de su ubiquitinación, y al contrario que la TS, promueve el entrecruzamiento entre las cromátidas y puede generar reordenamientos cromosómicos e inestabilidad en el genoma (Lehmann *et al.*, 2020). La elección entre una u otra vía de reparación determina, por lo tanto, un resultado propenso o libre de errores o la reorganización del DNA, y las modificaciones postraduccionales de PCNA actúan en este punto como un elemento regulador clave al precisar cómo se repara el daño en el DNA (**Figura 14**).

Ubiquitinación de PCNA: control de la vía de tolerancia al daño en el DNA (DDT)

La respuesta celular ante el bloqueo de la horquilla de replicación, el desacoplamiento de la helicasa de DNA y la detención de la polimerasa replicativa, es la monoubiquitinación de PCNA en la lisina 164, mediada por el heterodímero Rad6/Rad18 (E2/E3 de ubiquitina) en la levadura (Bailly *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2006; Hoege *et al.*, 2002) (**Figura 15**). En los sitios en los que se ha producido la lesión, la acumulación de RPA unida al DNA de cadena sencilla actúa reclutando a Rad18 a la cromatina, lo que contribuye directamente a la modificación de la abrazadera (Davies *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2019). La ubiquitinación de PCNA promueve el intercambio transitorio de las polimerasas replicativas (Pol δ y Pol ϵ) por las polimerasas de translesión, que poseen cajas PIP y motivos de unión a ubiquitina UBM o UBZ que aumentan su afinidad por PCNA-Ub en el punto de bloqueo de la replicación (Bienko *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006; Plosky *et al.*, 2006; Lancey *et al.*, 2021). Las enzimas TLS, principalmente Pol ζ (familia B), Pol η , Pol κ , Pol ι y Rev1 (familia Y), son capaces de insertar un nucleótido opuesto a la lesión y/o extender la copia del DNA a partir de las bases incorporadas (Fan *et al.*, 2020; Prakash *et al.*, 2005), permitiendo la derivación del daño y la continuación de la replicación de la hebra naciente por la polimerasa replicativa δ (Haracska *et al.*, 2002). No obstante, al ser deficientes en la actividad exonucleasa 3'-5' (actividad correctora), son propensas a producir mutaciones (Vaisman y Woodgate, 2017).

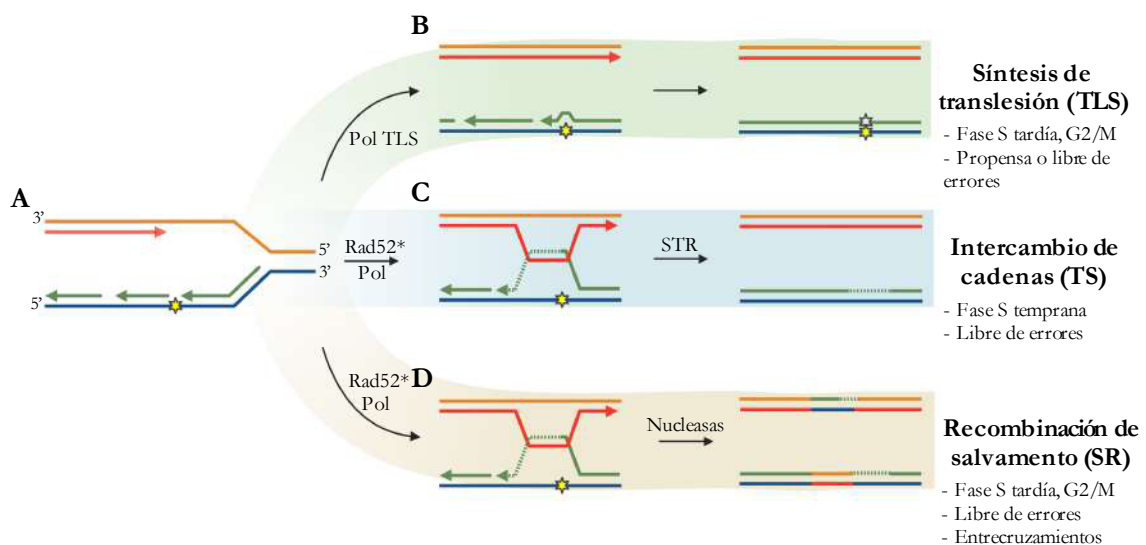


Figura 14. Mecanismos de tolerancia al daño en el DNA. **A.** El daño producido en el DNA durante la replicación (representado por la estrella amarilla en la cadena líder) detiene el avance de la polimerasa replicativa. Para continuar con la síntesis de DNA o reparar la brecha generada por la lesión, la célula activa las vías de tolerancia a daño en el DNA. **B.** En la síntesis de translesión (TLS), en la que la polimerasa de DNA replicativa se sustituye temporalmente por una polimerasa TLS; éstas pueden replicar a través de la lesión pero con baja fidelidad, por lo que son potencialmente mutagénicas. **C.** Otra vía es la denominada cambio de molde o intercambio de cadenas (TS), que utiliza la cadena hermana recién sintetizada como plantilla para reparar la lesión sin cometer errores. Los factores de recombinación del grupo epistático de Rad52 (Rad52*: Rad52, Rad51, Rad54 y Rad55/Rad57) dirigen la invasión de la hebra dañada y la polimerasa δ lleva a cabo la síntesis de reparación, generando así una estructura intermediaria de recombinación (SCJ) que resuelven Sgs1/Top3/Rmi1 (STR). **D.** El reinicio de la horquilla y la reparación de la lesión también pueden proceder a través de la vía de recombinación homóloga (en este contexto denominada recombinación de salvamento), que sigue el mecanismo descrito en **C** pero en el que la resolución de SCJ puede dar lugar al entrecruzamiento entre las cadenas. Se ha propuesto que las distintas vías actúan dependiendo de la fase del ciclo celular: TS en la fase S y SR y TLS durante las fases G2/M.

Para explicar el intercambio de las polimerasas en la horquilla de replicación, se han propuesto dos modelos. El primero de ellos propone que PCNA actúa como un "cinturón portaherramientas" (PCNA *toolbelt*) que recluta a las polimerasas de translesión a los monómeros que no están unidos a Pol δ polimerasas de translesión se enganchan a PCNA ubiquitinado a través de sus motivos de unión al pequeño péptido, localizándose en la cara posterior hasta su participación en la reparación, sin que ello conlleve la disociación de la polimerasa replicativa Pol δ (Indiani *et al.*, 2005; Kath *et al.*, 2014). El segundo mecanismo propone que Rev1 actúa como un "puente molecular" que media la unión entre una polimerasa TLS y PCNA para facilitar el intercambio (Boehm *et al.*, 2016).

En *S. cerevisiae*, además de la modificación de K164, se ha detectado la monoubiquitinación de otros residuos de lisina de PCNA en respuesta a defectos en la ligasa de DNA I (K107) (DasBradoo *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2013) y en la maduración del fragmento de Okazaki (K242; Becker, 2018), y tras la exposición de la célula a agentes dañinos como la radiación UV (K248; Povlsen *et al.*, 2012) y la colchicina (K168; Xu *et al.*, 2010). Adicionalmente, en humanos, se ha detectado la ubiquitinación de la lisina 117 inducida por UV (Elia *et al.*, 2015).

La monoubiquitinación de PCNA en la lisina 164 puede extenderse y formar cadenas de poliubiquitina unidas por la K63, por acción del heterodímero E2 Ubc13/Mms2 (UBC13/UEV1 en mamíferos) y la ligasa E3 Rad5, en *S. cerevisiae* (o los ortólogos SHPRH y HLTF en humanos) (Hoege *et al.*, 2002)

(Figura 15). Esta modificación conduce a la ruta de reparación libre de errores por la vía TS, promovida por la interacción de Rad 5 con Rad18 y PCNA, e implica la participación de factores de recombinación del grupo epistático Rad52 (Rad51, Rad55, Rad57 y Rad59, entre otros), y de la polimerasa replicativa δ (Pardo, 2018). En la levadura de fisión, en cambio, la poliubiquitinación de PCNA por Ubc13 activa la vía TLS (Coulon *et al.*, 2010).

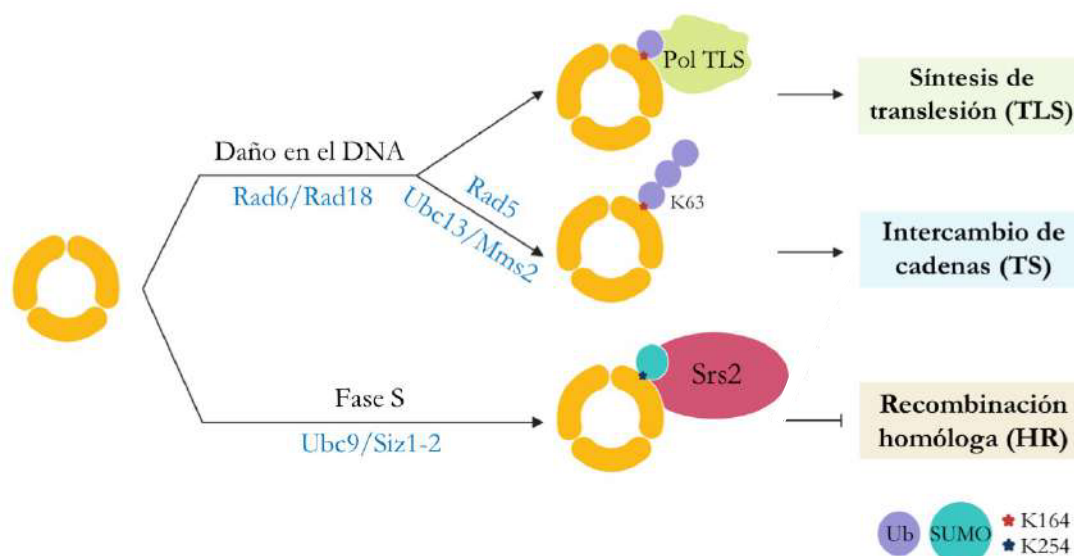


Figura 15. Regulación de las vías de tolerancia al daño del DNA mediante la modificación postraduccional de PCNA. La modificación postraduccional de PCNA por SUMO y ubiquitina da lugar al reclutamiento de proteínas específicas que, de otro modo, presentan interacciones débiles con este factor de procesividad. En respuesta a daño en el DNA, PCNA es monoubiquitinado en la lisina 164 por la enzima conjugadora Rad6 y la ligasa Rad18, promoviendo el reclutamiento de polimerasas TLS y la derivación del daño por la vía TLS. La extensión de esta modificación y la formación de una cadena de ubiquitinas unidas por la lisina K63 (poliubiquitinación), llevado a cabo por Ubc13/Mms2 y Rad5, promueve la reparación del daño por la vía TS. Durante la fase S del ciclo celular, PCNA es sumoilado en la lisina 164 y 127 por Ubc9 y las ligasas Siz1 y Siz2. Esta modificación promueve el reclutamiento de la helicasa Srs2 a la horquilla de replicación, donde inhibe los eventos indeseados de recombinación homóloga (HR) y la vía de reparación por recombinación (SR).

La vía TS comienza con la invasión de la hebra naciente bloqueada, que utiliza transitoriamente la cromátida hermana no dañada como molde de replicación. Una vez que la región que contiene la lesión en la cadena de DNA parental se copia, la cadena naciente vuelve a aparear con su cadena original, lo que conduce al reinicio de la replicación normal. Durante el proceso se forman intermediarios como estructuras de DNA en forma de X (denominadas "uniones

de cromátidas hermanas", o "*sister chromatid junctions*", SCJ), las cuales suelen ser resueltas por el complejo Sgs1/Top3/Rmi1 (STR) (BLM-TOPIIIa-RMI1-RMI2 en humanos) (Branzei *et al.*, 2008; Glineburg *et al.*, 2013; Karras y Jentsch, 2010) (**Figura 14**).

Cuál es el mecanismo que subyace a la selección de una u otra vía de reparación durante la replicación sigue siendo enigmático, aunque se han propuesto varias hipótesis. Se ha sugerido que el ensamblaje y desensamblaje dinámico de la poliubiquitilación del PCNA (Takahashi *et al.*, 2020), la desubiquitinación de la abrazadera en la lisina K164 (Álvarez *et al.*, 2019), o, de forma alternativa y emergente, la cinética de las vías, la participación de otros factores o el tipo de lesión son claves en la modulación de la derivación hacia una u otra ruta de reparación (Che *et al.*, 2021; Ripley *et al.* 2020).

Sumoilación de PCNA: preservando la estabilidad del genoma

PCNA también se conjuga con SUMO en la fase S, durante la replicación imperturbable y en respuesta a daño severo en el DNA (Hoege *et al.*, 2002; Parker *et al.*, 2008). En levaduras y vertebrados, la sumoilación tiene lugar principalmente en la conservada lisina 164, por acción de la ligasa Siz1 o sus homólogas en humanos PIAS1 y PIAS4 (Arawaka *et al.*, 2006; Hoege *et al.*, 2002; Leach y Michael, 2005; Parker *et al.*, 2008; Stelter y Ulrich, 2003). También se ha descrito la modificación del residuo K127 en PCNA de *S. cerevisiae* (Hoege *et al.*, 2002) y de K254 en los homólogos de humanos (Gali *et al.*, 2012) y *Arabidopsis* (Strzalka *et al.*, 2012).

En levaduras, la sumoilación de PCNA promueve el reclutamiento de la helicasa de DNA Srs2 a la horquilla de replicación, donde suprime los eventos de recombinación homóloga y la vía de reparación SR (**Figura 15**) (Papouli *et al.*, 2005; Pfander *et al.*, 2005). En humanos, se ha descrito la existencia de un homólogo funcional de Srs2, la proteína PARI, que conserva mecanismos de acción similares asociados a PCNA-SUMO (Moldovan *et al.*, 2012). Además, en este organismo se ha descrito que esta modificación de PCNA protege a la horquilla de replicación contra la formación de roturas del DNA de doble cadena si la misma se detiene al producirse una lesión (Gali *et al.*, 2012).

También en *S. cerevisiae*, la sumoilación de PCNA parece actuar como un interruptor entre la vía DDT y la recombinación homóloga, favoreciendo la reparación por TS (Branzei *et al.*, 2008). PCNA-SUMO promueve la unión de Rad18 a través de su motivo SIM y, de esta forma, la ubiquitinación de otros monómeros del trímero, lo que actuaría como un mecanismo de transición hacia la TS (Branzei *et al.* 2008; Parker y Ulrich, 2012; Parker y Ulrich, 2013). Para permitir la derivación del daño por esta vía, varias proteínas asociadas a la horquilla de replicación y PCNA, Esc2 y Elg1, actúan contrarrestando la actividad antirrecombinasa de Srs2 (Arbel *et al.*, 2020; Tamang *et al.*, 2019; Urulangodi *et al.*, 2015). Esc2 se une a la horquilla de replicación detenida, donde interacciona con el motivo SIM de Srs2 a través de sus dos dominios similares a SUMO (SUMO-like domains, SLD1/2). Según el modelo propuesto, esta proteína reduce los niveles de la helicasa al reclutar a Elg1 (ATAD5 en humanos), una subunidad alternativa de la proteína RCF que descarga PCNA-SUMO del DNA) (Arbel *et al.*, 2020; Tamang *et al.*, 2019; Urulangodi *et al.*, 2015) y 2) la enzima STUbL Slx5/8, las cuales limitan el acceso y median la degradación por vía proteosomal de Srs2, respectivamente (Urulangodi *et al.*, 2015), permitiendo la formación óptima de los filamentos de Rad51. También se ha propuesto que la ATPasa Mgs1 (WRNIP1 en células de mamíferos) (Hishida *et al.*, 2001), actúa favoreciendo específicamente la recombinación por TS y bloqueando otros modos de recombinación potencialmente peligrosos (Jiménez-Martín *et al.* 2020). En células de metazoos, PCNA-K164SUMO también es necesaria para la vía TS durante el bloqueo de la replicación (Mohiuddin, *et al.*, 2018).

Se desconoce qué mecanismos determinan qué vía de reparación utilizar y cómo éstas se coordinan. Diferentes factores y condiciones, como la presencia de estrés de replicación o el tipo de lesión en el DNA, y factores o complejos proteicos como Rad5 o Sgs1, entre otros, podrían influir en la selección de la vía de DDT que mejor se adapte a las necesidades de la célula (Fan *et al.*, 2020).

Srs2: Supressor of RAD6 mutant

El gen *SRS2* (*suppressor of rad 6 mutant 2*) se identificó en levaduras en una búsqueda de supresores a la sensibilidad al daño en el DNA de mutantes de la vía DDT, *rad6* y *rad18* (Aboussekhra *et al.*, 1989; Aguilera y Klein, 1988; Lawrence y Christensen, 1979; Rong *et al.*, 1991; Schiestl *et al.*, 1990). Dado que esta supresión

depende de un mecanismo de recombinación homóloga funcional, Srs2 se posicionó como una proteína con actividad anti-rebinogénica (Aboussekhra *et al.*, 1989; Rong *et al.*, 1991; Schiestl *et al.*, 1990).

Srs2 es una helicasa de DNA dependiente de ATP que pertenece a la superfamilia SF1a (*superfamily* 1a) y presenta homología con las helicases bacterianas UvrD, Rep y PcrA (Aboussekhra *et al.*, 1989; Gorbalenya *et al.*, 1988; Rong *et al.*, 1991). Como UvrD, Srs2 es capaz de desenrollar el DNA con polaridad 3'- 5' utilizando ATP como fuente de energía, lo que le permite translocarse a lo largo del DNA de cadena sencilla (Rong y Klein, 1993) y procesar diversos sustratos como horquillas, *flaps*, extremos 3' y 5' protuberantes, extremos romos, uniones de Holliday (*Holliday junctions*, HJ) y bucles D (Le Breton *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2017; Marini y Krejci, 2012; Prakash *et al.*, 2009; Sebesta *et al.*, 2011; Van Komen *et al.*, 2003).

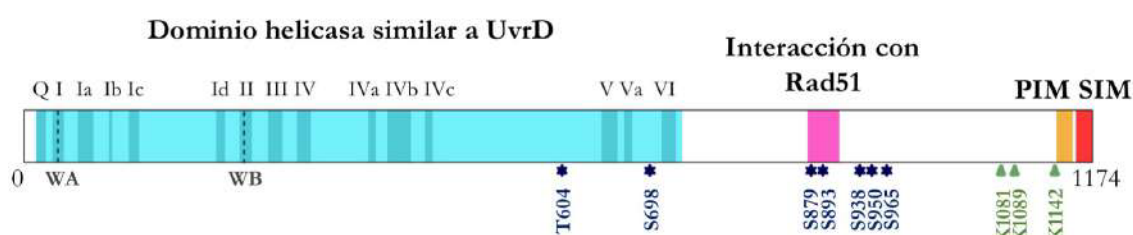


Figura 16. Organización de la proteína Srs2 de *S. cerevisiae*. El dominio helicasa similar a UvrD está coloreado de cyan, y en él se han destacado los diferentes motivos helicasa descritos. La región y los motivos que median la interacción con Rad51, PCNA (PIM) y SUMO (SIM) están marcados en rosa, naranja y rojo, respectivamente. Los residuos que son fosforilados se han indicado con un asterisco azul y aquellos sumoilados con un triángulo verde. WA: Walker A; WB: Walker B. Modificado de Niu y Klein, 2017.

Srs2 contiene, en su extremo N-terminal, un dominio helicasa similar a UvrD (*UvrD-like*) que incluye los motivos helicasa (Gorbalenya *et al.*, 1988; Gorbalenya *et al.*, 1989; Lee y Yang, 2007; Tanner *et al.*, 2003) (**Figura 16**). Estos motivos, entre los que están los motivos Walker A y Walker B, comprenden los residuos involucrados en la unión al DNA y unión e hidrólisis del ATP (Lee y Yang, 2007; Walker *et al.*, 1982). La región C-terminal contiene los residuos que se modifican postraduccionalmente, por SUMO o un grupo fosfato, la región de interacción a Rad51 y los motivos de unión a PCNA (PIM no canónico) y SUMO

(SIM canónico) (Niu y Klein, 2017) (**Figura 16**). En total, se han identificado más de un centenar de interactores de Srs2, incluidos los principales factores relacionados con la reparación y recombinación homóloga del DNA, como la nucleasa Mre11 y Mus81, Rad51, Rad52 y las helicasas Sgs1, Mph1 y Nej1, implicada en la vía NHEJ (Chiolo *et al.*, 2005; Kolesar *et al.*, 2016), componentes de la ruta de sumoilación Ubc9, Siz1 y Siz2 y ubiquitinación Rad5 y Rad18, y otras proteínas como Slx5 y Esc2 (Marini y Krejci, 2010; Niu y Klein, 2017). Las regiones que flanquean el dominio helicasa, en cambio, exhiben un alto grado de variabilidad de secuencia y longitud, especialmente el dominio C-terminal (Richar *et al.*, 2005).

La proteína Srs2 está conservada en el reino *Fungi* (Doe y Whitby, 2004; Suzuki *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2001; Yasuhira, 2009), en plantas, invertebrados y anfibios (Blanck *et al.*, 2009), además de contar con análogos funcionales en mamíferos y aves (Moldovan *et al.*, 2012). Sobre las proteínas homólogas de plantas no se dispone de mucha información, procediendo ésta principalmente de estudios llevados a cabo con organismos modelo. En *Arabidopsis*, se ha observado que la expresión de *SRS2* se reprime tras la exposición a radiación γ (Culligan *et al.*, 2006) y se ha confirmado su actividad como helicasa de DNA funcional con direccionalidad 3'→5' y propiedades que le permiten participar en diferentes pasos durante el procesamiento de los intermediarios de recombinación (HJs y HJs parciales) (Blanck *et al.*, 2009). En el briófito *Physcomitrella patens*, la expresión del gen *SRS2* se indujo como respuesta al daño en el DNA inducido por bleomicina (Kamisugi *et al.*, 2016), mientras que su ausencia no produjo ningún defecto detectable en el crecimiento, hipersensibilidad al daño en el DNA, ni efecto en la eficiencia de integración de transgenes selectivos (*gene targeting*) en la planta (Charlot *et al.*, 2014; Kamisugi *et al.*, 2016), posiblemente debido a la existencia de un alto nivel de redundancia en los elementos encargados del mantenimiento del genoma de este organismo (Kamisugi *et al.*, 2016).

En mamíferos, aunque no se ha identificado un homólogo de Srs2, se ha descrito la existencia de varias proteínas que presentan funciones análogas (RTEL1, RECQL5, FBH1, PARI y FIGNL1), capaces de suprimir la recombinación homóloga desmantelando los filamentos de Rad51 o limitando la extensión del bucle D (Chiolo *et al.*, 2007; Hu *et al.* 2007; Matsuzaki *et al.* 2019; Moldovan *et al.* 2012; Osman *et al.*, 2005; Simandlova *et al.* 2013). Entre ellos

destaca PARI (*PCNA-associated recombination inhibitor*), que presenta una organización de dominios similar a la de Srs2, se une a PCNA sumoilado e inhibe los eventos de recombinación homóloga inapropiados a través de los mecanismos descritos para la helicasa de levaduras (Burkovics *et al.*, 2016; Moldovan *et al.*, 2012).

Papel multifuncional de Srs2

En *S. cerevisiae*, Srs2 actúa como un regulador de la recombinación homóloga, que participa tanto en la replicación como en la reparación del DNA (Crickard y Greene, 2019; Niu y Klein, 2017).

Mecanismos de reparación de las roturas del DNA de doble cadena (DSBs)

Las roturas del DNA de doble cadena (*double strand breaks*, DSBs) son eventos comunes en las células eucariotas, consecuencia de la exposición a agentes dañinos (Vitor *et al.*, 2020). Para reparar este daño las células cuentan con dos vías principales: la unión de extremos no homólogos (*non-homologous end joining*, NHEJ) o la recombinación homóloga (*homologous recombination*, HR). La primera vía es la predominante en las células de mamíferos, e implica la unión de ambos extremos de la doble cadena de DNA con poco o ningún procesamiento adicional. Este mecanismo resulta eficiente y a menudo mutagénico, ya que origina pequeñas deleciones o inserciones (Ali *et al.*, 2022). La segunda vía, la reparación por recombinación homóloga, incluye un grupo de vías que comparten dos características: i) requieren secuencias de DNA homólogas intactas para la reparación (DNA donante) y ii) comienzan con la resección del DNA alrededor de la rotura, que genera DNA de cadena sencilla. Dependiendo de la naturaleza de la rotura del dsDNA, la reparación dependiente de homología puede proceder a través del anillamiento de una sola hebra (*single-strand annealing*, SSA), la replicación inducida por rotura (*break-induced replication*, BIR) o la conversión génica (*gene conversion*, GC) (**Figura 17**).

La recombinación homóloga comienza con la resección de los extremos 5' de la doble cadena de DNA para formar un extremo 3' protuberante, al que se une

la proteína RPA y posteriormente Rad51 (presinapsis) (Daley *et al.*, 2014; Jasin y Rothstein, 2013). En este punto, si la zona de rotura del DNA está flanqueada por repeticiones homólogas directas, puede ocurrir la reparación por la vía SSA, a través del anillamiento de las secuencias complementarias en los extremos reseccionados. Este mecanismo es mutagénico, ya que se pierde la secuencia comprendida entre la zona de homología y el extremo 5', pero puede actuar como un mecanismo de salvaguarda cuando no hay otras opciones disponibles (Bhargava *et al.*, 2016) (**Figura 17B**). La recombinación homóloga continúa con la búsqueda de secuencias homólogas por el filamento de nucleoproteína Rad51-ssDNA, el establecimiento de un contacto físico con la molécula donante (sinapsis) y la invasión del DNA homólogo (postsinapsis), desplazando a la hebra complementaria y creando un bucle de desplazamiento (bucle D, o *D-loop*). La cadena invasora y el molde homólogo se emparejan y forman un heterodúplex de DNA, que es extendido en su extremo 3' por la polimerasa δ para restaurar la secuencia alrededor del sitio de ruptura bucle D extendido (McVey *et al.*, 2016; Sung, 1994). La estructura resultante, denominada bucle D extendido, es un intermediario crítico en la determinación del entrecruzamiento o no entrecruzamiento, y puede ser procesada a través de dos vías principales comprendidas como conversión génica: SDSA (*synthesis-dependent strand-annealing pathway*) y DSBR. En la vía SDSA, el bucle D extendido es disociado para permitir la unión de la hebra recién sintetizada con el segundo extremo procesado de la DSB, generándose exclusivamente productos sin entrecruzamientos. En cambio, si el bucle D es desplazado y unido con el segundo extremo del DSB, se forman las estructuras de unión doble de Holliday (dHJ), cuya resolución o disociación puede dar lugar a productos con o sin entrecruzamientos, respectivamente (vía DSBR) (Heyer, 2015; Ranjha *et al.*, 2018; Symington *et al.*, 2014) (**Figura 17**). En este proceso participan diferentes helicasas que ayudan a prevenir la invasión de cadenas erróneas o a limitar el alcance de la actividad de la polimerasa. Por último, la vía BIR tiene lugar cuando la síntesis de DNA continúa hasta el final del cromosoma. Tanto los mecanismos GC como BIR pueden dar lugar a una reparación sin errores si se utiliza una cromátida hermana como donante, pero si la reparación implica a un cromosoma homólogo o a un sitio de homología ectópico, pueden producirse pérdidas de heterocigosidad o reordenamientos cromosómicos (Chen *et al.*, 2007; Malkova e Ira, 2013; Stark y Jasin, 2003).

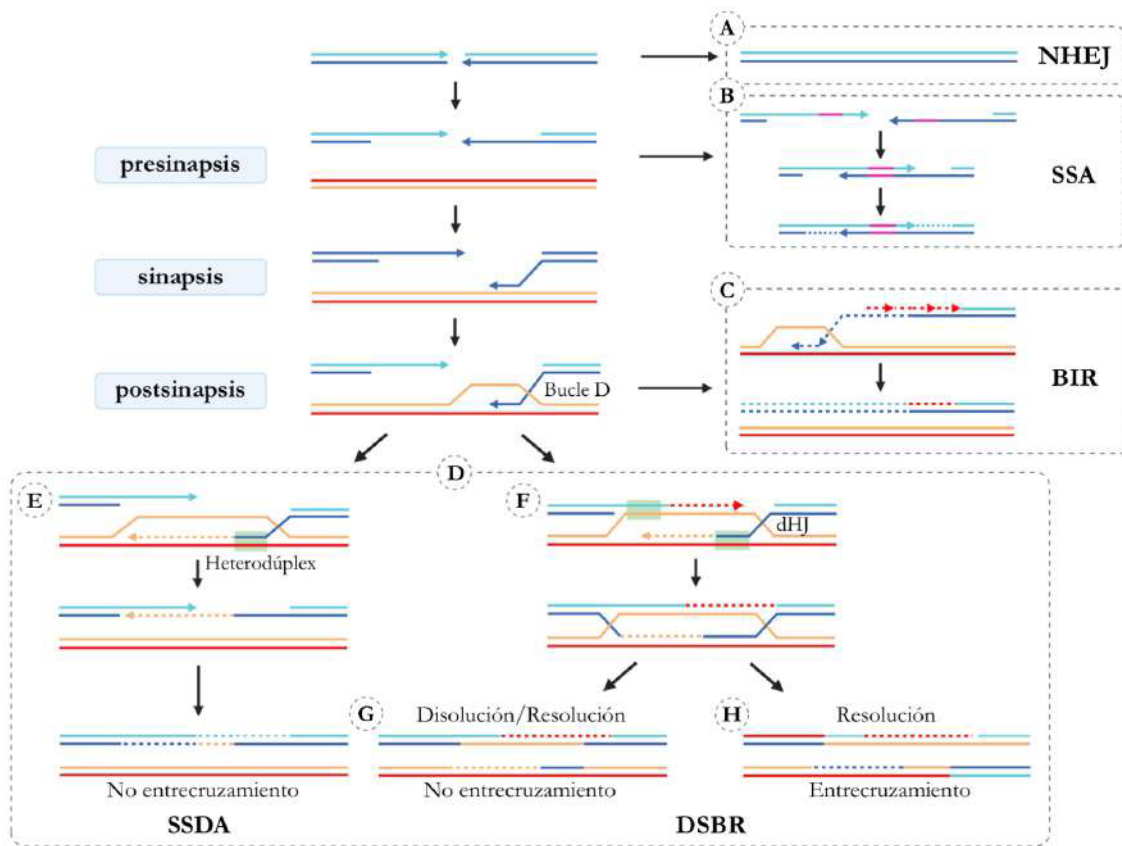


Figura 17. Mecanismos de reparación de la rotura de DNA de doble cadena (DSB). Una rotura en el DNA de doble cadena suele considerarse el tipo más peligroso de daño en el DNA. Las células poseen varios mecanismos para hacer frente a esta lesión, que es reparada principalmente por la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o por recombinación homóloga (HR). NHEJ (A) implica la ligación de los extremos con poco o ningún procesamiento del DNA alrededor de la rotura del dsDNA, lo que conlleva a menudo pequeñas inserciones o deleciones. Alternativamente, dependiendo de la naturaleza del DSB, la reparación dependiente de homología puede proceder a través del: (B) recocido de una sola hebra (SSA), (C) la replicación inducida por la rotura (BIR) o (D) la conversión génica (GC). Estas tres vías de reparación comienzan con la resección del extremo 5' alrededor de la DSB para crear extremos protuberantes de ssDNA (presinapsis). Una vez reseccionado el DNA, puede ser reparado por SSA (B) cuando existen repeticiones directas flanqueando el sitio de rotura (líneas rosas). GC y BIR requieren la invasión del extremo 5' protuberante a una molécula donante (sinapsis) y un posterior intercambio de cadenas en el que una cadena de la molécula donante es desplazada por la invasora para formar un bucle D (postsinapsis). La vía BIR (C) se emplea cuando sólo está presente un extremo, de modo que la hebra invasora se extiende y el DNA recién sintetizado se desplaza del donante para actuar como molde de la segunda hebra. La GC (D) es el principal mecanismo de reparación de una DSB, para lo que requiere que ambos extremos de la rotura tengan homología con una molécula de DNA donante y estén disponibles para la reparación, y puede producirse a través de las vías SSDA o DSBR. Durante la SSDA (E), la cadena invasora se desplaza de la molécula donante y se une a las secuencias del otro extremo de la ruptura, generando exclusivamente productos sin entrecruzamiento. La DSBR (F), en cambio, implica la extensión de la hebra invasora, la captura del segundo extremo de la rotura y la resolución del intermediario de doble unión Holliday (dHJ) formado por endonucleasas o helicasas. A diferencia del SSDA, la resolución de una dHJ puede dar lugar a un producto sin entrecruzamiento (G) o con entrecruzamiento (H). Las puntas de las flechas indican los extremos 3' del DNA. Las

Figura 17. (continuación) líneas punteadas muestran el DNA recién sintetizado y sus colores corresponden a las moléculas de DNA que se han utilizado como plantillas. DSB: *double-strand break*; NHEJ: *non-homologous end joining*; GC: *gene conversion*; BIR: *break-induced replication*; SSA: *single-strand annealing*; SDSA: *synthesis-dependent strand annealing*; DSBR: *double-strand break repair*. Adaptado de Andriuskevicius *et al.*, 2018.

Actividad de Srs2 en la horquilla de replicación

Diversos estudios genéticos permitieron inferir el papel antirrecombinasa de Srs2 en *S. cerevisiae*. La ausencia o mutación del gen *SRS2*: (1) da lugar a un fenotipo hiperrrecombinante, (2) suprime la sensibilidad frente a agentes genotóxicos en levaduras deficientes en la vía de tolerancia al daño en el DNA (Aguilera y Klein, 1988; Palladino y Klein, 1992) y (3) exhibe letalidad sintética o crecimiento lento en combinación con mutantes en genes implicados en el mantenimiento del genoma (Gangloff *et al.* 2000; Klein, 2001; Ooi *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2006; Tong *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004), que en muchos casos se alivia por la delección de *RAD51* y de otros factores esenciales en la recombinación homóloga como *RAD52*, *RAD55* y *RAD57* (Gangloff *et al.* 2000; Heude *et al.*, 1995; Schild, 1995). Todos estos fenotipos se han asociado con la generación de intermediarios de recombinación tóxicos en la horquilla de replicación, lo que ha permitido situar a Srs2 como un inhibidor de la recombinación homóloga (Aboussekhra *et al.*, 1989; Aboussekhra *et al.*, 1992; Broomfield y Xiao, 2002; Chanet *et al.*, 1996; Fabre *et al.*, 2002; Rong *et al.*, 1991; Schiestl *et al.*, 1990). Dicha función fue respaldada posteriormente por estudios bioquímicos que demostraron que Srs2 es capaz de dismantelar eficazmente los filamentos de nucleoproteína de Rad51-ssDNA, un intermediario clave para la recombinación homóloga (actividad bautizada como *stripasse*) (Krejci *et al.*, 2003; Veaute *et al.*, 2003) (**Figura 18**).

Srs2 lleva a cabo su función antirecombinasa en la horquilla de replicación, donde es reclutado por PCNA sumoilado, con la que interacciona a través de los motivos SIM y PIM de su extremo C-terminal (Armstrong *et al.*, 2012; Kolesar *et al.*, 2012; Papouli *et al.*, 2005; Pfander *et al.*, 2005). Para explicar cómo desempeña esta función se han propuesto dos mecanismos. El primero de ellos es el dismantelamiento de los filamentos de nucleoproteína Rad51-ssDNA, siguiendo la dirección de translocación 3'-5'. Esta actividad prototípica de helicasas antirrecombinasas (Bernstein *et al.*, 2010; Branzei y Szakal, 2017; Brosh, 2013; Veaute *et al.*, 2005) ha sido estudiada principalmente *in vitro*, aunque aún no se

dispone de mucha información sobre cómo se inicia o se regula. A partir de diversos ensayos se ha propuesto que: 1) la interacción entre Srs2 y Rad51 es esencial en ensayos *in vitro*, pero no *in vivo* (Antony *et al.*, 2009; Colavito *et al.* 2009; Sasanuma *et al.*, 2013), que Srs2 es reclutado al complejo presináptico 2) preferentemente en grupos de RPA flanqueados por Rad51, o bien al unirse 3) al heterodúplex formado por la unión de dsDNA al filamento ssDNA-Rad51 (Kaniecki *et al.*, 2017) o 4) al ssDNA desnudo (De Tullio *et al.*, 2017), y también se ha mostrado que Srs2 5) actúa en tándem (Dupaigne *et al.*, 2008; Kaniecki *et al.*, 2017; Lytle *et al.*, 2014) y 6) puede eliminar a Rad52 del RPA-ssDNA, un intermediario temprano de la HR (De Tullio *et al.*, 2017). En cuanto a la regulación de este mecanismo, se ha visto que varios factores accesorios de la recombinación homóloga, incluyendo Rad52, Rad55/57 y el complejo SHU, pueden actuar como reguladores negativos de la actividad de Srs2 al promover el ensamblaje de los nucleofilamentos de Rad51 (Bernstein *et al.*, 2011; Burgess *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). Otras proteínas, como las mencionadas previamente Esc2, Elg1 y el complejo Slx5/Slx8 pueden directamente reducir la presencia de Srs2 en la horquilla de replicación estancada (Urulangodi *et al.*, 2015).

Además de desensamblar los filamentos de nucleoproteína de Rad51, se ha mostrado que Srs2 también es capaz de inhibir la síntesis del DNA durante su reparación al disociar a Pol δ de su complejo con PCNA-SUMO, limitando la extensión del extremo 3' de la cadena invasora (que forma el bucle D) (Burkovics *et al.*, 2013). Esta actividad da lugar a tramos de conversión más cortos, lo que reduce los eventos de entrecruzamiento.

Papel de Srs2 en la reparación de la rotura del DSB

Srs2 actúa preservando la integridad del genoma al evitar que se produzcan eventos indeseados de recombinación homóloga durante la replicación del DNA, y entrecruzamientos durante la reparación del dsDNA. A este respecto, Srs2 desempeña un papel importante al promover la reparación de roturas en el dsDNA por la vía SDSA (Aylon *et al.*, 2003; Dupaigne *et al.*, 2008; Ira *et al.*, 2003; Mitchel *et al.*, 2013; Miura *et al.*, 2013; Robert *et al.*, 2006; Saponaro *et al.*, 2010).

Se ha sugerido que el mecanismo responsable de la promoción de la vía SDSA (función pro-SDSA) también podría ser el desmantelamiento de los

filamentos Rad51-ssDNA (Ira *et al.*, 2003; Jenkins *et al.*, 2019). Alternativamente, se ha propuesto que podría depender de la capacidad de Srs2 para interrumpir los bucles D extendidos (**Figura 18**), mediados por Rad51 y Rad54, reduciendo de esta forma la generación de uniones dobles de Holliday y su resolución por entrecruzamiento (Dupaigne *et al.*, 2008; Ira *et al.* 2003; Liu *et al.*, 2017; Piazza *et al.* 2019). Datos genéticos muestran que es necesaria la sumoilación de PCNA para reclutar a Srs2 al bucle D, ya que las cepas mutantes *siz* y *PCNA-K164R* presentan los mismos defectos que la cepa *srs2* en la vía SDSA (Burkovics *et al.*, 2013; Kolesar *et al.*, 2016; Le Breton *et al.*, 2008; Miura *et al.*, 2013; Robert *et al.*, 2006).

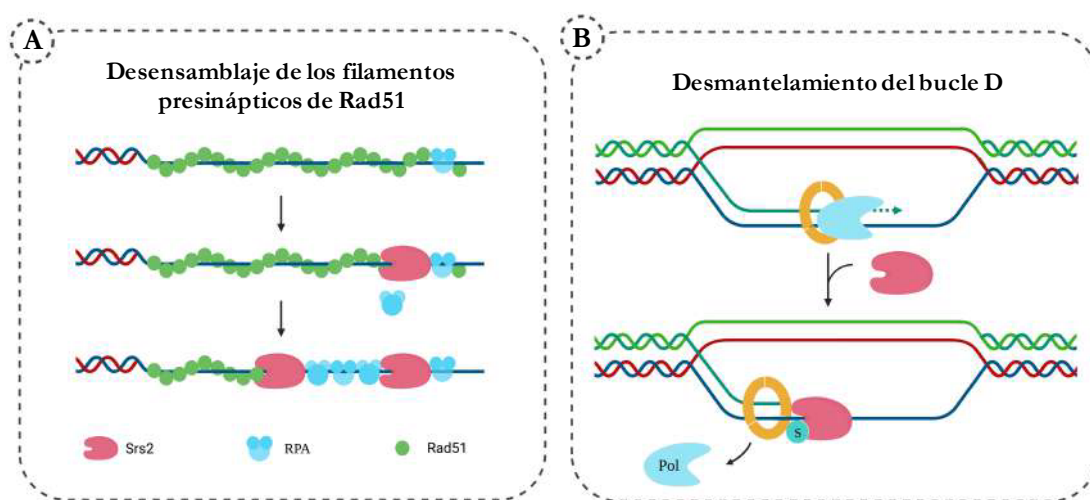


Figura 18. Mecanismos de acción de Srs2. **A.** Desensamblaje de los filamentos presinápticos de Rad51. El DNA de cadena sencilla, generado como resultado de la resección del extremo 5' o la separación de cadenas, es rápidamente cubierto por RPA (esferas azules). Srs2 es reclutado por RPA dentro del complejo presináptico, desde comienza a desensamblar las moléculas de Rad51 (esferas verdes) (Antony *et al.*, 2009). Esto permite que se carguen más moléculas de RPA y crea más sitios para la asociación de nuevas proteínas Srs2 a lo largo del ssDNA (Kaniecki *et al.*, 2017). **B.** Desmantelamiento del bucle D. Srs2 limita la extensión de la síntesis de reparación dependiente de Rad51 liberando a Polδ de su complejo con PCNA, bloqueando así la extensión adicional del extremo 3' de la cadena invasora y limitando la extensión de la conversión (Burkovics *et al.*, 2013).

Papel de las modificaciones postraduccionales de Srs2

Las funciones de Srs2 están reguladas por modificaciones postraduccionales (principalmente sumoilación y fosforilación) de la helicasa y otras proteínas interactoras (Chiolo *et al.*, 2005; Kolesar *et al.*, 2012; Saponaro *et al.*, 2010).

La fosforilación de residuos de serina o treonina de Srs2 (**Figura 16**) es necesaria para dismantelar estructuras específicas del DNA, como los bucles D durante la vía de reparación SDSA (Saponaro *et al.*, 2010). La sumoilación de Srs2 tiene lugar en tres lisinas localizadas en el extremo del dominio C-terminal (K1081, K1089 y K1142) y es dependiente de su motivo SIM (Kolesar *et al.*, 2012; Saponaro *et al.*, 2010). Esta modificación se induce por daño en el DNA, y se ha visto que: (1) promueve específicamente la recombinación del rDNA (Kolesar *et al.*, 2016; Saponaro *et al.*, 2010), (2) tiene un efecto inhibitorio en la vía de reparación SDSA en ausencia de su fosforilación (Saponaro *et al.*, 2010) y (3) altera su interacción con otras proteínas, como es el caso de PCNA sumoilado (Kolesar *et al.*, 2012; Kramarz *et al.*, 2017).

El motivo SIM de Srs2 también juega un papel importante en la regulación de sus funciones al coordinar su interacción con otras proteínas. Este motivo: (1) aumenta o reduce su afinidad por PCNA sumoilado, al estar disponible para su unión al SUMO conjugado a PCNA o a la enzima conjugadora, respectivamente, (2) estimula su unión a otras proteínas de recombinación sumoiladas como Mre11, Rad51, Rad59 y Rad52, promoviendo el ensamblaje de complejos de reparación del DNA (Kolesar *et al.*, 2016), y (3) media su degradación a través de su interacción con Esc2 (Urulangodi *et al.*, 2015).

Funciones adicionales de Srs2

En levaduras, Srs2 también cumple un papel fundamental durante la meiosis al resolver los filamentos de nucleoproteína de Rad51-ssDNA, suprimiendo así la formación de daños letales aberrantes en el DNA durante la profase I tardía (Palladino y Klein, 1992; Sasanuma *et al.* 2013; Sasanuma *et al.*, 2019).

Además de la regulación de la recombinación homóloga, Srs2 también participa en la correcta activación de los puntos de control de la replicación, así como en la recuperación y la adaptación de la célula en respuesta a la detención del ciclo celular (Liberi *et al.*, 2000; Vaze *et al.*, 2002). En ausencia de esta helicasa, las células muestran un retraso en el crecimiento celular, con una fase S y/o G2 tardía prolongada y meiosis defectuosas (Palladino y Klein, 1992), lo cual podría ser el resultado de la generación de intermediarios de recombinación irresolubles que desencadenan en la activación de los puntos de control y comprometen la

progresión del ciclo celular (Vaze *et al.*, 2002). Srs2 también participa en otras vías de reparación de DSB como SSA, BIR y NHEJ (Aylon *et al.*, 2003; Hegde y Klein 2000; Ira *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2012; Lydeard *et al.*, 2007; Vaze *et al.*, 2002).

OBJETIVOS

En la presente tesis doctoral se han establecido tres objetivos principales:

1. Estudiar la interferencia de las proteínas virales involucradas en la replicación de los geminivirus en las modificaciones postraduccionales de PCNA de tomate.
2. Caracterizar la proteína homóloga de SRS2 de *Arabidopsis* y estudiar su posible papel en la replicación de los geminivirus.
3. Desarrollar herramientas que faciliten la identificación de proteínas de la planta cuya sumoilación se vea alterada por la expresión de Rep de geminivirus.

MATERIALES Y MÉTODOS

MÉTODOS GENERALES

Las técnicas moleculares estándar, así como la manipulación de las cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, se llevaron a cabo siguiendo métodos descritos por Sambrook y Green, 2012.

El modelo de PCNA de tomate se realizó con el paquete UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004), usando como referencia el trímero de PCNA humano (número de acceso al Banco de Datos de Proteínas: 1AXC).

MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Escherichia coli

Las cepas de *E. coli* DH5 α y TOP10 (Thermo Fisher Scientific) se usaron para llevar a cabo la construcción, el mantenimiento y la amplificación de todos los plásmidos. Los productos de PCR generados y clonados en este trabajo fueron secuenciados. La cepa BL21 (DE3) CodonPlus-RIL (Agilent) se empleó para la prueba de expresión de AtSRS2 silvestre y NCM631, derivada de BL21 (Govantes *et al.*, 1996), para los ensayos de sumoilación y ubiquitinación. Las diferentes cepas se cultivaron a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) (1% p/v tripton, 0,5% p/v extracto de levaduras, 0,25% p/v NaCl [pH 7.0]) (Maloy, 1990) suplementado con el/los antibiótico/s correspondiente/s: kanamicina (50 μ g/mL), ampicilina (100 μ g/mL), cloranfenicol (10 μ g/mL) y/o estreptomycin (50 μ g/mL).

- *E. coli* DH5 α : *F-endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80 dlac Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K- m_K+), λ -*.
- *E. coli* NCM631 BL21: *hsds gal λ DE3 LacI, LacUV5::T7 Pol.*
- *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIL: *E. coli* B F⁻ omp^T hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r].

Agrobacterium tumefaciens

Las cepas de *A. tumefaciens* GV3101 (pSoup) (Holsters *et al.*, 1980) y C58C1

y (Deblaere *et al.*, 1985) se utilizaron para la expresión transitoria de proteínas en *N. benthamiana*, y, en el caso de GV3101, también para la transformación de *A. thaliana* por inmersión floral (Clough y Bent, 1998). Ambas cepas se cultivaron a 28°C en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con los antibióticos rifampicina (50 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL) o estreptomicina (100 µg/mL).

- *A. tumefaciens* GV3101: C58 (rifR) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) (gentR) Nopaline (pSoup-tetR).
- *A. tumefaciens* C58C1: pTiB6S3ΔT-DNA.

MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Cultivo de *A. thaliana*

En este trabajo se han empleado plantas de *A. thaliana* silvestres ecotipo Columbia (Col0). El método de esterilización de las semillas fue superficial, por exposición a vapores de gas cloro durante 4 horas, resultado de la mezcla de 100 mL de lejía y 3 mL de ácido clorhídrico concentrado (Lindsey *et al.*, 2017). Éstas se airearon posteriormente en una cabina de flujo laminar durante 4 horas y se estratificaron a baja temperatura (4-6°C) y oscuridad un mínimo de 48 horas. A continuación, las semillas esterilizadas se sembraron en placas de Petri con medio MS (medio de Murashige y Skoog), compuesto por 4.33 g/L de medio basal Murashige y Skoog, 15 g/L de sacarosa, 0,5 g/L de ácido morfolinoetanesulfónico (MES) (pH ajustado a 5,7), suplementado con higromicina (40 µg/mL) para la selección de plántulas resistentes, y se dispusieron en cámaras de cultivo a una temperatura de 22°C y un fotoperiodo de día corto (8/16 horas de luz/oscuridad, a 120 µmol fotones m⁻² s⁻¹). Las placas se mantuvieron en estas condiciones entre 10 y 14 días para la selección de plántulas resistentes, y los ensayos de expresión de AC1 y C1 de begomovirus. Las plántulas seleccionadas se transfirieron a una mezcla de sustrato orgánico:vermiculita en proporción 4:1 v/v y se trasladaron a otra cámara de cultivo a 22°C y fotoperiodo de día largo (16/8 horas de luz/oscuridad, a 120 µmol fotones m⁻² s⁻¹) para inducir la floración y obtener semillas.

Líneas transgénicas de *Arabidopsis*

La línea *HisSUM1 H89R sum1-1 sum2-1*, a partir de la cual se generaron las que se detallan en este trabajo, fue desarrollada y caracterizada por Saracco *et al.*, 2007 y Miller *et al.*, 2010. Las líneas RC10B y AF24 fueron generadas por Edgar Rodríguez Negrete y Manuel A. Arroyo Mateos (no publicado) mediante transformación por inmersión floral (Clough y Bent, 1998) de plantas de *Arabidopsis* ecotipo Col0 con la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 que contenía los vectores pER8-Rep^{TYLCSV} y pER8-Rep^{TGMV}, respectivamente.

Las distintas líneas HSTG, HSTS y HSP se generaron al transformar por inmersión floral la línea *His-SUMO1 H89R sum1-1 sum2-1* con la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 que contenía los vectores pER8-Rep^{TYLCSV}, pER8-Rep^{TGMV} o pER8-vacío, respectivamente. La selección de plantas transformantes se realizó en medio MS sólido (agar fisiológico 8 g/L, Sigma) suplementado con higromicina (40 µg/mL).

Cultivo de *N. benthamiana*

Las plantas de *N. benthamiana* silvestres se cultivaron en una mezcla de sustrato orgánico:vermiculita en proporción 4:1 v/v y se mantuvieron en condiciones controladas de luz (16/8 horas de luz/oscuridad) y temperatura (22-24°C).

CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

Todas las construcciones utilizadas y generadas en este trabajo, mencionadas y descritas a continuación, se recogen en la **tabla 5**.

Clonación de los sistemas de sumoilación y ubiquitinación en *E. coli*

Dianas y genes virales

Las secuencias de DNA codificantes (*coding DNA sequence*, CDS) de las dianas de los ensayos de sumoilación y ubiquitinación, así como los marcos abiertos de lectura (ORFs) de las proteínas virales cuya interferencia en dichas

modificaciones postradruccionales se probó en los mismos, se clonaron en los vectores de expresión para *E. coli* pET28b (Novagen, EMD Millipore, Billerica, MA) o pET29aDEST (elaborado y cedido por el grupo del Dr. Harrold van den Burg).

La región codificante de PCNA de *S. lycopersicum* (SIPCNA) y el ORF de AC1 del begomovirus TGMV (posición 13 hasta el nucleótido 1543 -pasando por el origen; número de acceso al GenBank: NC_001507) se amplificaron a partir de los vectores pCNACT2 y pDBRepTG (Castillo *et al.*, 2004) utilizando las parejas de oligonucleótidos O1/O2 y O3/O4 (**Tabla 6**), respectivamente, y se clonaron en los sitios *NdeI/BamHI* del vector pET28b. De esta forma, se obtuvieron las construcciones pET28b-SIPCNA y pET28b-Rep^{TGMV}.

El marco abierto de lectura del doble mutante de Rep de TGMV que no interacciona con la enzima conjugadora de SUMO, Rep K68/102A, se amplificó por PCR a partir de la construcción pGBAL1-K68/102A (Sánchez-Durán *et al.*, 2011) con el par de cebadores O03/O04, y se clonó en los sitios *NdeI/BamHI* de pET28b. Tal y como se ha descrito anteriormente, el fragmento RBS-6xHis- Rep K68/102A se subclonó en pET28-SIPCNA previamente digerido con *EcoRI* y *XhoI*, obteniéndose pET28-SIPCNA-RepK68/102A.

El ORF del gen AC3 de TGMV (posición 1465 al nucleótido 1067) se amplificó por PCR a partir del vector que contiene el componente A del virus (pNSB1429), para lo que se emplearon los oligonucleótidos O5 y O6 (**Tabla 6**). El fragmento resultante se subclonó en los sitios de restricción *NoI* y *AscI* del vector donador del sistema Gateway pENTRTM/D-TOPO (Invitrogen), obteniéndose pENTR-REn^{TGMV}. Por último, AC3 se transfirió al vector de destino pET29aDEST por recombinación homóloga a través de la tecnología Gateway (reacción LR, Invitrogen), dando lugar a pET29aDEST-REn^{TGMV}.

La construcción pET28b-C2 se generó mediante la amplificación por PCR del ORF de C2 de TYLCSV (posición 1631 al nucleótido 1224; número de acceso al GenBank L27708) con el par de cebadores O7/O8 (**Tabla 6**) y su introducción en los sitios *EcoRI/XhoI* de pET28b.

Los mutantes puntuales de PCNA, resultado de la sustitución de determinadas lisinas por alanina o arginina, se generaron por PCR utilizando pET28b-SIPCNA como sustrato. Las sustituciones aminoacídicas de las lisinas

164, 254 y 190 por alaninas se introdujeron por PCR utilizando el kit Quikchange Lighting Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, Agilent, Santa Clara, California), siguiendo las instrucciones del fabricante, y las parejas de cebadores O9/O10, O11/12 y O15/O16, respectivamente. Los dobles mutantes SIPCNAK164/168A y SIPCNAK164/254A se generaron sobre el mutante simple SIPCNAK164A, y el triple mutante SIPCNA K164/168/254A sobre SIPCNA K164/168A. La mutación K168A se introdujo con la pareja de oligonucleótidos O13/O14, mientras que para K254A se utilizó la mencionada anteriormente, O11/O12 (**Tabla 6**).

Las sustituciones aminoácidas K164R y K254R se introdujeron separadamente en SIPCNA por PCR con el kit NZYMutagenesis (NZYTech), junto a las parejas de oligonucleótidos O17/O18 y O19/O20, respectivamente (**Tabla 6**). El doble mutante SIPCNAK164/254R se generó al introducir la mutación K254R sobre SIPCNAK164R, dando lugar a pET28b-SIPCNAK164/254R.

La fusión transcripcional de *PCNA* de tomate y AC1 de TGMV silvestre o mutante (Rep K68/102A) se generó al introducir el fragmento que contiene el ORF viral con la etiqueta 6xHis y el sitio de unión a ribosoma (*ribosome binding Site*, RBS) (RBS-6xHis-AC1/RBS-6xHis-Rep K68/102A) en el vector pET28b-SIPCNA. Dicho fragmento se obtuvo al digerir pET28b-Rep o pET28b-RepK68/102A con *Xba*I y *Xho*I, y se transfirió a pET28b-SIPCNA previamente digerido con *Eco*RI y *Xho*I. Como los extremos resultantes del corte con *Xba*I y *Eco*RI no son cohesivos, se hicieron romos con el fragmento Klenow de la polimerasa de DNA I antes de digerir con *Xho*I. De este modo, PCNA y AC1 se expresan desde el mismo promotor T7 y se traducen desde un único mRNA policistrónico. El fragmento RBS-6xHis-AC1 también se introdujo en el sitio *Not*I de pGEX-AtCAT3, tras eliminar los extremos 3' protuberantes no compatibles, obteniéndose pGEX-AtCAT3-Rep^{TGMV}. La generación de pGEX-AtCAT3, que expresa el fragmento C-terminal de la catalasa (AtCAT3Ct, nucleótidos 419-472) fusionado a GST (glutación S-transferasa) y Flag, está descrita en Castaño-Miquel *et al.*, 2011.

Los ORFs de AC3 de TGMV y C2 de TYLCSV se clonaron en el vector pET28b-SIPCNA siguiendo la estrategia detallada para AC1, dando lugar a pET28-SIPCNA-C2^{TYLCSV} y pET28-SIPCNA-REn^{TGMV}, respectivamente.

La versión silvestre de la región codificante del gen *SRS2* de *A. thaliana* se amplificó a partir del vector pCAL-n-FLAG-c-His-AtSRS2 (cedido por el Dr. Holger Puchta), empleando los oligonucleótidos O33 y O34 (**Tabla 6**). El fragmento resultante de la PCR se clonó en el vector donador pDONR211 y, finalmente, se transfirió al vector de destino pEt29aDEST a través de la tecnología Gateway, mencionada anteriormente.

Para expresar la proteína SRS2 de *A. thaliana* (AtSRS2) en la cepa de *E. coli* NCM631, se sintetizó una versión optimizada de la región codificante del gen *SRS2* empleando el algoritmo OptimumGene™ (GenScript). De esta forma, se modificaron una variedad de parámetros críticos para la eficiencia de la expresión en la bacteria, entre ellos el sesgo en el uso de codones. Esta nueva versión del gen *SRS2* optimizada para su expresión en *E. coli* (AtSRS2 CO, por *codon optimization*) se amplificó a partir del vector pUC57-AtSRS2-CO, proporcionado por GenScript, usando los oligonucleótidos O35 y O36 y la enzima de alta fidelidad Phusion (Thermo Fisher). A continuación, se clonó en el vector donador pDONR/Zeo por recombinación, bajo la acción de la clonasa II BP (Gateway BP clonase II Enzyme Mix, Invitrogen), y, finalmente, se transfirió al vector de destino pET29aDEST por la enzima clonasa II LR (Invitrogen).

Sistema de sumoilación

El sistema de sumoilación de mamíferos, constituido por los vectores pBADE y pRHSUMO1, fue generado y cedido por Mencía y de Lorenzo (Mencía y de Lorenzo, 2004). El sistema formado por las proteínas de *A. thaliana* se construyó de forma similar al anterior, resultando en dos vectores compatibles que contienen las enzimas activadora y conjugadora de SUMO (pASS1a) y una de las isoformas maduras del péptido modificador (pAtSUMO).

El primer paso para generar pASS1a consistió en la amplificación de los marcos abiertos de lectura de los genes de las enzimas activadora y conjugadora de SUMO, *AtSCE1* (483 pb), *AtSAE1a* (969 pb) y *AtSAE2* (2103 pb) a partir de cDNA de *A. thaliana* silvestre ecotipo Col0 y las parejas de oligonucleótidos O21/O22, O23/O24 y O25/O26, respectivamente. Cada producto se subclonó en pGEM-T *easy* para su secuenciación, y, posteriormente, con el fin de que cada ORF incluyera su propio RBS, se transfirieron al vector de expresión pET28b

previamente digerido con *NcoI/BglII*, *NdeI/BamHI* o *NcoI/SalI* para generar pET28b-AtSCE, pET28b-AtSAE1a y pET28b-AtSAE2, respectivamente. A continuación, los tres ORFs con sus respectivos RBS se reagruparon en pET28b. En primer lugar, el fragmento RBS-*AtSCE1*, obtenido al digerir pET28b-AtSCE con *EcoRI* y *XbaI*, se clonó en el sitio *XbaI* de pET28b-AtSAE2, generando así pETSS. En segundo lugar, pET28b-AtSAE1a se digirió con *XbaI/BamHI* y se introdujo en pETTS previamente digerido con *SalI*, siendo la construcción resultante renombrada pETTS1a. Finalmente, el casete completo se clonó en el vector pACYC184. Dicho vector, con origen de replicación P15A y gen de resistencia a cloranfenicol, se escogió por su compatibilidad con el resto de vectores del ensayo; las dianas del ensayo de sumoilación se clonaron en pET28b (origen *ColE1* y resistencia a kanamicina) y los tres AtSUMOs en pJB866 (RK2 y resistencia a ampicilina). pETSS1a se digirió con *SphI* y *EagI* y el fragmento resultante, una vez generados los extremos romos, se clonó en el pACYC184 previamente abierto con *EcoRV*, obteniéndose finalmente pASS1a.

Las versiones maduras (diGly o GG) de las regiones codificantes de los genes *AtSUMO1*, *AtSUMO2* y *AtSUMO3* se amplificaron a partir de cDNA de *A. thaliana* silvestre usando las parejas de cebadores O27/O28, O29/O30 y O31/O32, respectivamente, y se clonaron en los sitios *NdeI/BamHI* de pET28b. A continuación, el fragmento que contiene el CDS de SUMO fusionado a la etiqueta de histidina 6xHis, obtenido al digerir con las enzimas *XbaI* y *BamHI*, se insertó en el vector pRHSUMO1 previamente abierto con *SphI* y *BamHI* (Mencia y de Lorenzo, 2004). Debido a que el corte con *XbaI* y *SphI* no produce extremos cohesivos, se generaron extremos romos antes de digerir con *BamHI*. De este modo, se sustituyó el gen *SUMO1* de humano (*HsSUMO1*) por *SUMO1*, *SUMO2* o *SUMO3* de *A. thaliana*.

Sistema de ubiquitinación

El sistema de ubiquitinación de *A. thaliana* seleccionado para su expresión en *E. coli* fue generado y cedido por el grupo del Dr. Strzalka (descrito en Strzalka *et al.*, 2013). Este sistema está formado por tres plásmidos diferentes: (1) pACYCDUET-UBA1-RAD5, que contiene la enzima activadora de ubiquitina UBA1 (*ubiquitin activating enzyme 1*) y la ligasa RAD5 (*gamma-radiation hypersensitive 5*); (2) pETDUET-UBC35/pETDUET-UBC35-UEV1A, que incluye la enzima

conjugadora UBC35 (*ubiquitin conjugating enzyme 35*), sola o con la ligasa UEV1A (*ubiquitin E2 variant 1A*, también denominada MMZ1, por MMS ZWEI *homologue 1*), y (3) pCDFDUET-UBQ, que presenta la forma madura del péptido ubiquitina.

Plásmidos utilizados en ensayos en plantas

Ensayo de sumoilación en *N. benthamiana*

El CDS de *SIPCN4* (GenBank ID: NM_001247915, cedido por Keygene N. V, Wageningen, Países Bajos) se amplificó por PCR usando la pareja de oligonucleótidos O37/O38 (**Tabla 6**). El fragmento generado, que contiene *SIPCN4* fusionado a la etiqueta FLAG en su extremo amino, se subclonó en el vector pJL-TRBO (Lindbo, 2007) dando lugar a pTRBO-FlagPCNA. El vector pK7WG2 (Karimi *et al.* 2002), que contiene Rep de *Tomato yellow leaf curl virus-Oman* (TYLCV; Genbank ID: FJ956702.1) fusionado a eGFP, fue también proporcionado por Keygene N.V. Finalmente, el CDS de la forma madura de *SUMO1* de *A. thaliana* (residuos 1-91) clonado previamente en el vector donador pDONR211 (Mazur *et al.*, 2017), se introdujo en el vector de destino pGWB402 mediante una reacción LR (Gateway LR Clonase II reaction (Thermo Fisher) para generar pGWB402-AtSUMO1.

Localización subcelular en *N. benthamiana*

Los vectores que expresan *SIPCN4* silvestre y los mutantes *SIPCN4* K164R, *SIPCN4* K254R y *SIPCN4* K164/254R fusionadas a GFP en su extremo N-terminal se obtuvieron mediante reacción LR, empleando como donador las construcciones generadas en pDONR/Zeo y pGWB6 como vector de destino.

La fusión traduccional de *SIPCN4* con *AtSUMO1* (1-254 aa) (*SIPCN4*K254AtSUMO1ΔGG o, de forma resumida, PCNASUMO) fue sintetizada por GenScript, y se generó al incluir la secuencia de *SUMO1* tras el codón que codifica la lisina 254 de *PCNA*. Dicha secuencia se amplificó por PCR a partir del vector pUC57-PCNASUMO con la pareja de oligonucleótidos O41 y O42 (**Tabla 6**), que contienen los sitios de restricción *NcoI* y *AsaI*, y se clonó en los mismos sitios del vector donador pENTR™/D-TOPO. Finalmente, se transfirió al vector de destino pGWB6 por acción de la enzima clonasa II LR.

Las construcciones que expresan Rep de los begomovirus TGMV y TYLCV -Almería (Número de acceso al Genbank AJ489258) en el vector binario pBINX' han sido descritas previamente en Sánchez-Durán *et al.*, 2011 y la tesis doctoral de Manuel A. Arroyo Mateos (2015).

La región codificante de *AtSRS2* se clonó en los vectores pGWB655 (mRFP en el extremo N-terminal) y pGWB452 (GFP en el extremo N-terminal) (Nakamura *et al.*, 2010) utilizando la tecnología Gateway, con pDONR221-*AtSRS2* como vector donador.

Los vectores pGWB655-Nucleolin, pGWB452-*AtPCNA1* y pGWB442-*AtSUMO1* fueron cedidos por el Dr. Harrold van den Burg.

Complementación fluorescente bimolecular (BiFC)

Los ensayos de BiFC se llevaron a cabo con la colección de vectores Gateway generados por Gehl y colaboradores (Gehl *et al.*, 2009).

La región codificante de la versión silvestre y los mutantes puntuales simples y doble de *PCNA* de tomate, SIPCNA K164R, SIPCNA K254R y SIPCNA K164/254R, se amplificaron a partir de las construcciones en pET28b (pET28b-SIPCNA, pET28b-SIPCNA K164R, pET28b-SIPCNA K254R y pET28b-SIPCNA K164/254R) empleando la pareja de oligonucleótidos O39/O40. Los productos resultantes, que contienen los sitios *attB*, se clonaron a continuación en el vector donador pDONR/Zeo para, finalmente, transferirlos a los vectores de destino pDEST-SCYNE^{GW} y pDEST-SCYCE^{GW} utilizando la tecnología Gateway. La fusión traduccional PCNASUMO se clonó en los mismos vectores de destino por acción de la enzima clonasa II LR, utilizando como donador pENTR-PCNASUMO.

El CDS de *AtSRS2*, clonado en el vector pDONR/Zeo, se introdujo en los vectores de destino pDEST-VYNE^{GW} (mitad N-terminal de Venus [residuos 1-173 aa], referido como Venus^N), pDEST-VYCE^{GW} (mitad C-terminal de Venus [residuos 156-239 aa], Venus^C), pDEST-SCYNE^{GW} (mitad N-terminal de S(CFP)3A [residuos 1-173 aa], referido como SCFP^N) y pDEST-SCYCE^{GW} (mitad C-terminal de S(CFP)3A [residuos 156-239 aa], SCFP^C) por recombinación homóloga, empleando la reacción LR (tecnología Gateway); de este modo, la mitad

N- o C-terminal de las proteínas fluorescentes Venus o SCFP se expresa fusionada al extremo amino de AtSRS2.

El resto de vectores empleados en los ensayos de complementación fluorescente bimolecular (pSCYNE-AtSUMO1GG, pSCYCE-AtSUMO1GG, pSCYNE-AtSUMO1ΔGG, pSCYNE-AtSUMO1SIM, pSCYNE-AtSUMO1ΔGG-SIM, pRep-SCYCE, pSCYCE-AtSIZ1, pSCYCE-AtSCE1) (Mazur *et al.*, 2019) fueron cedidos por el Dr. Harrold van den Burg.

Genotipado de las líneas de *A. thaliana* generadas

Los genotipos mutantes *sum1-1* (línea SAIL_296_C12) y *sum2-1* (SALK_129775) de las plantas seleccionadas por su resistencia a higromicina se confirmaron por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para los extremos 5' y 3' de los genes *SUM1* y *SUM2* (nombrados LP y RP, respectivamente) y para el borde izquierdo del T-DNA (LBb1.3 para las líneas SALK, renombrado en este trabajo LB1, o LB3 para las líneas SAIL, designado como LB2) (**Tabla 6**). Estos oligonucleótidos se combinaron para la amplificación del alelo silvestre LP + RP y el alelo mutante RP + LB.

Todos los oligonucleótidos se diseñaron con la herramienta “T-DNA *Primer Design Tool*” del Salk INstitute Genomic Analysis Laboratory.

Expresión inducible de Rep de geminivirus en *A. thaliana*

Para expresar de forma inducible la proteína Rep de los begomovirus monopartito y bipartito TYLCSV y TGMV, respectivamente, en la línea de *A. thaliana* *His-H89R-SUM1 sum1-1 sum2-1*, ambos ORFs se clonaron de forma independiente en el vector pER8, que contiene un promotor inducible por β -estradiol (Brand *et al.*, 2006; Zuo *et al.*, 2000). De esta forma, se generaron los plásmidos pER8-Rep^{TYLCSV} (Edgar Rodríguez-Negrete, no publicado) y pER8-Rep^{TGMV} (Manuel A. Arroyo-Mateos, 2015).

ENSAYOS EN BACTERIAS

Ensayo de sumoilación con el sistema reconstituido en *E. coli*

El ensayo de sumoilación de SIPCNA, así como el de la interferencia en dicha modificación postraducciona de Rep y REn, se llevaron a cabo según se describe en Mencía y de Lorenzo, 2004, con algunas modificaciones. Las células de *E. coli* de la cepa NCM631 se transformaron por choque térmico con el set apropiado de plásmidos (dianas potenciales, elementos virales, enzimas de sumoilación y SUMOs), incluyendo los antibióticos apropiados en cada caso (50 µg/mL de kanamicina, 25µg/mL de cloranfenicol y/o 100 µg/mL de ampicilina). La expresión de las distintas proteínas se indujo añadiendo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM a los cultivos en fase exponencial de crecimiento (densidad óptica a 600 nm [DO₆₀₀] entre 0.8 y 1). Los cultivos se mantuvieron durante 4 horas a 37°C y en constante agitación, tras lo cual se realizó la extracción de proteínas totales y su análisis por *western blot*.

Ensayo de ubiquitinación con el sistema reconstituido en *E. coli*

El ensayo de ubiquitinación en *E. coli* se llevó a cabo de forma similar al descrito para la sumoilación con algunas modificaciones. Todos los cultivos se incubaron durante 15 horas a 20°C una vez añadido el IPTG (C_f: 1 mM) y suplementados con los antibióticos correspondientes (50 µg/mL de kanamicina, 25µg/mL de cloranfenicol, 100 µg/mL de ampicilina y/o 100 µg/mL de espectinomicina). Los extractos de proteínas totales se analizaron por *western blot*.

Ensayo de expresión de AtSRS2 en *E. coli*

Las pruebas de expresión de AtSRS2 y AtSRS2 CO en *E. coli* se llevaron a cabo de forma similar a los ensayos de sumoilación y ubiquitinación, con algunas modificaciones. Una vez alcanzada una DO₆₀₀ entre 0,8 y 1, el cultivo bacteriano se dividió en dos, añadiendo IPTG 1 mM a uno de ellos (I) y manteniendo el otro como control negativo de la expresión (NI). A continuación, estos se incubaron a 37°C durante 4 horas o a 16°C durante 6 o 20 horas. Transcurrido este tiempo, se realizó la extracción de proteínas como se describe a continuación y se comprobó

la expresión de AtSRS2 y AtSRS2 CO por electroforesis SDS-PAGE y la posterior tinción del gel de poliacrilamida (6%) con azul de Coomassie.

Extracción de proteínas de *E. coli*

La extracción de proteínas totales de los cultivos de *E. coli* se realizó a partir de un volumen equivalente a 2 mL a $DO_{600} = 2$. Cada muestra se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto, y se resuspendió en 200 μ l de tampón Laemmli 2x (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% [p/v] SDS, 20% [v/v] glicerol, 2% [v/v] β -mercaptoetanol y 0.01% [p/v] azul de bromofenol). Tras ello, cada extracto se sonicó en un baño de agua durante 15 minutos, se incubó 10 minutos a 96 °C y se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos. Finalmente, los extractos de proteínas totales se guardaron a -80°C o se analizaron directamente por *western blot*.

ENSAYOS EN PLANTAS

Ensayo de sumoilación en *N. benthamiana*

Las construcciones pTRBO-FlagPCNA, pK7WG2-Rep, pGWB402-AtSUMO1 y pBIN61-P19 TBSV (*Tomato bushy stunt virus*) (Voinnet *et al.*, 2003) se transformaron independientemente por electroporación en la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*. A los 2 días, se aislaron colonias de cada transformación y se cultivaron en medio LB bajo en sales (1% p/v triptona, 0,5% p/v extracto de levaduras, 0,25% p/v NaCl [pH 7.0]) suplementado con los antibióticos correspondientes, 20 μ M de acetosiringona y 10 mM de MES (ácido 2 [N-morfolino]-etanosulfónico; pH= 5.6), a 28°C y con agitación constante. Al día siguiente, las células se centrifugaron y resuspendieron en medio de agroinfiltración (1 X MS [Murashige and Skoog; Duchefa], 10 mM MES [pH 5.6], 2% [p/v] sacarosa, 200 μ M acetosiringona). Los diferentes cultivos se mezclaron entonces en una proporción 1:1:1, manteniendo una DO_{600} final de 1, y se coinfiltraron en hojas de *N. benthamiana* de 2 semanas de edad (en la mezcla sin Rep, pK7KWG2-Rep se sustituyó por un cultivo que contenía el vector pGWB451 vacío). En todas las mezclas se añadió el supresor del silenciamiento P19 del TBSV a una DO_{600} final de 0.5. Transcurridos 3 días, se recogieron las hojas completas y se dispusieron

sobre papel húmedo en una placa de Petri, donde se incubaron durante 45 minutos en un baño a 37°C. Finalmente, se congeló todo el tejido vegetal en nitrógeno líquido y se guardó hasta la extracción de proteínas y su análisis por *western blot*.

Expresión transitoria de proteínas en *N. benthamiana*: localización subcelular y ensayos de complementación fluorescente bimolecular (BiFC)

Las cepas de *A. tumefaciens* GV3101 y C58C1 se transformaron por electroporación con los plásmidos correspondientes, incluyendo pBIN61-P19 TBSV en los ensayos en los que se incluyó AtSRS2. Para la expresión de PCNA y sus distintas versiones, así como de PCNA silvestre y Rep de los virus TYLCV y TGMV, se empleó la cepa GV3101, mientras que en los ensayos de BiFC y la localización subcelular de AtSRS2 se utilizó la cepa C58C1. Colonias independientes de cada transformación se cultivaron durante la noche en medio LB suplementado con rifampicina (50 µg/mL) y el antibiótico de selección apropiado. Al día siguiente, las células se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos, y el precipitado resultante se resuspendió en una solución de agroinfiltración (10 mM MES, pH 5.6, 10 mM MgCl₂ y 1 mM acetosiringona), y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y condiciones de oscuridad. La agroinfiltración de las diferentes soluciones de cultivos se llevó a cabo en la cara abaxial de hojas de *N. benthamiana* de 4-5 semanas de edad, con una jeringa de 1 mL desprovista de punta, manteniendo siempre la densidad óptica final de las células igual a 1. Para ello, en las coinfiltraciones, cada cultivo se preparó y mezcló a una DO₆₀₀ final de 0,5, o 0,4 en caso de incluir P19, que se mantuvo a una DO₆₀₀ de 0,2. En los ensayos en los que participaron tres construcciones, cada cepa de *Agrobacterium* se agregó a una DO₆₀₀ de 0,26, y P19 a 0,2. En los casos requeridos, se incluyó una solución de agrobacterias transformadas con un vector vacío para obtener una DO₆₀₀ total de 1. Tras la infiltración, las plantas se mantuvieron en una cámara a una temperatura controlada de 22°C y fotoperiodo de día largo, y se analizaron a las 48-72 horas por microscopía confocal y *western blot*.

En los ensayos de localización de PCNA y sus distintas versiones, así como de PCNA y Rep, se contabilizaron los núcleos de 8-10 células, que se clasificaron según el número de cuerpos nucleares observados.

En los ensayos de BiFC, las hojas se observaron bajo microscopía confocal 2 y 3 días tras la infiltración. La acumulación de las distintas proteínas se analizó por *western blot*.

Extracción de proteínas a partir de tejido vegetal

Para extraer la fracción total de proteínas a partir del tejido foliar agroinfiltrado de *N. benthamiana*, se tomaron ocho discos de 6 mm de diámetro (100 mg aproximadamente) y se trituraron con nitrógeno líquido. A este tejido se añadieron 200 µL de tampón Laemmli 2x y se homogeneizó con vórtex. Los extractos resultantes se incubaron durante 10 minutos a 96°C y se centrifugaron a máxima velocidad (14.000 rpm y 4°C) durante 5 minutos. Finalmente, éstos se guardaron a -80°C o se analizaron directamente por *western blot*.

Western blot

Los extractos de proteínas se analizaron por electroforesis SDS-PAGE, resolviéndose en geles de poliacrilamida del 10-12%, o del 6% en el caso de los extractos procedentes de células que habían sobreexpresado AtSRS2, y se transfirieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno) (Immobilon-P, Millipore) empleando el Trans-blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante (protocolos preprogramados y optimizados para el peso molecular de las proteínas de interés). Las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (1xTBS con un 5% de leche), durante toda la noche y a temperatura ambiente, y posteriormente se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios (2 h) y secundarios (1 h), estos últimos conjugados a la enzima HRP (*horseradish peroxidase*). Los anticuerpos y la dilución usadas en este trabajo se indican en la **tabla 6**. Las diferentes proteínas de interés se detectaron por quimioluminiscencia utilizando el sistema Clarity Western ECL Substrate (BioRad) y, en caso de requerir una mayor sensibilidad, el SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los geles de poliacrilamida y las membranas de PVDF se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue R250 para confirmar la misma carga entre las diferentes muestras.

Microscopía confocal

La fluorescencia de GFP, RFP, SCFP y Venus fusionadas a las proteínas de interés (ensayos de localización subcelular y BiFC) se visualizó en células de la epidermis de la cara abaxial de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con un microscopio confocal, 2 y 3 días después de la infiltración.

En ambos ensayos se utilizaron los microscopios con escáner laser Zeiss LSM 510 o Zeiss LSM 880 con fast Airscan, equipados con láser de argón y de helio-neón. La longitud de onda usada para la excitación de las diferentes proteínas fluorescentes fue: 458 nm (SCFP), 488 nm (GFP y quimera Venus-SCFP) y 514 nm (Venus) y 543 nm (RFP). Cada experimento se repitió al menos dos veces y se muestra una imagen representativa. Las imágenes fueron analizadas y procesadas con el programa ImageJ Fiji 1.51v.

Tabla 6. Anticuerpos usados en este trabajo.

Anticuerpo	Referencia
αPCNA	Hoege <i>et al.</i> , 2002
αHis	Biomedal (AB-3237)
αSUMO	Abcam (ab5316)
αAtSUMO1/2	Universidad de Amsterdam
αRep^{TGMV}	Sánchez-Durán <i>et al.</i> , 2011
αFLAG	Sigma-Aldrich (F7425)
αGFP	Chromotek (3H9)
αT7	Novagen (69522)

Expresión de C1 y AC1 en *A. thaliana*

Una vez seleccionadas, esterilizadas y estratificadas, las semillas de las líneas generadas y los correspondientes controles se sembraron en placas de Petri con medio MS suplementado con higromicina (40 μ g/mL), y se mantuvieron a 22°C y fotoperiodo de día corto. A los 10 días, se transfirieron 20 plántulas de cada línea a matraces de 100 ml que contenían 20 ml de medio MS líquido suplementado con β -estradiol a 0,2 μ M o DMSO (control negativo), que se incubaron en las mismas condiciones anteriores y agitación constante durante 24, 48 o 72 horas. En los ensayos en los que se mantuvieron los niveles de β -estradiol, éste se añadió de nuevo a las 24 y 48 horas. A los tres tiempos establecidos, se recogieron y

congelaron en nitrógeno líquido las 20 plántulas de cada matraz para el posterior análisis por PCR cuantitativa de la expresión de Rep.

Extracción de RNA

La extracción de RNA total se llevó a cabo a partir de las 20 plántulas de 10 días por línea de *A. thaliana* y condición experimental (100 mg aproximadamente). Una vez homogeneizado el tejido con nitrógeno líquido, se añadieron 400 µL de tampón de extracción (100 mM LiCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA y 1% SDS), 400 µL de fenol básico (pH: 8) y 400 µL de cloroformo. A continuación, la mezcla se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos y a temperatura ambiente. Tras ello, se recogió el sobrenadante, se mezcló con 1/3 del volumen de LiCl 8M y se mantuvo a 4°C durante toda la noche. Tras este período de incubación, se volvió a centrifugar a 13.000 rpm y 4°C durante 15 minutos. El precipitado resultante se resuspendió en 200 µL de agua libre de RNAsa y se añadieron 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M (pH: 5.2) y 2,5 volúmenes de etanol 100%, que se incubaron a -20°C. A continuación, se centrifugó de nuevo a 13.000 rpm y 4°C durante 15 minutos, resuspendiendo el precipitado en 1 mL de etanol 70%. Tras una nueva centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 20 µL de agua libre de nucleasas, tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) (Carl Roth). Del RNA extraído, 5-7 µg se trataron con DNAsa (RNase free Turbo DNaseI, Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante, que se precipitaron a continuación con fenol/cloroformo. Finalmente, la calidad y la concentración del RNA total de cada muestra se determinó con el espectrofotómetro Nanodrop 8000 (Thermo Fisher).

Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA, se usaron 500 ng del RNA ya tratado y limpio. Se empleó el iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad) y se siguieron las instrucciones detalladas por el fabricante.

Para confirmar la ausencia de DNA contaminante antes de la síntesis de cDNA, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando la pareja de

oligonucleótidos O43 y O44, que amplifican un fragmento del gen actina de *Arabidopsis* (*AtActin*).

PCR cuantitativa (qPCR)

La medición de los niveles de expresión de los genes de interés se llevó a cabo por PCR cuantitativa (qRT-PCR, de *real-time quantitative reverse transcription* PCR). Para ello, se usaron 10 ng de cDNA. La mezcla de reacción para cada muestra se preparó con 2 µL de molde, 1 µL de la mezcla de oligonucleótidos (10 µM) y 5 µL de SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) en un volumen final de 10 µL. Los oligonucleótidos empleados se detallan en la **tabla 6**. La reacción fue llevada a cabo usando el termociclador CFX96 T0cuh Real-Time PCR Detection System instrument (Bio-Rad), y las condiciones establecidas fueron las estándares: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 10 segundos a 60°C. Por cada muestra se realizaron 3 réplicas técnicas. El valor final obtenido para cada muestra por el método de cuantificación relativa basado en la comparación de valores Ct (*threshold cycle*) para las secuencias de interés, normalizadas respecto a un gen endógeno como control interno (en este caso, el gen actina de *Arabidopsis*) y en relación a una muestra de referencia (calibrador), o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Extracción de DNA genómico de plantas

La extracción de DNA genómico de las plántulas de *Arabidopsis* se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en Edwards *et al.*, 1991, con algunas modificaciones: 1) una vez precipitado el DNA genómico con isopropanol, se añadió un siguiente paso de lavado con 500 µl de etanol al 70%, y 2) tras la última centrifugación, el precipitado se dejó secar al aire, sin aplicar vacío.

Tabla 4. Lista de vectores utilizados en esta tesis doctoral.

Construcción	Vector	Inserto	Referencia
pCNACT2	pACT2	<i>SIPCN4</i>	Castillo <i>et al.</i> , 2003
pDBRepTG	pBD-GAL4	AC1 de TGMV	Castillo <i>et al.</i> , 2004
pGBAL1-K68/102A	pGBKT7	Rep K68/102A	Sánchez-Durán <i>et al.</i> , 2011
pGEX-AtCAT3	pGEX	<i>AtCAT3</i>	Castaño-Miquel <i>et al.</i> , 2011
pET28b-SIPCNA	pET28b	<i>SIPCNA</i>	Este trabajo
pET28b-Rep ^{TGMV}	pET28b	AC1 de TGMV	Este trabajo
pET28b-Rep K68/102A	pET28b	Rep K68/102A	Manuel A. Arroyo-Mateos, 2015
pENTR-REN ^{TGMV}	pENTR TM / DTPPO	AC3 de TGMV	Este trabajo
pET29aDEST-REN ^{TGMV}	pET29aDEST	AC3 de TGMV	Este trabajo
pET28b-C2	pET28b	C2 de TYLCSV	Este trabajo
pET28b-SIPCNA-Rep ^{TGMV}	pET28b	<i>SIPCNA</i> y AC1 de TGMV	Este trabajo
pET28b-SIPCNA-REN ^{TGMV}	pET28b	<i>SIPCNA</i> y AC3 de TGMV	Este trabajo
pET28b-SIPCNA-C2 ^{TYLCSV}	pET28b	<i>SIPCNA</i> y C2 de TYLCSV	Este trabajo
pGEX-AtCAT3-Rep ^{TGMV}	pGEX	<i>AtCAT3</i> y AC1 de TGMV	Este trabajo
pET28b-SIPCNA K164A	pET28b	SIPCNA K164A	Este trabajo
pET28b-SIPCNA K254A	pET28b	SIPCNA K254A	Este trabajo
pET28b-SIPCNA K190A	pET28b	SIPCNA K190A	Este trabajo
pET28b-SIPCNA K164/168A	pET28b	SIPCNA K164/168A	Este trabajo
pET28b-SIPCNA K164/254A	pET28b	SIPCNA K164/254A	Este trabajo
pET28b-SIPCNA K164/168/254A	pET28b	SIPCNA K164/254A	Este trabajo
pET28b-SIPCNA K164R	pET28b	SIPCNA K164R	Este trabajo
pET28b-SIPCNA K254R	pET28b	SIPCNA K254R	Este trabajo

pET28b-SIPCNA K164/254R	pET28b	SIPCNA K164/254R	Este trabajo
pBADE	pBAD33	<i>HsAos1</i> , <i>HsUba2</i> y <i>MsUbc9</i>	Mencía y de Lorenzo, 2004
pRHSUMO	pJB866	<i>HsSUMO1</i>	Mencía y de Lorenzo, 2004
pGAtSCE	pGEM-T	<i>AtSCE1</i>	Este trabajo
pGAtSAE1a	pGEM-T	<i>AtSAE1a</i>	Este trabajo
pGAtSAE2	pGEM-T	<i>AtSAE2</i>	Este trabajo
pEt28b-AtSCE1	pET28b	<i>AtSCE1</i>	Este trabajo
pET28b-AtSAE1a	pET28b	<i>AtSAE1a</i>	Este trabajo
pET28b-AtSAE2	pET28b	<i>AtSAE2</i>	Este trabajo
pETSS	pET28b	<i>AtSCE1</i> y <i>AtSAE2</i>	Este trabajo
pETTS1a	pET28b	<i>AtSCE1</i> , <i>AtSAE2</i> y <i>AtSAE1a</i>	Este trabajo
pASS1a	pACYC184	<i>AtSCE1</i> , <i>AtSAE2</i> y <i>AtSAE1a</i>	Este trabajo
pET28b-AtSUMO1	pET28b	<i>AtSUMO1</i>	Este trabajo
pET28b-AtSUMO2	pET28b	<i>AtSUMO2</i>	Este trabajo
pET28b-AtSUMO3	pET28b	<i>AtSUMO3</i>	Este trabajo
pRHAtSUMO1	pJB866	<i>AtSUMO1</i>	Este trabajo
pRHAtSUMO2	pJB866	<i>AtSUMO2</i>	Este trabajo
pRHAtSUMO3	pJB866	<i>AtSUMO3</i>	Este trabajo
pCAL-n-FLAG-c-His-AtSRS2	pCAL	<i>AtSRS2</i>	Cedido por el Dr. Holger Puchta
pDONR211-AtSRS2	pDONR211	<i>AtSRS2</i>	Este trabajo
pUC57-AtSRS2CO	pUC57	<i>AtSRS2</i> CO	Este trabajo
pDONRZeo-AtSRS2CO	pDONR/Zeo	<i>AtSRS2</i> CO	Este trabajo
pET29aDEST-AtSRS2	pET29aDEST	<i>AtSRS2</i>	Este trabajo
pET29aDEST-AtSRS2CO	pET29aDEST	<i>AtSRS2</i> CO	Este trabajo
pACYCDUET-UBA1-RAD5	pACYCDUET-1	<i>AtUBA1</i> y <i>AtRAD5</i>	Strzalka <i>et al.</i> , 2013
pETDUET-UBC35	pETDUET-1	<i>AtUBC35</i>	Strzalka <i>et al.</i> , 2013
pETDUET-UBC35-UEV1A	pETDUET-1	<i>AtUBC35</i> y <i>AtUEV1a</i>	Strzalka <i>et al.</i> , 2013

pCDFDUET-UBQ	pCDFDUET-1	<i>AtUBQ</i>	Strzalka <i>et al.</i> , 2013
pTRBO-FlagPCNA	pJL-TRBO	<i>SIPCN4</i>	Este trabajo
pK7WG2-Rep^{TYLCV}	pK7WG2	C1 de TYLCV	Cedido por Keygene N.V.
pDONR211-AtSUMO1	pDONR211	<i>AtSUMO1</i>	Este trabajo
pGWB402-AtSUMO1	pGWB402	<i>AtSUMO1</i>	Este trabajo
pBIN61-P19	pBIN61	<i>P19</i>	Voinnet <i>et al.</i> , 2003
pTRBO-FlagPCNA	pTRBO	<i>SIPCN4</i>	Este trabajo
pDONRZeo-SIPCN4	pDONR/Zeo	<i>SIPCN4</i>	Este trabajo
pDONRZeo-SIPCN4 K164R	pDONR/Zeo	SIPCN4 K164R	Este trabajo
pDONRZeo-SIPCN4 K254R	pDONR/Zeo	SIPCN4 K254R	Este trabajo
pDONRZeo-SIPCN4 K164/254R	pDONR/Zeo	SIPCN4 K164/254R	Este trabajo
pGWB6-SIPCN4	pGWB6	<i>SIPCN4</i>	Este trabajo
pGWB6-SIPCN4 K164R	pGWB6	SIPCN4 K164R	Este trabajo
pGWB6-SIPCN4 K254R	pGWB6	SIPCN4 K254R	Este trabajo
pGWB6-SIPCN4 K164/254R	pGWB6	SIPCN4 K164/254R	Este trabajo
pUC57-PCNASUMO	pUC57	SIPCN4K254 <i>AtSUMO1ΔGG</i>	Este trabajo
pENTR-PCNASUMO	pENTR TM / DTPPO	SIPCN4K254 <i>AtSUMO1ΔGG</i>	Este trabajo
pGWB6-PCNASUMO	pGWB6	SIPCN4K254 <i>AtSUMO1ΔGG</i>	Este trabajo
pBINX'-Rep TGMV	pBINX'	AL1 de TGMV	Sánchez-Durán <i>et al.</i> , 2011
pBINX'-Rep TYLCV	pBINX'	C1 de TYLCV	Tesis de Manuel A. Arroyo-Mateos, 2015
pGWB655-AtSRS2	pGWB655	<i>AtSRS2</i>	Este trabajo
pGWB452-AtSRS2	pGWB452	<i>AtSRS2</i>	Este trabajo
pGWB655-Nucleolin	pGWB655	<i>Nucleolin</i>	Cedido por el Dr. Harrold van den Burg

pGW452-AtPCNA1	pGW452	<i>AtPCNA1</i>	Cedido por el Dr. Harrold van den Burg
pGW442-AtSUMO1	pGW442	<i>AtSUMO1</i>	Cedido por el Dr. Harrold van den Burg
pSCYNE-SIPCNA	pDEST-SCYNE ^{GW}	SIPCNA	Este trabajo
pSCYNE-SIPCNA K164R	pDEST-SCYNE ^{GW}	SIPCNA K164R	Este trabajo
pSCYNE-SIPCNA K254R	pDEST-SCYNE ^{GW}	SIPCNA K254R	Este trabajo
pSCYNE-SIPCNA K164/254R	pDEST-SCYNE ^{GW}	SIPCNA K164/254R	Este trabajo
pSCYNE-SIPCNASUMOΔGG	pDEST-SCYNE ^{GW}	SIPCNAK254 AtSUMO1ΔGG	Este trabajo
pSCYCE-SIPCNA	pDEST-SCYCE ^{GW}	SIPCNA	Este trabajo
pSCYCE-SIPCNA K164R	pDEST-SCYCE ^{GW}	SIPCNA K164R	Este trabajo
pSCYCE-SIPCNA K254R	pDEST-SCYCE ^{GW}	SIPCNA K254R	Este trabajo
pSCYCE-SIPCNA K164/254R	pDEST-SCYCE ^{GW}	SIPCNA K164/254R	Este trabajo
pSCYCE-SIPCNASUMOΔGG	pDEST-SCYCE ^{GW}	SIPCNAK254 AtSUMO1ΔGG	Este trabajo
pSCYNE-AtSUMO1	pDEST-SCYNE ^{GW}	<i>AtSUMO1</i>	Mazur <i>et al.</i> , 2019
pSCYCE-AtSUMO1	pDEST-SCYCE ^{GW}	<i>AtSUMO1</i>	Mazur <i>et al.</i> , 2019
pSCYNE-AtSUMO1ΔGG	pDEST-SCYNE ^{GW}	AtSUMO1ΔGG	Mazur <i>et al.</i> , 2019
pSCYNE-AtSUMO1SIM	pDEST-SCYNE ^{GW}	AtSUMO1F32A/I34A	Mazur <i>et al.</i> , 2019
pSCYNE-AtSUMO1ΔGG SIM	pDEST-SCYNE ^{GW}	AtSUMO1ΔGG F32A/I34A	Mazur <i>et al.</i> , 2019
pRep^{TYLCV}-SCYCE	pDEST-GWSCYCE	C1 de TYLCV	Maio <i>et al.</i> , 2019

pSCYCE-AtSCE1	pDEST- SCYCE ^{GW}	<i>AtSCE1</i>	Mazur <i>et al.</i> , 2019
pSCYCE-AtSIZ1	pDEST- SCYCE ^{GW}	<i>AtSIZ1</i>	Mazur <i>et al.</i> , 2019
pVYNE-AtSRS2	pDEST-VYNE ^{GW}	<i>AtSRS2</i>	Este trabajo
pVYCE-AtSRS2	pDEST-VYCE ^{GW}	<i>AtSRS2</i>	Este trabajo
pSCYNE-AtSRS2	pDEST- SCYNE ^{GW}	<i>AtSRS2</i>	Este trabajo
pSCYCE-AtSRS2	pDEST- SCYCE ^{GW}	<i>AtSRS2</i>	Este trabajo
pER8-Rep^{TGMV}	pER8	AC1 de TGMV	Tesis de Manuel A. Arroyo-Mateos, 2015
pER8-Rep^{TYLCV}	pER8	C1 de TYLCV	Edgar Rodríguez Negrete (no publicado)

Tabla 5. Lista de oligonucleótidos usada en este trabajo.

Nº	Nombre	Secuencia (5'-3')
O1	O5 Le PCNA exp	CCCATATGTTGGAACCTACGTCTTGTTCAG
O2	O3 Le PCNA exp	AAGGATCCTCAAGGCTTGGTTTC
O3	AL1 Fw NdeI	CCCATATGCCATCGCATCC
O4	AL1 Rv BamHI	AAGGATCCTTAGCTGCTCTGTGTGA
O5	AL3 Fw NotI	AAGCGGCCGCCATGGATTACGCACAGGG
O6	AL3 Fw AscI	AAGGCGCGCCCTTAATAAAAATTATATTATTATTGAATGATTTTCG
O7	C2 Fw EcoRI	GGGCCGAATTCATGCAATCTTCGTCACC
O8	C2 Rv XhoI	ACCTCGAGCCTAAAGACTCTTAAAAAATG
O9	SIPCNAK164AFw	GATACAGTTGGTTATTTTCGGTGACTgcgGAAGGTGTG
O10	SIPCNAK164ARv	CACACCTTCcgAGTCACCGAAATAACAACCTGTATC
O11	SIPCNAK254AFw	CCTGGCACCTgcaATAGAAGAGGATG
O12	SIPCNAK254ARv	CCTCTTCTATtgcAGGTGCCAGG
O13	SIPCNAK164/168A Fw	ACTgcgGAAGGTGTGgcaTTCTCAACCAGAGGT
O14	SIPCNAK164/168A Rv	ACCTCTGGTTGAGAAtgccCACACCTTCcgAGT
O15	SIPCNAK190A Fw	CAACTGTTGACGCGCCTGAAGAAGCC
O16	SIPCNAK190A Rv	GGCTTCTTCAGGCGCGTCAACAGTTG
O17	K164RFw	TTTCGGTGACTCGGGAAGGTGTGAA
O18	K164RRv	TTTACACCTTCCCGAGTCACCGAAA
O19	K254RFw	ACCTGGCACCTCGGATAGAAGAGGA
O20	K254RRv	TCCTCTTCTATCCGAGGTGCCAGGT
O21	AtSCE1FwNcoI	CCATGGCTAGTGGAATCGCTCG
O22	AtSCE1RvBglII	AGAGATCTTTAGACAAGAGCAGG
O23	AtSAE1aFwNdeI	CATATGGACGGAGAAGAGCTTACC
O24	AtSAE1aRvBamHI	GGATCCTTAAGAGGTAAAAGAGTCGG
O25	AtSAE2FwNcoI	AACCATGGCTACGCAACAACAGC)
O26	AtSAE2RvSalI	GGGTGACCTATTTCAACTCTTATCTTC)
O27	AtSUMO1 Fw	AACATATGTCTGCAAACCAGG
O28	AtSUMO1 Rv	AAGGATCCTCAGCCACCAGTCTGATG
O29	AtSUMO2 Fw	AACATATGTCTGCTACT CCGG
O30	AtSUMO2 Fw	AGGGATCCCTAACCACCAGTCTGAT G
O31	AtSUMO3 Fw	AACATATGTCTAACCCTCAAG
O32	AtSUMO3 Rv	AGGGATCCTTAACCACCACTCATCGC

O33	AtSRS2wt GW attB1	GGGGACAAGT [*] TTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGA GAATCTCCCA
O34	AtSRS2wt GW attB2	GGGGACCACTTTTGTACAAGAAAGCTGGGT [*] TCAGAG TGATTTGTACTGT
O35	AtSRS2CO GW_attB1	GGGGACAAGT [*] TTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGA GAACCTGCCG
O36	AtSRS2CO GW attB2	GGGGACCACTTTTGTACAAGAAAGCTGGGT [*] TTACAG GCTTTTATACTGC
O37	FP5751	AAAATTAATTAAATGGACTACAAGGACGACGATGAC AAAGTCAAGCTTCTCGAGAATTCC [*] TTGGAAC [*] TACGTC TTGTTCA
O38	FP6068	AAAAGCGGCCGCCTAAAGGCTTGGTTTCCTCTT CATCC
O39	SIPCNA GW_attB1	GGGGACAAGT [*] TTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGT [*] T GGAAC [*] TACGTC
O40	SIPCNA GW_attB2	AAAAAAGCAGGCTTCATGTTGGAAC [*] TACGTC
O41	SIPCNA NotI Fw	AAGCGGCCGCCATGTTGGAAC [*] TACGTCTTGTTC
O42	AtSUMO1ΔGG AscI Rv	AAGGCGCGCCCTCAAGTCTGATGGAGC
O43	Actina At Fw	GGCAAGTCATCACGATTGG
O44	Actina At Rv	CAGCTTCCATTCCCACAAAC
O45	earn 108_C4TG-Fw	GAAGATGGGCAACCTCACCTC
O46	earn 109_C4TG-Rv	TGCTGCAGCGTCGTTAGATGT
O47	earn 102_C4TS-Fw	TCCCCAACCAGATCAGCACAT
O48	earn 103_C4TS-Rv	TTGGCGTAAGCGTCATTGG
LP1	LP Sum1-1	TTTCGTGTAGCTGCGATTAGG
RP1	RP Sum1-1	TTATCTTTGCTCGCCATTAGC
BP1	LBb1.3 SALK	ATTTTGCCGATTTCGGAAC
LP2	LP Sum2-1	GTCGGAGAATCGGATTCTTC
RP2	RP Sum2-1	TGAGGGTGTGTATTGGTGGAG
BP2	LB3	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC

RESULTADOS 1

Análisis de la interferencia de las proteínas de los geminivirus implicadas en su replicación con las modificaciones postraduccionales de PCNA de tomate

En este capítulo se incluyen algunos resultados obtenidos por los Drs. Miguel Ángel Sánchez Durán y Manuel A. Arroyo Mateos, incluidos en sus respectivas tesis doctorales. Estos resultados, junto a parte de los presentados en este trabajo, se han recogido en un artículo publicado bajo el título: *Geminivirus Replication Protein Impairs SUMO Conjugation of Proliferating Cellular Nuclear Antigen at Two Acceptor Sites* (Arroyo-Mateos *et al.*, 2018).

Rep reduce la sumoilación de PCNA

La expresión ectópica de la proteína viral esencial para la replicación, Rep, altera la sumoilación de proteínas específicas de la planta (Sánchez-Durán *et al.*, 2011). Aunque la determinación del número e identidad de estas dianas requiere un análisis proteómico exhaustivo, se plantearon como posibles candidatas aquellas proteínas del hospedador que se sumoilen e interaccionen con Rep. Una de las que reúne ambos requisitos es PCNA, para la que se ha descrito la conjugación de SUMO a los homólogos de levaduras, *X. laevis*, mamíferos y *Arabidopsis* (Arakawa *et al.*, 2006; Elrouby *et al.*, 2012; Gali *et al.*, 2012; Hoege *et al.*, 2002; Leach y Michael, 2005; Moldovan *et al.*, 2012; Strzalka *et al.*, 2012) y la interacción con Rep de varios begomovirus de las proteínas de *Nicotiana tabacum* y tomate (Bagewadi *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2003).

La sumoilación de PCNA1 y PCNA2 de *Arabidopsis* (AtPCNA1 y AtPCNA2) se describió a partir de ensayos en células de *E. coli* que expresaban los componentes de la ruta de sumoilación (Elrouby *et al.*, 2010; Strzalka *et al.*, 2012). Para evaluar si PCNA de tomate (denominado en adelante como SIPCNA o PCNA) también se sumoila y, además, si Rep interfiere con dicha modificación postraducciona, se siguió una estrategia similar. En este caso, se empleó el sistema de sumoilación de mamíferos desarrollado por Mencía y de Lorenzo (2004), en el que los genes involucrados en dicha ruta, las enzimas activadoras E1 (SAE1/2) de humanos, *HsAos1/HsUba2*, la conjugadora E2 (SCE) de ratón, *MmUbc9*, la forma madura de SUMO1 de humano, *HsSUMO1*, y la proteína diana, se expresan a partir de un sistema inducible basado en promotores T7. Al incluir el péptido SUMO maduro, que contiene los dos residuos de Gly en el extremo C-terminal, no se requiere la escisión proteolítica del péptido y, por tanto, la expresión de proteasas de SUMO. En este sistema, *HsAos1*, *HsSUMO1* y la proteína diana están fusionados a una etiqueta de histidina para facilitar su detección. Los ensayos de sumoilación se llevaron a cabo en células de *E. coli* (cepa NCM631, derivada de BL21) cotransformadas con los tres plásmidos compatibles, de modo que se expresan simultáneamente las enzimas activadoras y la conjugadora desde un mRNA policistrónico (plásmido 1), SUMO (plásmido 2) y la proteína diana PCNA de tomate o, alternativamente, PCNA y Rep desde un mRNA policistrónico (plásmido 3). Tras inducir la expresión de proteínas en las células que reunían los

plásmidos adecuados, los extractos de proteínas totales se analizaron mediante *western blot*, empleando los anticuerpos anti-PCNA, anti-SUMO, anti-His y anti-Rep de TGMV (**Figura 19**). En todos los extractos que incluían PCNA se detectó una doble banda del tamaño esperado para dicha proteína (~ 37 KDa) al incubarse con el anticuerpo anti-PCNA (**Figura 19, calle 1**). En aquellos procedentes de células que también expresaban la maquinaria completa de sumoilación y SUMO (E1/E2 y SUMO) se detectó una doble banda adicional de 55 KDa aproximadamente (**Figura 19, calle 5**), que no estaba presente en los extractos que no incluían SUMO (**Figura 19, calle 4**). Para confirmar que la misma correspondía a PCNA-SUMO, ya que su tamaño se ajusta al esperado para la diana monosumoilada, se repitió el *western blot* incubando la membrana con anticuerpos anti-SUMO y anti-His. En ambos casos, se observó la misma doble banda, lo que corroboró que se trataba de PCNA conjugado a un péptido SUMO, de modo que cada banda correspondería a una molécula de PCNA-1xSUMO. Las bandas extras observadas en las membranas incubadas con los anticuerpos anti-SUMO y anti-His corresponden a aquellas descritas previamente como SUMO libre y cadenas de SUMO (dímero, trímero y tetramero) (Mencia y de Lorenzo, 2004) (**Figura 19, calles 5 y 6**). Este resultado indica que PCNA de tomate se sumoila, tal y como se ha descrito para los homólogos citados anteriormente.

Una vez confirmada la sumoilación de PCNA de tomate, se evaluó si Rep del begomovirus TGMV interfiere en dicha modificación. Para ello, ambas proteínas se coexpresaron desde el mismo vector a partir de un mRNA policistrónico, junto al sistema de sumoilación y SUMO. En esta ocasión, la intensidad de la banda identificada como PCNA-SUMO se redujo drásticamente (**Figura 19, calle 6**). Esta misma disminución se observó en la banda de alto peso molecular (X1) revelada con anti-SUMO y anti-His pero no con antiPCNA, que debe corresponder a una cadena de SUMO o alguna otra proteína del ensayo y no al monómero de PCNA unido a dos péptidos de SUMO, como se podría haber esperado por su tamaño. La expresión de Rep se confirmó mediante el uso del anticuerpo anti-Rep de TGMV, con el que se detectó una banda con un peso molecular de 44 KDa, el estimado para la proteína viral (**Figura 19, calles 2, 4 y 6**). En esas mismas calles también se observaron bandas adicionales más pequeñas (X2), que podrían corresponder a formas truncadas de Rep. Sin embargo, no se reveló ninguna banda que pudiera identificarse como la forma sumoilada de la proteína viral, descartando así que SUMO se una de forma covalente a Rep en las

condiciones ensayadas. El conjunto de estos resultados demuestra que Rep reduce la sumoilación de PCNA de tomate.

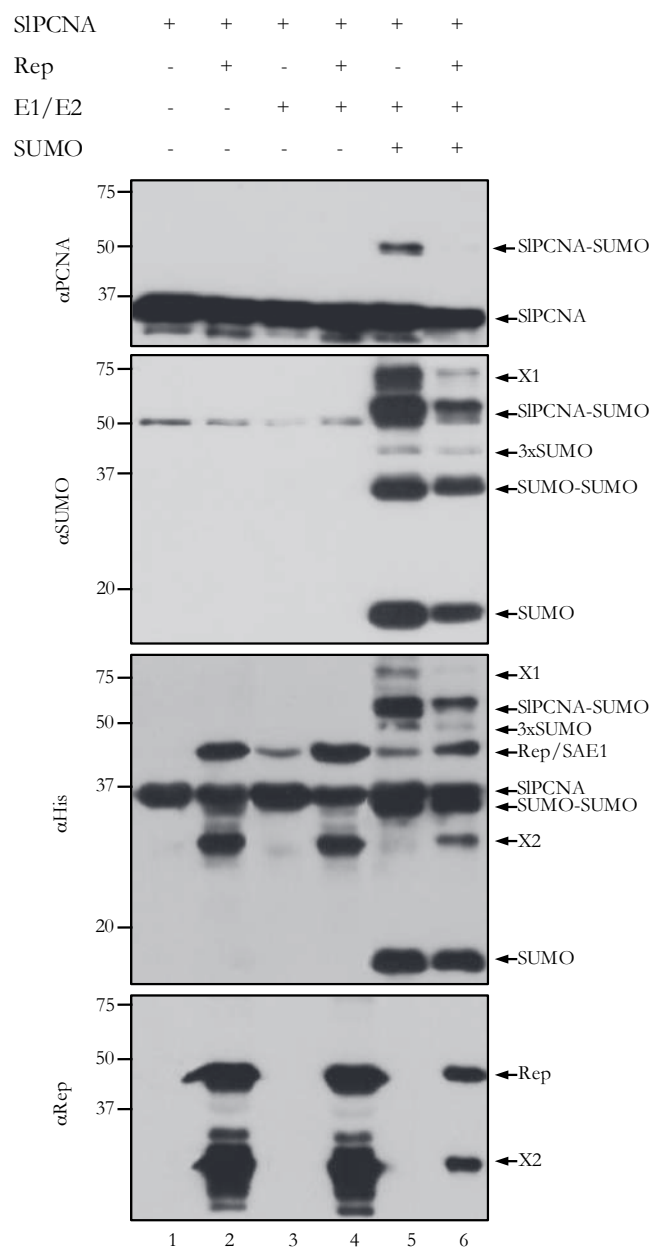
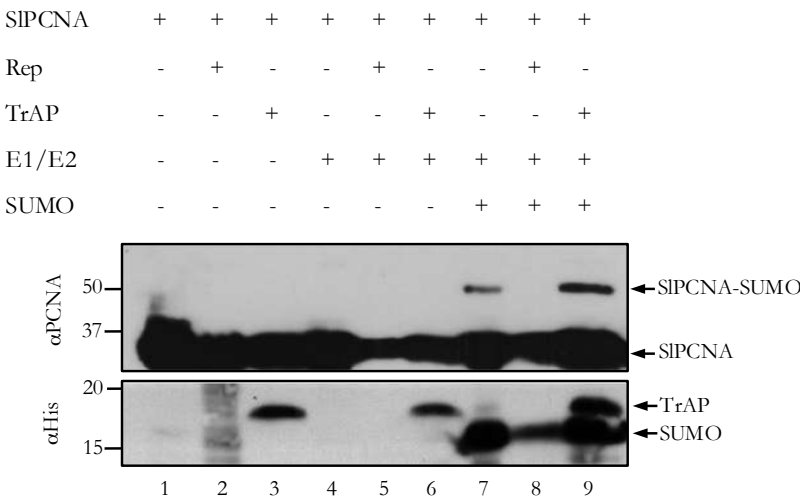


Figura 19. Rep modula la sumoilación de PCNA utilizando un sistema reconstituido en bacteria. PCNA de tomate, Rep de TGMV, las enzimas E1 y E2 (HsAos1/HsUba2 y MmUbc9, respectivamente) y SUMO (HsSUMO1) se coexpresaron en la cepa NCM631 de *E. coli*. Los extractos de proteínas totales se incubaron con los anticuerpos anti-PCNA, anti-SUMO, anti-His y anti-Rep. PCNA, Aos1, SUMO y Rep están marcados con una etiqueta 6xHis. Los componentes presentes en cada calle (1-6) se indican en el panel superior (+/-). Las bandas detectadas están etiquetadas en el lado derecho. X1: cadena de 4xSUMO; X2: forma trunca de Rep. El marcador de peso molecular se indica a la izquierda (kDa). Figura extraída de la tesis doctoral de Miguel Ángel Sánchez Durán, 2009.

Para determinar si la inhibición observada en la sumoilación de PCNA es específica, se realizó un ensayo similar utilizando la proteína TrAP (codificada por C2) del begomovirus multipartito TYLCSV en lugar de Rep. En este caso, la intensidad de la banda identificada como PCNA-SUMO no se vio alterada (**Figura 20A, calle 9**), lo que indica que el efecto observado se debe a la presencia de Rep y descarta que pueda tratarse de una interferencia inespecífica consecuencia de la expresión simultánea de PCNA con otra proteína a partir de un mRNA policistrónico.

A



B

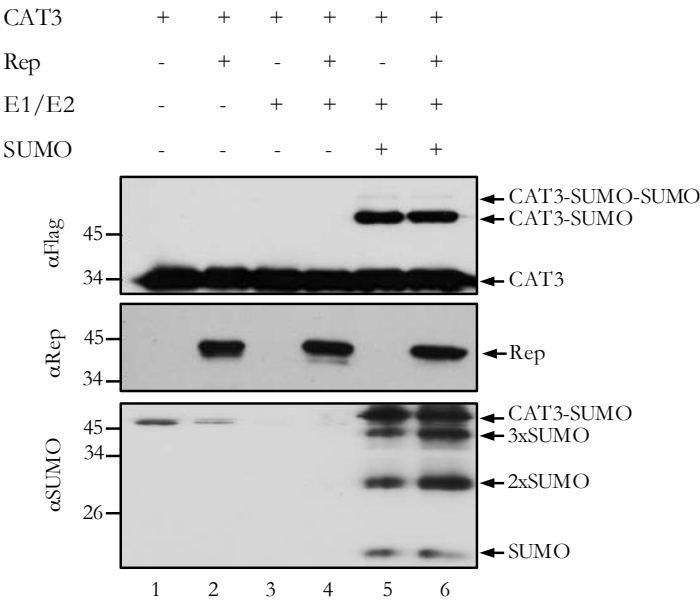


Figura 20. Rep interfiere de forma específica con la sumoilación de PCNA. **A.** PCNA de tomate, Rep de TGMV, C2 de TYLCSV, E1/E2 (SAE1, SAE2 y Ubc9 de mamíferos) y SUMO (HsSUMO1) se coexpresaron en células NCM631 de *E. coli* según se indica en la tabla superior (+/-) Los extractos de proteína total se incubaron con los anticuerpos indicados a la izquierda. Las bandas relevantes están etiquetadas en el lado derecho. **B.** Similar al panel A, pero se sustituyó PCNA por la catalasa 3 de *Arabidopsis* (CAT3) como diana del ensayo. A la izquierda se indica el marcador de peso molecular (KDa). Figura extraída de la tesis doctoral de Miguel Ángel Sánchez Durán, 2009.

A continuación, para comprobar si la supresión de la sumoilación de PCNA se debe a la interacción de Rep con SCE, descrita anteriormente (Castillo *et al.*, 2004; Sánchez-Durán *et al.*, 2011) y, como consecuencia, a una posible inhibición de la actividad conjugadora de la enzima, se repitió el ensayo de sumoilación utilizando como proteína diana la Catalasa 3 (CAT3) de *A. thaliana*, un sustrato conocido de esta ruta de modificación postraducciona (Castaño-Miquel *et al.*, 2013). En esta ocasión, la intensidad de las bandas correspondientes a la forma monosumoilada (CAT3-SUMO) y polisumoilada (CAT3-SUMO-SUMO) de CAT3 no se vio alterada (**Figura 20B, calle 6**), lo que indica que la expresión de Rep no afecta a la actividad global de la enzima conjugadora de SUMO y, de nuevo, que el efecto observado es específico.

La interacción de Rep con la enzima conjugadora de SUMO no participa en la reducción de la sumoilación de PCNA

La proteína Rep de los begomovirus monopartitos TYLCV y TYLCSV y del bipartito TGMV se unen a SCE1 de plantas a través de su extremo amino-terminal (Castillo *et al.*, 2004; Sánchez-Durán *et al.*, 2011; Maio *et al.*, 2019). El dominio de interacción se mapeó en la proteína Rep de TGMV entre los residuos 56-114, donde se identificó una región esencial para la unión a la enzima conjugadora de SUMO (residuos 56-85) y otra región que estabiliza o potencia la interacción (residuos 86-114) (Sánchez-Durán *et al.*, 2011). El análisis posterior de las lisinas localizadas en este dominio, ya que son aminoácidos que desempeñan un papel crucial en la mayoría de las interacciones con SCE, permitió identificar a K68 y K102 como residuos implicados en la unión entre ambas proteínas, cumpliendo el primero de ellos el papel principal en el establecimiento de la interacción (Sánchez-Durán *et al.*, 2011). La eliminación de ambas lisinas, además, afectó de forma dramática a la replicación viral, lo que sugiere que la interacción

entre Rep y SCE es esencial para la multiplicación de los geminivirus (Castillo *et al.*, 2004; Sánchez-Durán *et al.*, 2011).

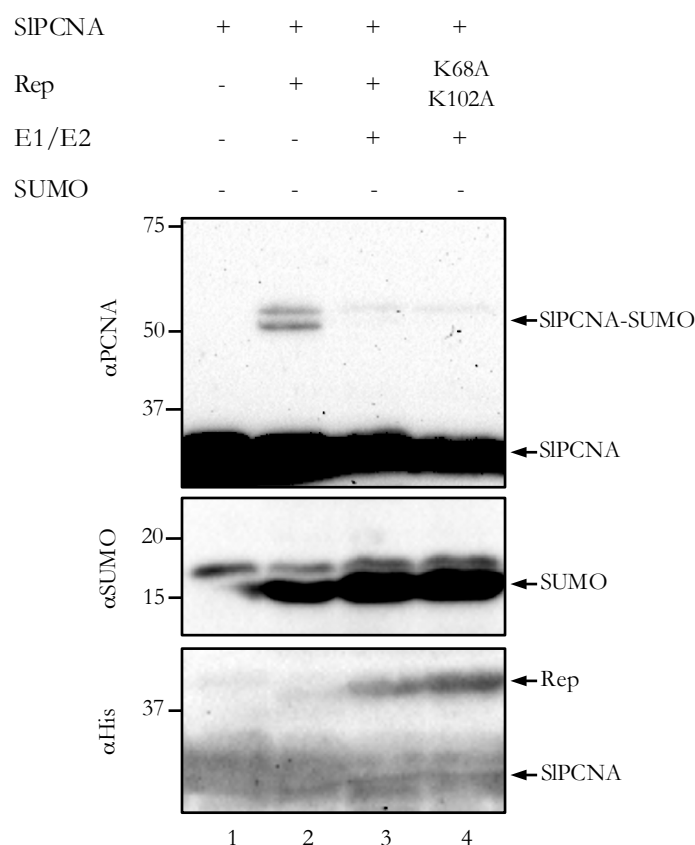


Figura 21. La interacción entre Rep y SCE no es esencial para suprimir la sumoilación de PCNA *in bacteria*. Este ensayo se llevó a cabo como se describe en la leyenda de la figura 1. En esta ocasión, se incluyó el mutante de Rep que no interacciona con la enzima conjugadora SCE (Rep K68/102A). Las proteínas expresadas en cada extracto se indican en el panel superior (+/-). A la derecha se han etiquetado las bandas detectadas. El patrón del marcador peso molecular se muestra a la izquierda (KDa).

Para profundizar en el mecanismo que media la interferencia de Rep con la sumoilación de PCNA, se comprobó si es necesaria la interacción entre la proteína viral y la enzima conjugadora de SUMO. En este caso, se llevó a cabo un ensayo de sumoilación en *E. coli* sustituyendo el gen silvestre de Rep por el que porta la doble mutación K68/102A. Como se había observado, la expresión de la proteína silvestre redujo drásticamente la intensidad de la doble banda correspondiente a PCNA sumoilado, apareciendo sólo una muy tenue a la altura aproximada de la de mayor peso molecular (**Figura 21, calle 3**). Este mismo

resultado se obtuvo al incluir el mutante de Rep K68/102A (**Figura 21, calle 4**), lo que indica que la interacción de Rep con SCE1 no interviene en la supresión de la sumoilación de PCNA, al menos en las condiciones ensayadas

PCNA de tomate se sumoila en las lisinas 164 y 254

La sumoilación de PCNA de levaduras ocurre principalmente en la conservada lisina K164, presente también en los homólogos pollo, de mamíferos y de *X. laevis* (Arakawa *et al.*, 2006; Gali *et al.*, 2012; Göhler *et al.*, 2008; Leach y Michael, 2005; Moldovan *et al.*, 2012), y en menor medida en la K127, ausente en las proteínas de plantas, mamíferos y *Xenopus*. Mientras que la unión covalente de SUMO a K164 requiere la participación de la ligasa de SUMO (E3) Siz1, la modificación de K127 también puede tener lugar *in vitro* sin la presencia de la enzima E3 (Hoege *et al.*, 2002; Parker *et al.*, 2008). En un trabajo previo, utilizando un sistema de sumoilación reconstituido en *E. coli*, se obtuvo que PCNA1 y PCNA2 de *A. thaliana* se sumoilan en la lisina K254 y, adicionalmente, en K13, K14, K20, K217 y K240, pero no en K164 (Strzalka *et al.*, 2012). En células humanas, también se ha identificado el residuo K254 de PCNA como sitio aceptor de SUMO (Gali *et al.*, 2012).

Para determinar qué lisinas de PCNA de tomate se sumoilan y examinar si Rep interfiere con la modificación de todas ellas, se llevaron a cabo ensayos de sumoilación en *E. coli* en los que se incluyeron como diana mutantes puntuales de SIPCNA en varios residuos candidatos, sustituidos por alaninas. Estas lisinas se seleccionaron teniendo en cuenta el siguiente criterio: (1) están conservadas en los homólogos de PCNA de diferentes organismos, (2) han sido descritas previamente como un aceptor de SUMO en algún homólogo de PCNA, o bien (3) son sitios potenciales de sumoilación según las herramientas informáticas GPS SUMO-gp y SUMOsp2.0 (Ren *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2014) y (4) se localizan en la superficie de PCNA. Este análisis sugirió que los residuos K91, K164, K168, K190 y K254 tienen una alta probabilidad de ser sumoilados, destacando entre ellos K164 y K254 como los principales candidatos (**Figura 22A**). Ambas lisinas están conservadas en homólogos de PCNA desde levaduras a humanos (**Figura S1**) y han sido descritas como sitios aceptores de SUMO.

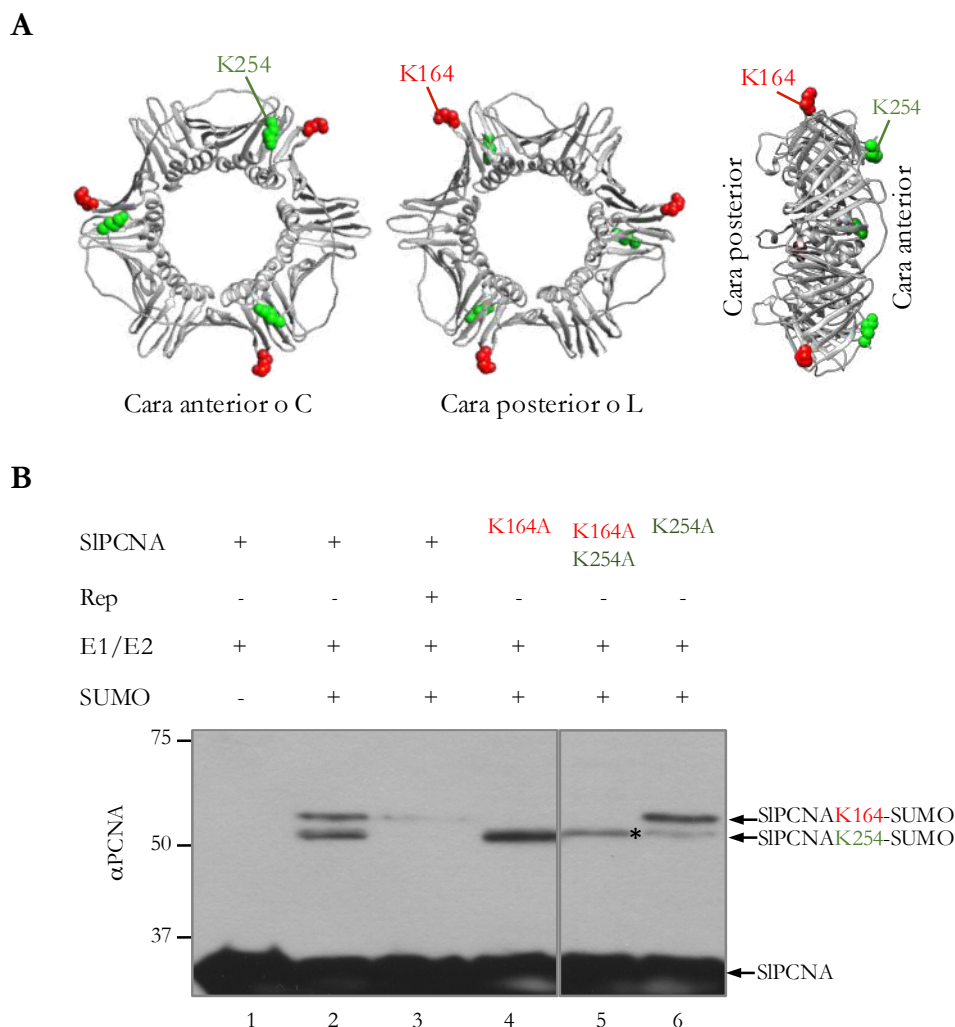


Figura 22. PCNA de tomate se sumoila en las lisinas 164 y 254. A. Modelo tridimensional del trímero de PCNA de tomate, predicho a partir de la estructura de PCNA de humano. Las lisinas mutadas se destacan en rojo (K164) y verde (K254) en los tres monómeros. **B.** Ensayo de sumoilación de SIPCNA silvestre y los mutantes K164A, K254A y K164/254A. También se incluye Rep de TGMV. Los extractos de proteínas se incubaron con el anticuerpo frente a PCNA, con el que se detectaron las bandas etiquetadas a la derecha. El asterisco señala la banda correspondiente a PCNA sumoilaado en una lisina no identificada. Los componentes presentes en cada calle (1-6) se indican en el panel superior (+/-). El marcador de peso molecular se muestra a la izquierda (kDa).

Una vez se generaron mutantes simples y doble de PCNA en estas dos lisinas, se probó su sumoilación con el sistema de modificación de mamíferos reconstituido en *E. coli*. Al expresar el mutante simple PCNA K164A se detectó una única banda correspondiente a la diana sumoilaada, concretamente la de menor peso molecular de la doble banda observada con la proteína silvestre (**Figura 22B, calle 4**). En cambio, al sustituir la lisina 254 (PCNA K254A), la intensidad de la

misma se redujo, mientras que la de la banda superior se mantuvo inalterada (**Figura 22B, calle 6**). Con el doble mutante PCNA K164/254A tan solo se observó una banda tenue, de un peso molecular similar a la obtenida con el PCNA K254A (**Figura 22B, calle 5**). Este ensayo reveló que la doble banda resultante de la coexpresión de PCNA de tomate silvestre con la maquinaria completa de sumoilación corresponde, al menos, a dos monómeros de la proteína diana unidos a SUMO a través de dos residuos distintos, lo que da lugar a una movilidad electroforética ligeramente diferente para cada uno de ellos. Concretamente, la banda superior pertenece al monómero modificado en la lisina K164, y la inferior, al menos parcialmente, es el producto de la conjugación de SUMO a la K254. Este fenómeno ya se había descrito anteriormente para PCNA de levaduras y de humanos, de modo que la proteína sumoilada en el residuo 164 migraba en el gel de poliacrilamida con un peso molecular diferente al de PCNA modificado en la lisina 127 o 254, respectivamente (Gali *et al.*, 2012; Hoege *et al.*, 2002; Pfander *et al.*, 2005). La banda restante, observada al expresar PCNA mutante para la lisina 254, podría corresponder a un monómero de la proteína conjugado a SUMO a través de una lisina diferente a las dos identificadas. Para determinar cuál de ellas estaba implicada, se introdujeron en el doble mutante de PCNA K164/254A mutaciones adicionales en cada una de las otras lisinas seleccionadas (K91, K168 o K190) y se llevaron a cabo nuevos ensayos de sumoilación (Manuel Arroyo-Mateos, 2015). No obstante, ninguna de estas mutaciones condujo a la desaparición de la banda anterior, sugiriendo que es otra lisina la que actúa como sitio de unión a SUMO, quizás en ausencia de las principales K164 y K254.

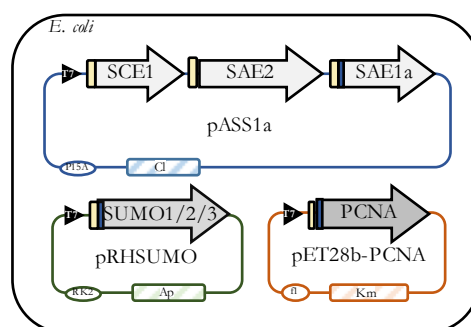
El sistema de sumoilación de *A. thaliana* también modifica PCNA de tomate *in bacteria*

Como se mencionó anteriormente, Strzalka y colaboradores (2012) realizaron ensayos de sumoilación en *E. coli* con AtPCNA1 y AtPCNA2, detectando la modificación en la lisina 254 pero no en la descrita como principal sitio de conjugación a SUMO, la K164. Nuestros resultados con PCNA de tomate muestran, no obstante, que la lisina 164 también se une covalentemente al pequeño péptido, y con una eficiencia similar a K254, lo que arroja dudas acerca de la conservación de la modificación de este residuo en PCNA de plantas. No obstante,

ambas aproximaciones experimentales difieren no solo en la diana, ya que se trata de diferentes homólogos de PCNA, sino también en el origen de las enzimas de la ruta de sumoilación. Mientras que el sistema empleado con SIPCNA, originalmente desarrollado por Mencía y de Lorenzo, utiliza las enzimas E1 y SUMO1 de humanos (Aos1/Uba2 y SUMO1) y E2 de ratón (Ubc9), Strzalka y colaboradores utilizaron todos los componentes de *A. thaliana*. Con el fin de determinar si la discrepancia entre ambos resultados se debe a la disparidad de los sistemas utilizados, se optó por realizar los ensayos de sumoilación de SIPCNA con las enzimas de modificación de la planta modelo. Para generar este sistema, se clonaron en el mismo vector pACYC184 (Mok *et al.*, 1991) las ORFs de las enzimas de activación (AtSAE1a y AtSAE2) y conjugación (AtSCE1) de SUMO para su expresión a partir de un mRNA policistrónico. Por otra parte, las ORFs de las formas maduras de las isoformas 1, 2 y 3 de SUMO se clonaron independientemente en el vector pRHSUMO (Mencía y de Lorenzo, 2004) (**Figura 23A**).

Utilizando este sistema y siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente, se llevó a cabo el ensayo de sumoilación con SIPCNA para determinar si nuestra diana podía ser modificada por AtSUMO1, AtSUMO2 y/o AtSUMO3. Como control positivo, se incluyó SUMO1 de humano. Los extractos totales de proteínas se incubaron con anticuerpos anti-PCNA y anti-His, éste último para confirmar la expresión de distintas isoformas de SUMO (**Figura 23B**). En consonancia con el resultado obtenido en los ensayos de sumoilación llevados a cabo anteriormente con las enzimas de mamíferos, la coexpresión de PCNA y SUMO1 de humano dio lugar a una doble banda de aproximadamente 55 KDa (**Figura 23B, calle 3**). Ésta misma se detectó también en los extractos de proteínas que contenían AtSUMO1 y AtSUMO2, aunque con un peso molecular ligeramente menor al obtenido con HsSUMO1, debido a las diferencias en las secuencias de estas isoformas (**Figura 23B, calles 4 y 5**). La misma doble banda se detectó en presencia de AtSUMO3, pero la intensidad fue notablemente inferior (**Figura 23, calle 6**), a pesar de que las tres isoformas del péptido se expresaron a un nivel similar (**Figura 23, calles 4, 5 y 6**). Estos resultados indican que PCNA de tomate es modificado por AtSUMO1 y AtSUMO2, y, con una baja eficiencia, por AtSUMO3, con las enzimas E1 y E2 de la ruta de sumoilación de *A. thaliana* y sin requerir la presencia de una ligasa E3.

A



B

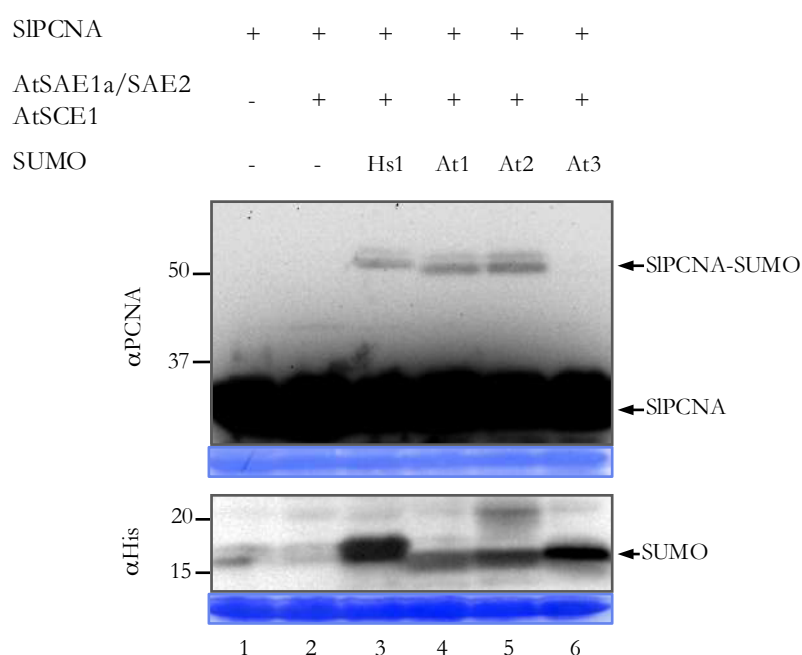


Figura 23. El sistema de sumoilación de *A. thaliana* también modifica PCNA de tomate *in bacteria*. **A.** Diagrama de los plásmidos utilizados para expresar la maquinaria de sumoilación de *A. thaliana* y la proteína diana en *E. coli*. Se destacan los orígenes de replicación (P15A, RK2 y f1), los marcadores de resistencia (Km, kanamicina; Ap, ampicilina; Cl, cloranfenicol), el promotor T7 (triángulo negro), el sitio de unión a ribosoma o RBS (rectángulo amarillo), la etiqueta de 6xHis (rojo) y los genes clonados en cada vector. **B.** Ensayo de sumoilación de SIPCNA con el sistema de sumoilación de *A. thaliana*. PCNA de tomate, SAE1a/SAE2 y SCE1 de *Arabidopsis* se cotransformaron y coexpresaron con AtSUMO1, 2, 3 o HsSUMO1 en la cepa de *E. coli* NCM631. Los extractos de proteínas se incubaron con los anticuerpos anti-PCNA y anti-His. Los componentes presentes en cada calle se indican en la tabla superior (+/-). Las bandas relevantes están señaladas y etiquetadas a la derecha. Los números de la izquierda indican los tamaños del marcador de peso molecular (KDa). La membrana se tiñó con azul de Coomassie como control de carga total de proteínas para cada extracto.

SIPCNA se sumoila en las lisinas 164 y 254 con el sistema de *A. thaliana*

Para confirmar que la doble banda observada en el ensayo de sumoilación de PCNA silvestre con el sistema de modificación de *A. thaliana* también corresponde a la unión covalente de SUMO a dos lisinas diferentes del monómero, K164 y K254, los mutantes simples y el doble para estos residuos se sobreexpresaron junto con el sistema de sumoilación de la planta y AtSUMO1 en *E. coli* (**Figura 24B**). Se escogió esta isoforma porque es homóloga a AtSUMO2 y presenta un patrón y un nivel de expresión relativa similar en la planta, superior al del resto de AtSUMOs. De nuevo, al incluir el mutante PCNA K164/254R, no se detectó la doble banda observada con la proteína silvestre, revelándose en su lugar una banda con una intensidad muy baja (**Figura 24B, calle 6**). Estos resultados indican que PCNA de tomate se sumoila en las lisinas 164 y 254 en ensayos en *E. coli*, independientemente del origen de los componentes del sistema de modificación utilizados. La banda tenue observada en estos ensayos indica que, como se sugirió anteriormente, puede haber un tercer residuo que se sumoile en menor medida o pueda sumoilarse en ausencia de las dos lisinas principales.

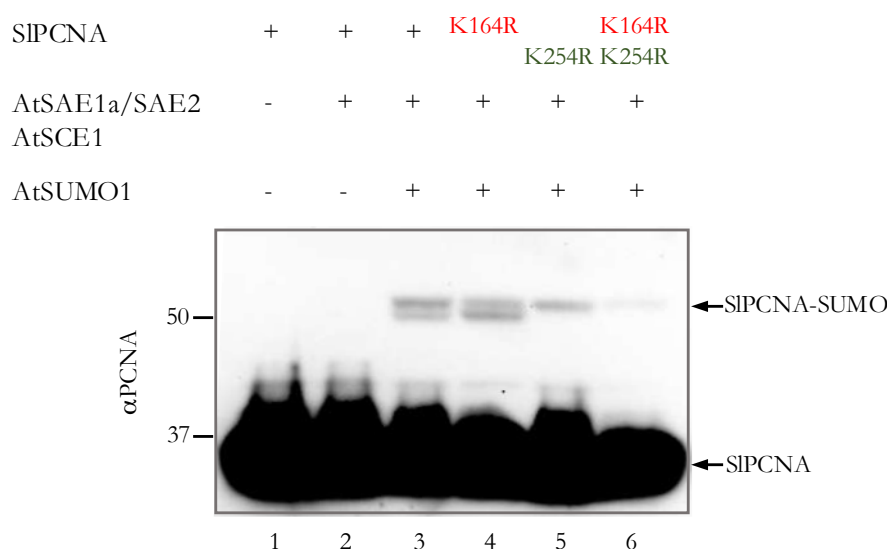


Figura 24. SUMO 1 de *A. thaliana* modifica los mismos residuos de PCNA de tomate en un sistema reconstituido en bacterias. Ensayo de sumoilación de los mutantes de SIPCNA (K164R, K254R y K164/254R) con el sistema de modificación de *A. thaliana* en *E. coli*. La expresión de proteínas se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* NCM631 como se indica en el panel superior (+/-). Los extractos se incubaron con el anticuerpo anti-PCNA para detectar PCNA y PCNA-SUMO, etiquetados a la derecha. El marcador de peso molecular se muestra a la izquierda (kDa).

Rep también interfiere en la modificación de PCNA por SUMO usando el sistema de sumoilación de *Arabidopsis* reconstituido en bacteria

Una vez confirmada la sumoilación de PCNA de tomate utilizando el sistema de modificación compuesto por las enzimas presentes en *A. thaliana*, se comprobó si Rep también interfiere con la conjugación de SUMO a dicha diana en estas condiciones. Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, PCNA y Rep se coexpresaron desde el mismo vector como un mRNA policistrónico junto con la maquinaria de sumoilación completa de *Arabidopsis* (AtSAE1a/2, AtSCE1 y AtSUMO1). En presencia de Rep, la intensidad de las dos bandas identificadas como PCNA monosumoilado se redujo considerablemente en comparación con la mostrada en ausencia de la proteína viral (**Figura 25, calles 3 y 4, respectivamente**), ratificando así el resultado obtenido con el sistema de mamíferos (**Figura 19**).

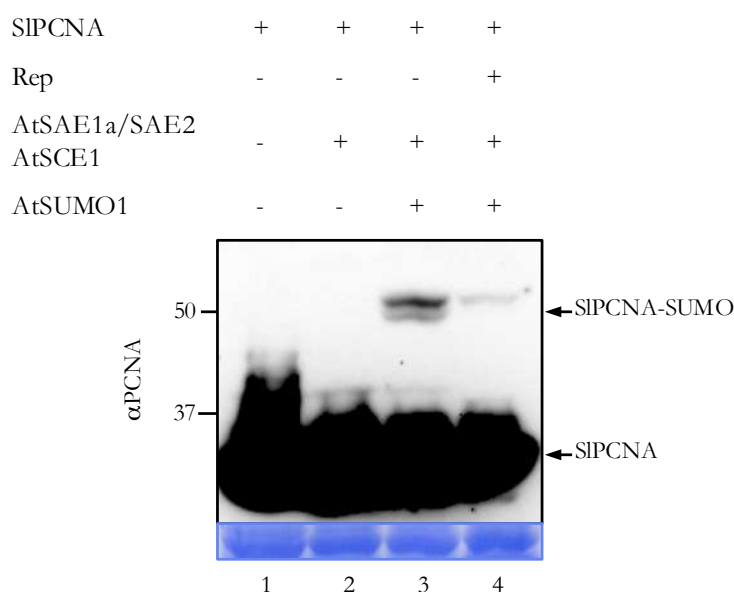
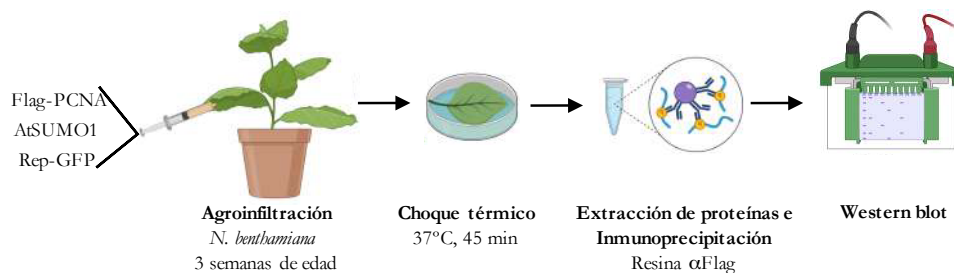


Figura 25. Rep interfiere en la sumoilación de PCNA de tomate en un sistema de *Arabidopsis* reconstituido en bacteria. PCNA de tomate, Rep de TGMV y las enzimas SAE1a, SAE2 y SCE1, así como SUMO1 de *Arabidopsis*, se coexpresaron en la cepa de *E. coli* NCM631. Los extractos de proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF que se incubó con un anticuerpo frente a PCNA. La expresión de los diferentes componentes (+/-) se indica en el panel superior. Las bandas relevantes están destacadas a la derecha. El patrón de peso molecular se representa a la izquierda. La membrana teñida con azul de Coomassie se incluyó como control de carga total de proteínas para los distintos extractos.

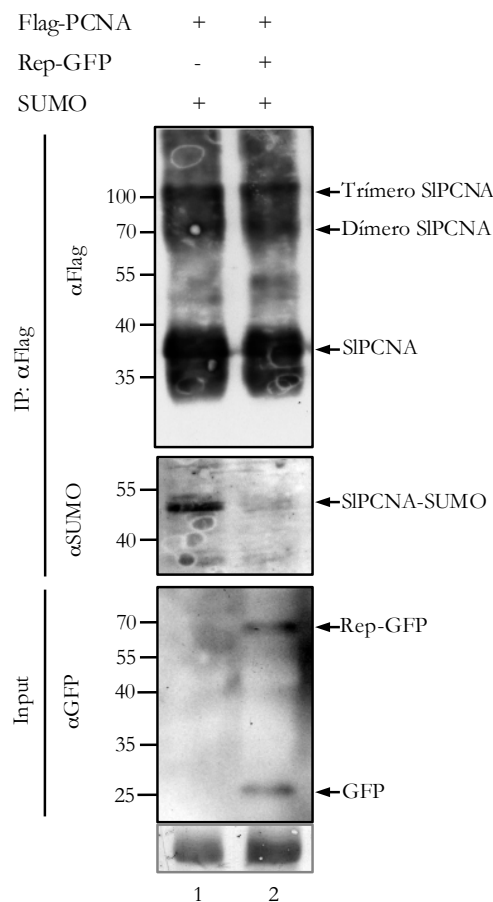
Rep también reduce la sumoilación de PCNA de tomate *in planta*

Mientras que la sumoilación de los homólogos de PCNA de plantas se había detectado en bacterias utilizando diferentes sistemas de sumoilación reconstituidos, ésta seguía sin poder demostrarse en la célula vegetal. PCNA se expresa principalmente en la fase S del ciclo celular, y, debido a la naturaleza dinámica y reversible de esta modificación postraducciona, tan solo una pequeña proporción de la proteína se encuentra sumoilada en un momento dado.

A



B



C

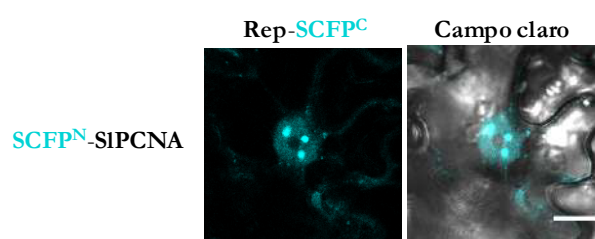


Figura 26. Rep compromete la sumoilación de PCNA de tomate *in planta*. **A.** Esquema del diseño experimental. Flag-PCNA de tomate y SUMO1 de *A. thaliana* se expresaron transitoriamente en hojas de *N. benthamiana* en presencia y ausencia de Rep-GFP del virus TYLCV. Las hojas infiltradas se incubaron en un baño a 37°C durante 45 minutos, tras lo cual se llevó a cabo la extracción de proteínas. Este extracto se enriqueció en Flag-PCNA mediante inmunoprecipitación, usando una resina anti-Flag (IP: α Flag) y se analizó por *western blot*. **B.** Las proteínas inmunoprecipitadas se incubaron con anticuerpos frente a la etiqueta Flag y AtSUMO1. La acumulación de Rep se comprobó con el anticuerpo anti-GFP (input). Las bandas detectadas se destacan a la derecha y el patrón de peso molecular se indica a la izquierda. Se incluye la tinción con azul de Coomassie como control de carga. **C.** Ensayo de complementación fluorescente bimolecular. SCFPN-PCNA y Rep-SCFPC se sobreexpresaron transitoriamente en hojas de *N. benthamiana*, que se observaron 3 días más tarde por microscopía confocal. Escala = 10 μ m.

Tomando lo anterior en consideración, la principal dificultad residiría en los niveles bajos de PCNA-SUMO en la célula, probablemente por debajo del umbral de sensibilidad de los métodos de detección utilizados. Hasta el momento, ninguno de los análisis masivos realizados para identificar las dianas de SUMO en plantas han logrado detectar a PCNA como una de ellas (Budhiraja *et al.*, 2009; Colignon *et al.*, 2017; Mailand *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2011; Rytz *et al.*, 2018). Otras estrategias abordadas, como la expresión transitoria de SIPCNA en hojas de *N. benthamiana* y en protoplastos de tomate, destinada a aumentar la cantidad de la diana, tampoco permitieron identificar a SIPCNA-SUMO. Para conseguir este objetivo y, posteriormente, confirmar que Rep también modula el estado de modificación de esta proteína en la planta, resultaba crucial, por lo tanto, aumentar su sumoilación.

Con este fin, y en colaboración con el grupo del Dr. Harrold van der Burg en la Universidad de Ámsterdam, se diseñó un ensayo en *N. benthamiana* dirigido a incrementar el porcentaje de PCNA sumoilado (**Figura 26A**). En primer lugar, se generó una construcción para expresar PCNA de tomate fusionado a un epítipo FLAG (Flag-PCNA), la cual se coagroinfiltró junto a la forma madura de

AtSUMO1 en hojas jóvenes, no expandidas completamente, de *N. benthamiana* silvestre (2 semanas de edad). En estas hojas, el número de células en la fase replicativa del ciclo celular, en la que se encuentra la mayor proporción de PCNA sumoilado (Pfander *et al.*, 2005), es probablemente mayor. Tres días después, las hojas agroinfiltradas se sometieron a un choque térmico de 37°C durante 45 minutos para aumentar los niveles de sumoilación general de la planta (Kurepa *et al.*, 2003). Tras extraer las proteínas totales, la muestra se enriqueció en Flag-PCNA usando una resina anti-FLAG (**Figura 26A**). Cuando la membrana se incubó con un anticuerpo anti-FLAG, se detectaron tres bandas que mostraban intensidades similares y tamaños que podían corresponder a PCNA en forma de monómero, dímero y trímero (35, 70 y 100 KDa, respectivamente; **Figura 26B**). Por debajo de los 55 KDa, se observaron algunas bandas del tamaño apropiado para PCNA-SUMO, pero su definición e intensidad hacían difícil su identificación. Para confirmar la sumoilación de PCNA, la membrana se incubó con anti-AtSUMO1/2, revelándose así la banda correspondiente a PCNA-SUMO (alrededor de los 50 KDa; **Figura 26B, calle 1**). Cuando Rep de TYLCV se coexpresó en *N. benthamiana* (Rep-GFP) en las mismas condiciones descritas, la intensidad de la banda anterior disminuyó drásticamente (**Figura 26B, calle 2**). La presencia de la proteína viral se confirmó con el anticuerpo anti-GFP. Estos resultados muestran por primera vez que PCNA también se sumoila en la planta y confirman que, al igual que ocurre con el sistema reconstituido en *E. coli*, Rep compromete dicha modificación postraduccional en la célula vegetal.

En este ensayo, por razones técnicas, se utilizó la proteína Rep de TYLCV en lugar de Rep de TGMV, incluido en los experimentos en *E. coli*. Aunque la interacción de esta proteína viral con PCNA se había confirmado para varios begomovirus, aún no se había demostrado para la presente en TYLCV. Para comprobar si el comportamiento de Rep era similar al de sus homólogos en cuanto a su capacidad de interacción con PCNA, se llevó a cabo un ensayo de complementación molecular bifluorescente (BiFC) en *N. benthamiana*. Para ello, la mitad C-terminal de la proteína fluorescente super cyan (SCFPC; fragmento 156-239 aa) (Gehl *et al.*, 2009) se clonó en el extremo C-terminal de Rep TYLCV, mientras que la parte N-terminal del mismo fluoróforo (SCFPN; fragmento 1-173 aa) se fusionó al extremo amino de SIPCNA, generando así Rep-SCFPC y SCFPN-SIPCNA, respectivamente. Ambas construcciones se transformaron en *A. tumefaciens* y se coinfiltraron en hojas de *N. benthamiana* silvestre. Tres días más

tarde, las hojas infiltradas se observaron bajo microscopía confocal. En el núcleo de las células epidérmicas se observó la señal azul procedente de la reconstitución de la proteína fluorescente súper cyan, destacando la aparición de varios cuerpos nucleares que emitían una señal más intensa (**Figura 26C**). Este resultado muestra que Rep de TYLCV también interacciona con PCNA y que esta unión tiene lugar en el núcleo, tanto en zonas concretas que podrían ser cuerpos nucleares como en el nucleoplasma.

REn también reduce la sumoilación de PCNA

Los datos publicados indican que dos de las seis proteínas mayores de 75 aminoácidos codificadas en el genoma de los begomovirus, REn (*replication enhancer protein*) y Rep, participan en funciones similares. Estos dos factores, que interaccionan entre ellos, comparten interactores del huésped (incluyendo PCNA) y participan en la replicación del DNA del virus, lo que sugiere que ambos forman parte del complejo que constituye el replisoma viral. Aunque no se ha detectado la interacción de REn con componentes de la ruta de sumoilación, su unión a Rep y a PCNA y su papel en la replicación viral condujo a plantear si su presencia también reduciría la conjugación de SUMO a esta proteína de la planta, como se ha observado previamente.

Para comprobarlo, el marco abierto de lectura del gen AC3 de TGMV se clonó sustituyendo a C1 en el vector para la expresión en *E. coli* que contenía PCNA de tomate, de modo que se expresara con la proteína diana a partir de un mRNA policistrónico. A continuación, se llevó a cabo el ensayo de sumoilación en *E. coli* con el sistema de *A. thaliana* y en las mismas condiciones descritas previamente. Los extractos de proteínas se analizaron de nuevo por *western blot*, con los anticuerpos frente a PCNA y 6xHis. En todas las calles, se volvió a observar la banda correspondiente al monómero de la proteína de la planta, por debajo de 37 KDa (**Figura 27**). En consonancia con los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, la coexpresión de las enzimas de la ruta de sumoilación y AtSUMO1 dio lugar a la doble banda identificada como PCNA sumoilado (~55 KDa), que no se detectó en presencia de Rep (**Figura 27, calles 3 y 4**, respectivamente) ni al incluir la proteína REn (**Figura 27, calle 5**). La expresión de ambas proteínas virales se confirmó tras incubar la membrana con el anticuerpo

anti-His (**Figura 27**). Este resultado indica que REn, al igual que Rep, interfiere con la sumoilación de PCNA.

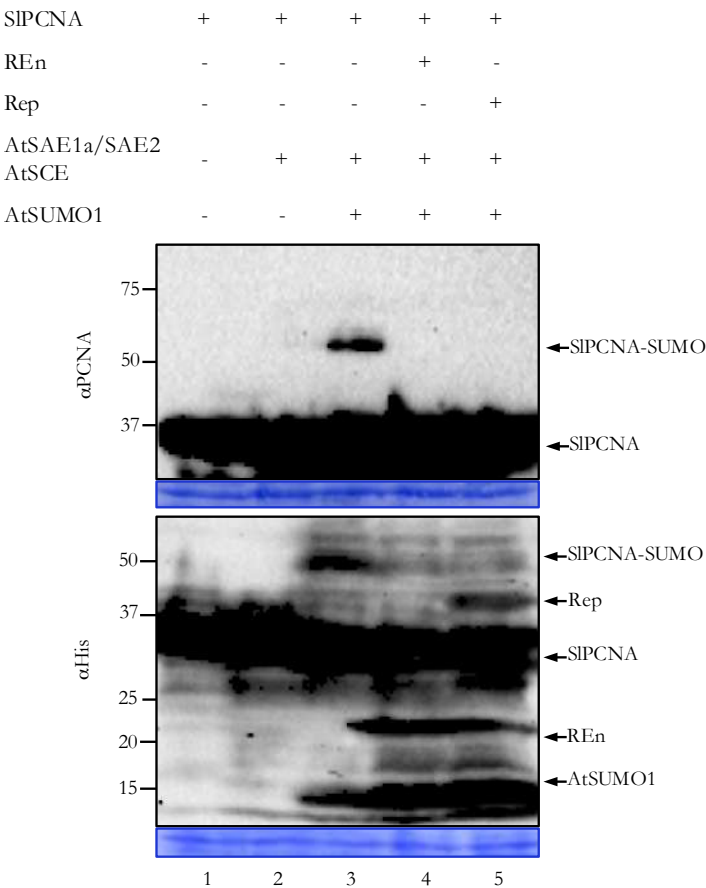


Figura 27. REn también reduce la sumoilación de PCNA de tomate con el sistema reconstituido en bacteria. El sistema de sumoilación de *A. thaliana* (SAE1a/SAE2) y SUMO1 se coexpresaron con PCNA, Rep o REn de TGMV en la cepa NCM631 de *E. coli*. La expresión de los diferentes componentes (+/-) se indica en la tabla superior. Los extractos de proteínas totales se incubaron con anticuerpos frente a PCNA y la etiqueta 6xHis y las bandas relevantes se han destacado a la derecha. El marcador de peso molecular se muestra a la izquierda.

REn no se sumoila utilizando el sistema de sumoilación de *Arabidopsis* reconstituido en bacteria

Para profundizar en cuál podría ser el mecanismo que utilizan estas proteínas virales para interferir con la sumoilación de PCNA, se estudió si, como ocurre con otras proteínas que interaccionan o afectan a este sistema de modificación, REn se sumoila. El análisis de proteínas REn de begomovirus monopartitos y bipartitos utilizando el software de predicción GPS-SUMO (Zhao

et al., 2014) mostró la existencia de un sitio consenso de sumoilación (Ψ KXE) (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007), que incluye la lisina 130 en REn de TGMV (**Figura 28**). La secuencia de esta proteína está muy conservada en los geminivirus, aunque la presencia de un residuo de lisina en la antepenúltima posición (correspondiente a los aminoácidos 130, 131 o 132) solo se ha encontrado en algunas especies de begomovirus (**Figura 28**).

GPS SUMO				
Posición K	Secuencia	Puntuación	Corte	P-valor
K130	KYK K FY	3.851	3.32	0.045
Bi/OW	TGMV	...HSIKY K FY	132	
	AbMV	...HSIK K FY	132	
	BGMV	...HEIKY K FY	132	
	CaLCuV	...HVINE K LY	132	
	ToLCV	...HDIK F NFY	134	
	ToMoV	...HSIK F KFY	132	
	ToYMoV	...HEIKV N LY	132	
Bi/NW	ACMV	...HEIK F NVY	134	
	EACMV	...HAIK F NLY	134	
	PepGMV	...HEIK K LY	132	
	MYMIV	...HNVQY K LY	134	
M	AYVV	...SIIK F NLY	134	
	CLCuGV	...HNIQI K LY	133	
	TYLCSV	...HEIKY N LY	134	
	TYLCV	...HDIKY K FY	134	
		: : : . *		

Figura 28. Identificación de un residuo de lisina (K130) como sitio putativo de sumoilación en REn de TGMV y su conservación en diferentes begomovirus. Esta lisina se identificó con la herramienta de predicción informática GPS SUMO. Se muestra el alineamiento de los últimos aminoácidos de la proteína REn de varios begomovirus bipartitos (Bi) del Nuevo y Viejo mundo (NW y OW, respectivamente) y monopartitos (M). Los nombres completos y los números de acceso se indican en materiales y métodos.

Para llevar a cabo el ensayo de sumoilación, la OFR del gen AC3 de TGMV se clonó en el vector de expresión pET29aDEST, que se cotransformó en *E. coli* junto al sistema de sumoilación y las tres isoformas de SUMO por separado (AtSUMO1, 2 y 3). Los extractos de proteínas totales se analizaron por *western blot* con los anticuerpos anti-His y anti-SUMO (**Figura 29**). La expresión de REn dio lugar a una banda por debajo de los 25 KDa que identificamos como la proteína viral (**Figura 29; calles 1-5**). En aquellos extractos que contenían las enzimas de

la ruta de sumoilación y las isoformas de AtSUMO1 y 2 se detectaron dos bandas de 15 KDa y 30 KDa, aproximadamente, correspondientes a los monómeros y dímeros de SUMO1/2 (el anticuerpo anti-SUMO utilizado no reconoce la isoforma AtSUMO3) (**Figura 29; calles 3, 4, 6 y 7**). Sin embargo, tras la expresión de la proteína viral y el sistema completo de sumoilación no se observó ninguna banda adicional del tamaño esperado para la forma sumoilada de REn, lo que indica que esta diana no se ha modificado postraduccionamente. Este mismo resultado se había obtenido previamente con Rep (Manuel Arroyo-Mateos, 2015; Miguel Ángel Sánchez Durán, 2009), lo que indica que ninguna de las proteínas virales implicadas en la replicación se sumoilan.

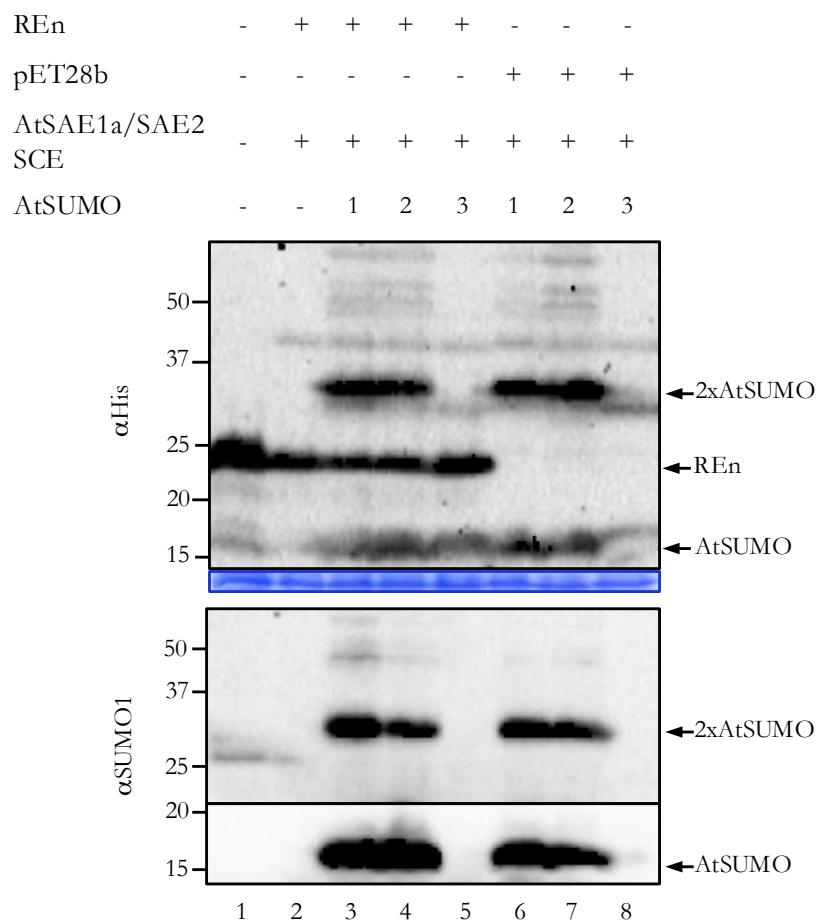


Figura 29. REn no se sumoila usando el sistema de sumoilación reconstruido en *E. coli*. Ensayo de sumoilación de la proteína REn de TGMV. El sistema de sumoilación de *A. thaliana* (SAE1a, SAE2, SCE1) y REn se coexpresaron junto a AtSUMO1, -2 o -3 en la cepa NCM631 de *E. coli*. En la tabla superior se indican las proteínas presentes en cada calle. El tamaño de las bandas del marcador de peso molecular se muestra en KDa.

PCNA de tomate se ubiquitina en la lisina K164

La sumoilación y la ubiquitinación de PCNA juegan un papel clave en el mantenimiento de la integridad del genoma (Choe y Moldovan, 2017), y ha sido descrita en los homólogos de levaduras (Hoege *et al.*, 2002; Frampton *et al.*, 2006), *Xenopus* (Leach y Michael, 2005), pollo (Arakawa *et al.*, 2006), humanos (Gali *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2009) y en *Arabidopsis* (Strzalka *et al.*, 2012; Strzalka *et al.*, 2013).

El número de enzimas implicadas en la ruta de ubiquitinación es muy superior a las involucradas en la sumoilación (Miriscecu *et al.*, 2018). En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado dos proteínas activadoras E1, UBA1 y UBA2 (Hatfield *et al.*, 1997), y se han predicho 37 enzimas conjugadoras E2 y alrededor de 1500 genes que codifican componentes de ligasas E3 (Lee y Kim, 2011) (Kraft *et al.*, 2005). Strzalka y colaboradores (2013) demostraron la ubiquitinación de AtPCNA1 y AtPCNA2 empleando un sistema reconstituido en bacteria, e identificaron las enzimas de la ruta que intervienen en esta modificación. Además, determinaron que la principal lisina de AtPCNA1/2 que se une covalentemente a la ubiquitina es la conservada 164, para lo que emplearon una estrategia de mutación similar a la utilizada en el presente trabajo y, por tanto, diferente a la escogida por estos mismos autores en los ensayos de sumoilación de estas dianas (Strzalka *et al.*, 2012).

Para establecer si la ubiquitina se une covalentemente a PCNA de tomate e identificar a qué lisinas, se llevaron a cabo ensayos de mono y poliubiquitinación en *E. coli*. El sistema utilizado, también basado en promotores T7, fue el mismo que emplearon Strzalka y colaboradores (2013); los marcos abiertos de lectura de las enzimas E1 (AtUBA2) y E3 (AtRAD5a) están clonados en el vector pACYCDUET, el de la E2 (AtUBC35) en pETDUET y la secuencia correspondiente a la forma madura de la ubiquitina (AtUBQ) en el plásmido pCDFDUET (**Figura 30B**). Al contrario de lo que sucede con la sumoilación, la enzima E2 no es capaz de transferir de forma directa la ubiquitina a la proteína diana, por lo que es necesario incluir la correspondiente ligasa E3 en el ensayo. Todos los vectores se cotransformaron en *E. coli* junto a SIPCNA silvestre o una de las diferentes versiones mutantes (K164R, K168R, K254R y K190R). Los extractos de proteínas se analizaron por *western blot* utilizando el anticuerpo anti-PCNA. Como se observa en la **figura 30C**, la expresión de PCNA silvestre junto a las enzimas del sistema completo de ubiquitinación y la ubiquitina dio lugar a una

única banda por debajo de los 50 KDa (**calle 2**), que coincidía con el tamaño esperado para PCNA-Ub. De esta forma, confirmamos que PCNA de tomate también se monoubiquitina utilizando el sistema de modificación de *Arabidopsis* conformado por las enzimas de UBA2/ UBC35/RAD5a (E1/E2/E3), en ensayos llevados a cabo en *E. coli*.

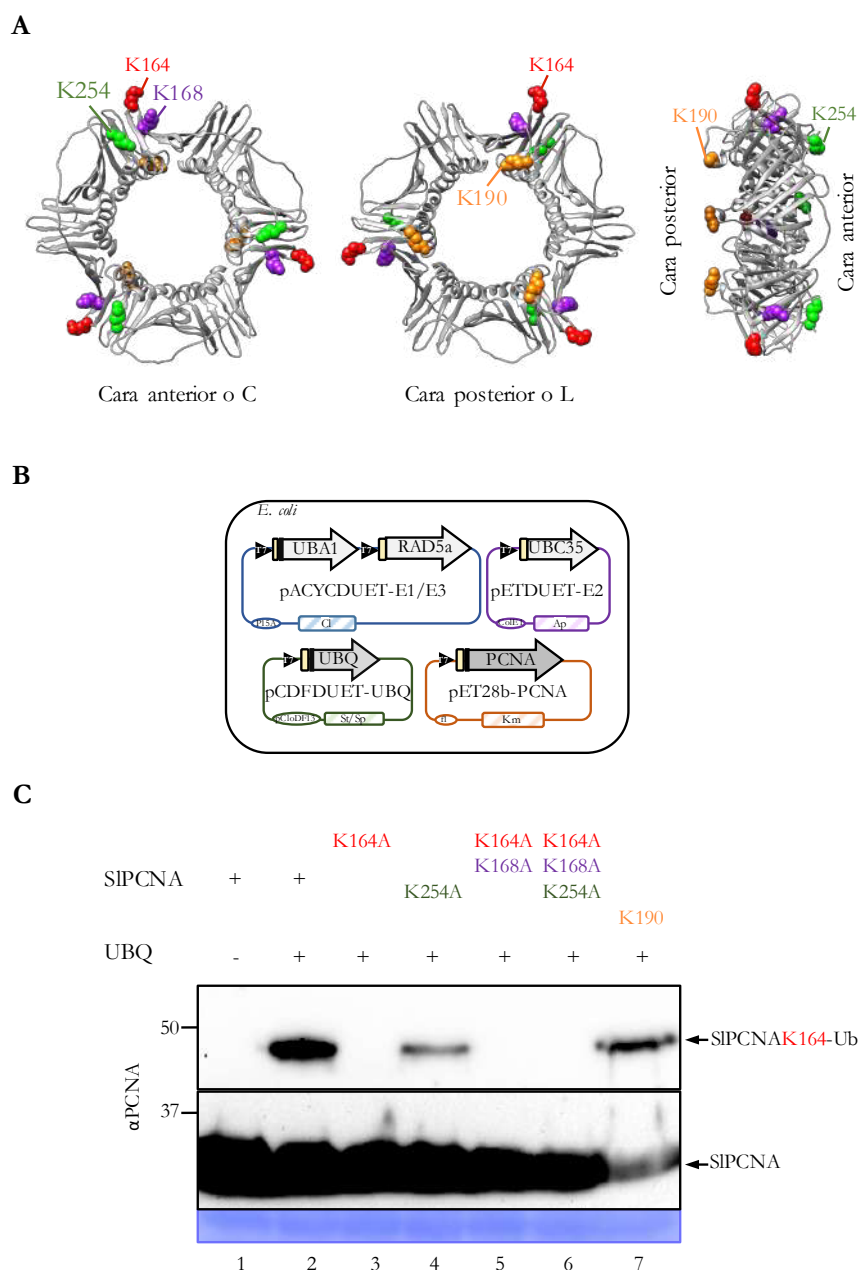


Figura 30. PCNA de tomate se ubiquitina en la lisina 164. A. Modelo tridimensional del trímero de PCNA de tomate. Las lisinas mutadas para el ensayo se destacan en rojo (K164), verde (K254), morado (K168) y azul (K190) en los tres monómeros de la estructura. **B.** Diagrama de los plásmidos utilizados para reconstituir el sistema ubiquitinación de *A. thaliana* y expresar la proteína diana en *E. coli*. Se destacan los orígenes de la replicación (P15A, ColE1, pCloDF13 y f1), los marcadores de

Figura 30. (continuación) resistencia (Km: kanamicina; Ap: ampicilina; Cl: cloranfenicol, St/Sp: estreptomicina/ espectinomicina), el promotor T7 (triángulo negro), la etiqueta de histidina (azul), el sitio de unión al ribosoma (amarillo) y los genes clonados en cada vector; pACYCDUET-E1/E3 (UBA1 y RAD5), pETDUET-E2 (UBC35), pCDFDUET-UBQ (ubiquitina) y pET28b-PCNA (SIPCNAs silvestre y versiones mutantes). **C.** Ensayo de ubiquitinación de PCNA silvestre y mutantes. Los vectores se cotransformaron en la cepa NCM631 y la expresión de proteínas se indujo con IPTG 1mM durante 20 horas. Los extractos se incubaron con el anticuerpo anti-PCNA. Las bandas detectadas están etiquetadas a la derecha. Los tamaños de referencia del marcador de peso molecular se muestran a la izquierda. La membrana se tiñó con azul de Coomassie como control de carga total de proteínas similar para los distintos extractos.

Para determinar qué lisina o lisinas de PCNA están siendo monoubiquitinadas, se utilizaron mutantes puntuales simples y dobles de la diana en los residuos 164, 168, 190 y 254. La lisina 164 se identificó como aceptor de ubiquitina en los homólogos de PCNA mencionados anteriormente, mientras que de K254 solo se ha descrito su capacidad de unirse covalentemente a SUMO en plantas y humanos. Las otras dos lisinas, 168 y 190, también se probaron como aceptores potenciales porque cumplen los criterios establecidos para su selección como residuos modificables por ubiquitina: (1) están muy conservadas, (2) han sido identificadas como sitios potenciales de ubiquitinación usando las herramientas informáticas UbPred (Radivojac *et al.*, 2010) y UbSite (Lee *et al.*, 2016) y (3) se localizan en el exterior del anillo trimérico (**Figura 30A**). Tras llevar a cabo el ensayo de ubiquitinación en *E. coli* y el análisis de los extractos totales de proteínas por *western blot*, se obtuvo que la banda identificada como PCNA-Ub (~45 KDa) no estaba presente al mutar la lisina 164 (mutantes K164A, K164/168A y K164/168/254A; **Figura 30B, calles 3, 5 y 6**), pero sí los la 254 y la 190 (mutantes simples K254A y K190A; **Figura 30B, calles 4 y 7**), lo que indicó que el residuo de PCNA de tomate que se une covalentemente a la ubiquitina es K164, como se había descrito para PCNA1 y PCNA2 de *A. thaliana* (Strzalka *et al.*, 2013).

Una vez detectada la monoubiquitinación de PCNA, se llevó a cabo el ensayo de poliubiquitinación. Para ello, el plásmido que contenía la enzima E2 AtUBC35 se sustituyó por otro pETDUET en el que se había clonado una segunda enzima E3, AtUEV1a. Esta proteína había sido identificada por Strzalka y colaboradores como responsable de la poliubiquitinación de la lisina 164 de AtPCNA1 y AtPCNA2 al coexpresarse con AtUBC35 y AtRAD5a. PCNA de tomate se cotransformó junto al sistema completo de poliubiquitinación en *E. coli* y se llevó

a cabo la expresión, extracción y análisis de las proteínas totales del mismo modo que para el ensayo de ubiquitinación. En esta ocasión, no se detectó ninguna banda de un peso molecular mayor a PCNA que pudiese corresponder a esta proteína unida covalentemente a varios péptidos de ubiquitina (dato no mostrado), aunque no podemos descartar que el homólogo de tomate se poliubiquitine.

Rep no interfiere en la ubiquitinación de PCNA de tomate

Los resultados obtenidos anteriormente confirmaron que PCNA de tomate se sumoila y que la proteína Rep de geminivirus impide que SUMO se conjuge a los dos residuos de lisina modificados, K164 y K254. También, en ensayos en *E. coli*, se mostró que PCNA se ubiquitina en la misma lisina 164.

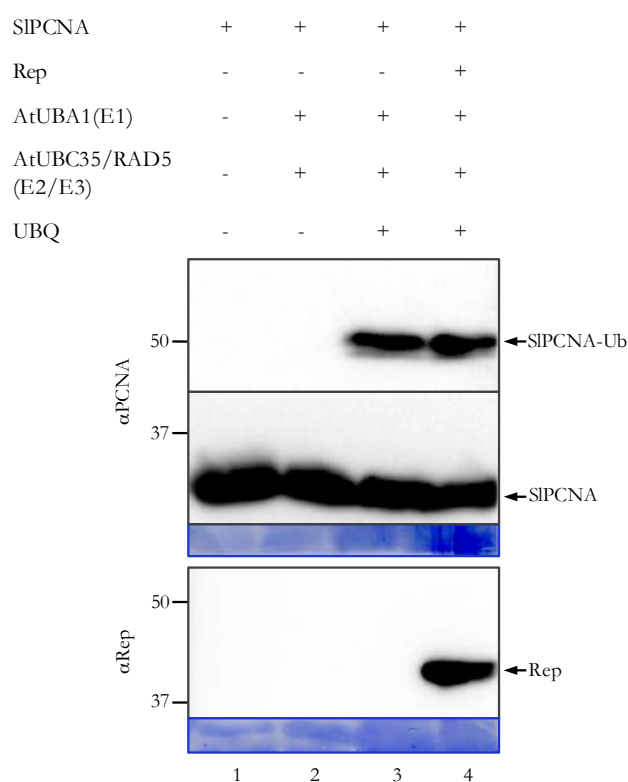


Figura 31. Rep no interfiere en la ubiquitinación de PCNA de tomate utilizando un sistema reconstituido en bacteria. Las enzimas del sistema de ubiquitinación de *A. thaliana* UBA1 (E1), UBC35 (E2), RAD5a (E3) y UBQ (péptido ubiquitina maduro) se coexpresaron con PCNA de tomate y Rep de TGMV en la cepa NCM631 de *E. coli*. El ensayo se llevó a cabo como se describe en la leyenda de la figura 12. Las combinaciones de proteínas se indican en el panel superior (+/-). La membrana se tiñó con azul de Coomassie para confirmar la igualdad de carga de cada muestra. El tamaño de las bandas del marcador de peso molecular se muestra en kDa.

Aunque no se conoce el mecanismo por el que Rep interfiere en la sumoilación de PCNA, los resultados previos sugieren que la interacción directa entre ambas proteínas podría alterar la unión de la enzima conjugadora de SUMO a la diana, o bien ocultar las lisinas aceptoras, impidiendo así la conjugación de SUMO. Considerando que K164 se modifica tanto por sumoilación como por ubiquitinación, nos preguntamos si Rep también afectaría a la unión covalente de la ubiquitina. Con tal fin, se llevó a cabo el ensayo de ubiquitinación en bacterias con PCNA y Rep junto al sistema de ubiquitinación de *A. thaliana* (AtUBA2, AtUBC35, AtRAD5a y AtUBQ). Los extractos de proteína totales se analizaron mediante *western blot* utilizando anticuerpos frente PCNA y Rep. Como se observó previamente, al coexpresar el sistema de ubiquitinación y PCNA se obtuvo una banda de ~ 50 KDa correspondiente a PCNA-Ub (**Figura 31, calle 3**). Sin embargo, en esta ocasión, la presencia de Rep no disminuyó la intensidad de la banda anterior (**Figura 31, calle 4**), lo que indica que esta proteína viral no interfiere con la ubiquitinación de PCNA y que, por tanto, reduce de forma específica la unión de SUMO a las lisinas aceptoras. Para confirmar la expresión de la proteína viral se incubaron todos los extractos con un anticuerpo contra Rep de TGMV. Sólo en la calle que contenía el extracto en el que se había expresado la proteína viral se detectó una banda de unos 40 KDa, que se ajusta al tamaño esperado para la misma (**Figura 31, calle 4**).

Rep favorece la localización de SPCNA en áreas concretas del nucleoplasma

Los geminivirus se replican en células vegetales diferenciadas, donde reactivan el ciclo celular e inducen la expresión de la maquinaria de síntesis de DNA del huésped (Nagar *et al.*, 1995). La expresión de Rep produce un incremento en la acumulación de PCNA e induce la endoreduplicación del DNA cromosómico (Egelkroun *et al.*, 2001; Nagar *et al.*, 2002). En los núcleos en los que Rep del begomovirus TGMV está presente, Nagar y colaboradores (2002) observaron que la cromatina mantiene una distribución similar a la que presenta durante la fase S del ciclo celular, organizándose en foci que podrían corresponder a los sitios de replicación del DNA. En esta fase, PCNA muestra un patrón de localización similar, agrupándose en foci que representan las factorías activas de replicación celular (Essers *et al.*, 2005; Meister *et al.*, 2007). En plantas, este patrón

punteado se ha observado para AtPCNA1 durante la fase S temprana de ciclo celular (Yokoyama *et al.*, 2016).

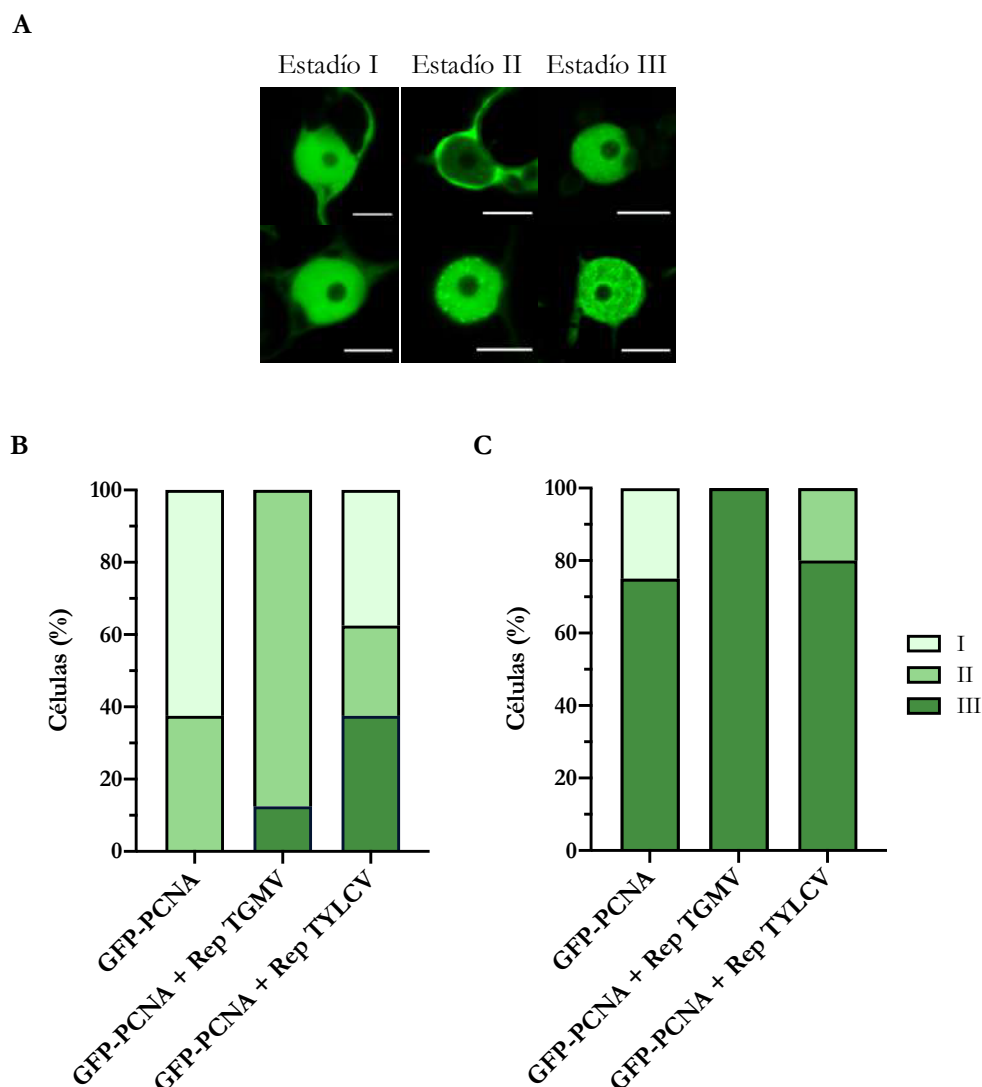


Figura 32. La presencia de Rep de los virus TGMV y TYLCV acelera la localización subcelular de GFP-PCNA en foci. Las hojas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con las construcciones GFP-PCNA, Rep TGMV y Rep TYLCV y se visualizaron mediante microscopía confocal a los 2 y 3 dpi. **A** y **B**. Imágenes de núcleos de células epidérmicas representativos de la señal emitida por GFP-PCNA en los estadios I, II y III a los 2 dpi (**A**) y 3 dpi (**B**). Escala = 10 μ m. **C** y **D**. Porcentaje de células que expresan GFP-PCNA, GFP-PCNA + Rep TGMV y GFP-PCNA + Rep TYLCV en cada estadio a los 2 (**C**) y 3 (**D**) dpi. Para cada columna, n = 8-10 células. GFP: 26 KDa; GFP-PCNA: 56 KDa.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, nos planteamos si la expresión de Rep alteraría la localización subnuclear de PCNA y si ello podría ser representativo de

un cambio en la maquinaria de replicación. Para comprobarlo, se realizó un ensayo de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*, en las que se coagroinfiltró una construcción para expresar PCNA de tomate fusionado a GFP en su extremo N-terminal (GFP-PCNA) y otra para Rep de TYLCV o TGMV (**Figura 32**). La distribución subnuclear de GFP-PCNA se observó por microscopía confocal dos y tres días después de la infiltración (2 y 3 dpi), estableciéndose tres estadios (I, II y III) en función del patrón que mostraba la señal emitida; como referencia, se utilizó el patrón de localización subnuclear que presenta GFP-AtPCNA1 a lo largo de la interfase del ciclo celular (Yokoyama *et al.*, 2016). El estadio I se caracterizó por la distribución uniforme de la proteína en el nucleoplasma; el estadio II, por la aparición de algunos foci, siendo el número observado inferior a 50; y el estadio III representó las células cuyo nucleoplasma mostraba una señal punteada, con un número de foci mayor a 50 (**Figura 32A y 32B**). A los 2 dpi, el 62,5% de las células que solo expresaron GFP-PCNA exhibieron una señal homogénea en el núcleo (estadio I), mientras que el 37,5% presentaron algunos foci (estadio II) (**Figura 32C**). A los 3 dpi, el número de foci por célula aumentó, de modo que el 75% de las células manifestaron un patrón punteado correspondiente al estadio III (**Figura 32D**). La coexpresión de la proteína Rep de los dos geminivirus produjo un incremento tanto en el número de células que mostraban foci de GFP-PCNA como en el número de foci por núcleo. Este aumento fue especialmente visible a los 2 dpi, cuando el 100% y el 62,5% de los núcleos que también contenían Rep de TGMV y Rep de TYLCV, respectivamente, ya presentaban algún foci (estadios II y III) (**Figura 32C**). Concretamente, el 12,5% de las células que coexpresaron GFP-PCNA y Rep de TGMV y el 37,5% que contenían GFP-PCNA y Rep de TYLCV ya se encontraban en el estadio III. Este resultado indica que la presencia de la proteína Rep de geminivirus favorece la distribución de SPCNA en foci nucleares.

La unión a AtSUMO1 activa la localización de PCNA de tomate en foci en el núcleo

A lo largo de la interfase del ciclo celular, se ha observado que AtPCNA1 exhibe distintos patrones de localización subnuclear, los cuales son indicadores de la progresión de la fase S y, concretamente, de la replicación del DNA (Yokoyama *et al.*, 2016). En levaduras, PCNA es modificada por SUMO de forma constitutiva

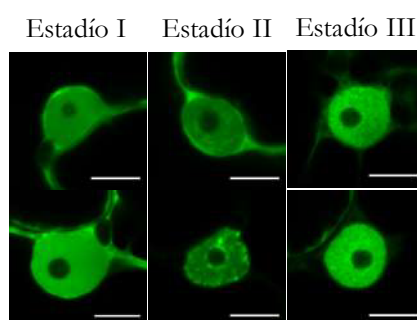
durante esta fase (Papouli *et al.*, 2005; Pfander *et al.*, 2005). En *Arabidopsis* y tomate, PCNA también se sumoila, pero se desconoce cuándo tiene lugar su modificación (Strzalka *et al.*, 2012; este trabajo).

Los resultados anteriores muestran que GFP-PCNA expresado en hojas de *N. benthamiana* presenta una dinámica de distribución nuclear similar a la descrita para AtPCNA1 durante el avance del ciclo celular (Yokoyama *et al.*, 2016). Considerando que PCNA es sumoilado durante la fase S, nos preguntamos si esta modificación alteraría su localización subnuclear. Para llevar a cabo este estudio, se expresaron fusiones traduccionales de GFP con los mutantes de PCNA deficientes en sumoilación (los mutantes simples y doble en las lisinas 164 y 254) y una versión de la proteína que mimetiza un estado constitutivamente sumoilado (GFP-PCNA-SUMO) en hojas de *N. benthamiana*. Esta versión se generó fusionando la forma madura de AtSUMO1 (AtSUMO1GG) a continuación de la lisina 254 de PCNA, por lo que se eliminaron los últimos aminoácidos del extremo carboxilo de la diana. Aunque este pequeño péptido se conjuga a la lisina aceptora a través de la doble glicina situada en su C-terminal, varios autores comprobaron que esta fusión es una forma completamente funcional y una estrategia útil en el estudio del efecto de la sumoilación sobre una proteína diana (Gali *et al.*, 2012; Hishida *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2001; Shiio y Eisenman, 2003; Xie *et al.*, 2007).

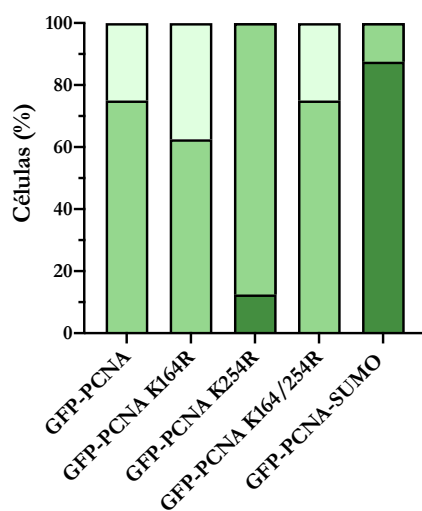
Como en el ensayo anterior, se observó la distribución subnuclear de las diferentes versiones de GFP-PCNA a los 2 y 3 dpi, y clasificándose las células en los estadios I, II o III según el criterio establecido previamente (**Figura 33A y 33B**). A los dos días tras la infiltración, el 87,5% de las células que expresaban la quimera GFP-PCNA-SUMO mostraron una señal punteada en el nucleoplasma (estadio III), mientras que el resto presentó mayoritariamente pocos foci (estadio II). Tan solo con el mutante GFP-PCNA K254R se observaron algunas células en el estadio III (12,5%) (**Figura 33C**). A los 3 dpi, en cambio, los núcleos del 60%, 50%, 80% y 60% de las células que expresaban GFP-PCNA silvestre y los mutantes GFP-PCNA K164R, K254R y K164/254R, respectivamente, exhibieron numerosos foci, aunque los núcleos con GFP-PCNA-SUMO seguían mostrando el mayor porcentaje (90%) (**Figura 33D**). La expresión de todas las versiones de GFP-PCNA se confirmó por *western blot* (**Figura 33E**). Estos resultados sugieren que las mutaciones en las lisinas 164 y 254 no alteran la distribución subnuclear de

la proteína silvestre, mientras que la fusión de AtSUMO1 al extremo carboxilo terminal activa su localización en foci. Esto indicaría que la unión covalente del pequeño péptido no es imprescindible para que PCNA adquiriera la distribución punteada observada en el núcleo, pero favorece su localización temprana en los foci. Alternativamente, podría significar que el efecto conductor de SUMO tiene lugar a través de una interacción no covalente con PCNA.

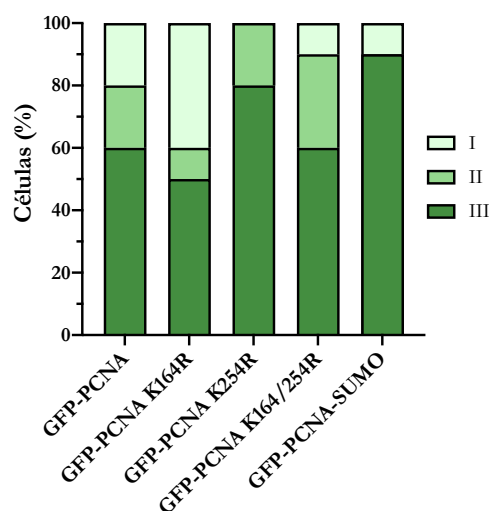
A



B



C



E

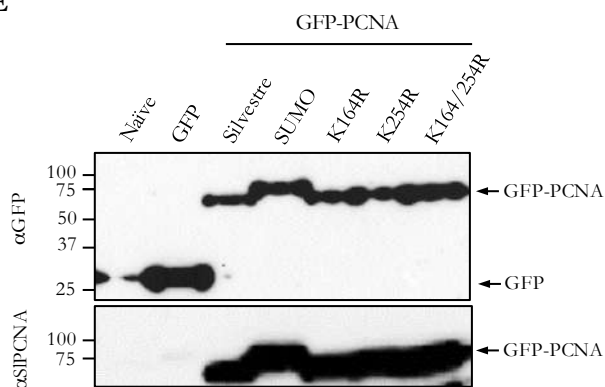


Figura 33. La mutación de las principales lisinas sumoilables de SIPCNA no altera su distribución subnuclear, pero la unión covalente de SUMO acelera su localización en numerosos foci. El ensayo se llevó a cabo tal y como se describe en la leyenda de la figura 14. GFP-PCNA silvestre y los mutantes GFP-PCNA K164R, GFP-PCNA K254R, GFP-PCNA K164/254R y GFP-PCNA-SUMO se expresaron en hojas de *N. benthamiana*. **A** y **B**. Imágenes de microscopía confocal que muestran la fluorescencia de GFP-PCNA en núcleos de células epidérmicas en estadio I, II y III a los 2 dpi (**A**) y 3 dpi (**B**). Escala = 10 μ m. **C** y **D**. Porcentaje de células que expresan una de las versiones de GFP-PCNA en cada estadio a los 2 dpi (**C**) y 3 (**D**) dpi. Para cada columna, n = 8-10 células. **E**. *Western blot* de los extractos de proteínas totales de las hojas agroinfiltradas con GFP y las distintas variantes de GFP-PCNA a los 3 dpi. Como control negativo se incluyó un extracto de hoja sin inocular (naïve). Para la detección de GFP-PCNA se emplearon los anticuerpos antiGFP y antiSIPCNA. El marcador de peso molecular se indica a la izquierda (KDa). GFP: 26 KDa; GFP-PCNA: 56 KDa; GFP-PCNA-SUMO: 67 KDa.

La mutación de las lisinas 164 y 254 de PCNA de tomate no alteran su interacción con AtSUMO1

Para comprobar si la interacción entre PCNA de tomate y SUMO1 de *Arabidopsis* tiene lugar a través de la conjugación del pequeño péptido a los residuos de lisina, se llevó a cabo un ensayo de complementación fluorescente bimolecular (BiFC) en hojas de *N. benthamiana*. Para ello, se clonó AtSUMO1, PCNA silvestre y los mutantes simples de la diana PCNA K164R y K254R y el doble K164R/254R en el sistema de vectores generado por Gehl y colaboradores (2009), de modo que se expresaran como proteínas de fusión unidas a la mitad N-terminal o C-terminal del fluoróforo SCFP (SCFP^N, fragmento 1-173 aa; SCFP^C, fragmento 156-239 aa) (**Figura 34A**). La reconstitución de la fluorescencia de SCFP se empleó para determinar la interacción de SCFP^C-PCNA silvestre y los distintos mutantes con SCFP^N-SUMO1, a los 2 y 3 dpi. Como control, cada construcción se combinó con el vector vacío que contenía la mitad del fluoróforo correspondiente, sin que se observase fluorescencia en ningún caso. A los 2 dpi, se obtuvo una señal fluorescente en el citoplasma y el núcleo de las células que expresaban tanto PCNA silvestre como los distintos mutantes junto a SUMO1 (**Figura 34B**). En el nucleoplasma destacó la presencia de varios agregados similares a cuerpos nucleares (*nuclear bodies*, NB), de tamaño y número similar en todos los casos. A los 3 dpi, la interacción del par PCNA-SUMO1 mantuvo la misma distribución en la célula y, de nuevo, no se observaron diferencias entre la localización de los mutantes de PCNA o la proteína silvestre con SUMO1 (**Figura 34C**). Sin embargo, la señal fluorescente emitida por los cuerpos nucleares fue menos intensa que a los 2 dpi.

Este resultado indica que PCNA interacciona con SUMO1 y que ello no se ve alterado por la mutación de las lisinas 164 y 254 (**Figura 34B** y **34C**). Esto podría deberse a que: (1) alguna otra lisina está siendo sumoílada en ausencia de las dos principales, (2) PCNA se une a SUMO1 de forma no covalente y es atraída a los sitios activos de sumoílación, o (3) PCNA interacciona con otras proteínas sumoíladas por SUMO1.

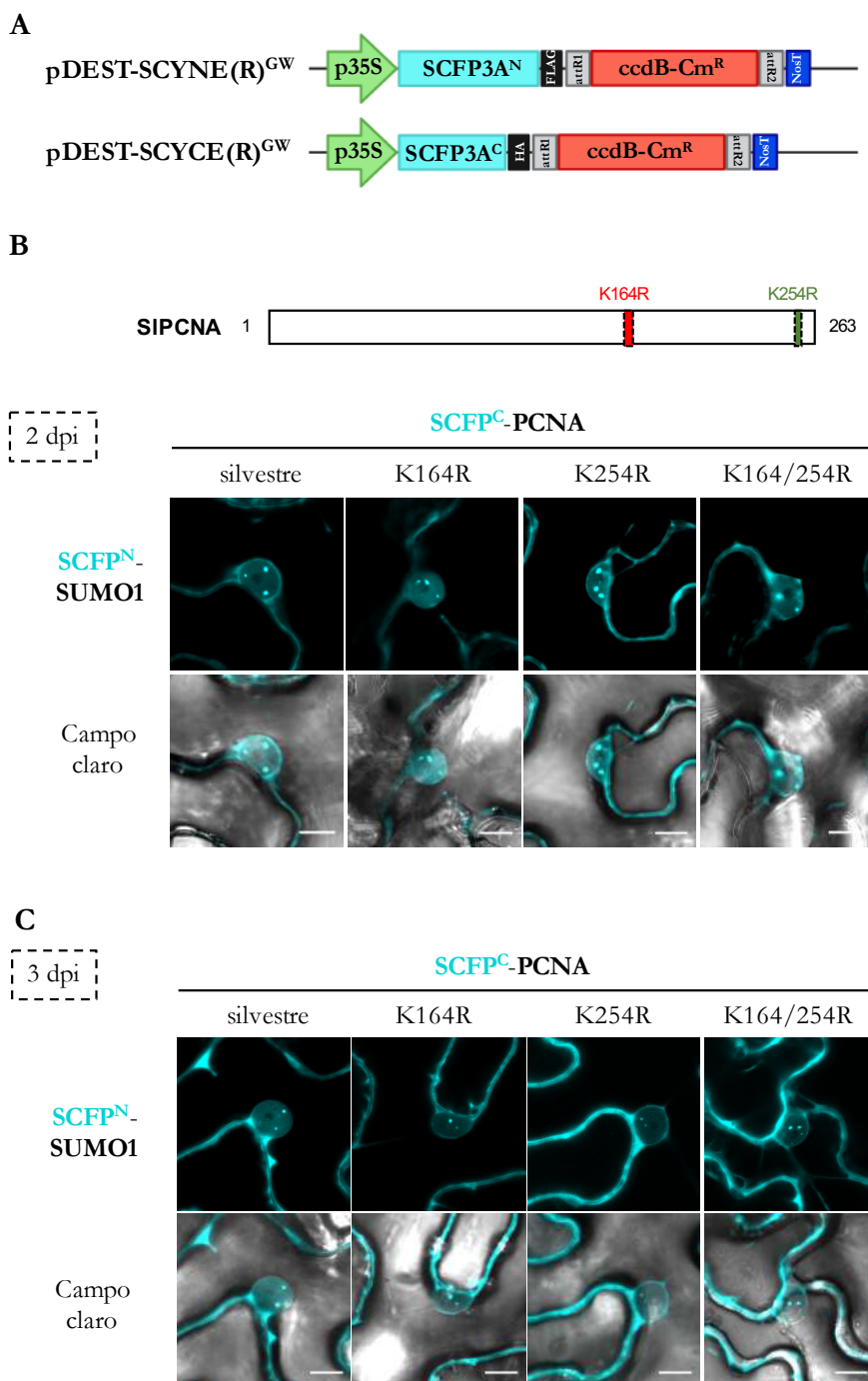


Figura 34. Ensayo de interacción por BiFC de SUMO1 y los mutantes de PCNA de tomate.
A. Esquema de los vectores empleados: pDEST-SCYNE(R)^{GW} (SCFP3A^N, 1–173 aa; etiqueta FLAG) y pDEST-SCYCE(R)^{GW} (SCFP3A^C, 156–239; etiqueta HA). Ambos contienen un fragmento de SCFP3A (SCFP) para su fusión al extremo N-terminal de la proteína diana (adaptado de Gehl *et al.*, 2009). **B y C.** Localización subcelular de SCFP^C-PCNA silvestre y de los mutantes puntuales en las lisinas 164 y 254 con SCFP-SUMO1 en células epidérmicas de *N. benthamiana*. El tejido agroinfiltrado se observó mediante microscopía confocal a los 2 dpi (**B**) y 3 dpi (**C**). Se muestra la fluorescencia de CFP y la combinación CFP + campo claro. Escala = 10 μ m.

PCNA también interacciona con SUMO de forma no covalente

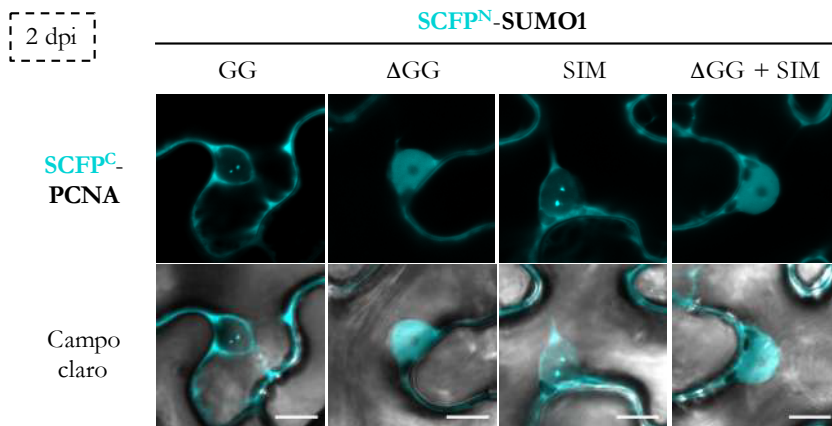
Para caracterizar la interacción de PCNA con SUMO1 y comprobar si la formación de los cuerpos nucleares observados se debe a la actividad conjugativa del péptido modificador, se llevó a cabo el ensayo de BiFC con las versiones de AtSUMO1 descritas en Mazur *et al.*, 2019. Éstas incluyen: (1) una variante no conjugativa de SUMO1, que carece del motivo diGly final necesario para su unión a la lisina aceptora (SUMO1 Δ GG); (2) el mutante afectado en la interacción no covalente con las proteínas diana, SUMO1 F32A/I34A (denominado SUMO1 SIM), en el que se eliminaron los dos residuos hidrofóbicos conservados determinantes para su unión a través de los motivos SIM, y (3) el mutante doble SUMO1 Δ GG+SIM (**Figura 35A**). Todas las versiones de SUMO1 se fusionaron en su extremo N-terminal a SCFP^N y se coinfiltraron con SCFP^C-PCNA silvestre en hojas de *N. benthamiana*.

A los 2 y 3 dpi, la coexpresión de SCFP^C-PCNA junto a SCFP^N-SUMO1 silvestre o SCFP^N-SUMO1 SIM permitió la reconstitución de la proteína SCFP en el citoplasma y en varios cuerpos nucleares, siendo muy leve la señal emitida por el fluoróforo en el nucleoplasma (**Figura 35B y 35C**). Sin embargo, la combinación de PCNA con los mutantes de SUMO1 defectivos en conjugación (Δ GG y Δ GG+SIM) no dio lugar a la formación de ningún agregado nuclear, detectándose una señal homogénea y más intensa en el nucleoplasma (**Figura 35B y 35C**). La expresión y acumulación de niveles similares de las distintas variantes de SUMO1, así como la expresión de PCNA, se comprobó por *western blot* (**Figura 35D**). Los resultados obtenidos muestran que presencia de la forma madura de SUMO es esencial para la formación de cuerpos nucleares, y que PCNA también interacciona con AtSUMO1 de forma no covalente, tanto en el nucleoplasma como en el citoplasma, al detectarse su unión a la variante que carece del motivo diGly.

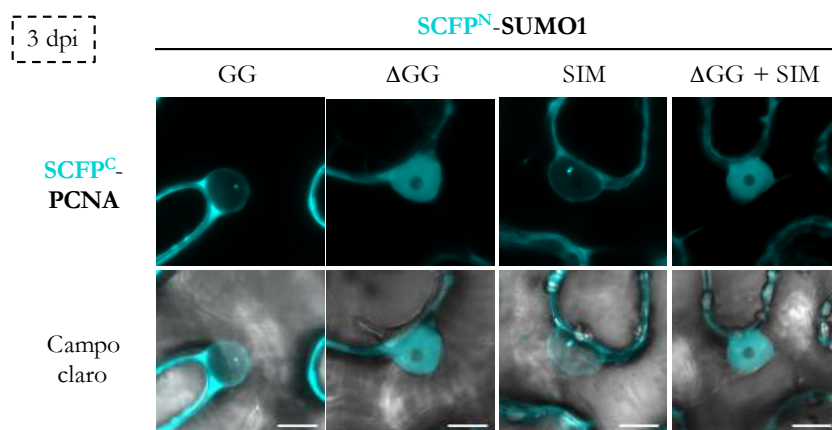
A



B



C



D

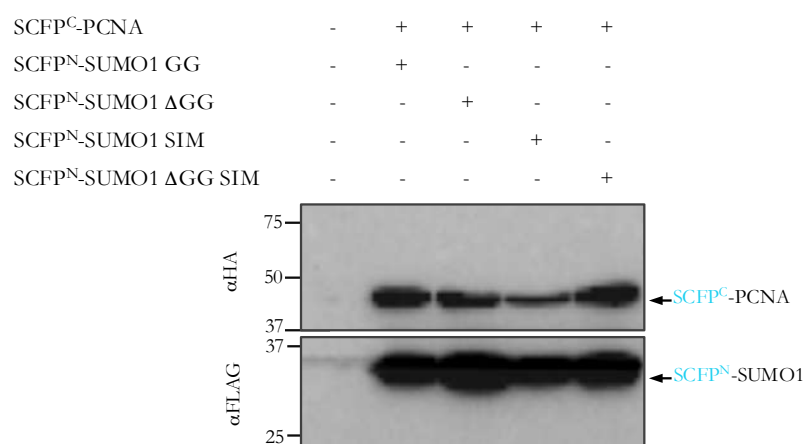


Figura 35. Ensayo de interacción por BiFC de PCNA con las variantes de SUMO1. **A.** Representación esquemática de los residuos mutados y eliminados en los mutantes de SUMO1: SIM, F32A/I34A; Δ GG: delección del motivo diGly final (Δ G92/93). **B y C.** Localización subcelular de la interacción de PCNA y las variantes de SUMO1 en células epidérmicas de *N. benthamiana*. Las hojas se agroinfiltraron con SCFPC-PCNA silvestre y SCFPN-SUMO1 (forma madura, GG), SCFPN-SUMO1 Δ GG, SCFPN-SUMO1 SIM y SCFPN-SUMO1 Δ GG+SIM. El tejido infiltrado se observó mediante microscopía confocal a los 2 dpi (**B**) y 3 dpi (**C**). Se muestran la fluorescencia de CFP y la combinación CFP + campo claro. Escala = 10 μ m. **D.** Detección de la expresión de las distintas variantes de SCFPN-SUMO1 y SCFPC-PCNA por *western blot* a los 3 dpi. Los extractos de proteínas totales se analizaron con los anticuerpos antiHA y antiFLAG para detectar SCFPC-PCNA y SCFPN-SUMO1, respectivamente. SCFPN-SUMO1: 32,3 KDa; SCFPC-PCNA: 41,3 KDa.

PCNA de tomate contiene dos motivos potenciales de interacción con SUMO

Los resultados obtenidos por BiFC muestran que SIPCNA interacciona con la variante no conjugativa de SUMO1, lo que indica que la unión entre ambas proteínas puede estar produciéndose por una vía diferente a la sumoilación. Dado que SUMO es capaz de interaccionar con múltiples proteínas de forma no covalente, a través de los denominados como motivos de interacción con SUMO (SIM), nos preguntamos si PCNA podría contener uno de estos motivos.

Los motivos SIM están tradicionalmente compuestos por una secuencia corta de aminoácidos ([V/I]-X-[V/I]-[V/I]) flanqueados por residuos ácidos hidrofóbicos (Song *et al.*, 2010), aunque se han descrito hasta una decena de variantes del mismo. Empleando las herramientas informáticas GPS-SUMO (Ren *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2014) y JASSA (Beauclair *et al.*, 2015), se identificaron en PCNA dos secuencias como potenciales sitios de unión a SUMO, denominadas SIM 1 y SIM 2 (**Figura 36**). Estos motivos, clasificados como SIM tipo β ([V/I]-[V/I]-X-[V/I/L]) (Song, 2004), se encuentran conservados en otros homólogos de PCNA de plantas y, en el caso del SIM 1, también en PCNA de vertebrados (**Tabla 7**).

Tabla 7. Motivos SIM identificados para distintos homólogos de PCNA.

Motivo	Organismo ^a	Secuencia	GPS SUMO		JASSA
			Puntuación	P valor	Puntuación
SIM 1 (87-90)	SIPCNA	IITI	43,44	0,057	0,877
	NbPCNA	IITL	35,792	0,108	1,392
	AtPCNA1	IITI	42,8	0,061	0,877
	AtPCNA2	IITI	43,44	0,057	0,877
	ZmPCNA	IITI	42,74	0,06	0,877
	OsPCNA	IITI	44,82	0,049	0,877
	MpPCNA	IITM	—	—	—
	ScPCNA	TLTL	—	—	—
	SpPCNA	LVTL	—	—	0,223
	CePCNA	TCML	—	—	—
	XIPCNA	IITL	40,965	0,085	1,392
	GgPCNA	IITL	38,693	0,103	1,392
	MmPCNA	IITL	38,693	0,103	1,392
	HsPCNA	IITL	38,693	0,103	1,392
SIM 2 (159-162)	SIPCNA	VISV	38,719	0,09	2,632
	NbPCNA	VISV	39,001	0,089	0,700
	AtPCNA1	VISV	38,739	0,09	0,700
	AtPCNA2	VISV	38,739	0,09	0,700
	ZmPCNA	IISV	38,865	0,037	0,700
	OsPCNA	IISV	45,474	0,046	0,272
	MoPCNA	TISV	—	—	—
	ScPCNA	NIMI	—	—	—
	SpPCNA	TINA	—	—	—
	CePCNA	NITA	—	—	—
	XIPCNA	VISC	—	—	—
	GgPCNA	VISC	—	—	—
	MmPCNA	VISC	—	—	—
	HsPCNA	VISC	—	—	—

^aPCNA de *S. lycopersicum* (SIPCNA; NP_001234844.1), *N. benthamiana* (NbPCNA; AAG24908.1), *A. thaliana* (AtPCNA1; NP_172217.1; AtPCNA2; NP_180517.1), *Zea mays* (ZmPCNA; NP_001105461.1), *Oryza sativa* (OsPCNA; XP_015627245.1), *Marcantia polymorpha* (MpPCNA; PTQ33763.1), *S. cerevisiae* (ScPCNA; NP_009645.1), *S. pombe* (SpPCNA; NP_596504.1), *Caenorhabditis elegans* (CePCNA; NP_500466.3), *X. laevis* (XIPCNA; P18248.1), *Gallus gallus* (GgPCNA; NP_989501.1), *M. musculus* (MmPCNA; NP_035175.1) y *H. sapiens* (HsPCNA; 5IY4_A)

En la estructura tridimensional del homólogo de tomate, ambos motivos putativos forman parte de una lámina β ; SIM 1 está localizado en el dominio 1, orientado hacia la cara anterior, y SIM 2 en el dominio 2, en la zona lateral del

trímero y separado por un aminoácido de la lisina 164 (**Figura 36**). La función potencial de estas secuencias como mediadoras de la interacción no covalente con SUMO se puede confirmar mediante ensayos de interacción con mutantes de PCNA en uno o varios de los residuos que los componen. Adicionalmente, estos SIM podrían actuar favoreciendo la sumoilación de esta proteína, como se ha descrito para muchas dianas de mamíferos (Knipscheer *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2006; Meulmeester *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2008).

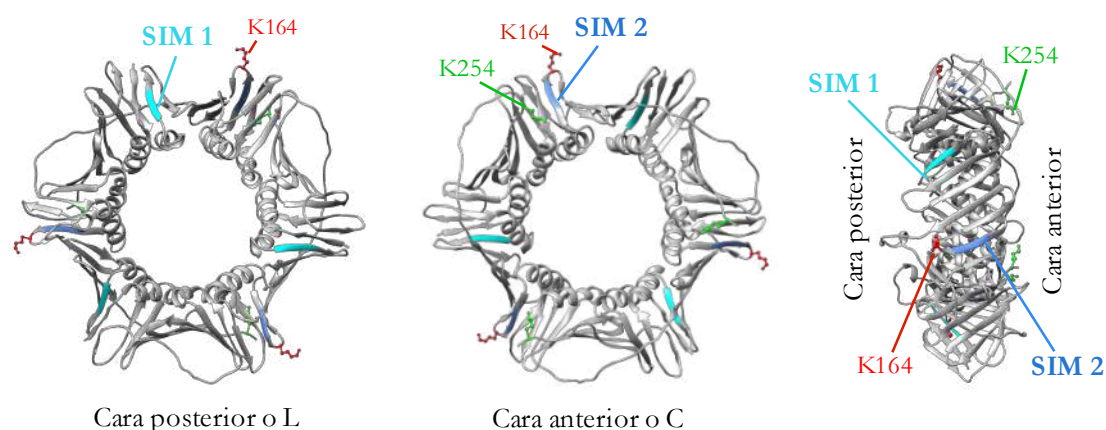


Figura 36. Localización de los motivos de interacción con SUMO identificados en PCNA de tomate. Modelo estructural del trímero de PCNA de tomate mostrando la posición que ocupan los motivos SIM1 (cyan) y SIM2 (azul marino) así como la de las lisinas que se sumoilan (K164 y K254).

RESULTADOS 2

Análisis de la helicasa de DNA SRS2 de *Arabidopsis*

SRS2 es una proteína conservada en plantas

Srs2 es una helicasa de DNA perteneciente a la superfamilia 1 (SF1) que presenta similitud estructural y funcional con las helicasas bacterianas UvrD, Rep y PcrA (Aboussekhra *et al.*, 1989). Esta proteína ha sido ampliamente caracterizada en *S. cerevisiae*. En plantas, la existencia de un homólogo fue confirmada por Blanck y colaboradores, quienes realizaron la caracterización bioquímica de SRS2 de *A. thaliana* (Blanck *et al.*, 2009). Según este estudio, SRS2 es una proteína codificada por un gen de copia única, conservada en el reino vegetal pero no en el animal, donde solo se han encontrado homólogos en invertebrados y anfibios. A pesar de su ausencia en otros metazoos como los mamíferos, éstos disponen de varias helicasas que cumplen funciones análogas a Srs2 (Karpenshif y Bernstein, 2012; Uringa *et al.*, 2011). En humanos, se han propuesto distintos ortólogos, entre los que destacan PARI, FBH1 y RTEL1 (Bacquin *et al.*, 2013; Barber *et al.*, 2008; Chiolo *et al.*, 2007; Moldovan *et al.*, 2012; Recker *et al.*, 2014).

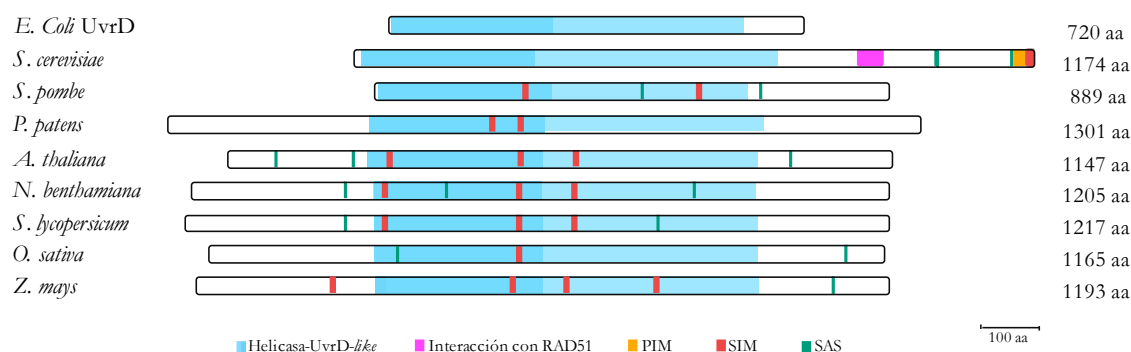


Figura 37. Esquema de la organización de los dominios y motivos identificados en SRS2. Comparación de Srs2 de levaduras y las proteínas homólogas presentes en plantas. Los dominios helicasa se han identificado con la herramienta Interpro y se han coloreado con dos tonalidades de azul, que representan el fragmento N- y C-terminal (la extensión de cada fragmento se indican en la tabla 9). En el extremo C-terminal de Srs2 de *S. cerevisiae* se muestran la región de interacción con Rad51 (magenta), los motivos de unión a PCNA o PIM (naranja) y SUMO o SIM (rojo) y los residuos de lisina sumoilados (K1081, K1089 y K1142, verde). En Srs2 de *S. pombe* y los homólogos en plantas se destacan los motivos SIM y SAS identificados con las herramientas GPS-SUMO, JASSA y SUMOplot™ (Tabla 10). La longitud de cada proteína se indica a la derecha (aa).

Para profundizar en el estudio de SRS2 en plantas, se analizaron las proteínas homólogas a esta helicasa presentes en varias especies vegetales: *S. lycopersicum*, *N. benthamiana*, *O. sativa*, *Z. mays* y *P. patens* (**Tabla 8**). En aquellos organismos en los que existen varias isoformas, se escogieron las que muestran un mayor porcentaje de identidad con respecto a AtSRS2 (**Tabla 8**). En el siguiente análisis también se incluyó Srs2 de *S. pombe*, un ortólogo de ScSrs2 con actividad antirrecombinasa descrita (Doe y Withby, 2004).

Tabla 8. Listado de homólogos de Srs2 en varias especies de plantas.

Organismo	Isoforma	Longitud	Identidad ^b (%)	Cobertura (%)	Número de acceso ^a
<i>A. thaliana</i>	—	1147	—	—	NP_001320059.1
<i>S. lycopersicum</i>	—	1289	56.10	98	XP_010318187.1
<i>N. benthamiana</i>	—	1205	56.54	99	Nbv6.1trP37483
<i>Z. mays</i>	X1	1151	58.33	79	XP_008670427.1
	X2	1183	61.83	79	XP_008670428.1
<i>O. sativa</i>	X1	1143	59.38	79	XP_015647242.1
	X2	1145	59.39	79	XP_015647243.1
	X3	1143	59.38	79	XP_015647244.1
	X4	1106	58.04	79	XP_015647245.1
	X5	1155	61.03	79	XP_015647246.1
	X6	1166	62.3	79	XP_015647247.1
	X7	1143	61.31	79	XP_015647248.1
	X8	1168	62.3	79	XP_015647249.1
	X9	938	65.22	60	XP_015647250.1
<i>P. patens</i>	X1	931	51.02	79	XP_024395384.1
	X2	935	51.07	79	XP_024395408.1
	X3	936	51.23	79	XP_024395416.1
	X4	862	48.67	79	XP_024395426.1
	X5	931	50.87	79	XP_024395434.1
	X6	783	54.9	61	XP_024395447.1
	X7	783	54.9	61	XP_024395458.1
	X8	931	50.87	79	XP_024395471.1
	X9	942	51.28	79	XP_024395476.1

^aNúmero de acceso en GenPept, salvo para *N. benthamiana*, cuya secuencia se obtuvo de *N. benthamiana Genome and Transcriptome Sequencing Consortium*. ^bPorcentaje de identidad con respecto a AtSRS2.

Srs2 de *S. cerevisiae* contiene, en su extremo N-terminal, un dominio helicasa homólogo a la proteína UvrD de *E. coli* (UvrD-like) (Aboussekhra *et al.*, 1989; Rong *et al.*, 1991). Éste se divide, a su vez, en dos dominios estructurales, que corresponden a la región N-terminal, que media la unión a ATP (IPR014016), y la región C-terminal, que participa principalmente en la unión al DNA (IPR014017) (**Tabla 8**). Este dominio helicasa, que en los homólogos de plantas ocupa una posición central en la proteína, se identificó en todas las proteínas SRS2 utilizando el programa Interpro (EMBL-EBI (**Figura 37; Tabla 9; Figura S2**). En el alineamiento de las secuencias proteicas se incluyó también la helicasa de *E. coli* UvrD, de la que toma nombre el dominio característico (**Figura S2**).

Tabla 9. Dominio helicasa identificado en UvrD, Srs2 y homólogos de Srs2.

Organismo	Proteína	Dominio helicasa-UvrD like	
		Unión a ATP (N-terminal) (IPR014016)	Helicasa de DNA (C-terminal) (IPR014017)
<i>E. Coli</i>	UvrD	8-286	277-616
<i>S. cerevisiae</i>	Srs2	14-316	307-734
<i>S. pombe</i>	Srs2	9-304	296-645
<i>P. patens</i>	SRS2-like	352-654	645-1032
<i>A. thaliana</i>	SRS2-like	246-548	540-915
<i>N. benthamiana</i>	SRS2-like	318-609	601-978
<i>S. lycopersicum</i>	SRS2-like	329-621	613-988
<i>O. sativa</i>	SRS2-like	286-578	570-943
<i>Z. mays</i>	SRS2-like	314-606	597-971

En ScSrs2 se han identificado, además, una serie de motivos característicos distribuidos a lo largo del dominio helicasa. Estos motivos, dieciséis en total, están conservados en las helicasas SF1 y, en su mayoría, también en las SF2, e incluyen residuos involucrados en la unión e hidrólisis de ATP y la unión al DNA: I, Ia-Id, II-IV, IVa-IVc, V, Va, VI, VIa y motivo Q (Gorbalenya y Koonin, 1993; Hodgman, 1988; Korolev *et al.*, 1998; Lee y Yang, 2007; Tanner *et al.*, 2003). Concretamente, los motivos I, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI y el motivo Q (Gorbalenya

et al., 1989; Gorbalenya y Koonin, 1993; Hodgman, 1988; Tanner *et al.*, 2003) están implicados en la unión a ATP (Theis *et al.*, 1999; Velankar *et al.*, 1999) y se encuentran conservados en las helicasas de ambas superfamilias. Entre ellos destacan I y II, que incluyen los motivos Walker A y Walker B, respectivamente, los cuales son esenciales para la unión al ATP y la hidrólisis de dicha molécula. La presencia de estos elementos es necesaria, aunque no suficiente, para identificar una proteína como helicasa, ya que son los únicos elementos compartidos por todos los grupos de helicasas conocidos (Walker *et al.*, 1982). Los motivos Ic-d, IVa-c, Va y VIa, que participan en la unión al DNA y en la interacción entre dominios estructurales en UvrD (Korolev *et al.*, 1998; Lee y Yang, 2007), están menos conservados entre las helicasas SF2. Todos estos motivos mencionados quedaron alineados en el dominio helicasa predicho de las distintas proteínas homólogas de SRS2, a excepción del VIa (**Figura 38A**). Como se ha descrito para las helicasas SF1 y SF2, los motivos I, Ia, Ib, II, III, IV, IVa, V, VI y Q mostraron una alta conservación entre las proteínas homólogas a SRS2 (**Figura 38A** y **Figura S2**). En el motivo Walker A destacó la conservación de una lisina, K41 en ScSrs2 y K273 en AtSRS2, la cual se ha descrito en ambos organismos como fundamental para la actividad helicasa y translocasa (Blanck *et al.*, 2009; Krejci *et al.*, 2004) (**Figura 38A**). Sin embargo, las secuencias alineadas con los motivos Ic-d, IVb-c y Va en los homólogos SRS2 de plantas presentaron una mayor variación en sus secuencias con respecto a ScSrs2 y UvrD, y, por tanto, un menor grado de conservación (**Figura 38A**; **Figura S2**). Entre ellos, el motivo IVc no mantuvo ninguno de los aminoácidos definidos para dicho motivo en ScSrs2 o UvrD.

Para completar el análisis, se obtuvieron los modelos estructurales de los dominios helicasa UvrD-like de ScSrs2 (14-734 aa) y AtSRS2 (246-915 aa), así como EcUvrD (1-646 aa), utilizando la herramienta I-TASSER (Zhang *et al.*, 2015). Los diferentes motivos mencionados anteriormente se colorearon en la estructura tridimensional resultante. Mientras que los motivos Q, I, Ia, II, III, IV, IVa, V y VI se disponen alrededor del sitio de unión e hidrólisis del ATP en UvrD, Ib, Ic, Id, IVb, IVc, Va y VIa rodean el área de unión al DNA (Lee y Yang, 2007; **Figura 39**). Como se puede observar en la **figura 39**, los dominios helicasa de *S. cerevisiae* y *Arabidopsis* presentan una estructura casi idéntica que, a su vez, mantiene una gran similitud con la proteína EcUvrD. Además, las tres helicasas conservan los diferentes motivos en localizaciones similares (**Figura 39**). Estos análisis, que muestran la similitud existente en la secuencia proteica y la estructura terciaria entre

los diferentes homólogos de SRS2, sugieren que estas proteínas deben ser similares también desde el punto de vista funcional.

	Motivo Q	Motivo I (Walker A)	Motivo Ia	Motivo Ib	Motivo Ic
	▽	▽ ▽ ▽ ▽ ▽	***	▽	* ◆ ◆ ◆
EcUvrD	LNDKQREA-V	VLGAGSGKTRVL	IMAVTFTNKAAAEMRHRI	TFH	DFQILDSED
ScSrs2	LNTQQRAAAL	VIAGAGTGKTKVL	IIVTFTFNKAANEMKERL	TFH	DWRIIDEKE
SpSrs2	LNEEQRIS-V	ILAGPGSGKTRVL	LIATFTFNKAANEIKLRI	TFH	NWLIADRND
PpSRS2 X9	LNDSQREAAAL	ILAGPGSGKSTSM	ILAMTFTTAAATEMRQV	TFH	EFLVYGHGQ
AtSRS2	LNDRQRDAAC	VIAGPGSGKSTSM	ILAMTFTTKAATSEMRERI	TFH	EFSVYGHGQ
NbSRS2	LNDRQQAAC	IVAGPGSGKSTSM	ILAMTFTTAAASEMRERI	TFH	EFLIYGHGQ
SlSRS2	LNDRQQAAC	IVAGPGSGKSTSM	ILAMTFTTAAASEMRERI	TFH	EFLIYGHGQ
OsSRS2 X8	LNDRQREAAAC	IVAGPGSGKSTSM	ILAMTFTTAAASEMRDRI	TFH	EFLIYGNQ
ZmSRS2 X2	LNDRQKEAAC	IVAGPGSGKSTSM	ILAMTFTTAAASEMRERI	TFH	EFLIYGHGQ
	** * :	::** * :*** :	:: *** * : * : *	***	:: : . :

	Motivo Id	Motivo II (Walker B)	Motivo III	Motivo IV
	*	▽ ▽	▽ * *	▽ ▽
EcUvrD	VDFAELL	ILVDEFQDTNNIQ	IVGDDQSIYGWRGA	TIRLEQNYRSTSNIL
ScSrs2	LDFFDDL	VLVDEFQDTNGIQ	IVGDPDQSIYAFRNA	TIILVENYRSSQKIL
SpSrs2	ADFFDDL	ILIDDEFQDTSKIQ	IVGDPDQSIYGFSA	VLHLERNYRSAPKIL
PpSRS2 X9	MDYHDFIS	VLVDEFQDTSRMQ	IVGDDQSIYGFNGA	EVRLHQNYRSTRSIV
AtSRS2	LDYHDLIS	IIVDEFQDTSTMQ	IVGDDQSIYGFNGA	EVRLIKNYRSSRHIV
NbSRS2	LDYHDLIS	IIVDEFQDTSAMQ	IVGDEDQSIYGFSGA	EVRLSKNYRSTRCIV
SlSRS2	LDYHDLIS	MVIDEFQDTSAVQ	IVGDEDQSIYGFSGA	EVRLSKNYRSTRCIV
OsSRS2 X8	LDYHDFIN	IVVDEFQDTSAMQ	IVGDEDQSIYGFNGA	EVRLSKNYRSTRAIV
ZmSRS2 X2	LDYHDFIN	IVVDEFQDTSAMQ	IVGDEDQSIYGFNGA	EIRLSKNYRSTRAIV
	* : ::	:::***** :*	**** * : : : *	: * .**** : *

	Motivo IVa	Motivo IVb	Motivo IVc	Motivo V
	* *	* ◆ ◆	* * *	* * ▽ ▽
EcUvrD	AILYRSN	MPYRIYGMRFERQEIKDALSYLRLI	PTRGIGDRT	VQLMTLHSAKGLEFPQVF
ScSrs2	AILVRQR	IPYKIIRGHSFWDSEKTRAMNLKLI	PARGLGPAT	VTISTIHGAKGLEWPVVF
SpSrs2	AILYRSS	VPYRMVGVNKFDFEIRDLIAYLRVL	PPRNIGKTK	VTISTLHAAKGLEWPVVF
PpSRS2 X9	AVLYRRQ	IPFNH-GVAFYRKKIKSVISMLRTV	ALYSGDKSE	VTLTTHQSKGLEWDTVY
AtSRS2	AILYRRQ	IPFNH-GVAFYRKKVQVILAMLKTT	ALLPFEKEE	VTLTTHQSKGLEWDIVF
NbSRS2	AVLFRRQ	IQFNH-GVAFYRKKVVRVAILMLKTT	ALLPSEKEE	VTLTTHQSKGLEWDTVF
SlSRS2	AVLFRRQ	IPFNH-GVAFYRKKVVKGIAMLRIT	ALLPSEKEE	VTVTTHQSKGLEWDTVF
OsSRS2 X8	AVLYRRQ	IPFNH-GVAFYRKKVIKAIMAILKTT	AILPGDKEE	ITLTTHQSKGLEWDVVF
ZmSRS2 X2	AVLYRRQ	IPFNH-GVAFYRKKVIKAIMAILRTT	ALLPGDKEE	ITLTTHQSKGLEWDVVF
	* : *	: : : * : : : *		: : * : * :**** :*

	Motivo Va	Motivo VI	Motivo VIa
	* *	▽	* *
EcUvrD	FPSQMS	LEEERRLAYVGVTRA	RRLYG
ScSrs2	IPCVPN	IDEERRMFFVAQTRA	----
SpSrs2	IPHSR-	LDEERRLLYVGATRA	----
PpSRS2 X9	TPLLNE	IEEERRLFYVAMTRA	----
AtSRS2	IPLLHE	LEEERRLLYVAMTRA	----
NbSRS2	IPLLHE	IEEERRLLYVAMTRA	----
SlSRS2	IPLLHE	IEEERRLLYVAMTRA	----
OsSRS2 X8	IPLLHE	LEEERRLFYVAMTRA	----
ZmSRS2 X2	IPLLHE	LEEERRLLYVAMTRA	----
	*	::***** :* ***	

EcUvrD	FPSQMS	LEEERRLAYVGVTRA	RRLYG	--VSH
ScSrs2	IPCVPN	IDEERRMFFVAQTRA	----	KKLYR
SpSrs2	IPHSR-	LDEERRLLYVGATRA	----	--VF-
PpSRS2 X9	TPLLNE	IEEERRLFYVAMTRA	----	-PGAI
AtSRS2	IPLLHE	LEEERRLLYVAMTRA	----	HENLP
NbSRS2	IPLLHE	IEEERRLLYVAMTRA	----	QEETP
SlSRS2	IPLLHE	IEEERRLLYVAMTRA	----	QKGTP
OsSRS2 X8	IPLLHE	LEEERRLFYVAMTRA	----	----P
ZmSRS2 X2	IPLLHE	LEEERRLLYVAMTRA	----	----P



▽ unión a nucleótidos
 * unión a ssDNA
 * unión a dsDNA
 ◆ interacción 1B-2B

Figura 38. Motivos helicasa conservados en UvrD de *E. coli*, Srs2 de levaduras y plantas. Comparación de las secuencias aminoacídicas de los 16 motivos conservados en el dominio helicasa de UvrD y Srs2 entre los homólogos de Srs2. EcUvrD: UvrD de *E. coli* (EGT71023.1); ScSrs2: Srs2 de *S. cerevisiae* (NP_012443.1); SpSrs2: Srs2 de *S. pombe* (NP_594341.1); PpSRS2 X9: SRS2 de *P. patens*, isoforma 9; AtSRS2: SRS2 de *A. thaliana*; NbSRS2: SRS2 de *N. benthamiana*; SlSRS2: SRS2 de *S. lycopersicum*; OsSRS2 X8: SRS2 de *O. sativa*, isoforma 8; ZmSRS2: SRS2 de *Z. mays*, isoforma 2. Los números de acceso para los homólogos de SRS2 en plantas se indican en la Tabla 2. En colores fríos se destacan los 8 motivos ATPasa (motivo Q, I, Ia, II, III, IV, V y VI); en colores cálidos se han coloreado los 8 motivos de unión a DNA y, en caso de EcUvrD, de interacción entre los dominios estructurales 1B y 2B (Ib, Ic, Id, IVa, IVb, IVc, Va y VIa) (indicados en la rueda de color). En los motivos I y II se destacan los motivos Walker A y Walker B.

Tras el dominio helicasa, ScSrs2 contiene una región C-terminal flexible de casi 400 aminoácidos de longitud que media la mayoría de las interacciones proteína-proteína y contiene las regiones que son modificadas postraduccionalmente (Chiolo *et al.*, 2005). Concretamente, en este extremo destaca la región de unión a Rad51, motivos de interacción con PCNA (PIM) y SUMO (SIM) y tres residuos de lisina que son sumoilados (K1081, K1089 y K1142) (Niu *et al.*, 2017). Continuando con el análisis, se buscaron los elementos anteriores en los diferentes homólogos de SRS2, sin que se pudiera identificar ninguno de ellos. Para Rad51 no se ha definido aún un motivo consenso de interacción, habiéndose acotado una región en la zona central de Srs2 que no se ha conservado. En cambio, para la unión con PCNA se han definido los denominados motivos de interacción con PCNA (PIM) o cajas PIP, que presentan una amplia variación en su secuencia (Prestel *et al.*, 2019). ScSrs2 contiene una caja PIP no canónica (Armstrong *et al.*, 2012), y su secuencia tampoco se ha conservado en los diferentes homólogos analizados. No obstante, este motivo ha podido mantenerse en las diferentes proteínas SRS2 con algunas variaciones respecto a la secuencia definida en *S. cerevisiae*, lo que dificulta su identificación al no haber disponibles herramientas informáticas de predicción. En cambio, se han desarrollado diferentes programas que han permitido identificar varias secuencias como potenciales motivos SIM y de unión covalente a SUMO (GPS SUMO, JASSA y SUMOplot™) (Beauclair *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2014), (**Figura 37; Tablas 10 y 11**). Los motivos SIM se localizaron principalmente en la región correspondiente al dominio helicasa, en una posición idéntica en las especies dicotiledóneas, estando uno de ellos presente en todas las proteínas de plantas (**Figura 37; Figura S2**). Los sitios de sumoilación se distribuyeron a lo

largo de las proteínas, y presentaron diferentes secuencias y localización en los distintos homólogos a excepción de uno, presente en SRS2 de *Arabidopsis*, *N. benthamiana* y *S. lycopersicum* (**Figura 37; Figura S2**). En *P. patens* no se reconoció ninguna secuencia como sitio potencial de sumoilación. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas completas de los homólogos de Srs2, con todos los motivos y dominios mencionados destacados, se muestra en la **figura S2**.

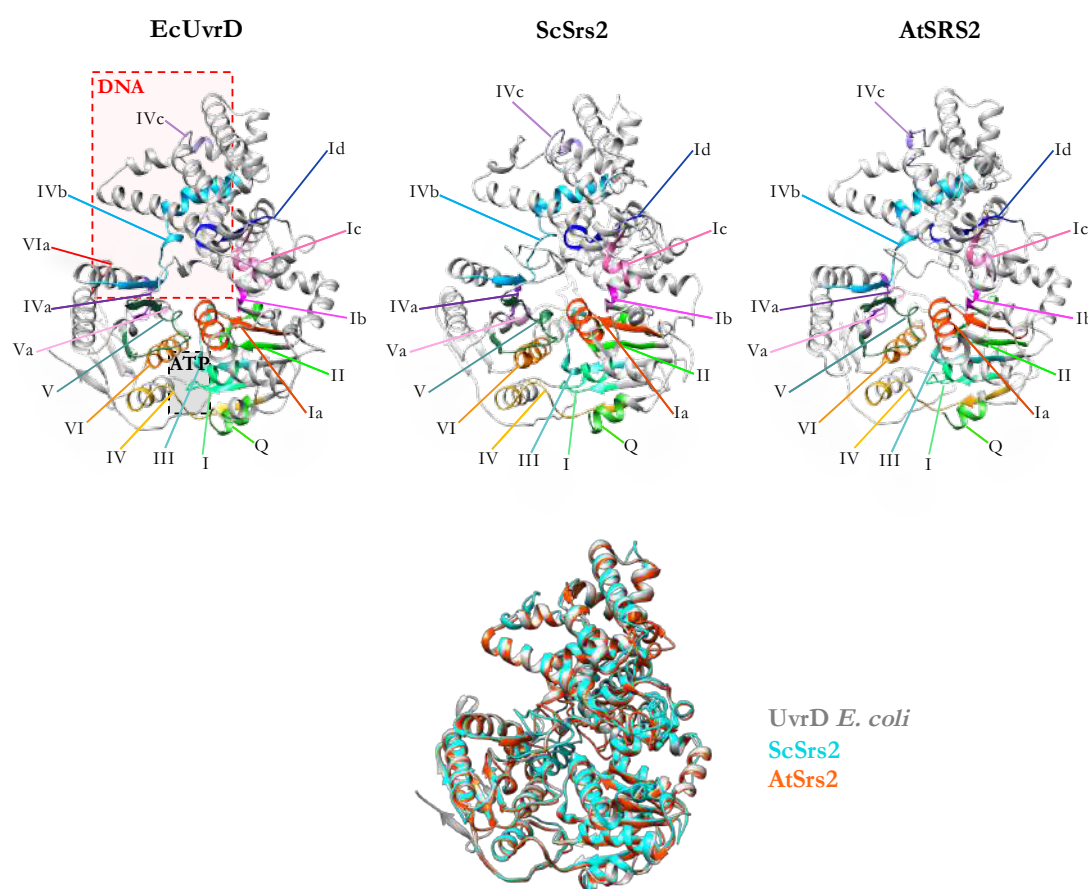


Figura 39. Modelos de la estructura tridimensional del dominio helicasa de EcUvrD (1-646 aa), ScSrs2 (246-915 aa) y AtSRS2 (246-915 aa). A. Los modelos se obtuvieron *in silico* utilizando el servidor I-TASSER (Zhang *et al.*, 2008) y se procesaron con el programa Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). Los motivos se han mapeado y resaltado utilizando los mismos colores que en la figura 19. En la estructura de EcUvrD se han remarcado los espacios en los que se disponen la molécula de DNA de doble cadena y ATP/ADP (figura adaptada de Lee y Yang, 2007). B. Superposición de los tres modelos anteriores.

El análisis de las secuencias de los diferentes homólogos de SRS2 indica que esta proteína es una helicasa de DNA también en plantas y que, potencialmente,

conservará algunas de las funciones descritas en *S. cerevisiae* y *A. thaliana*. Aunque no se han identificado los motivos de interacción descritos en la proteína de levaduras, es probable que se hayan mantenido con variaciones en sus secuencias, dada su relevancia en los distintos roles que Srs2 desempeña en la célula eucariota.

Tabla 10. Potenciales motivos SIM identificados en los homólogos de SRS2.

Organismo	Posición	Secuencia	GPS-SUMO		JASSA	
			Puntuación	P valor	Puntuación	Tipo
<i>S. Pombe</i>	261 - 264	ITIV	49,797	0,024	0,314	α
	562 - 565	IVLL	47,778	0,021	1,338	β
<i>P. patens</i>	611 - 614	VTIV	33,075	0,144	0,808	α
	723 - 726	IAVL	33,467	0,103	0,616	2
<i>A. thaliana</i>	281 - 284	VLVL	35,554	0,08	3,166	3
	505 - 508	ITIV	37,341	0,096	0,314	α
	600 - 603	IIEI	42,779	0,067	2,632	β
<i>N. benthamiana</i>	335 - 338	LIIV	37,375	0,069	1,815	3
	566 - 569	ITIV	35,5	0,118	0,314	α
	661 - 664	ILEI	29,983	0,182	0,304	1
<i>S. lycopersicum</i>	346 - 349	LIIV	37,375	0,069	1,815	3
	578 - 581	ITIV	35,5	0,118	0,314	α
	673 - 676	ILEI	30,312	0,179	0,304	1
<i>O. sativa</i>	535 - 538	ITIV	36,749	0,102	0,314	α
<i>Z. mays</i>	252-255	VISV	36,45	0,094	0,7	β
	563-566	ITIV	36,652	0,103	0,314	α
	658-661	IIEI	40,197	0,078	2,632	β
	829-832	VVDV	34,233	0,154	10,774	β

SRS2 de *A. thaliana* se sumoila utilizando un sistema reconstituido en *E. coli*

Srs2 de *S. cerevisiae* se mono y polisumoila, tanto *in vivo* como *in vitro*, en tres lisinas situadas en su extremo C-terminal (K1081, K1089 y K1142) (Kolesar *et al.*,

2016; Saponaro *et al.*, 2010). Esta modificación es estimulada por la acción de las ligasas E3 Siz1 y Siz2 y, como sucede con otras proteínas de mamíferos, es dependiente de su motivo SIM, probablemente al mediar la unión de la proteína diana con la enzima conjugadora Ubc9 y SUMO (Kolesar *et al.*, 2012; Kolesar *et al.*, 2016; Saponaro *et al.*, 2010).

Tabla 11. Potenciales sitios de sumoilación identificados en los homólogos de SRS2 estudiados.

Organismo	Secuencia ^a	SUMOplot™		GPS-SUMO		JASSA	
		P	P	P valor	P	Tipo ^b	
<i>S. Pombe</i>	VKNE (K465)	0,93	21,99	0,002	Alto	Consenso directo fuerte	
	PFLKGE (K668)	0,91	11,95	0,009	Bajo	HCSM	
<i>A. thaliana</i>	LKPEIES (K84)	0,91	6,21	0,02	Bajo	PDSM extendido	
	LKLDEET (K218)	0,91	3,42	0,035	Bajo	PDSM extendido	
	IKHE (K971)	0,94	17,18	0,004	Alto	Consenso directo fuerte	
<i>N. benthamiana</i>	LKLE (K270)	0,91	7,19	0,015	Bajo	Consenso fuerte	
	MKKEP (K444)	0,8	21,96	0,003	Bajo	SUMO-Ac switch	
	IKGETECNT EG (K871)	0,94	17,13	0,004	Alto	NDSM	
<i>S. lycopersicum</i>	FKLE (K281)	0,85	4,35	0,025	Bajo	Consenso directo	
	VKRE (K818)	0,93	31,28	0	Alto	Consenso directo fuerte	
<i>O. sativa</i>	LKEE (K326)	0,91	11,05	0,01	Bajo	Consenso directo fuerte	
	IKWEQIP (K1098)	0,94	17,74	0,004	Alto	Minimal SC SUMO	
<i>Z. mays</i>	IKWEQIP (K1126)	0,94	15,53	0,006	Alto	Minimal SC SUMO	

P: puntuación; ^aMotivo de sumoilación (posición de la lisina); ^bHCSM, *hydrophobic cluster sumoylation motif*; PDSM, *phosphorylation-dependent sumoylation motif*; SUMO-Ac switch, *SUMO-Acetyl switch*; NDSM, *negatively charged aminoacid-dependent sumoylation motif*; Minimal SC SUMO, *Minimal synergy control motif-SUMO*

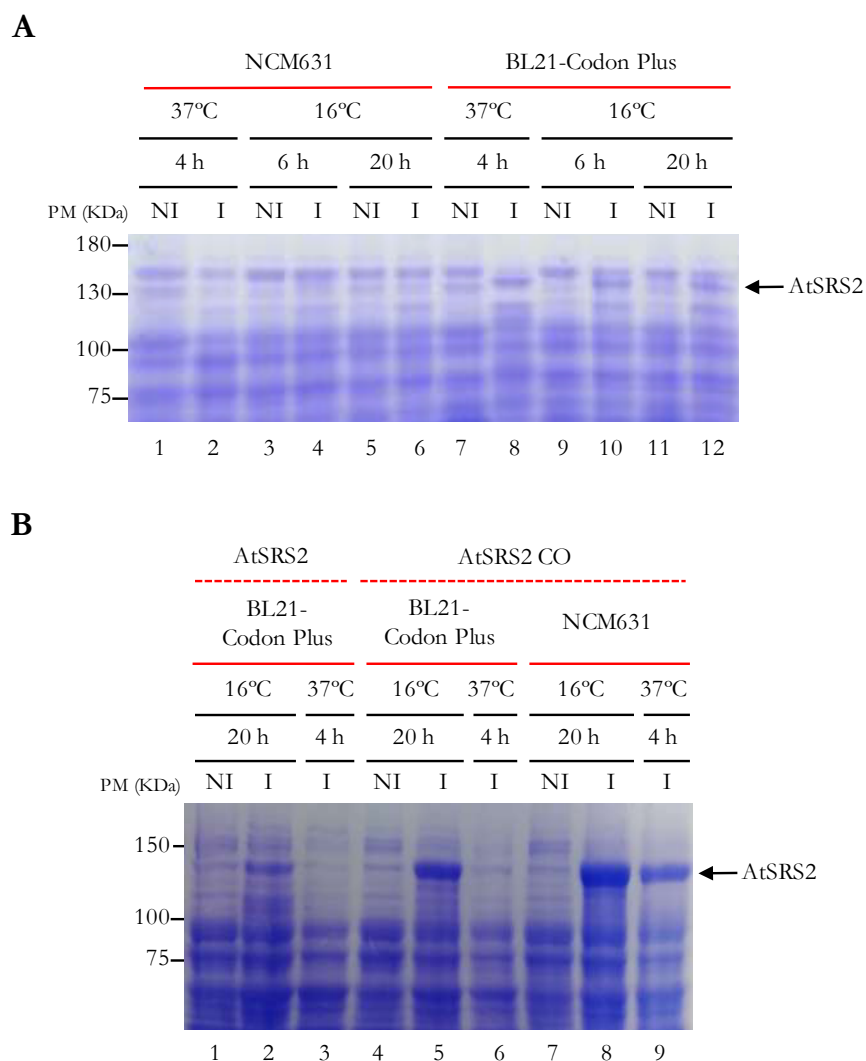


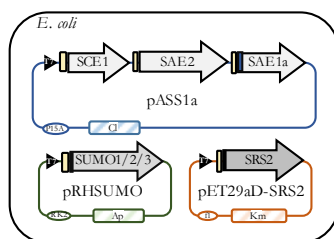
Figura 40. Ensayos de sobreexpresión de AtSRS2 en *E. coli*. **A.** Expresión de AtSRS2 en las cepas bacterianas NCM631 (derivado de BL21) y BL21-CodonPlus(DE)-RIL en tres condiciones: 37°C/4h, 16°C/6h y 16°C/20h. Los extractos de proteínas totales procedentes de las células inducidas y no inducidas se analizaron en un gel de poliacrilamida al 8%, que se tiñó con una solución de azul de Coomassie. El marcador de peso molecular (kDa) se indica a la derecha. **B.** Expresión de la versión optimizada AtSRS2 CO, según se ha descrito en A. Se incluyó AtSRS2 silvestre como control de expresión. AtSRS2: 129 kDa. NI: no inducido; I: inducido.

En SRS2 de *A. thaliana* no se ha confirmado la existencia de ningún motivo de unión a SUMO, así como tampoco lisinas que se sumoilen, contando tan solo con los candidatos propuestos anteriormente (**Tablas 10 y 11**). Para determinar si AtSRS2 se sumoila, se llevó a cabo el ensayo de sumoilación con el sistema de modificación postraducciona de la planta, desarrollado para su expresión en *E. coli*. El marco abierto de lectura de AtSRS2 se clonó en el vector pET29aDEST, en fase con la etiqueta T7 en su extremo amino. Como paso previo al ensayo, dicha

construcción se transformó en la cepa de *E. coli* NCM631 (derivado de BL21) y se realizó una prueba de expresión, para lo que se establecieron tres condiciones: alta temperatura y tiempo corto (37°C/4 horas) y baja temperatura y tiempos más largos (16°C/6 horas y 16°C/20 horas). Tras la inducción y extracción de proteínas, se analizó la expresión de AtSRS2 en un gel de acrilamida al 8%no detectándose la banda esperada para AtSRS2 (130 KDa) en ninguna de las condiciones probadas. Ante la posibilidad de que la falta de expresión de AtSRS2 se debiera a una reducción de la eficiencia de la traducción como consecuencia de la existencia en AtSRS2 de codones poco frecuentes en el genoma de *E. coli* (Bonekamp *et al.*, 1985; Kane, 1995), se decidió utilizar la cepa bacteriana BL21 Codon Plus (DE)-RIL. Esta cepa contiene un vector con copias extra de los genes de tRNA *argU*, *ileY* y *leuW*, que reconocen los codones de arginina AGA y AGG, el codón de isoleucina AUA y el codón de leucina CUA, respectivamente, poco usuales en *E. coli*. Las células transformadas se utilizaron para un nuevo ensayo de expresión de AtSRS2 bajo las tres condiciones establecidas inicialmente. Al comparar los extractos inducido y no inducido obtenidos tras la inducción, en la cepa BL21 CodonPlus se observó una banda del tamaño esperado para la helicasa en todas las condiciones probadas (**Figura 40A, calles 8, 10 y 12**). Este resultado confirmó que el problema en la expresión de la proteína de interés era, efectivamente, el sesgo de codones. Desafortunadamente, las copias extras de los genes de tRNA *argU*, *ileY* y *leuW* están clonadas en el vector pACYC, el mismo que se utiliza para la expresión de las enzimas de la ruta de sumoilación. Ello impide, por tanto, que el ensayo de sumoilación pueda llevarse a cabo en esta cepa, al tratarse de plásmidos incompatibles.

Para resolver el problema se optó por sintetizar una secuencia de *AtSRS2* optimizando el uso de codones y otros parámetros que aumentan la eficiencia de su traducción en la bacteria, como el contenido en GC (GenScript). Esta secuencia, denominada AtSRS2 CO, se clonó en el vector pET28aDEST y se transformó en las cepa NCM631 y BL21 CodonPlus para llevar a cabo una prueba de expresión. Tras la inducción y extracción de proteínas, se detectó la banda esperada para AtSRS2 en los extractos inducidos procedentes de ambas cepas. La mayor expresión se obtuvo con AtSRS2 CO transformada en BL21, a 16°C y tras 20 horas de inducción (**Figura 40B**).

A



B

AtSRS2	+	+	+	+	+	-	-	-
pET28b	-	-	-	-	-	-	-	-
AtSAE/SCE1 (E1/E2)	-	+	+	+	+	+	+	+
AtSUMO	-	-	1	2	3	1	2	3

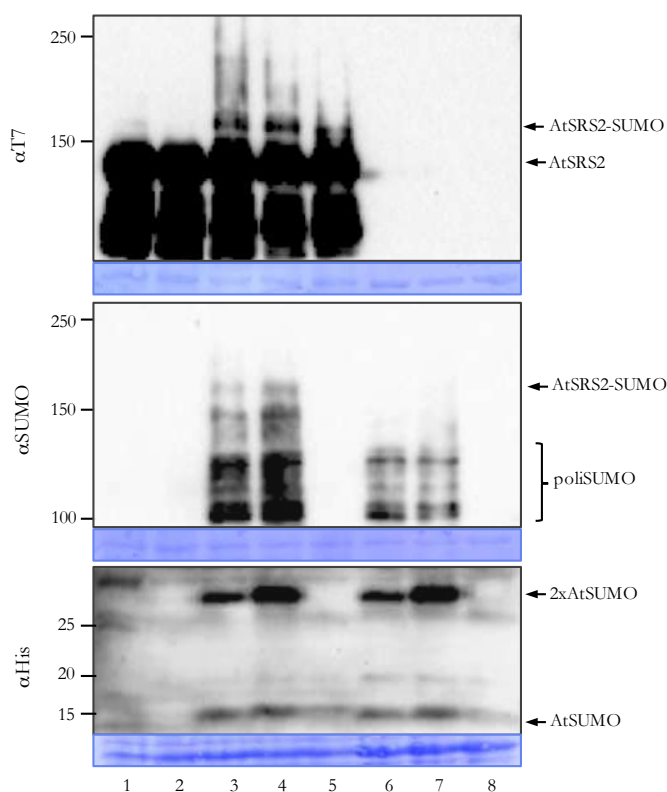


Figura 41. Ensayo de sumoilación de AtSRS2 con el sistema de conjugación de SUMO reconstituido en *E. coli*. **A.** Representación esquemática de los vectores utilizados en el ensayo, en los que se han clonado las enzimas SAE1a, SAE2 y SCE1 (pASS1a), los parálogos de SUMO (pRHSUMO) o la proteína diana (pET29aD-AtSRS2). En cada vector se destaca el origen de replicación, el gen de resistencia, el sitio de unión al ribosoma (amarillo), la etiqueta de histidina (azul) los genes clonados. **B.** SRS2, SAE1a/2, SCE y AtSUMO1, -2 y -3 de *Arabidopsis* se coexpresaron en la cepa de *E. coli* NCM631; pET28b se incluyó como control negativo. Los extractos de proteínas totales se incubaron con los anticuerpos antiT7, antiAtSUMO1/2 y antiHis. La membrana se tiñó con azul de Coomassie como control de carga. La expresión (+/-) de los diferentes componentes se muestra en el panel superior. Las bandas relevantes están indicadas en el margen derecho. El marcador de peso molecular (KDa) se muestra a la izquierda. AtSRS2: 129 KDa; AtSUMO: 10 KDa.

Para llevar a cabo el ensayo de sumoilación, AtSRS2 CO se cotransformó en NCM631 junto a las enzimas de la ruta de sumoilación y las tres isoformas de AtSUMO (**Figura 41A**). La expresión de estas proteínas, su extracción y posterior análisis por *western blot* utilizando los anticuerpos antiT7 y antiSUMO1/2, permitió detectar una banda por encima de los 150 KDa en las calles que contenían la diana junto al sistema de modificación y AtSUMO1 o AtSUMO2, que podría corresponder a la proteína sumoilada (**Figura 41B, calles 3 y 4**). En cambio, no se identificaron bandas que pudieran identificarse como formas polisumoiladas de la helicasa. En las calles que contenían el vector vacío no apareció ninguna señal similar con el primer anticuerpo, mostrando la especificidad del mismo, mientras que con antiSUMO1/2 se revelaron bandas correspondientes a cadenas de poliAtSUMOs pero no la identificada como AtSRS2-SUMO. La expresión de AtSUMO se comprobó con el anticuerpo antiHis, con el que se revelaron los monómeros y dímeros de AtSUMO1 y AtSUMO2.

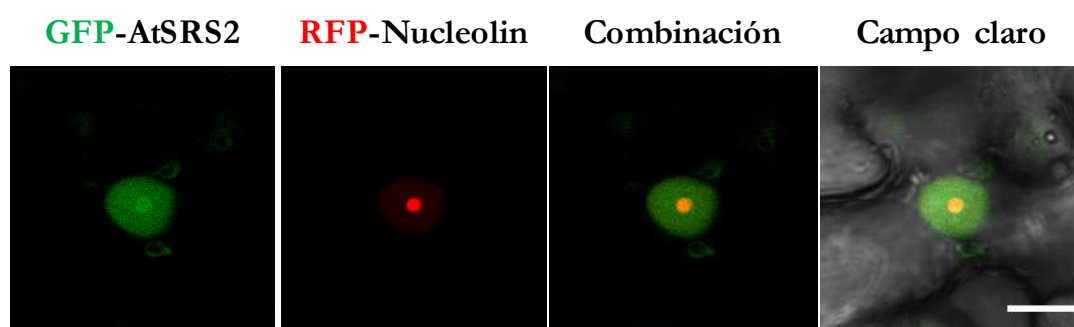


Figura 42. AtSRS2 se localiza en el núcleo y el nucleolo. Las células epidérmicas de *N. benthamiana* coagroinfiltradas con GFP-AtSRS2 y RFP-Nucleolina se observaron mediante microscopía confocal a los 3 dpi. Se muestra la fluorescencia GFP y RFP, la combinación de los dos canales y con el campo claro. Escala = 10 μ m.

SRS2 de *A. thaliana* se localiza en el núcleo y nucleolo

Para continuar con la caracterización de SRS2 de *A. thaliana*, se determinó su localización subcelular. AtSRS2, fusionada a GFP (GFP-AtSRS2) por su extremo amino, se expresó en hojas de *N. benthamiana*, y el tejido coinfiltado se observó a los tres días en un microscopio confocal. Tal y como sucede con su homólogo en levaduras, SRS2 de *A. thaliana* se localiza exclusivamente en el núcleo de la célula (**Figura 42**). La señal GFP se detectó de forma homogénea por todo

el nucleoplasma, incluyendo el nucléolo. Esta localización se confirmó incluyendo la proteína RFP-Nucleolina de tomate como marcador (**Figura 42**).

AtSRS2 colocaliza con AtPCNA y AtSUMO1 en el núcleo

Dada la importancia que la unión de PCNA y SUMO tiene para muchas de las funciones que Srs2 desempeña en la levadura de gemación, es probable que su interacción se haya conservado en los diferentes homólogos de la helicasa. En primer lugar, y como paso previo a los ensayos de interacción, se comprobó si las tres proteínas colocalizaban en la célula. Para ello, se clonaron las fases abiertas de lectura de *AtSRS2*, *AtPCNA1* y *AtSUMO1* en vectores binarios fusionados a diferentes fluoróforos en su extremo N-terminal, para dar lugar a RFP-AtSRS2, GFP-AtPCNA1 y YFP-AtSUMO1 (**Figura 43**). Las tres construcciones se transformaron de forma independiente en *A. tumefaciens* y después se coinfiltraron en hojas de *N. benthamiana* silvestre junto al supresor del silenciamiento P19. Como se observa en la **figura 43**, a los 3 dpi las tres proteínas colocalizaron en el núcleo, AtSRS2 y AtSUMO1 también lo hicieron en el nucléolo y AtPCNA1 y AtSUMO1 en el citoplasma.

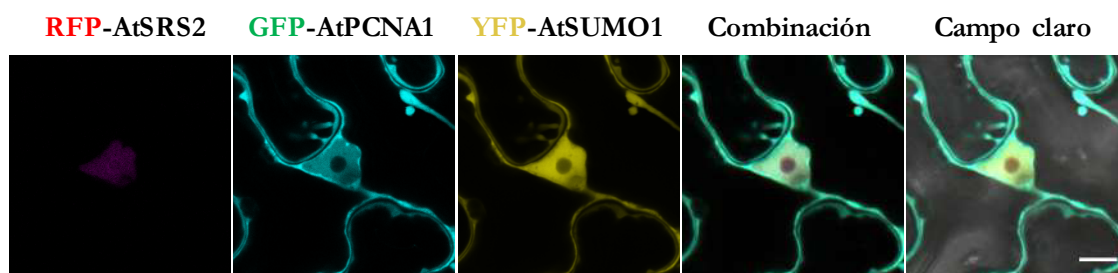


Figura 43. AtSRS2 interacciona con AtPCNA1 y AtSUMO1 en el núcleo de la célula vegetal. Las hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones RFP-AtSRS2, GFP-AtPCNA1 y YFP1-AtSUMO1 se observaron bajo microscopía confocal a los 3 dpi. Se muestra la fluorescencia de RFP, GFP, YFP y la combinación de los tres canales y también con el campo claro. Escala = 10 μ m.

AtSRS2 interacciona con PCNA y SUMO, pero no consigo mismo

Para determinar si AtSRS2 interacciona con PCNA y SUMO, tal y como sucede con su homólogo en levadura, se llevó a cabo un ensayo BiFC usando el

mismo sistema de vectores mencionados previamente (Gehl *et al.*, 2009). AtSRS2 se expresó como proteína de fusión junto a la mitad N-terminal de SCFP (SCFP^N-AtSRS2), mientras que SIPCNA y SUMO1 de *A. thaliana* se unieron a la parte C-terminal del mismo fluoróforo (SCFP^C-SIPCNA y SCFP^C-AtSUMO1). La coexpresión de SCFP^N-AtSRS2 con SCFP^C-SIPCNA o SCFP^C-AtSUMO1 en hojas de *N. benthamiana* reveló una señal fluorescente en el núcleo de las células infiltradas (**Figura 44**). Además, para ambas parejas de interactores se detectó la aparición de cuerpos nucleares similares a los observados en la interacción de SIPCNA con AtSUMO1 (**Figuras 34 y 35**). Estos resultados indican que AtSRS2 interacciona con PCNA y SUMO en el núcleo. En el ensayo de interacción de AtSRS2 con AtSRS2 no se detectó ninguna señal (**Figura 44**).

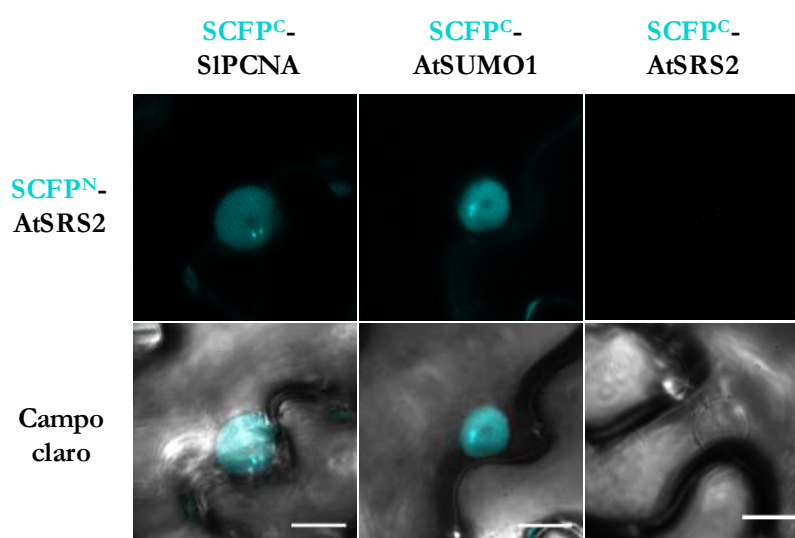


Figura 44. AtSRS2 interacciona con SIPCNA y AtSUMO1 en el nucleoplasma y en cuerpos nucleares. El ensayo de complementación fluorescente bimolecular se llevó a cabo en hojas de *N. benthamiana* coagroinfiltrada con los pares SCFP^N-AtSRS2·SCFP^C-SIPCNA, SCFP^N-AtSRS2·SCFP^C-AtSUMO1 y SCFP^N-AtSRS2·SCFP^C-AtSRS2. El tejido infiltrado se visualizó con un microscopio confocal a los 3 dpi. Se muestra la fluorescencia de CFP y la combinación con el campo claro. Escala = 10 μ m.

AtSRS2 interacciona con enzimas de la ruta de sumoilación pero no con Rep

Tras comprobar que AtSRS2 se sumoila en el ensayo en *E. coli* (**Figura 41**), se estudió si esta helicasa interacciona con los componentes de la ruta de sumoilación, como se ha descrito para Srs2 de *S. cerevisiae*. Esta proteína se une a

Ubc9 (SCE) y a las ligasas SIZ1 y SIZ2 (Kolesar *et al.*, 2012; Pfander *et al.*, 2005), aunque se ha sugerido que la interacción con la enzima conjugadora esta mediada por SUMO (Kolesar *et al.*, 2012).

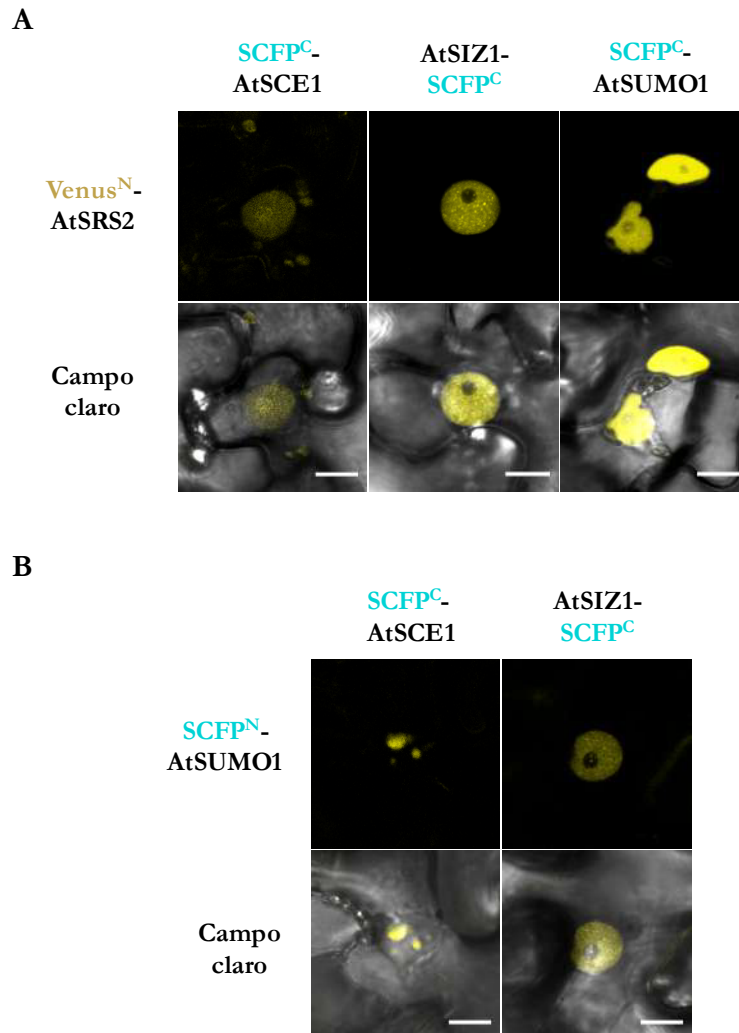


Figura 45. AtSRS2 interacciona con las enzimas de la ruta de sumoilación SCE1 y SIZ1 de *Arabidopsis*. Las células epidérmicas de *N. benthamiana* co-agroinfiltradas con los pares Venus^N-AtSRS2·SCFP^C-SCFP^C-AtSCE1 y Venus^N-AtSRS2·AtSIZ1-SCFP^C se observaron mediante microscopía confocal a los 3 dpi. Como control positivo, se incluyó la combinación de todas las proteínas anteriores con SCFP^N-AtSUMO1. Se muestra la fluorescencia YFP y la combinación YFP + campo claro. Escala = 10 µm.

Utilizando el sistema de vectores para BiFC implementado por Gehl y colaboradores (2009), AtSRS2 se fusionó al extremo N-terminal de la proteína fluorescente Venus (Venus^N-AtSRS2), mientras que AtSCE1 y AtSIZ1 lo hicieron al extremo C-terminal de SCFP (SCFP^C-AtSCE1 y AtSIZ1-SCFP^C). La

coexpresión de Venus^N-AtSRS2 con estas dos proteínas de la ruta de sumoilación en hojas de *N. benthamiana* dio lugar a la reconstitución de la señal fluorescente en el núcleo de las células, detectándose muchos cuerpos nucleares al combinarse con la ligasa E3 y una señal menos intensa con la enzima conjugadora de SUMO (Figura 45A). Como control positivo, las tres proteínas se coexpresaron con SCFP^N-AtSUMO1 (Figura 45A y 45B).

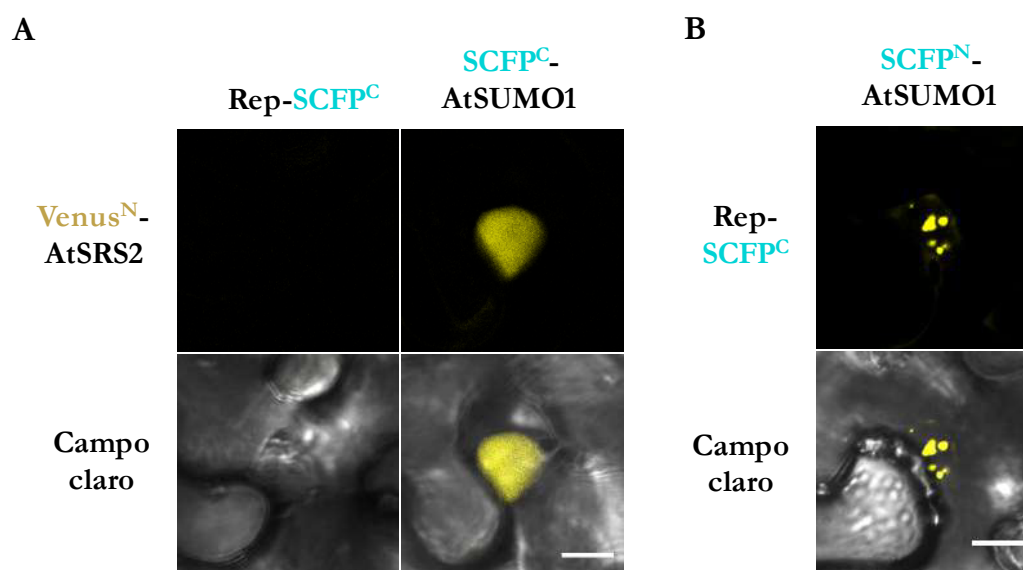


Figura 46. AtSRS2 no interacciona con Rep. Ensayo de BiFC con las parejas Venus^N-AtSRS2·Rep-SCFP^C, Venus^N-AtSRS2·SCFP^C-AtSUMO1 y Rep-SCFP^C·SCFP^N-AtSUMO1. Tanto AtSRS2 como Rep se combinaron con AtSUMO1 como control positivo. Se muestra la fluorescencia de YFP (Venus^N + SCFP^C), CFP (SCFP^N + SCFP^C) y la combinación de ambas con el campo claro. Escala = 10 μm.

A continuación, se realizó el mismo ensayo incluyendo Rep como diana. Tanto AtSRS2 como la proteína viral interaccionan con SIPCNA, AtSUMO1 y AtSCE1 y actúan directamente sobre el DNA durante su replicación y recombinación, por lo que presumiblemente compartirían un mismo escenario durante la replicación del genoma viral. Rep del virus TYLCV se fusionó al fragmento SCFP^C en su extremo C-terminal (Rep-SCFP^C) y se coexpresó junto a Venus^N-AtSRS2 en hojas de *N. benthamiana*, pero no se detectó la reconstitución del fluoróforo en el tejido infiltrado (Figura 46). Como control positivo, se incluyó de nuevo SCFP^C-AtSUMO1.

Caracterización de la interacción de AtSRS2 con SIPCNA y AtSUMO1

En levaduras, Srs2 interactúa preferentemente con PCNA sumoilado a través de dos motivos de interacción adyacentes para PCNA y SUMO, PIM y SIM, localizados en su extremo C terminal (Armstrong *et al.*, 2012; Kolesar *et al.*, 2012; Papouli *et al.* 2005; Pfander *et al.*, 2005). Para comprobar si AtSRS2 establece su unión con SIPCNA de la misma forma, se realizó de nuevo el ensayo de BiFC incluyendo las versiones de la abrazadera que carecen de las lisinas 164 y 254. Tanto los mutantes simples como el doble se clonaron en el vector pDEST-SCYCE^{GW} (**Figura 47A**) (SCFPC^C-SIPCNA K164R, SCFPC^C-SIPCNA K254R y SCFPC^C-SIPCNA K164/254R), y se coexpresaron con SCFPC^N-AtSRS2 en hojas de *N. benthamiana*. Para todas las combinaciones se observó fluorescencia en el nucleoplasma de las células, destacando la formación de cuerpos nucleares, sin aparentes diferencias entre la señal emitida por la interacción de AtSRS2 con SIPCNA silvestre y los mutantes simples y doble, afectados en la unión de AtSUMO1 y ubiquitina (**Figura 47A**).

No obstante, dado que las células epidérmicas de *N. benthamiana* en las que se sobreexpresaron las proteínas se encuentran en su mayoría en la fase G0 del ciclo celular, cabe esperar que los niveles de sumoilación de PCNA sean muy bajos. Por ello, SCFPC^N-AtSRS2 se coexpresó a continuación con la quimera SIPCNA-SUMO fusionada a SCFPC^C. Tanto la combinación SCFPC^N-AtSRS2 + SCFPC^C-SIPCNA como SCFPC^N-AtSRS2 + SCFPC^C-SIPCNA-SUMO dio lugar a una señal fluorescente en el nucleoplasma y en cuerpos nucleares. Sin embargo, la fluorescencia emitida por la interacción con SIPCNA fue más intensa en el nucleoplasma, mientras que tras la expresión de SIPCNA-SUMO se detectó una señal más intensa en el cuerpo nuclear (**Figura 47B**). Estos resultados apuntan a que AtSRS2 interacciona de forma directa con SIPCNA, por lo que debe contener en su secuencia un motivo PIM.

Una vez confirmada la interacción de AtSRS2 con AtSUMO1 (**Figura 44**), se llevó a cabo un ensayo de BiFC para determinar si la unión entre ambas proteínas tiene lugar de forma covalente, a través de la sumoilación, y no covalente, mediada por un motivo SIM. Tal y como se hizo con SIPCNA, SCFPC^C-AtSRS2 se coexpresó con SCFPC^N-AtSUMO1GG, SCFPC^N-AtSUMO1 Δ GG, SCFPC^N-AtSUMO1 SIM y SCFPC^N-AtSUMO1 Δ GG+SIM. La reconstitución de SCFP se

detectó tres días más tarde en el núcleo de todas las células, pero no se observaron cuerpos nucleares en las combinaciones que incluían las variantes no conjugativas (SCFP^N-AtSUMO1 Δ GG y SCFP^N-AtSUMO1 Δ GG+SIM) (**Figura 48**), como se había observado anteriormente con SIPCNA (**Figura 47**). Los resultados sugieren que la formación de estas estructuras subnucleares es dependiente de sumoilación.

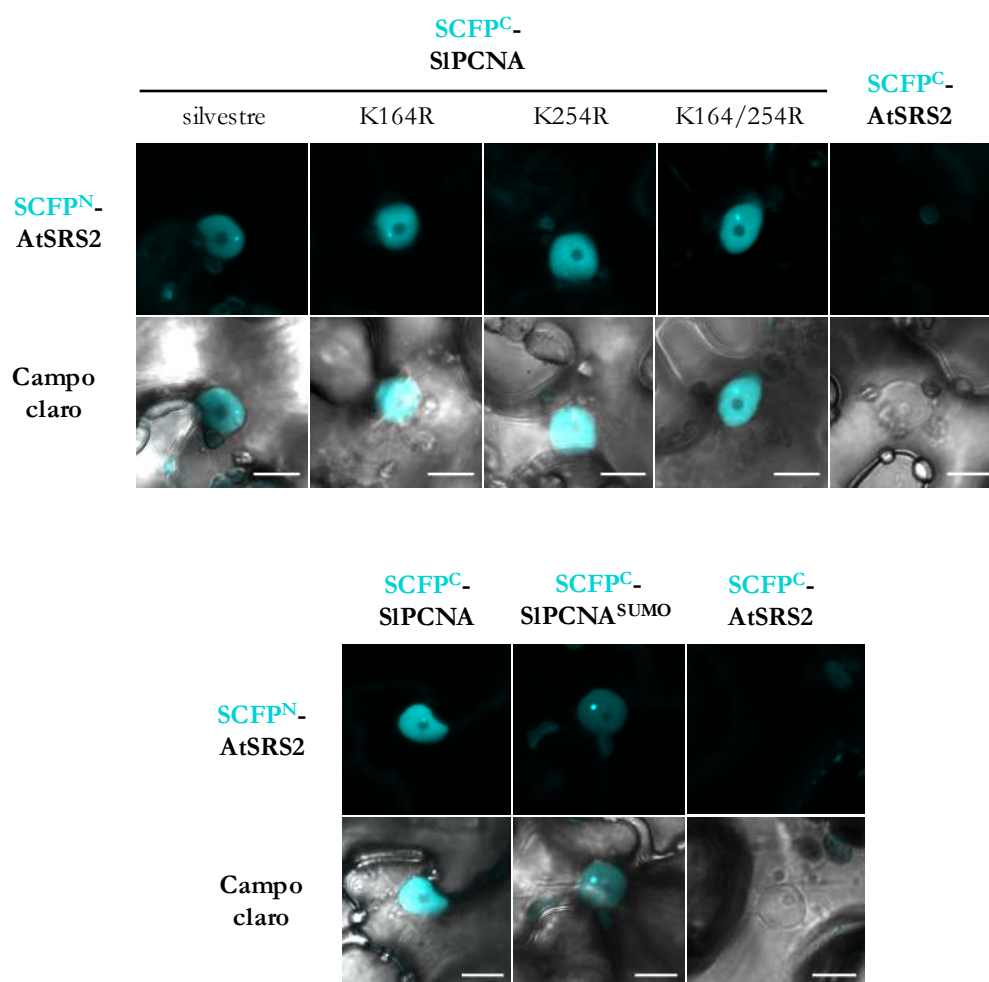


Figura 47. AtSRS2 interacciona con SIPCNA de forma independiente a su sumoilación. El ensayo de BiFC se llevó a cabo con SCFPC-SIPCNA y los distintos mutantes en las lisinasceptoras de SUMO combinados con SCFP^N-AtSRS2. Las células epidérmicas agroinfiltradas se observaron bajo microscopía confocal a los 3 dpi. La pareja SCFP^N-AtSRS2-SCFPC-AtSRS2 se añadió como control negativo. Se muestra la fluorescencia de CFP y la combinación CFP + campo claro. Escala = 10 μ m.

En resumen, SRS2 de *A. thaliana* interacciona con SIPCNA y AtSUMO1 en el núcleo de la célula vegetal, tanto en el nucleoplasma como en los denominados cuerpos nucleares. La interacción con AtSUMO1, además, parece

tener lugar tanto de forma covalente como no covalente, como sucede entre Srs2 y SUMO en *S. cerevisiae* (Kolesar *et al.*, 2012).

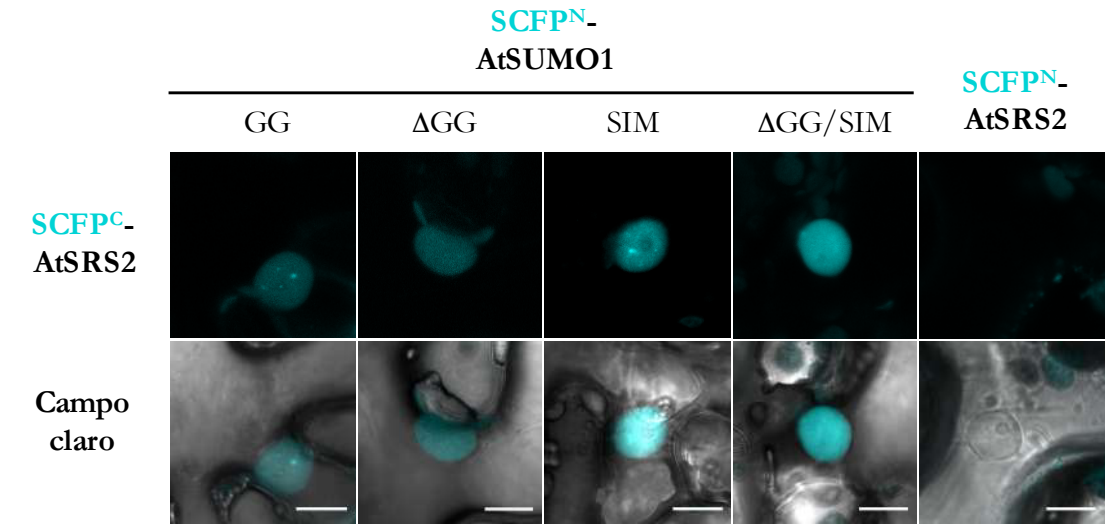


Figura 48. AtSRS2 interacciona con AtSUMO1 de forma covalente y no covalente. El ensayo se llevó a cabo como se describe en la figura 29, pero combinando SCFP^N-AtSRS2 con las variantes de AtSUMO1. Las células epidérmicas que coexpresaron cada una de las parejas de BiFC se visualizaron bajo microscopía confocal a los 3 dpi. La pareja SCFP^N-AtSRS2·SCFP^C-AtSRS2 se añadió como control negativo de interacción. Se muestra la fluorescencia de CFP y la combinación CFP + campo claro. Escala = 10 μm.

DISCUSIÓN

¿Qué efecto/s tienen Rep y ren sobre las modificaciones postraduccionales de PCNA?

PCNA de tomate se sumoila

Los ensayos realizados con el sistema de sumoilación reconstituido en *E. coli* muestran que PCNA de tomate se sumoila con SUMO1 y SUMO2 de *Arabidopsis* y, de forma menos eficiente, con SUMO3 (**Figura 23**). Este resultado difiere parcialmente del obtenido por Strzalka y colaboradores, quienes mostraron que los dos homólogos de PCNA presentes en el genoma de *Arabidopsis* (AtPCNA1 y 2) se modifican con AtSUMO1, 2, 3 y 5 con una eficiencia similar (Strzalka *et al.*, 2012). Considerando que se emplearon las mismas enzimas de modificación en los dos ensayos, la diferencia en la conjugación de los SUMOs podría deberse a características específicas de los PCNAs utilizados, en lo que se refiere a la unión con las isoformas de SUMO (cabe considerar que en el genoma de tomate no se ha identificado un homólogo de AtSUMO3). Esta especificidad de unión de las distintas isoformas se ha observado en PCNA de humanos, el cual se conjuga predominante a HsSUMO1 (ortólogo de AtSUMO3) y, de forma mucho más débil, a HsSUMO2/3 (ortólogos de AtSUMO1/2) (Gali *et al.*, 2012).

El análisis de mutantes de SIPCNA ha confirmado que esta proteína se sumoila en dos lisinas: la K164, cuya conjugación a SUMO se ha detectado en otros eucariotas pero no en PCNA de *Arabidopsis*, y la K254, identificada como un residuo aceptor en la planta modelo y en humanos (Gali *et al.*, 2012; Strzalka *et al.*, 2012) (**Figura 24**). La identificación de la lisina 164 como residuo sumoilable en la proteína de tomate, pero no en las de *Arabidopsis* se podría atribuir a diferencias experimentales relacionadas con:

1. La isoforma de SUMO elegida. Strzalka y colaboradores emplearon AtSUMO3 para identificar los residuos sumoilados, presente sólo en un pequeño clado de la familia *Brassicaceae* (Hammoudi *et al.*, 2016), mientras que en nuestros ensayos se utilizó la isoforma 1.
2. La estrategia utilizada en la generación de los mutantes de PCNA. Para la identificación de los residuos sumoilables de AtPCNA1 y 2, Strzalka y colaboradores reemplazaron todas las lisinas de ambas proteínas por

argininas a excepción de la elegida para su análisis, en lugar de sustituir un único residuo, como se ha hecho en este trabajo. Es posible que el cambio masivo de aminoácidos altere la estructura terciaria de las proteínas, afectando así al resultado de su sumoilación. Además, la sobreexpresión de las enzimas activadora y conjugadora en presencia de una diana con un solo residuo de lisina podría generar falsos positivos, debido a las condiciones estequiométricas de la reacción. En este sentido, cabe destacar que en los ensayos de Strzalka y colaboradores (2012) se detectó la sumoilación de cinco lisinas adicionales ubicadas en el círculo interno del anillo del trímero, posiciones que no parecen accesibles para las enzimas de la maquinaria de modificación.

A partir de los resultados en ambos estudios se pueden plantear dos posibilidades: (1) K164 se sumoila sólo con AtSUMO1, mientras que a K254 se conjugan tanto AtSUMO1 como AtSUMO3, o bien (2) que la no detección de la K164 en AtPCNA1/2 se debe a la estrategia empleada en la identificación de los residuos sumoilables. Esta lisina, sin embargo, se detectó como un residuo que se ubiquitina en los homólogos de *Arabidopsis* al emplear mutantes puntuales (AtPCNA1/2 K164R) (Strzalka *et al.*, 2013).

Además de su conjugación a SUMO, se ha descrito la mono- y poliubiquitinación de la lisina 164 de PCNA de levaduras, animales y *Arabidopsis* (Kanao y Masutani, 2017; Leung *et al.*, 2019). Los ensayos en bacterias han permitido confirmar que la proteína homóloga de tomate también se monoubiquitina en el mismo residuo K164 por la enzima conjugadora UBC35 (homóloga de Ubc13, involucrada en la ubiquitinación de PCNA de *S. cerevisiae*) y la ligasa RAD5a (homóloga de Rad5) de *Arabidopsis* (**Figura 30**), proteínas empleadas previamente en ensayos con AtPCNA1/2 (Strzalka *et al.*, 2013). Sin embargo, no se ha podido detectar la poliubiquitinación de SIPCNA (datos no mostrados) a pesar de emplear el mismo complejo enzimático AtUBC35/AtUEV1A/AtRAD5a con el que se obtuvo la formación de cadenas de ubiquitina en los homólogos de *Arabidopsis* (Strzalka *et al.*, 2013). La falta de sensibilidad del ensayo, o que la combinación de enzimas anterior no es la más apropiada para la formación de cadenas de ubiquitina en el homólogo de tomate, pueden ser causas que hayan impedido detectarla.

PCNA y SUMO interaccionan de forma covalente y no covalente en el núcleo y el citoplasma

Mazur y colaboradores determinaron que la versión madura de AtSUMO1 y la actividad conjugativa de AtSCE1 son esenciales para su ensamblaje en cuerpos nucleares, que podrían constituir centros de sumoilación activos (Mazur *et al.*, 2019). Los cuerpos formados en el nucleoplasma tras la sobreexpresión de SCFP^N-PCNA y SCFP^C-AtSUMO1 resultaron ser dependientes de sumoilación, ya que solo se observaron al utilizar la variante conjugativa de SUMO (**Figura 35**). Sin embargo, que estas estructuras también sean visibles al expresar los mutantes de PCNA en las lisinas 164 y 254, indica que: (1) existe otra lisina no identificada que es sumoilada, (2) PCNA es capaz de formar heterotrímeros con NbPCNA endógeno, que sería el monómero sumoilado, o bien (3) AtSUMO1 se conjuga a otros sustratos nucleares, que interaccionarían con SlPCNA, permitiendo la reconstitución del fluoróforo.

Si bien la conjugación de SUMO a homólogos de PCNA ha sido ampliamente demostrada, solo se ha descrito su interacción no covalente en el núcleo y citoplasma entre la variante no conjugativa de AtSUMO3 (AtSUMO3 Δ GG) y AtPCNA1/2 (Strzalka *et al.*, 2012). En nuestro ensayo de BiFC, la ausencia de la doble glicina final de AtSUMO1 (AtSUMO Δ GG) no interrumpió su interacción con PCNA de tomate en ninguno de los compartimentos celulares (**Figura 35**), lo que indica que esta unión no es dependiente de la sumoilación de esta diana. La identificación de dos secuencias como potenciales SIMs en SlPCNA, una en el dominio A (SIM 1) y otra en el dominio B, cerca de la K164 (SIM 2) (**Figura 36**), sugiere que la interacción no covalente podría estar mediada por estos motivos. Los SIMs, descritos en la mayoría de las proteínas que son sumoiladas (Song *et al.*, 2004), juegan un papel relevante en la sumoilación al acoplar la enzima conjugadora cerca de la lisina de la diana o al aumentar localmente la concentración de moléculas de SUMO (Kerscher, 2007). Todos los ejemplos conocidos de sumoilación que ocurren en lisinas que no forman parte de un motivo consenso (como K164 de PCNA) implican un SIM funcional (Beauchair *et al.*, 2015). De este modo, los motivos SIM identificados en PCNA de tomate podrían constituir un sitio de contacto adicional que favorezca la conjugación de SUMO o contribuya o refuerce su unión a interactores sumoilados (Mayanagi *et al.*, 2011).

Aunque no podemos descartar que la interacción entre PCNA de plantas y SUMO en el citoplasma sea un artefacto generado por la sobreexpresión de ambas proteínas, (1) la existencia de sustratos citoplasmáticos modificados por SUMO, (2) la localización de PCNA en el citoplasma de algunos tipos de células humanas, donde se ha descrito su participación en el control de la supervivencia celular y la regulación del metabolismo del carbono (Bouayad *et al.*, 2012; De Chiara *et al.*, 2012; Müller *et al.*, 2013; Naryzhny and Lee, 2010; Ohayon *et al.*, 2016; Rosental *et al.*, 2011; Witko-Sarsat *et al.*, 2010), y (3) la existencia de interactores de PCNA situados fuera del núcleo e implicados en la señalización celular, que contienen cajas PIP y motivos APIM (Olaisen *et al.*, 2015; Olaisen *et al.*, 2018), indica que PCNA sumoilado podría tener un papel aún no descrito en este compartimento celular. La identificación en PCNA de mamíferos y vertebrados de una secuencia de exportación nuclear (*nuclear export signal*, NES) dependiente del receptor de exportación nuclear CRM1/Exportina1 (Bouayad *et al.*, 2012; De Chiara *et al.*, 2013), ampliamente conservada en plantas, abre la posibilidad de que PCNA, o PCNA sumoilado pueda ser exportado al citoplasma.

Rep y REn reducen la sumoilación pero no la ubiquitinación de PCNA

Rep reduce la sumoilación de PCNA en sus dos lisinasceptoras (**Figuras 19 y 25**). Cómo tiene lugar esta interferencia está por determinar, pero los datos obtenidos indican que: (1) es específica de PCNA, o, al menos, de un reducido número de sustratos e (2) independiente de su interacción con SCE1, ya que el mutante de Rep afectado en su unión a la enzima conjugadora presenta el mismo efecto sobre la sumoilación de la proteína de tomate (**Figura 20**). Ambos resultados indican que la unión de esta proteína viral a SCE no debe afectar su actividad conjugadora, por lo que la reducción observada en la sumoilación de PCNA no es consecuencia de la inhibición general de esta modificación. Teniendo todo ello en cuenta, se ha propuesto que Rep interfiere en la conjugación de SUMO a PCNA mediante su unión directa a la diana. Considerando la estructura hexamérica de Rep construida *in silico* (mostrada más adelante) y los resultados obtenidos previamente, que muestran que esta proteína viral interacciona con residuos localizados por toda la superficie de PCNA a través de su región central (Bagewadi *et al.*, 2004) y que la expresión de versiones truncadas de Rep que

contienen esa región es suficiente para reducir la sumoilación de PCNA (Tesis Manuel Arroyo-Mateos, 2015), se ha propuesto un modelo de interacción entre ambas proteínas (**Figura 50**). De acuerdo con este modelo, proponemos que la unión de Rep a PCNA podría afectar a la conjugación de SUMO al limitar o alterar el acceso de la enzima conjugadora a la lisina aceptora. Esta interferencia podría ser consecuencia de la interacción de esta proteína viral con SCE y/o SUMO a través de su motivo SIM (Tesis de Francesca Maio, 2019), que alteraría la correcta orientación de la enzima con respecto a PCNA, interrumpiendo así con la conjugación de este pequeño péptido. Otra opción que se podría considerar es que la proteína viral presente actividad proteasa de SUMO, pero no se ha realizado ningún estudio al respecto. La generación de mutantes puntuales afectados en la unión de Rep a PCNA permitirá confirmar si esta interacción es necesaria para inhibir la conjugación de SUMO a las lisinas diana.

Más complejo, por falta de más datos experimentales, resulta proponer un mecanismo para explicar la reducción en la sumoilación de PCNA observada al expresar REn (**Figura 27**). Dado que esta proteína viral no interacciona con SCE1 (Castillo *et al.*, 2004) pero sí con PCNA (Castillo *et al.*, 2003) y Rep (Settlage *et al.*, 1996), y que la inhibición de la conjugación de SUMO a la abrazadera no requiere la presencia de Rep, la unión directa a PCNA también podría ser la responsable de la interferencia. La mutación de los residuos hidrofóbicos situados en la región de REn que participan en su unión a PCNA (Castillo *et al.*, 2003; Settlage *et al.*, 2005) permitirá confirmar si la interacción entre ambas proteínas reduce la conjugación de SUMO a esta diana.

Los resultados obtenidos en este trabajo también muestran que, al contrario de lo detectado con SUMO, Rep no interfiere con la conjugación de ubiquitina a la lisina 164 de PCNA de tomate. Ensayos preliminares con REn revelaron que su expresión tampoco reduce la ubiquitinación de PCNA (datos no mostrados), lo que indica que ambos factores virales alteran de forma similar las modificaciones postraduccionales de esta proteína eucariota. Estos datos contrastan, aparentemente, con la hipótesis propuesta para la interferencia en la sumoilación, ya que, si la unión de las proteínas virales a la abrazadera obstaculiza el acceso de SCE al sitio aceptor, sería esperable que el complejo enzima conjugadora/ligasa de ubiquitina encontrase el mismo impedimento. Sin embargo, es posible que las distintas enzimas se unan de forma diferente a la diana, por lo que la unión de Rep

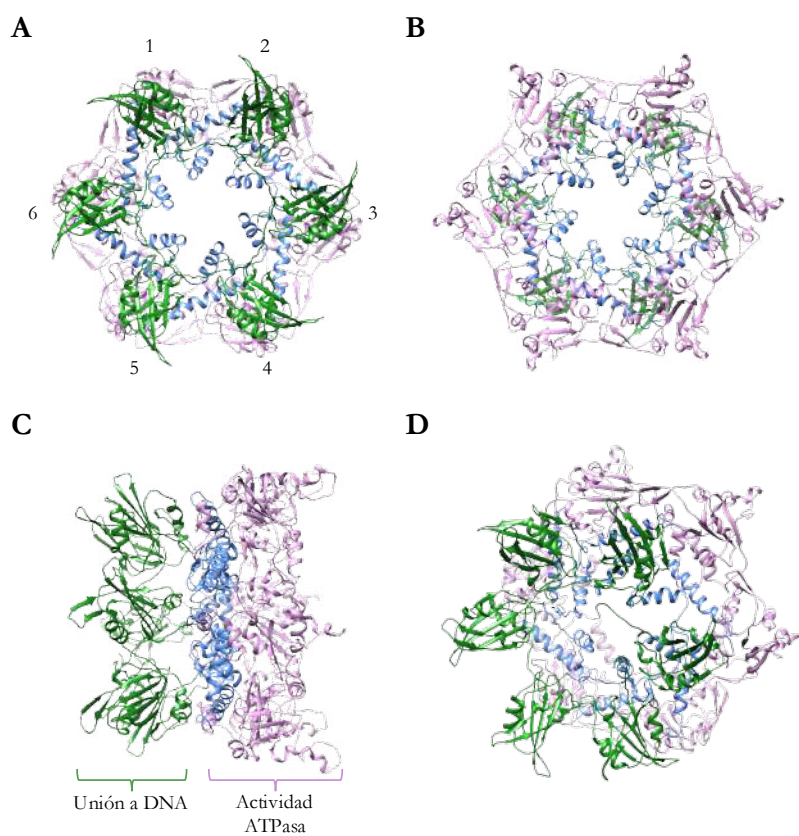
y REn a PCNA no suponga un impedimento para la conjugación de la ubiquitina pero lo sea para la de SUMO. Como se ha propuesto anteriormente para Rep, la interferencia con la sumoilación podría producirse al interaccionar REn con la enzima conjugadora, o con SUMO a través de su motivo SIM. Sin embargo, en las proteínas virales no se ha detectado una secuencia similar que medie su unión a la ubiquitina.

Modelo teórico de la interacción de Rep y PCNA

Durante la replicación del genoma geminiviral, Rep actúa como endonucleasa, ligasa, ATPasa y helicasa de DNA, actividades en las que están involucradas sus diferentes dominios y que parecen requerir la formación de oligómeros (Ruhel y Chakraborty, 2019). Esta proteína, presente en los denominados virus CRESS (*Circular Rep-encoding single-stranded DNA*) (filo *Cressdnaviricota*) entre los que se encuentran los geminivirus, se ha clasificado como miembro de la superfamilia de helicasas SF3 (clado 4), incluida a su vez en la superfamilia de ATPasas asociadas con diversas actividades celulares (*ATPases associated with diverse cellular activities*, AAA+). Esta superfamilia incluye principalmente helicasas replicativas de virus de DNA y , enzimas ensambladas a partir de seis subunidades dispuestas en forma de anillos homohexaméricos (Javed *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2022; O'Donnell y Li, 2018).

Recientemente, se ha determinado la estructura de la proteína Rep del circovirus porcino 2 (PCV2) en complejo con ADP y ssDNA/dsDNA (Tarasova *et al.*, 2021), el representante prototípico del género *Circovirus* (virus CRESS). Ésta constituye un hexámero formado por la unión de seis monómeros a través de sus dominios de oligomerización, organizados alrededor de un canal central al que se une el ss/dsDNA. A partir de esta estructura se muestra, además, que los dominios N-terminal (dominio endonucleasa) y C-terminal (dominio ATPasa) son móviles, adoptando este último una disposición en escalera de caracol alrededor del ssADN/dsADN que demuestran un modo secuencial de hidrólisis de ATP y la dirección de translocación del ssDNA (Tarasova *et al.*, 2021).

Modelo “cerrado”



Modelo “abierto”

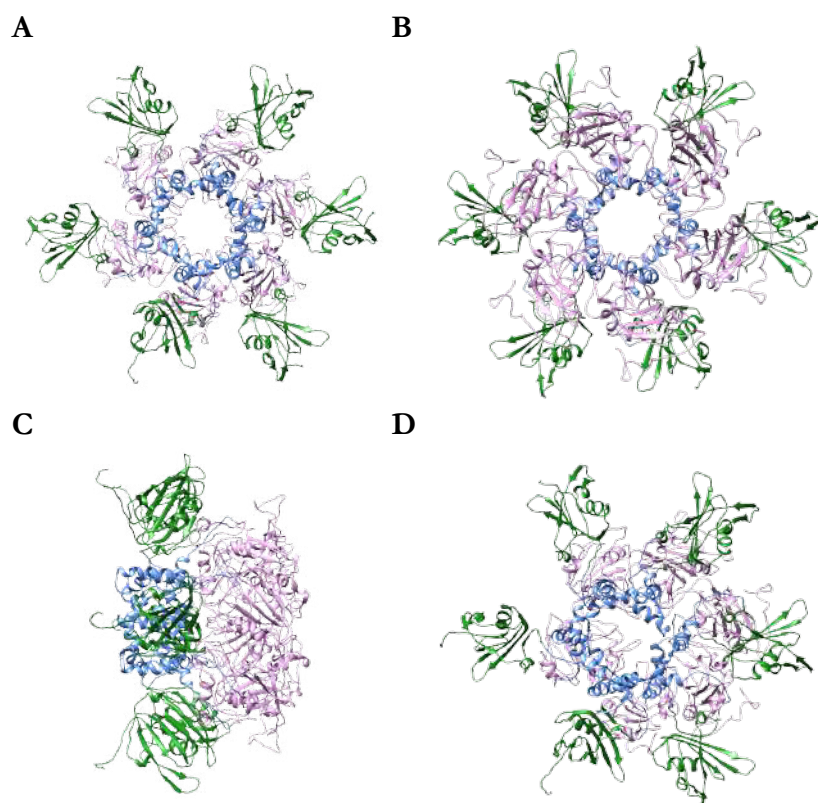


Figura 49. Modelo hexamérico de Rep “cerrado” y “abierto”. Los seis monómeros de Rep se unen a través de la región central, de modo que los dominios amino y carboxilo se disponen enfrentados formando dos anillos apilados. Esta estructura hexamérica es similar a la presentan otras proteínas Rep de virus CRESS y las helicasas replicativas. El dominio N-terminal, se ha coloreado de verde, la región C-terminal de azul y de lila el dominio C-terminal. **A.** Vista frontal. **B.** Vista posterior. **C.** Vista lateral. **D.** Vista girada.

Para los geminivirus se ha propuesto un modelo hexamérico similar, unido a DNA y a ADP, a partir de Rep del begomovirus *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) (Ruhel *et al.*, 2021). Este modelo se ha basado en el dominio helicasa del factor E1 del papilomavirus bovino (bovine papillomavirus, BVP), un virus de DNA de cadena doble, y su estructura homohexamérica (Enemark y Joshua-Tor *et al.*, 2006).

Considerando los resultados anteriores, en nuestro laboratorio se ha generado un modelo *in silico* de la estructura de la proteína Rep del begomovirus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*, en el que se han dispuesto seis subunidades formando un hexámero similar al que presentan las helicasas, principalmente de virus de DNA, de la superfamilia SF3 (Luis Díaz-Martínez y Manuel A. Arroyo-Mateos, sin publicar) (**Figura 49**). En la conformación propuesta, similar a la denominada forma de campana de las helicasas hexaméricas, los dominios amino y carboxilo terminal de los seis monómeros o subunidades forman dos anillos separados por la región central (también anular), que constituyen un canal o cavidad central al que se une el DNA y, en los residuos próximos al mismo, el ATP. Tanto la región amino como la carboximo terminal conectan con la zona central a través de una zona más desordenada y flexible que permitiría su movimiento independiente, adaptándose a la funciones de la estructura (**Figura 49**), de forma similar a como se ha mostrado para la proteína Rep de PCV2. Según la disposición de las regiones amino, se han establecido dos conformaciones de la estructura hexamérica, denominadas “cerrada” o “abierta”; en la conformación cerrada, las tres regiones de cada monómero están alineadas en el mismo plano, mientras que en la “abierta” la parte amino terminal se ha desplazado 90° hacia el exterior del anillo central, quedando la zona central expuesta. Esta estructura es consistente, como sugieren Ruhel y colaboradores, con funciones independientes de los dos extremos de la proteína, de modo que el C-terminal lleva a cabo la actividad helicasa y el N-terminal está involucrado en el inicio y la terminación de la replicación del DNA viral.

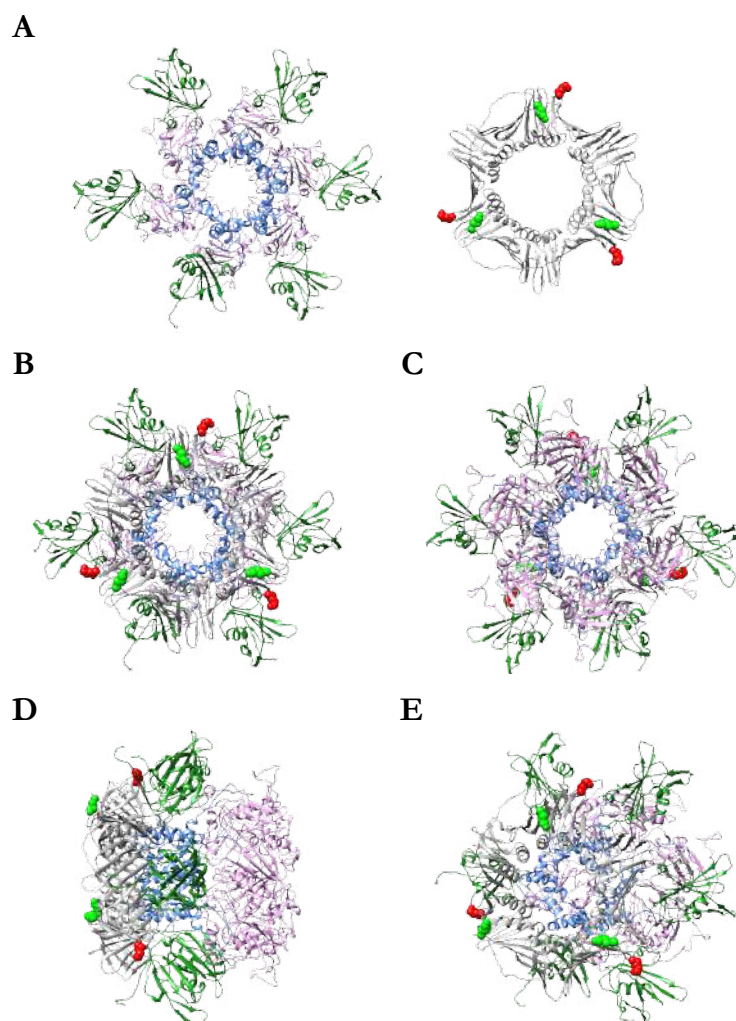


Figura 50. Modelo de la interacción de Rep con PCNA. **A.** Modelo hexamérico de Rep (izquierda) y trímero de PCNA de tomate (derecha). Las lisinas 164 y 254 de PCNA se han destacado en rojo y verde, respectivamente. El modo de unión propuesto entre Rep y PCNA, a través de su extremo amino y la cara anterior, respectivamente, se representa en **B**. Vista frontal. **D.** Vista posterior. **D.** Vista lateral. **E.** Vista girada.

A partir del hexámero de Rep y la estructura homotrimérica de PCNA se ha construido un modelo de interacción entre ambas proteínas. Entre las posibles opciones, se ha propuesto que su unión tiene lugar a través de la región central del factor viral (aminoácidos 120-180), como mostraron Bagewadi y colaboradores (2004), y la cara posterior de la abrazadera, quedando la cara frontal disponible para su interacción con las polimerasas de DNA (**Figura 50**). Los dominios amino terminal de los monómeros de Rep se dispondrían como se muestra en el denominado modelo abierto, quedando expuesta y disponible la región central para su unión a PCNA. De este modo, Rep podría actuar como una especie de gancho que dirija a PCNA hacia el DNA viral.

La conjugación de SUMO y la expresión de Rep aceleran la localización temprana de PCNA en subáreas nucleares

La dinámica subnuclear de AtPCNA1-sGFP presenta tres patrones diferentes a lo largo del ciclo celular caracterizados por una distribución homogénea en las fases G1 y G2 y la agrupación en foci durante la etapa de síntesis del DNA (Yokoyama *et al.*, 2016). Durante la fase S, PCNA de levaduras presenta una distribución similar, agrupándose en foci que constituyen las factorías de replicación celular (Essers *et al.*, 2005; Meister *et al.*, 2007).

En este trabajo, se ha observado un patrón de distribución en foci de GFP-SIPCA similar al descrito para AtPCNA1-sGFP, lo que sugiere que su sobreexpresión altera el ciclo celular de la célula diferenciada y promueve su entrada en fase S (endorreduplicación), un efecto ya descrito en células humanas (Wang *et al.*, 2018). La sumoilación de PCNA de tomate no es esencial para su localización y dinámica subnuclear pero parece actuar como promotor de la misma, ya que, mientras que la mutación de las lisinas 164 y 254 no impidió esta distribución, la fusión de SUMO al extremo C-terminal aceleró su agrupación subnuclear en áreas concretas del carioplasma (**Figura 33**). Esta acción podría tener lugar a través de la interacción de PCNA-SUMO con proteínas con motivos SIM que estén acumulándose en estas áreas, consideradas como potenciales centros de replicación, donde SUMO actuaría promoviendo, a través de su interacción con motivos SIM, el ensamblaje de complejos proteicos y compartimentos sin membrana (Martín-Rufo *et al.*, 2022; Yau *et al.*, 2021).

Un escenario similar al descrito para la localización de PCNA-SUMO se obtuvo al coexpresar PCNA con Rep de begomovirus, que aceleró la distribución de la proteína de tomate en foci. Si estos foci representaran áreas de replicación activa, este resultado indicaría que el factor viral actúa favoreciendo la localización de PCNA en los puntos en los que se está produciendo la copia del DNA. No obstante, la sugerencia de que tanto la sumoilación de PCNA como la presencia de Rep favorecen la asociación de la abrazadera en puntos activos de replicación no es incompatible con nuestro resultado anterior, que muestra que la proteína viral interfiere con la conjugación de SUMO a esta diana. En este caso, la proteína viral sería la que conduciría a PCNA a los foci mediante su interacción a otros factores sumoilados a través de su motivo SIM. Se ha descrito que este motivo media la unión de Rep a SCE1 y SUMO1, con los que forma un complejo ternario

en subáreas nucleares (Rep-SCE1-SUMO) (Sánchez-Durán *et al.*, 2011; Tesis de Francesca Maio, 2019), similar a los formados por SCE1, SUMO y SIZ1 (Mazur *et al.*, 2019). En este contexto se ha sugerido que Rep podría actuar como ligasa de SUMO, lo que revela una relación compleja de la proteína viral con la sumoilación y una capacidad potencial de explotar dicha modificación para manipular múltiples rutas de la planta (Tesis de Francesca Maio, 2019).

¿Cuáles son las posibles consecuencias biológicas del efecto de Rep y REn sobre las modificaciones postraduccionales de PCNA?

Rep y REn en la sumoilación de PCNA en la planta durante el proceso de infección

Los resultados obtenidos muestran que la sobreexpresión de las dos proteínas de geminivirus implicadas en la replicación, Rep y REn, reduce la sumoilación de PCNA. Considerando el papel que esta proteína conjugada a SUMO desempeña en levaduras, donde inhibe los eventos de recombinación al reclutar a la helicasa Srs2, proponemos que la interferencia observada provoca un aumento de la frecuencia de HR durante la amplificación del genoma viral.

SRS2 es una proteína conservada en plantas

La helicasa Srs2 de *S. cerevisiae* actúa como antirecombinasa y como factor limitante de los entrecruzamientos durante la replicación y la reparación del DNA: evita los eventos de recombinación en las horquillas de replicación, donde es reclutada por PCNA sumoilado, y favorece la reparación de las roturas del dsDNA por la vía SDSA, evitando que se produzcan entrecruzamientos (Niu y Klein, 2017). En plantas se ha identificado un homólogo de SRS2 en *Arabidopsis* (AT4G25120) que presenta actividad helicasa de DNA con polaridad 3'-5' y es capaz de procesar las estructuras ramificadas que se forman durante la vía SDSA (Blanck *et al.*, 2009).

Los datos obtenidos en el análisis *in silico* confirmaron que los homólogos de Srs2 de plantas presentan una estructura y características similares a la proteína

de levaduras, ya que contienen el característico dominio de las helicasas *UvrD-like*, incluyendo los motivos implicados en la actividad ATPasa y de unión al DNA, y también los motivos de unión covalente y no covalente a SUMO (SAS y SIM, respectivamente) (**Figura 37; Figura S2**). Aunque no se ha identificado la región de interacción con Rad51 ni cajas PIP, la detección de interacción entre SlPCNA y AtSRS2 indica que debe existir un motivo de unión a PCNA en la helicasa de *Arabidopsis*. La interacción de SRS2 con Rad51 es uno de los aspectos pendientes de estudio, que no ha dado tiempo a abordar durante la presente tesis doctoral.

En levaduras, Srs2 se encuentra en el núcleo formando múltiples y pequeños foci que colocalizan con PCNA sumoilado (Burgess *et al.*, 2009). La proteína SRS2 de *Arabidopsis* también se localiza en el núcleo de la célula vegetal, distribuyéndose homogéneamente entre el nucleoplasma y el nucléolo (**Figura 42**). Esta diferencia en la distribución podría deberse a que nuestros ensayos se llevaron a cabo en células vegetales diferenciadas, principalmente en la fase G0 del ciclo celular, mientras que la localización de Srs2 se observó en levaduras en fase S (Burgess *et al.*, 2009).

AtSRS2, al igual que la proteína de levadura, interacciona con PCNA y SUMO en el núcleo de la célula vegetal, tanto en el carioplasma como en áreas subnucleares concretas semejantes a cuerpos nucleares (**Figura 43**). Su unión a PCNA es independiente de su sumoilación, ya que se mantiene al eliminar las lisinas sumoilables (K164 y K254), aunque ésta parece favorecer su localización en cuerpos nucleares, como muestra que la señal emitida por los mismos al interaccionar AtSRS2 y PCNA-SUMO sea más intensa que cuando se expresan AtSRS2 y PCNA (**Figura 47**). Estos cuerpos nucleares son similares a los formados por AtSRS2 y la forma madura de SUMO (AtSUMO1 y el mutante AtSUMO1SIM) (**Figura 48**), cuyo ensamblaje depende de la capacidad conjugativa del péptido modificador, como ya se observó con PCNA y SUMO. Estos resultados sugieren que la sumoilación juega un papel clave en la formación de estas estructuras nucleares, posiblemente a través de la interacción SUMO/SIM, similar a la formación de complejos como los cuerpos PML (Lascorz *et al.*, 2021). Recientemente, se ha descrito que la formación de los complejos SUMO1-SCE1-SIZ1 de *Arabidopsis* y su agregación en cuerpos nucleares depende estrictamente de la actividad y capacidad conjugativa de SCE y SUMO, respectivamente, actuando estos como centros de sumoilación activa (Mazur *et al.*,

2019). De este modo, en estas áreas podría encontrarse una fracción de AtSRS2-SUMO, pero también la forma no conjugada de la proteína, que sería reclutada por otros factores sumoilados a través de su motivo SIM.

Srs2 de *S. cerevisiae* se mono y polisumoila, tanto *in vivo* como *in vitro*, en tres lisinas situadas en el extremo C-terminal de la proteína (1081, 1089 y 1142) (Kolesar *et al.*, 2016; Saponaro *et al.*, 2010). Esta modificación, inducida por daño, depende del motivo SIM de la helicasa, que interacciona con el péptido SUMO cargado a Ubc9 (SCE) (Kolesar *et al.*, 2012; Kolesar *et al.*, 2016; Saponaro *et al.*, 2010). El ensayo de sumoilación de AtSRS2 con el sistema de *Arabidopsis* confirmó que la helicasa de DNA de plantas también se modifica por AtSUMO1 y AtSUMO2, mientras que AtSUMO3 se conjuga con una eficiencia mucho menor (**Figura 41**). Aunque no se ha podido confirmar la sumoilación de esta proteína en la planta, su interacción por BiFC con: (1) AtSUMO1, (2) la enzima conjugadora (AtSCE1) y (3) la ligasa de SUMO (AtSIZ1), apoyan su sumoilación en la célula vegetal.

En levaduras, Srs2 interacciona con un amplio número de proteínas implicadas en el metabolismo del DNA (PCNA, Rad51, Rad52, Rad59, Mre11, entre otras), muchas de las cuales son sumoiladas. En la determinación de ese interactoma participan motivos específicos y el sitio SIM presente en la helicasa, pero también su sumoilación, ya que esta modificación compite por la disponibilidad del SIM (Kolesar *et al.*, 2012). Un ejemplo bien estudiado es PCNA; la sumoilación de esta proteína refuerza su unión a Srs2 a través de los motivos PIM y SIM situados en su extremo carboxilo, al mismo tiempo que reduce la conjugación de SUMO a la helicasa. No obstante, la sumoilación de Srs2 limita su interacción con PCNA-SUMO, lo que muestra la existencia de un mecanismo de regulación establecido por competencia por el sitio SIM (entre PCNA-SUMO y Ubc9-SUMO) (Kolesar *et al.*, 2012; Kolesar *et al.*, 2016). De este modo, se ha propuesto que el motivo SIM de Srs2 regula su función en la recombinación homóloga, actuando como inhibidor al mediar su unión a PCNA-SUMO y como promotor al favorecer su sumoilación y/o, como se ha sugerido, la formación de complejos recombinogénicos (Kolesar *et al.*, 2016). Además del estudiado papel de Srs2 como factor antirecombinogénico, a lo largo de los años se han acumulado pruebas que muestran que esta helicasa también puede cumplir una función pro-recombinogénica en algunas situaciones (Friedl *et al.*, 2001; Vaze *et al.*, 2008). Srs2

también promueve la reparación del dsDNA a través de la vía de reparación SDSA (Ira *et al.*, 2003), pero los estudios más recientes sugieren que esta actividad está favorecida por PCNA-SUMO (Liu *et al.*, 2017). Teniendo todo lo anterior en cuenta, la unión directa de AtSRS2 a SUMO y PCNA y, por tanto, la existencia de potenciales motivos SIM y PIM, permite inferir que la sumoilación y el motivo SIM juegan un papel similar al descrito para Srs2 de levadura en la regulación del interactoma de la helicasa en la planta y, consecuentemente, en su papel en la célula.

Hipótesis

Los datos obtenidos con AtSRS2 en este trabajo, junto con la detección de su actividad helicasa (Blanck *et al.*, 2009), indican que el genoma de plantas codifica una proteína homóloga a Srs2 de levaduras que podría desempeñar algunas de las actividades descritas asociadas a PCNA y SUMO, como participar en la replicación y reparación del DNA evitando los eventos de recombinación inapropiados.

En los geminivirus, la recombinación homóloga es un fenómeno mucho más frecuente que el esperado al considerar que emplean la maquinaria de la planta para su replicación y que la frecuencia de HR en el genoma de la planta es muy inferior (García-Andrés *et al.*, 2007; Lefeuvre y Moriones, 2015; Malathi *et al.*, 2017; Richter *et al.*, 2014). Se ha visto que la presencia de estos virus induce la expresión de factores involucrados en este mecanismo (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2008; Jeske *et al.*, 2001) y, a partir de experimentos de desarrollo de replicones, se ha sugerido que la proteína Rep genera aumento de la frecuencia de HR en la planta (Bates *et al.*, 2014). Aunque se desconocen cuáles son los mecanismos de HR asociados a los virus de ssDNA, es muy probable que estén fuertemente influenciados por la forma en la que estos patógenos se replican. Así, uno de los mecanismos de amplificación del genoma viral es la replicación dependiente de recombinación (RDR), en la que participan proteínas del huésped. Una de ellas, RAD51D, parálogo de RAD51, promueve la amplificación del begomovirus bipartito *Euphorbia yellow mosaic virus* en las primeras etapas de la infección y es necesario para la recombinación intra e intermolecular del genoma viral (Richter *et al.*, 2016b).

Tras los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos que la unión de Rep y REn con PCNA interferiría con su sumoilación, evitando el reclutamiento

de la helicasa SRS2 al replisoma viral. Según el modelo propuesto, la unión de Rep en su forma hexamérica con la cara posterior del trímero de PCNA impediría que la enzima SCE1 conjugase SUMO a las lisinas aceptoras 164 y 254, quedando éstas, no obstante, disponibles para su ubiquitinación. Esta interferencia no afectaría a la actividad de PCNA como factor de procesividad de la polimerasa, que permanecería unida a su cara frontal para la síntesis del DNA, sino que reduciría su interacción con SRS2 y, de este modo, su presencia en la horquilla de replicación. De este modo, al producirse una lesión en una cadena de DNA y detenerse la replicación, se podría unir la nucleoproteína Rad51 al ssDNA, o bien llevarse a cabo la extensión del extremo 3' de la cadena invasora, lo que conduciría a su reparación por recombinación homóloga. Ello conllevaría un aumento de la tasa de recombinación homóloga durante la copia del genoma del virus y la planta.

Adicionalmente, dado que se ha descrito que Srs2 promueve la vía SDSA en presencia de PCNA sumoiledado (Liu *et al.*, 2017), se ha propuesto que, en caso de rotura del dsDNA viral, la disminución de la conjugación de SUMO a la abrazadera y, consecuentemente, el reclutamiento de SRS2, podría favorecer su reparación por otra vía que conduzca a entrecruzamientos. Todo ello daría lugar a un aumento de la recombinación homóloga intra e intermolecular, respectivamente, siendo este último importante entre genomas de diferentes especies de geminivirus. Una mayor actividad de la HR, además, podría suponer una mayor eficiencia en la replicación del DNA del patógeno, al constituir éste uno de los principales mecanismos involucrados en la copia del genoma viral (a través de la vía RDR).

Consecuencias biológicas de la no interferencia de Rep sobre la ubiquitinación de PCNA en la planta

Considerando los papeles atribuidos a PCNA ubiquitinado relacionados con su función como factor de procesividad para polimerasas de alta y baja fidelidad y de regulador de las vías de reparación del daño en el DNA, se podría sugerir que la no interferencia de Rep con la monoubiquitinación de esta proteína podría contribuir al aumento de la eficiencia y una disminución de la fidelidad de la replicación del DNA viral.

Por una parte, PCNA monoubiquitinado podría favorecer la replicación del genoma viral *per se*. En *S. pombe*, se ha descrito que PCNA-Ub es necesario para la correcta progresión de la horquilla de replicación, de modo que su ausencia da lugar a un avance más lento y al aumento de huecos en el DNA (Daigaku *et al.*, 2017). En células humanas, se ha comprobado que esta forma modificada es fundamental para la replicación del DNA y la estabilidad del genoma (Leung *et al.*, 2019), y que protege a las horquillas estancadas de la degradación (Thakar *et al.*, 2020). En *X. laevis*, se ha propuesto que PCNA ubiquitinado actúa como un “acelerador molecular” que regula la velocidad del movimiento de la replicación durante la fase S (Leach y Michael, 2005). Teniendo todo ello en cuenta, sugerimos que, en el contexto de una infección por geminivirus, la presencia de PCNA ubiquitinado podría favorecer la progresión e integridad de las horquillas de replicación durante la copia del DNA viral y, consecuentemente, acelerar la replicación.

Por otra parte, la monoubiquitinación de PCNA, que media el acoplamiento de las polimerasas de translesión a la horquilla de replicación al producirse una lesión en el DNA, podría favorecer la reparación por la vía TLS del daño originado en el genoma viral durante su copia. Uno de los modelos existentes para el intercambio de polimerasas propone que PCNA se une simultáneamente a las polimerasas de alta y baja fidelidad, a estas últimas a través del péptido ubiquitina (modelo “cinturón portaherramientas” o PCNA *toolbelt*) (Leung *et al.*, 2019; Stodola y Burgers, 2016), de modo que se produce la permuta sincrónica entre ambas enzimas al bloquearse la horquilla de replicación y, de este modo, una rápida derivación del daño sin afectar al ensamblaje ni a la procesividad del complejo Pol δ (Hedglin *et al.*, 2016). Si Rep, al interferir con la sumoilación de PCNA, promoviese indirectamente su ubiquitinación, se podría ver favorecida la reparación de los daños producidos durante la copia del DNA viral a través de la vía TLS. El uso preferente de polimerasas de translesión, que carecen de actividad correctora, conllevaría un aumento en el número de errores durante la replicación del DNA y, además, que ésta se llevase a cabo más rápidamente, ya que sería más fácil completar la reparación si se tolera un cierto nivel de error. De este modo, la elevada tasa de mutación que presentan los geminivirus se podría atribuir, al menos parcialmente, al resultado de la selección de la reparación por la vía TLS de los errores cometidos durante la copia del genoma viral.

Impacto de Rep en el funcionamiento de PCNA como plataforma para regular el metabolismo del DNA

Los datos obtenidos muestran que las proteínas virales Rep y REn modulan el estado de modificación postraducciona l de PCNA, probablemente para controlar su función y crear un entorno celular adecuado para la replicación viral. Dado que las diferentes formas modificadas de la proteína del hospedador son necesarias tanto para la replicación eficiente como para la correcta reparación del daño en el DNA, proponemos que las proteínas virales alteran específicamente la conjugación de SUMO y no de la ubiquitina, en lugar de eliminar el papel regulatorio de una u otra modificación. De este modo, en el replisoma viral, la interacción de Rep y REn con PCNA interferiría con la capacidad de SCE para conjugar SUMO a la diana sin impedir la unión covalente de ubiquitina a la misma lisina aceptora. Es posible, además, que al impedir la sumoilación de PCNA se vea favorecida su ubiquitinación, ya que las lisinas quedarían disponibles para esta modificación. Como consecuencia, sugerimos que:

1. la no interferencia en la ubiquitinación de PCNA favorece la progresión adecuada y eficiente de la horquilla de replicación viral, la localización de polimerasas TLS en el replisoma viral y su participación en la reparación del daño en el DNA, y
2. la interferencia con la sumoilación de PCNA reduce la localización de SRS2 en el replisoma viral, lo que conduce al aumento del nivel de recombinación homóloga en el genoma de los geminivirus.

CONCLUSIONS

1. As previously described in other eukaryotic organisms, the sumoylation and ubiquitination of PCNA at lysine 164 indicate that both modifications are conserved in the plant protein.
2. The geminiviral Rep factor could reduce the SUMO conjugation of PCNA at two acceptor lysines through binding to this protein. This interaction would take place between the core region of Rep and the back side of PCNA.
3. The reduction of sumoylated PCNA produced by the geminiviral proteins involved in viral replication, Rep and REn, could contribute to an increase in viral homologous recombination rate by preventing the recruitment of the DNA helicase SRS2.
4. The non-interference of Rep in PCNA ubiquitination indicates that this viral protein does not prevent the access of the post-translational modification machinery to the lysine 164. It is possible that PCNA ubiquitinated results in a higher replication efficiency and an increase in the number of failures during replication, thus, favouring viral mutation rate.
5. Plant SRS2 is a DNA helicase that maintains the structure and functional domains of the homologue protein in *S. cerevisiae*.
6. The interaction of *Arabidopsis* SRS2 with PCNA and SUMO and its sumoylation suggest that this protein retains the functions associated with sumoylated PCNA described for *S. cerevisiae* homologue: to prevent unwanted homologous recombination events at the replication fork and to favour the repair of double-stranded DNA breaks through the SDSA pathway.
7. Rep co-expression and its sumoylation promote the nuclear localization of PCNA in discrete nuclear areas that may correspond to replication foci.

- 8.** SUMO conjugation activity promotes PCNA and AtSRS2 relocalization to nuclear bodies that could constitute sumoylation areas.

APÉNDICE

Desarrollo de herramientas para el análisis de los cambios producidos por Rep en el sumoiloma de la planta

INTRODUCCIÓN

Definiendo el sumoiloma de *Arabidopsis*

Para conocer la profundidad y la amplitud de los procesos celulares que se encuentran regulados por la sumoilación resulta imperativo definir el conjunto de proteínas modificadas por SUMO (Elrouby, 2015; Hendriks y Vertegaal, 2016; Augustine y Vertegaal, 2018). En plantas, la primera identificación de dianas de SUMO se llevó cabo principalmente mediante la selección de genes candidatos a partir de datos fenotípicos y bibliográficos y su validación en ensayos en bacterias o *in vitro*, identificándose un número limitado de proteínas sumoiladas (Castro *et al.*, 2012). Posteriormente, la obtención y el estudio de mutantes de los componentes de la ruta de modificación y el desarrollo de técnicas de purificación de proteínas en tándem y de detección masiva por espectrometría de masas ha permitido un abordaje más profundo de la sumoilación, aumentando el número de sustratos identificados y la comprensión de la dinámica del proceso (Augustine y Vierstra, 2018; Elrouby, 2015).

Estudios proteómicos para determinar el sumoiloma de *Arabidopsis*

En *Arabidopsis* se han desarrollado varias estrategias para el estudio del sumoiloma, siendo la más informativa la que combina: (1) el uso de líneas transgénicas mutantes para SUMO1 y SUMO2 (*sum1-1 sum2-1*) complementadas funcionalmente con una versión de SUMO1 diseñada para su purificación por cromatografía de afinidad y para facilitar la detección de los sitios de unión a SUMO por espectrometría de masas (HisSUMO H89R) (**Figura A1**), (2) el empleo de estrictos protocolos de purificación y (3) la aplicación de estrés térmico (**Tabla A1**). Esta aproximación, junto al desarrollo de técnicas cada vez más sensibles de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), ha permitido incrementar el número de dianas de SUMO a más de un millar (**Figura A2**) y ampliar el alcance de esta modificación a casi todos los procesos celulares (**Anexo**).

En los siete estudios proteómicos llevados a cabo hasta la fecha para definir el sumoiloma de *Arabidopsis* se ha identificado un total de 1324 dianas, en condiciones ambientales y de estrés abiótico (principalmente térmico) y biótico

(respuesta de defensa frente a *P. syringae*), lo que sitúa a esta modificación postraduccion al mismo nivel que otras importantes como la fosforilación, la ubiquitinación y la acetilación (**Tabla A1; Anexo**). Según la base de datos de *Gene Ontology* (GO), 966 (73,63%) de las proteínas detectadas se encuentran en el núcleo (**Figura A3, Anexo**), lo que concuerda con la mayor localización de las dianas de SUMO en este compartimento celular (Saracco *et al.*, 2007). También se han detectado sustratos presentes en el citoplasma (25,38%) y el cloroplasto (18,37%), y, en menor número, en casi todos los compartimentos celulares (**Anexo**).

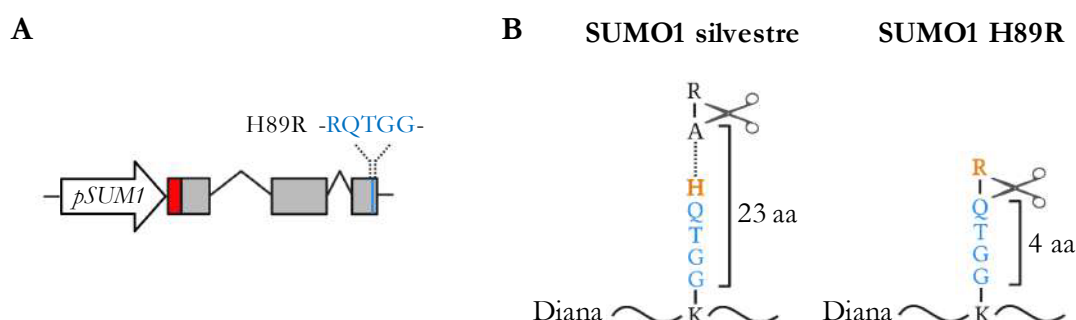


Figura A1. Versión optimizada de SUMO1 de *Arabidopsis* para su purificación y detección por espectrometría de masas. **A.** Esquema del transgén *6xHis-SUMO1 H89R*. Fragmento genómico de *SUMO1*. Las líneas indican los intrones, las cajas grises y la roja representan las regiones codificantes y la etiqueta de histidina, respectivamente, y la secuencia muestra los últimos aminoácidos del C-terminal. **B.** Diagramas de las huellas de tripsina generadas por las proteínas modificadas con SUMO1 silvestre o SUMO1 H89R. La sustitución de la histidina 89 (naranja), cercana a la diGly del C-terminal, por una arginina permite acortar la huella peptídica de SUMO tras la digestión con tripsina (la tijera indica el sitio de corte de la enzima), al tiempo que se distingue de las huellas producidas por la ubiquitina y otros péptidos modificadores similares a ubiquitina. Modificado de Miller *et al.*, 2010.

El listado de dianas sumoiladas se clasificó en cerca de 50 subconjuntos GO (GO *Slim*) referentes a procesos biológicos, entre los que destacan actividades nucleares relacionadas con la regulación de la expresión génica como la metilación del DNA, la modificación postraduccion al de histonas y la remodelación de la cromatina, la reparación del DNA, la transcripción, el metabolismo del RNA (incluyendo la regulación del *splicing* y el procesamiento del mRNA), la traducción y el silenciamiento génico, así como el crecimiento, el desarrollo de la planta y la respuesta frente a estreses abióticos y bióticos (**Figura A3, Anexo**). Acorde con estos procesos, las principales funciones moleculares en las que se clasificaron las dianas de SUMO fueron la unión a DNA, RNA y proteínas, la actividad como factor de transcripción y la actividad catalítica (**Figura A3, Anexo**). Además,

SUMO también se conjuga a numerosas dianas que participan en diversos procesos metabólicos, de biosíntesis y en la señalización celular, entre otros muchos llevados a cabo en el citoplasma y distintos orgánulos (**Anexo**). La categorización funcional de los sustratos sumoilados indica que esta modificación postraduccional está involucrada en prácticamente todos los procesos celulares y metabólicos de la planta (Ghimire *et al.*, 2020). El análisis del listado completo de proteínas sumoiladas con STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) para visualizar la interconectividad funcional (dato no incluido) mostró un número de interacciones significativamente mayor de las esperadas, lo que indica que todas las proteínas identificadas están, al menos parcialmente, conectadas biológicamente como grupo.

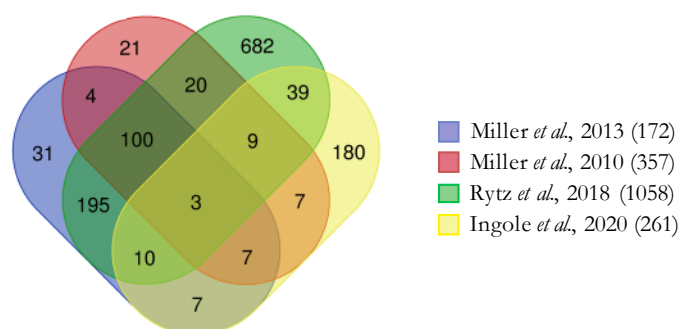


Figura A2. Comparación del número total de conjugados de SUMO1 detectados por espectrometría de masas con la línea *sum1-1 sum2-1 6xHis-SUM1 H89R* en varios estudios proteómicos. En la leyenda se indica, entre paréntesis, el número total de conjugados de SUMO1 detectados en cada análisis.

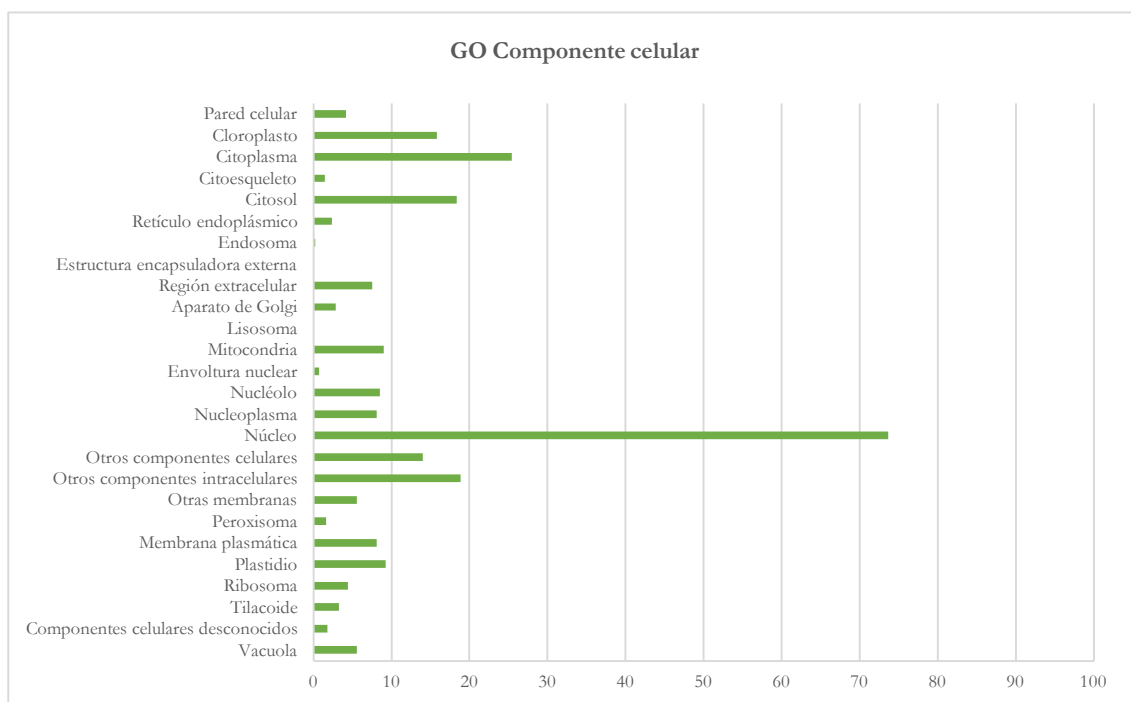
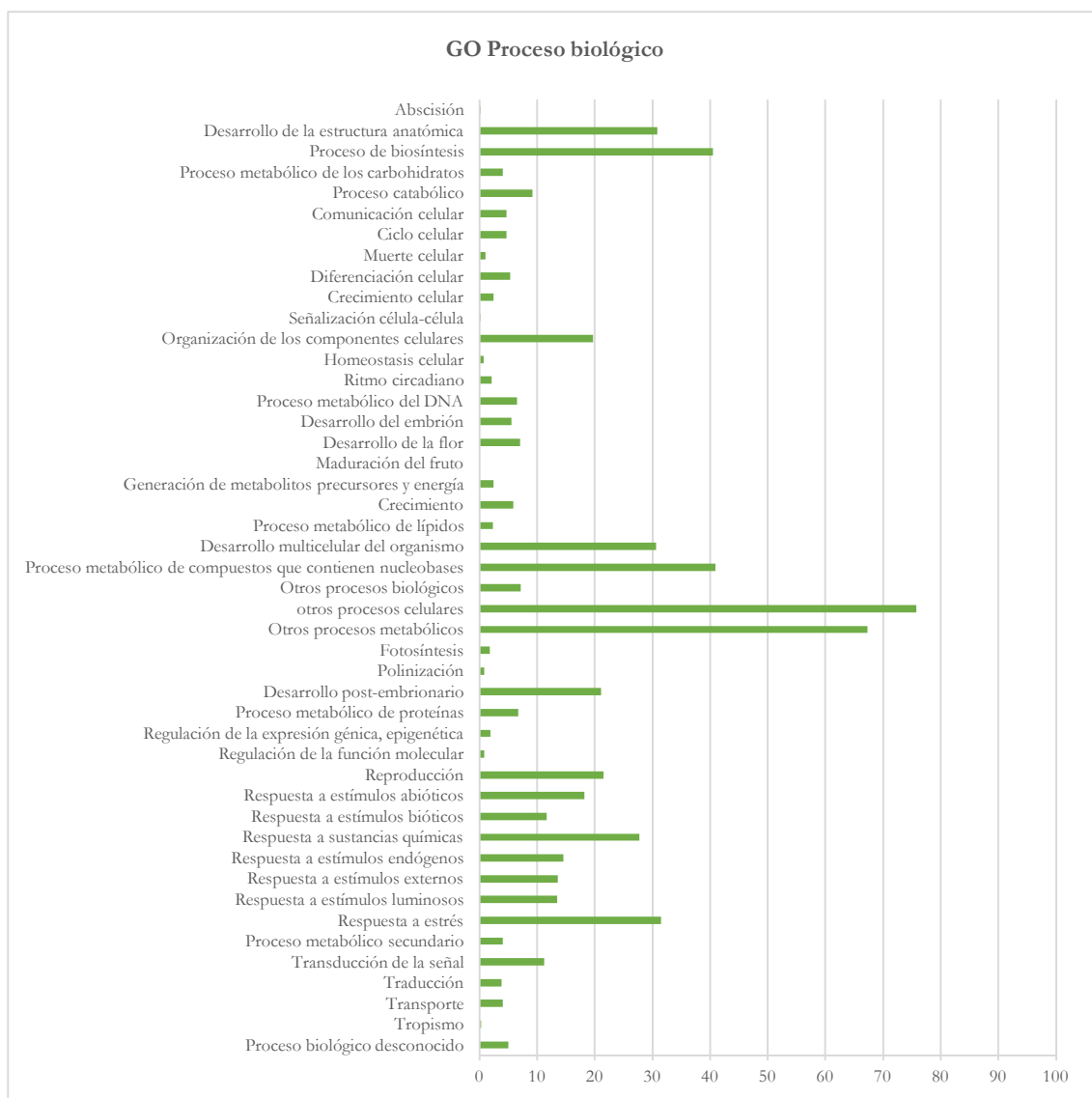
Los factores de transcripción (*transcription factors*, TFs) son las dianas más frecuentes de la sumoilación, que actúa modulando su unión al DNA, su localización, abundancia y asociación con la cromatina (Han *et al.*, 2021; Roy y Sadanandom, 2021). En el conjunto total de datos de proteómica de *Arabidopsis* se han identificado múltiples representantes de las familias de TFs WRKY, *Heat shock factor* (HSF), *Homeodomain*, ANACONDA, NAC y los miembros de la familia Groucho/Tup1 de correpresores transcripcionales TOPLESS/TOPLESS-Related (TPL/TPR) y LEUNIG, siendo los TPL una de las dianas más frecuentemente detectadas (**Tabla A2, Anexo**). Estos factores están implicadas en la respuesta a estreses abióticos (ICE1 ABI5, PHR1, HSFB2b y HSFC1, entre otros), la señalización hormonal (ARF2, ABF3 y JAZ3, -4 y -6) y la respuesta de defensa (EML1, -2, -3) y el desarrollo de la planta (TPL y TPR2).

Tabla A1. Resumen de los estudios proteómicos llevados a cabo para identificar los componentes del sumoiloma de *Arabidopsis*.

Línea de <i>Arabidopsis</i> <i>Genotipo</i> Transgén	Metodología	Nº dianas identificadas	Procesos involucrados	Referencia
Silvestre	Plantas de 45 días de edad. Expresión de SUMO inducida por pulverización de 5 mM de β -estradiol. Espectrómetro de masas (LC-MS/MS)	14	Proteínas relacionadas con la transcripción, la modificación de la cromatina, el metabolismo del RNA y la traducción.	Budhiraja <i>et al.</i> , 2009
pG10-90::tag3-SUM1 Q90A	Cromatografía de afinidad en resina Ni-NTA en condiciones desnaturalizantes			
pG10-90::tag3-SUM3	Q-TOF II equipado con una fuente de pulverización Z			
pG10-90::tag3-SUM5				
sum1-1/sum2-1	Plántulas de 7 días de edad. Sometidas a estrés térmico (30 min a 37°C) u oxidativo (exposición a 50 mM H ₂ O ₂ durante 4 h)	357	Factores de transcripción, componentes del metabolismo del RNA, proteínas de unión/remodelación de la cromatina, de reparación del DNA y reguladores del ciclo celular	Miller <i>et al.</i> , 2010
pSUM1::His:SUM1 H89R	Purificación por afinidad en 3 pasos: Ni-NTA, antiSUMO y Ni-NTA en condiciones desnaturalizantes LTQ-Orbitrap acoplado a un HPLC Agilent 1100 Nano-flow			
Silvestre	Plántulas de 10 días de edad. Sometidas a choque térmico (30 min a 39°C)	27	Proteínas relacionadas con el metabolismo del DNA y el RNA, las vías de señalización y el metabolismo general	Park <i>et al.</i> , 2011
p35S::HFA_tSUMO1	Cromatografía de afinidad en resina Ni-NTA seguida de electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2-DE) Espectrómetro de masas Voyager-DE STR MALDI-TOF			
Silvestre	Plántulas de 7 días de edad. Sometidas a choque térmico (30 min a 42°C).	16	Factores de transcripción, factor involucrado en la floración, chaperona, proteína cloroplastídica, enzimas involucradas en diferentes procesos metabólicos	López-Torrejón <i>et al.</i> , 2013
HA3-SUM1ox	Extracción de proteínas en condiciones desnaturalizantes, análisis por cromatografía líquida 2D e inmunotransferencia (2D-LC-IB)			

Analizador 4700 MALDI-TOF/TOF			
<i>sum1-1/sum2-1</i>	Plántulas de 7 días de edad. Sometidas a choque térmico (30 min a 37 °C), estrés oxidativo (50 mM H ₂ O ₂ durante 2 h) o etanol (10% etanol durante 2 h)	172	Proteínas implicadas en el procesamiento, estabilidad y exportación del RNA, reguladores de las modificaciones del DNA dirigidas por RNA y la condensación de la heterocromatina, factores de transcripción que regulan la respuesta a estrés térmico, subunidades del complejo del poro nuclear
pSUM1::His:SUM1 H89R	Purificación de 3 pasos (Miller <i>et al.</i> , 2010) y etiquetado iTRAQ		
	Cromatografía líquida en fase inversa (LC) seguida de ionización por electrospray (ESI). LTQ Orbitrap Velos		
<i>sum1-1/sum2-1</i>	Plántulas de 8 días de edad. Sometidas a estrés térmico (30 min a 37 °C), oxidativo (50 mM H ₂ O ₂) o etanol (10%)	1058 (105 asignados a SIZ1, 0 a MMS1-1)	Factores de transcripción, coactivadores/represores y modificadores de cromatina conectados a la defensa del estrés abiótico y biótico.
pSUM1::His:SUM1 H89R	Purificación de 3 pasos (Miller <i>et al.</i> , 2010) en condiciones desnaturalizantes		
<i>siz1-2</i>			
<i>sum1-1/sum2-1</i>	LTQ Orbitrap Velos o Q Exactive Plus en el modo de ionización por electrospray (ESI ⁵)		
pSUM1::His:SUM1 H89R			
<i>mms21-1</i>			
<i>sum1-1/sum2-1</i>			
pSUM1::His:SUM1 H89R			
<i>sum1-1/sum2-1</i>	Plantas de 3 semanas de edad. Infección con <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> (PstDC3000)	261	Respuesta de defensa general y anti-bacteriana (regulación HR y ROS), a estrés, a hormonas, regulación de la transcripción (proteínas relacionadas con la arquitectura de la cromatina), de la expresión génica, del metabolismo del RNA, procesos celulares y metabólicos
pSUM1::His:SUM1 H89R	Purificación de 3 pasos (Miller <i>et al.</i> , 2010)		
<i>sum1-1/sum2-1/srfr1-4</i>	TripleTOF 5600		
pSUM1::His:SUM1 H89R			

Ingole *et al.*,
2020



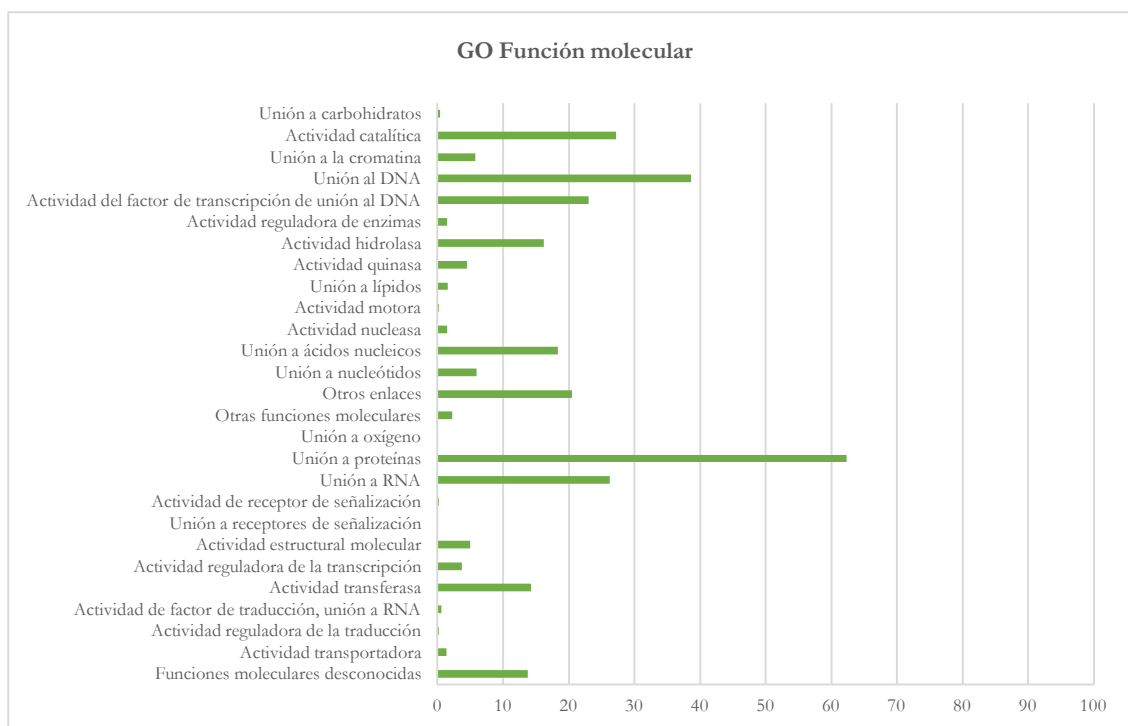


Figura A3. Histograma de las categorías principales de la ontología de genes (GO) asociadas a la función molecular, los procesos biológicos y los componentes celulares de los genes que codifican las proteínas identificadas como dianas de SUMO en los distintos estudios proteómicos. El eje x indica las diferentes subcategorías, y el eje y denota el porcentaje de genes.

El análisis de la lista de proteínas sumoiladas de *Arabidopsis* también ha permitido identificar diversas proteínas implicadas en la regulación del epigenoma, siendo especialmente relevantes la histona H2B, las enzimas modificadoras de histonas GCN5, HAC1 y MAM1/HAG4 (acetiltransferasas), HDA19/HD1 (desacetilasa) y UBP26 (desubiquitinadora), y del DNA CMT3 y MET3 (metiltransferasas), miembros del complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF (SWI3C y PICKLE), así como enzimas implicadas en la metilación del DNA dirigida por RNA (SUVH2, SUVH9 y KTF1), factores encargados del mantenimiento y la reparación del DNA (KU80, LIG1, DRT111 y RPA1, entre otros) y un gran número de proteínas implicadas en el metabolismo del RNA (**Tabla A2**). En este último grupo destaca el factor nuclear de unión al RNA UBA2A (UBP1-associated protein 2A) como la diana identificada en un mayor número de estudios proteómicos, una proteína que reconoce secuencias ricas en U en los 3'-UTRs de las plantas y contribuye a la estabilización de los mRNAs en el núcleo. En conjunto, la detección de estas dianas indica que la adición de SUMO actúa alterando la accesibilidad e integridad del genoma de la planta.

Tabla A2. Proteínas sumoiladas destacadas en estudios proteómicos en *Arabidopsis*.

Grupo funcional	Sustrato de SUMO
Sistema de sumoilación	SUM1, -2, SAE2, SCE1, SIZ1, ESD4
Sistema de ubiquitinación, proteosoma	UBQ8, -9, -12, -13, UBP5, -23, -26 RPN10, RPN12A, UFD1
Transcripción	
Inicio de la transcripción	IWS1, RAP74, TFIIA, -B, -E, TFIIS
Factores de transcripción	
ANACONDA	ANAC050, -51, ANAC080/ATAF2
bHLH	bHLH3, -7, -22, -25, -48, -49, -60, -62, -64, BEE2, BIM1, ICE1, MYC2, PIF4, UNE12
Global	GTA2, GTB1, GTE1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, GTL1, IMB1, SPT16
Homeodominio	BEL1, BEL10, KNAT3, -4, -5, HB6, ANL2
HSF	HSFA1D, -2, HSFB2B
MYB	CDC5, PHR1, MYB3R-1, 3R-3, -4, -50, -55, -70, -73, -77
NAC	NAC50, -52
WRKY	WRKY1, -2, -3, -4, -6, -7, -11, -20, -21, -23, -33, -39, -65
TOPLESS	TPL1, TPR1, -2, -3, -4
(Co)supresores	FLC, LEUNIG, LUG, LUH, RGA, SEU, SLK1
Complejo mediador	MED4, -10, -10A, -15, -19A, -26, -28
Modificación DNA/cromatina	
Histonas	HTA6, -7, HTB2, -4, -9
Remodelación de la cromatina	CHR4, -5, -8, -11, -17, PICKLE
(De)Acetilasas	ADA2A, -2B, GCN5, HAC1, -5, -12, HD1, -2B, -A3, SNL1-5
(De)Metilasas	CMT3, EFS, IBM1, KTF, MET1, SDG29, SUVR1, -2, -5, SUVH2, -6, -9
RdDM/TGS	DRD1, DRM3, IDN2, IDP1, -2, JMJ14, KTF1, MOM1, MORC1, -6, NERD, SUVH2, -9, SUVR2, UPB26
Complejo SWI/SNF	GIF, ARP4, BCL7B, BRD1, BRM, CHC1, CHR11, -12, Dentin SPP-related, G2481-1, GLTSCR, LUH, PICKLE, PKL, PKR1, SWI3A, -B, -C, -D, SWP73B, SYD
Reparación/mantenimiento del DNA	ATXRCC1, BARD1, DRT111, KU80, LIG1, MRE11, RAD4, NSE4, RPA1, SMC5, TOP1A, -1B
RNA	
Proteínas de unión a RNA	ATRZ-1B, DRH1, HYL1, LA1, MOS2, PRH75, RBP47C, RCF3, RH20, ROS3, RRC1, RRP6L1, RS31, -41, SDN3, UAP56A, UBA2A
Factores de <i>splicing</i>	ATU2AF35A, -65A, EMB1220, NOP56, PRP40B, RS40, SMP1, -2, SR34, -34A, STA1, AU1-70K
Ribosomas	RPL5B, -7B, -7C, -7D, -9B, -11B, -12A, -14B, -17A, -30C, RPS3aA, -3B, -3C, -4B, -5B, -6A, -7A, -7C, -8A, -9B
Complejo del poro nuclear	IMP-6, IMPA1, WIP

Reguladores del ciclo celular	SYN4, ILP1, ILP2, RHL1, DPB, CDC5, CDC48A, -C
Respuesta a estrés térmico	BAG7, HSFA1D, -A2, -B2B, -C1, HSP17.4, -17.6II, -70, -70-1, -70-3, -70T-1, -70B, cpHSC70-1
Señalización hormonal	ABI5, ABF3, ARF2, JAZ1, -6, -9, RGA1
Fotomorfogénesis, nutrición	CCA1, CES, COP1, DPa, EDA9, FLD, NIA1, -2, PHYB, RACK1B, SLY, SnRKα1, -β1, -β2, -γ

Otros sustratos de SUMO se han categorizado en la señalización de la defensa, como las proteínas que participan en la inmunidad y se inducen en respuesta a los patógenos UBPs (*UBP1-associated proteins 2A/B*), las anhidrasas carbónicas CA y RCA, las dismutasas de superóxido CSD1 y MSD1, SHMT1 (*Serine hydroxymethyl transferase*), HSR4 (*Hypersensitivity-related 4*) y el factor de transcripción WRKY18, que participan en la regulación de las respuestas de hipersensibilidad (*Hypersensitive response*, HR) y ROS (*Reactive oxygen species*) (Ingole *et al.*, 2020); en la fotomorfogénesis (RGL), la embriogénesis (TRAUCO, La1) y la floración (MBD9, REF6 y EMF1). Algunas de las dianas identificadas más frecuentemente son los propios componentes del sistema de conjugación de SUMO, la subunidad SAE2 del heterodímero E1, SCE1, SIZ1 y la proteasa ESD4, lo que indica que esta modificación también puede regular su propia actividad en respuesta a diferentes estímulos (**Tabla A2** y **Figura S3**).

La aplicación de estrés aumenta el número de conjugados en la planta

El análisis comparativo de los cambios producidos en el sumoiloma tras el tratamiento con calor, etanol y H₂O₂, así como por la infección de *Pseudomonas syringae* y la inducción de la respuesta autoinmune, reveló que el estrés aumenta la abundancia de los conjugados existentes, por encima del umbral de detección, en lugar de modificar dianas nuevas (Ingole *et al.*, 2020; Miller *et al.*, 2013). Se ha especulado que las plantas, tal y como se ha descrito en humanos, también modifican grupos específicos de dianas de SUMO funcionalmente relacionadas, según la naturaleza del estrés/estímulo, que incluyen proteínas con motivos SIM que median la formación de complejos (Hendriks y Vertegaal, 2016; Ingole *et al.*, 2020; Psakhye y Jentsch, 2012). Muchos de los sustratos que aumentan como parte

de la respuesta al estrés participan en la activación/represión de la transcripción, la regulación epigenética, la arquitectura de la cromatina y el metabolismo del RNA (Augustine y Vierstra, 2018) (**Tabla A2, Figura S3**), lo que indica que la sumoilación promueve una amplia reconfiguración de la expresión génica para tolerar el estrés. El estrés celular puede dar lugar, además, a que diferentes proteínas, que pueden formar parte de complejos proteicos o componer una ruta estén disponibles para su sumoilación, compitiendo con otras dianas (Enserink, 2015, Psakhye y Jentsch, 2012; Hendriks *et al.*, 2015). Rytz y colaboradores (2018) compararon los sumoilomas de plántulas de *Arabidopsis* silvestres con las mutantes para *Siz1*, y asignaron más de 100 dianas a esta ligasa E3, que participa en la sumoilación de la mayoría de las dianas inducida por estrés (Saracco *et al.*, 2007). Estas dianas residen principalmente en el núcleo (89%) (**Figura S3**), lo que concuerda con la localización nuclear de la enzima (Miura *et al.*, 2005), e incluye muchos de los factores de transcripción y modificadores de la cromatina previamente mencionados. Se ha sugerido que la sumoilación por SIZ1 durante la respuesta a estrés actúa regulando de forma específica la expresión de factores relacionados con la defensa y la señalización hormonal, mediante la represión/activación de la transcripción, y general, al alterar el acceso a la cromatina. Además, varias de las dianas dependientes de SIZ1 se asocian en complejos multisubunitarios, por lo que esta ligasa estaría involucrada en la modificación de todos los componentes (Rytz *et al.*, 2018).

Durante la respuesta de defensa frente a bacterias y en la inmunidad inducida, además del aumento del número de conjugados de SUMO, se ha detectado la sumoilación de dianas nuevas, lo que se ha atribuido a una mayor eficiencia en la traducción del pequeño péptido (Ingole *et al.*, 2020). No obstante, varios de los sustratos identificados son comunes con estudios anteriores (**Figura S3**), y probablemente representan el conjunto predominante de proteínas moduladas por SUMO. De nuevo, muchas de las proteínas identificadas tienen funciones asignadas a nivel nuclear, lo que refuerza el papel de la sumoilación en la regulación de estos procesos. Algunas de ellas son miembros de las familias de factores de transcripción bHLH, AT-Hook, bZIP, WRKY, GATA, TCPs y de respuesta al etileno, lo que sugiere su papel en la modulación de diversas expresiones génicas, así como proteínas involucradas en los mecanismos de defensa general/antibacteriana.

RESULTADOS

Generación de líneas de *Arabidopsis* para la expresión inducible de Rep de geminivirus y la detección optimizada de conjugados de SUMO1

Con el fin de evaluar el impacto que Rep tiene sobre el sumoiloma de la planta, se planteó llevar a cabo un análisis proteómico siguiendo una estrategia similar a la descrita anteriormente, que implica el uso de la línea de *Arabidopsis* desarrollada por Miller y colaboradores, la aplicación de choque térmico y un estricto protocolo de purificación (Ingole *et al.*, 2020; Miller *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2013; Rytz *et al.*, 2018). Como primer paso, se generaron líneas transgénicas de *Arabidopsis* que contienen construcciones para la expresión inducible de Rep de TYLCV (gen C1) o de TGMV (gen AC1) en el fondo mutante *6xHisSUM1 H89R sum1-1 sum2-1* (Miller *et al.*, 2010).

Tabla A3. Resumen de las líneas transgénicas de *Arabidopsis* generadas.

Línea <i>sum1-1</i> <i>sum2-1</i> His- SUMO1 K89R transformada con:	Nº de líneas	Líneas T2	Líneas T3
pER8	3	HSP2 HSP6 HSP10	HSP2.3
pER8-Rep ^{TYLCV}	6	HSTS1 HSTS2 HSTS5 HSTS6 HSTS8 HSTS9	HSTS1.3
pER8-Rep ^{TGMV}	7	HSTG9 HSTG11 HSTG16 HSTG21 HSTG24 HSTG25 HSTG26	HSTG25.3

Los marcos abiertos de lectura de los genes C1 y AC1 se clonaron en el vector pER8 bajo el promotor G10-90, inducible por β -estradiol, para evitar el efecto tóxico de Rep. Las construcciones se utilizaron para transformar plantas de la línea de *Arabidopsis* *6xHisSUMO1 H89R sum1-1 sum2-1*. Las plantas transgénicas resultantes se seleccionaron por su resistencia a higromicina en medio MS sólido, obteniéndose 3, 6 y 7 líneas heterocigotas para pER8 vacío, C1 y AC1, que se denominaron HSP (por *HisSUMO per8* vacío), HSTS (*HisSUMO Rep TYLCV*) y HSTG (*HisSUMO Rep TGMV*), respectivamente (**Tabla A3**).

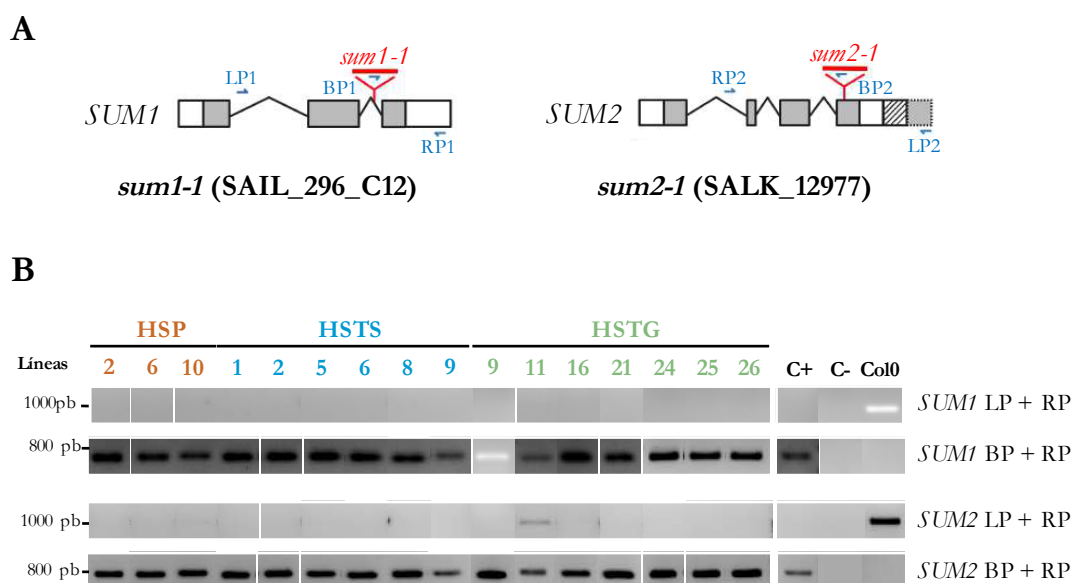
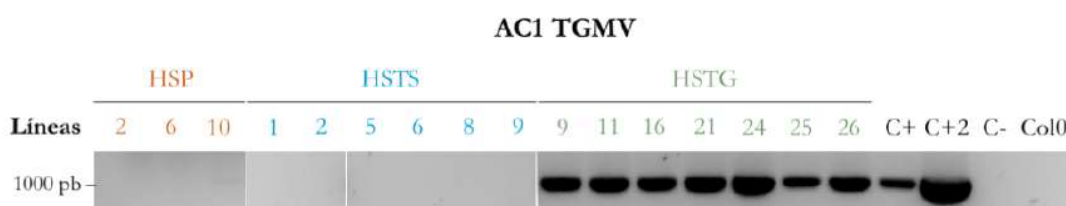


Figura A4. Genotipado de las líneas de *Arabidopsis* generadas. **A.** Diagrama de los genes *SUM1* y *SUM2* de *Arabidopsis* y localización de las inserciones de T-DNA en las líneas mutantes *sum1-1* SAIL_296_C12 y *sum2-1* SALK_129775. Los exones e intrones están representados por rectángulos grises y líneas negras, respectivamente, y las regiones 5' y 3' UTR por recuadros blancos. En el esquema de *SUM2*, el rectángulo a rayas representa la zona intergénica y el gris con el borde discontinuo el exón del gen anterior. Las flechas azules muestran las posiciones de los oligonucleótidos empleados en B; LP1: *left genomic primer, SUM1*; RP1: *right genomic primer, SUM1*; LB1: *left border primer for the T-DNA intersion SALK line LBb1.3*; LP2: *left genomic primer, SUM2*; RP2: *right genomic primer, SUM2*; LB2: *left border primer for the T-DNA intersion SAIL line LB3* (todos los oligonucleótidos fueron diseñados con la herramienta informática *T-DNA primer design* - <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Figura adaptada de Saracco *et al.*, 2007. **B.** Genotipado de las distintas líneas HSP, HSTS y HSTG generadas. Las parejas de oligonucleótidos utilizadas se indican a la derecha. DMS: línea *6xHisSUMO1 H89R sum1-1 sum2-1* (Miller *et al.*, 2010); C-: mezcla de PCR sin DNA genómico.

Posteriormente, se genotiparon para comprobar:

1. La interrupción de los genes *SUM1* y *SUM2* (**Figura A4**). El doble mutante *sum1-1/sum1-1 sum2-1/sum2-1* se obtuvo por cruzamiento de las líneas mutantes por inserción de T-DNA SAIL_296_C12 (*sum1-1*) y SALK_129775 (*sum2-1*) y complementación con el transgén 6xHisSUM1 H89R para rescatar la letalidad embrionaria de las plantas homocigotas *sum1-1 sum2-1* (Miller *et al.*, 2010; Saracco *et al.*, 2007). Este genotipo se confirmó realizando una PCR con oligonucleótidos específicos que hibridan en las secuencias del gen que flanquean el punto de inserción del T-DNA (denominados LP – *left genomic primer* - y RP – *right genomic primer*) y en el extremo 5' del T-DNA (LB- *left border primer of the T-DNA insertion*), de modo que se pueda amplificar el alelo silvestre (producto resultante de la combinación LP + RP, ~800 pb) o el mutante (RP + LB, ~1000 pb) (**Figura A4A**). En las plantas seleccionadas se obtuvo una banda al emplear los oligonucleótidos RP + LB, lo que indicó que eran homocigotas mutantes *sum1-1 sum2-1* (**Figura A4B**).
2. La integración de la construcción para la expresión de C1/AC1. Para ello también se realizó una PCR con una pareja de oligonucleótidos que amplifica un fragmento o la fase abierta completa de los genes virales C1 y AC1, respectivamente (**Figura A5**). Como controles positivos, utilizados en los posteriores ensayos de expresión, se incluyeron plántulas de las líneas AF24 y RC10B, que contienen en homocigosis el transgén para la expresión inducible por β -estradiol de Rep de TGMV y TYLCSV a partir del promotor G10-90 en un fondo silvestre (desarrolladas en nuestro laboratorio por Manuel A. Arroyo Mateos y Edgar Rodríguez Negrete, respectivamente). Tan solo a partir de las plantas que habían incorporado C1 se obtuvo una banda de 200 pb, y de las que contenían AC1 una de 1000 pb, aproximadamente.

A



B

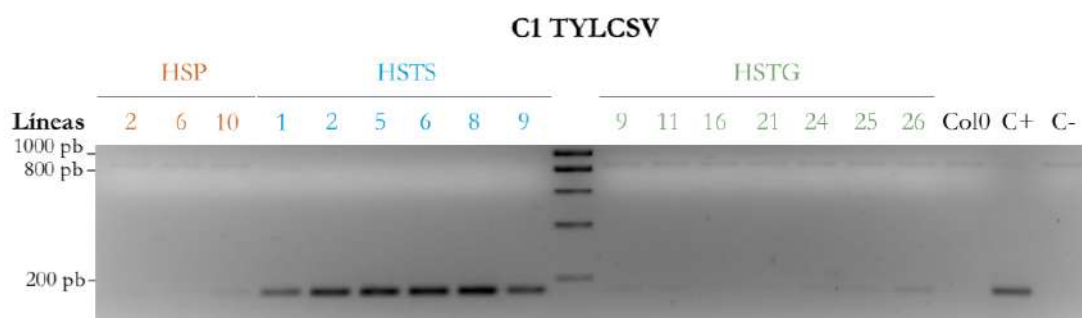


Figura A5. Amplificación de los genes *AC1* y *C1* en las líneas generadas. **A.** C+: línea control AF24; C+2: pER8-Rep^{TGMV}; C-: mezcla de PCR sin molde. **B.** C+: línea control RC10B; C-: mezcla de PCR sin molde.

En el crecimiento y la morfología de las plantas transformadas (T1) no se observó ninguna diferencia significativa con respecto al que exhiben *Arabidopsis* ecotipo Col0 o la línea *6xHisSUM1 H89R sum1-1 sum2-1*, lo que indica que la expresión de *C1/AC1* en ausencia del inductor es muy baja o inexistente.

Para obtener líneas homocigotas, se determinó la segregación de la resistencia a higromicina en plantas T2, seleccionando las plantas que contienen una única inserción del transgén (segregación 3:1). Los resultados obtenidos permitieron identificar tres líneas, una para cada construcción, que se ajustan a esta proporción (denominadas HSP2, HSTS1 y HSTG25; **Tabla A4**). A partir de éstas, se obtuvieron varias líneas homocigóticas (plantas T3), seleccionando una de ellas para los ensayos de expresión de los genes *C1/AC1* (HSP2.3, HSTS1.3 y HSTG25.3; **Tabla A3**).

Ensayos de expresión de *C1* y *AC1*

Con las líneas homocigotas T3, HSP2.3, HSTS1.3, y HSTG25.3, y las T2 HSTS2 y HSTG24, se realizó un ensayo de inducción de la expresión de *C1/AC1*. Para ello, se emplearon 20 plántulas de 10 días de edad (crecidas en placas con medio MS sólido, suplementado con higromicina para la selección de plántulas resistentes en las líneas T2) por línea y condición (presencia/ausencia de inductor y tiempo de incubación), que se dispusieron en medio MS líquido con 0,2 μ M de DMSO o β -estradiol, durante 24, 48 o 72 horas. Como controles positivos de la

expresión de AC1 y C1, se incluyeron las líneas AF24 y RC10B, respectivamente (**Figuras A6 y A7**). Los niveles de expresión calculados para las plántulas de estas líneas control se utilizaron para relativizar el obtenido en las líneas generadas en este trabajo, de modo que al valor correspondiente a las 24 horas de incubación en presencia de β -estradiol se le otorgó el valor 1.

Tabla A4. Prueba de χ^2 para la selección de líneas homocigotas.

Líneas T2	Total plántulas	Plántulas resistentes		Plántulas sensibles		Valor de χ^2	Segregación $\chi^2 = 3,84$ (P=0,05; gl=1)
		O	E	O	E		
HSP2	116	91	87	25	29	0,74	3:1
HSP6	151	45	113,25	106	37,75	164,52	-
HSP10	165	153	123,75	12	41,25	27,65	-
HSTS1	223	177	167,25	46	55,75	2,27	3:1
HSTS2	837	765	627,75	72	209,25	120,03	-
HSTS5	272	144	204	128	68	70,59	-
HSTS6	159	148	119,25	11	39,75	27,73	-
HSTS8	144	133	108	11	36	23,15	-
HSTS9	67	64	50,25	3	16,75	15,05	-
HSTG9	321	192	240,75	129	80,25	39,49	-
HSTG11	12	6	9	6	3	4	-
HSTG16	138	124	103,5	14	34,5	16,24	-
HSTG21	553	435	414,75	118	138,25	3,95	-
HSTG24	687	624	515,25	63	171,75	91,81	-
HSTG25	209	163	156,75	46	52,25	1	3:1
HSTG26	205	135	153,75	70	51,25	9,15	-

O: Plantas Observadas; E: Plantas Esperadas

La dinámica de los niveles de expresión del gen correspondiente fue similar para todas las líneas analizadas, detectándose un valor máximo de acumulación del mRNA a las 24 horas, que desciende progresivamente a las 48h y 72h (**Figuras A6 y A7**). En las líneas que contienen el gen AC1, HSTG24 y HSTG25.3, se obtuvieron niveles bajos de expresión, representando el máximo alcanzado a las 24 horas el 12% y 17% del valor correspondiente a la línea control AF24, respectivamente (**Figura A6**). A las 72 horas no se detectó expresión de AC1, lo

que indica que el β -estradiol desaparece transcurrido este tiempo. La ausencia de expresión del gen de geminivirus en las plántulas de los grupos control, incubadas en medio con DMSO, mostró que la expresión del transgén en ausencia del inductor es muy baja.

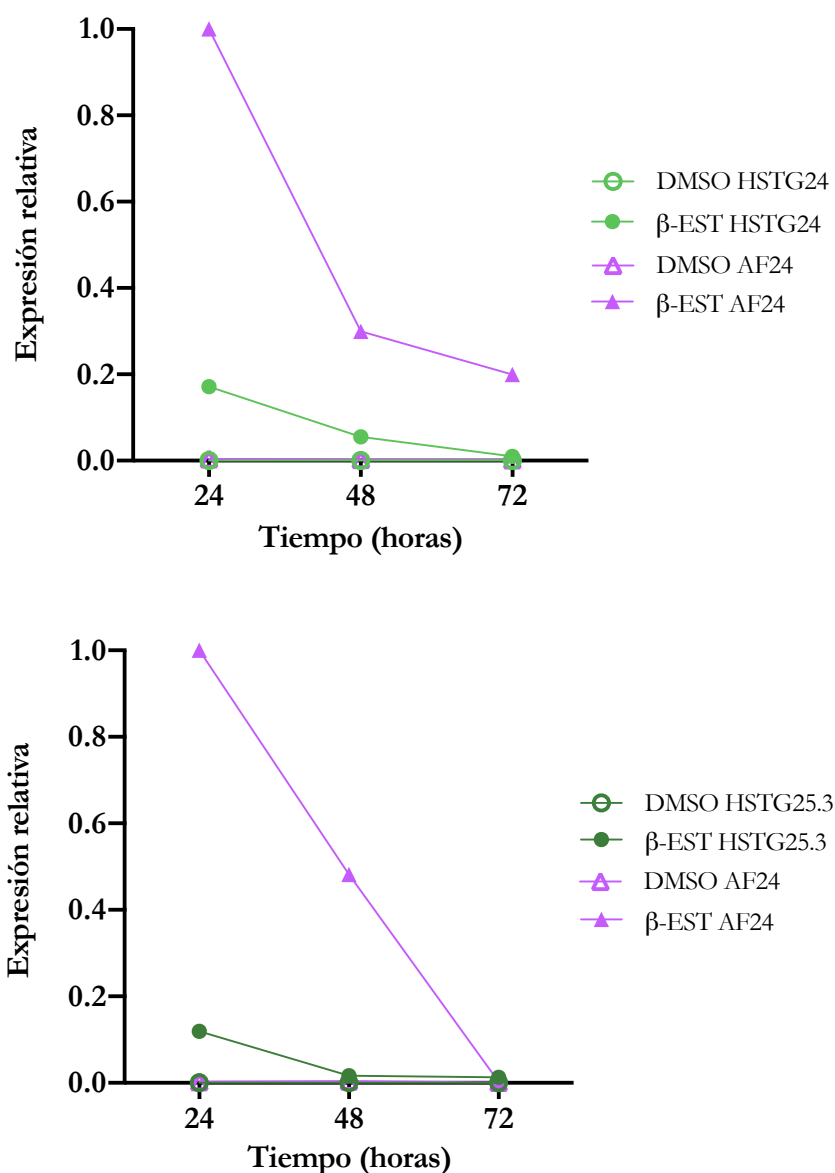


Figura A6. Niveles de expresión relativa de AC1 en las líneas HSTG24 y HSTG25.3 a las 24, 48 y 72 horas. Se analizó un grupo de 20 plántulas de *Arabidopsis* por cada línea y condición, incubadas en medio MS líquido suplementado con 0,2 mM β -estradiol (β -EST) o DMSO, añadidos a las 0 horas. Los niveles de expresión relativa del transcrito se obtuvieron por qPCR. Cada punto representa la media obtenida de dos réplicas biológicas.

En las líneas en las que se introdujo el transgén con C1, HSTS2 y HSTS1.3, los niveles de expresión del transcrito fueron más elevados que las anteriores con respecto a su línea control RC10B; para HSTS2, el máximo alcanzado a las 24 horas representó el 55% del obtenido con RC10B, mientras que para HSTS1.3 fue 3 veces superior al valor de su control (**Figura A7**). Al igual que sucedió con las líneas anteriores, la expresión se redujo a las 48 y 72 horas y no se detectó en las plántulas control.

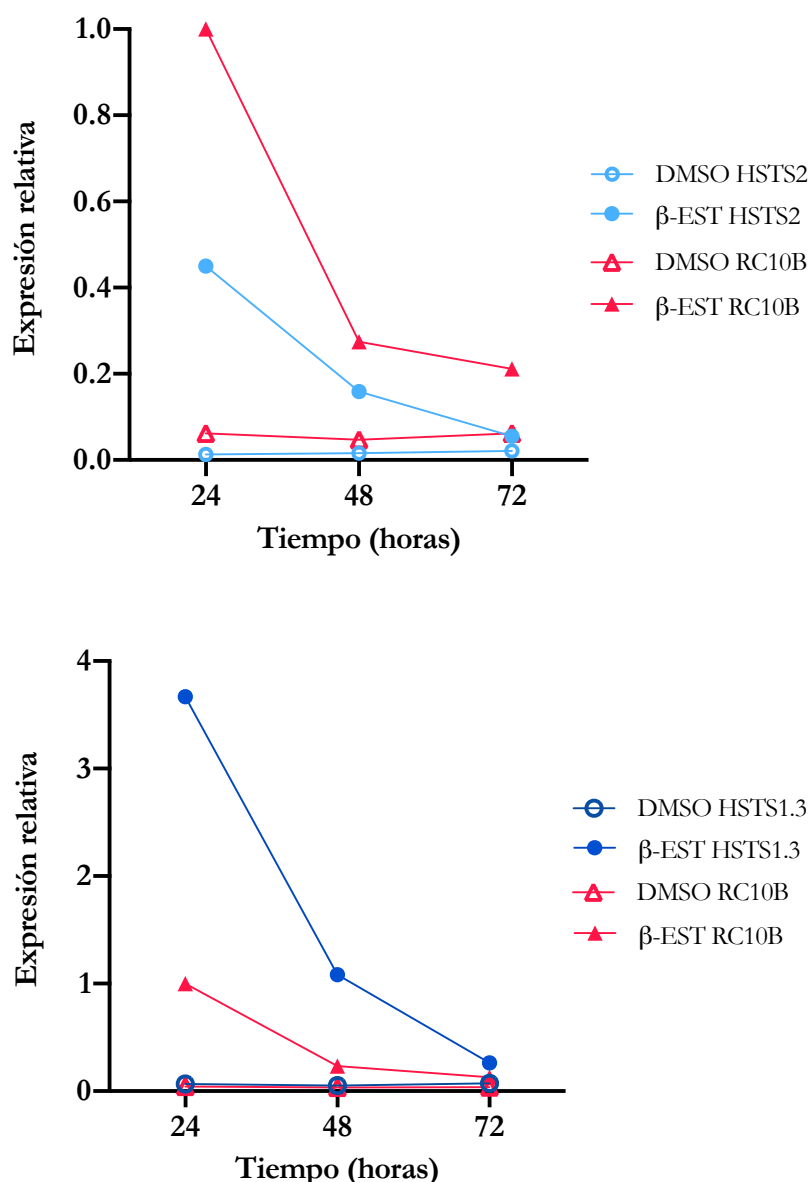


Figura A7. Niveles de expresión relativa de C1 en las líneas HSTS2 y HSTS1.3 a las 24, 48 y 72 horas. Para cada condición, se analizó un grupo de 20 plántulas por línea, incubadas en medio MS líquido suplementado con 0,2 mM β-estradiol (β-EST) o DMSO a

Figura A7. (continuación) las 0 horas. Los niveles de expresión relativa del transcrito se determinaron por qPCR. Cada punto representa la media obtenida de dos réplicas biológicas.

Dado que el efecto inductor del β -estradiol se reduce transcurridas 72 horas, se realizó un nuevo ensayo de expresión añadiendo β -estradiol a la misma concentración a las 24 y 48 horas, con el fin de mantener o incrementar los niveles de expresión de C1 y AC1. Como se observa en la **figura A8**, a las 48 horas aumentaron los niveles de expresión de C1 en las plántulas en las que se había administrado de nuevo el inductor con respecto a las 24 horas, alcanzándose el máximo a las 72 horas. Ello indica que la adición reiterada de β -estradiol permite elevar el nivel de expresión del transgén a lo largo del tiempo marcado.

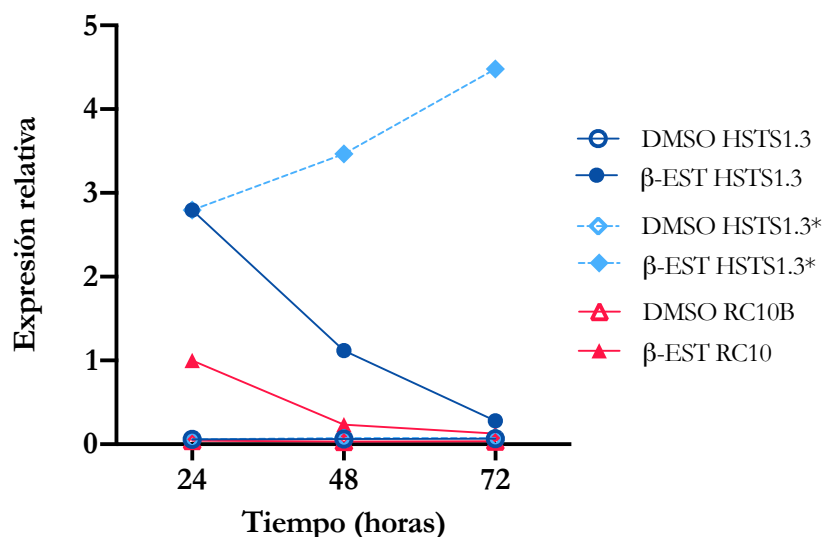


Figura A8. Niveles de expresión relativa de C1 en la línea HSTS1.3 a las 24, 48 y 72 horas tras la adición repetida de β -estradiol. Se analizó un grupo de 20 plántulas por línea para cada condición, las cuales se incubaron en medio MS líquido suplementado con 0,2 mM β -estradiol (β -EST) o DMSO; HSTS1*: adición de 0,2 mM β -estradiol a las 24 y 48 horas. Los niveles de expresión relativa del transcrito se determinaron por qPCR.

DISCUSIÓN

Con el fin de conocer la sumoilación de qué proteínas se ve afectada por la presencia de Rep, se han desarrollado las líneas de *Arabidopsis* descritas en este capítulo y un protocolo para la expresión inducible de los genes C1/AC1, que podrán utilizarse junto al procedimiento de purificación de tres pasos por cromatografía de afinidad desarrollado por Miller y colaboradores (2010) y un espectrómetro de masas para la detección optimizada de los conjugados de SUMO. El desarrollo de las líneas HSTS y HSTG, permitirá, además, identificar si hay dianas que se vean afectadas solo por Rep de un begomovirus monopartito o bipartito.

Los ensayos realizados mostraron que la expresión inducible por β -estradiol de C1/AC1 permite controlar y modular los niveles de transcrito del gen viral, casi 0 en ausencia de la hormona, aumentando su acumulación al administrarse la misma de forma repetida (**Figura A8**). Un aspecto por considerar del sistema propuesto para estudiar los cambios en el sumoiloma de la planta por Rep es que la expresión de este gen viral se induce en todos los tejidos de la planta, en lugar de estar limitada a las células acompañantes del floema y, en algunos géneros, a las células del parénquima, donde están confinados la mayoría de los geminivirus (Horns y Jeske, 1991; Wege *et al.*, 2001). No obstante, en caso de querer considerar únicamente las células acompañantes del floema, utilizando la línea desarrollada en este trabajo, se podría recurrir a la separación de los núcleos por un tipo especial de citometría de flujo, la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), o la microdissección láser.

El estudio comparativo de la dinámica de conjugación de SUMO1/2 frente a diversos estreses abióticos y bióticos ha revelado que estos estímulos aumentan la tasa de sumoilación de grupos de proteínas previamente sumoiladas, aunque también se ha detectado la modificación de dianas nuevas durante la infección por *P. syringae* PstDC3000 (Elrouby, 2015; Ingole *et al.*, 2020; Miller *et al.*, 2013). Aunque los resultados obtenidos indican que Rep reduce la sumoilación de sustratos específicos de la planta huésped (Capítulo 1; Arroyo-Mateos *et al.*, 2018; Sánchez-Durán *et al.*, 2011), la amplitud de procesos celulares en los que esta modificación postraducciona está involucrada, el papel multifuncional de Rep, su interacción con SCE (independiente de su interferencia en la sumoilación de

PCNA) y los datos obtenidos por Maio y colaboradores (Tesis de Francesca Maio, 2019), que muestran que Rep de TYLCV es capaz de formar un complejo con SCE1 y SUMO1, apuntan a que esta proteína también podría actuar favoreciendo la conjugación de SUMO a otros sustratos. Todo ello plantea un escenario muy complejo de la sumoilación y su modulación durante el proceso de infección.

Al igual que en levaduras y animales, la mayoría de las dianas identificadas en plantas residen en el núcleo y participan en actividades relacionadas con el metabolismo del DNA y el RNA, destacando la regulación de la expresión génica. Considerando que Rep induce la replicación del DNA (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004), no podemos descartar que se produzca una alteración de la sumoilación de algunos factores encargados de estos procesos que sean dianas de SUMO durante la etapa temprana de la infección. Las líneas de *Arabidopsis* desarrolladas en este trabajo podrían ser utilizadas para la evaluación del efecto que Rep tiene sobre el sumoiloma de la planta, identificar las proteínas cuya unión a SUMO se ve afectada y, de esta forma, determinar qué vías podrían estar siendo manipuladas durante el proceso de infección viral.

Una de las limitaciones a considerar con la estrategia propuesta es que el estudio se realizaría sobre plántulas, por lo que se requiere un elevado número de las mismas para disponer de suficiente material vegetal para el análisis. Como alternativa planteamos llevar a cabo la sumoilación *in vitro* de los extractos de proteínas de las plántulas tras el ensayo de inducción de Rep. Finalmente, para realizar una evaluación más completa del papel de la sumoilación y la modulación de Rep se podría considerar analizar las dianas de SUMO3 afectadas, ya que este participa en las respuestas de defensa frente a patógenos (van der Burg *et al.*, 2010).

ANEXO

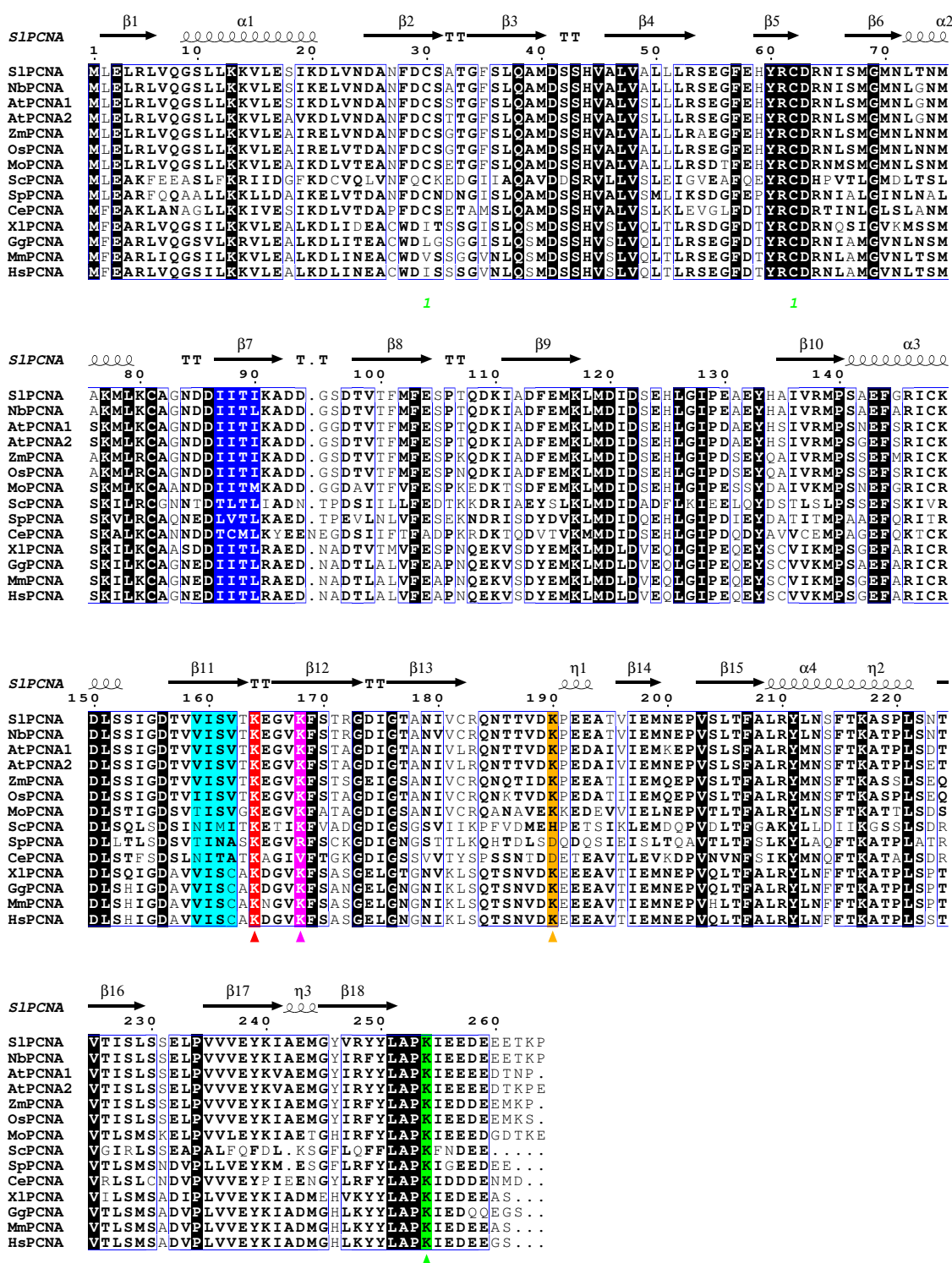


Figura S1. Alineamiento múltiple de la secuencia proteica de PCNA de diferentes especies. Se han resaltado los motivos SIM1 (azul oscuro) y SIM2 (cyan) y las lisinas destacadas en este trabajo, 164 (rojo), 168 (rosa), 190 (naranja) y 254 (verde).

[illegible]

Eucvrd	Motivo I (Walker A)	Motivo Ia	Motivo Ib	Motivo Ic	
ScSrs2					130
SpSrs2					131
PpSrs2					132
AtSrs2					133
NbSrs2					134
SlSrs2					135
OsSrs2_X8					136
ZmSrs2_X2					137
Eucvrd					138
ScSrs2					139
SpSrs2					140
PpSrs2					141
AtSrs2					142
NbSrs2					143
SlSrs2					144
OsSrs2_X8					145
ZmSrs2_X2					146
Eucvrd					147
ScSrs2					148
SpSrs2					149
PpSrs2					150
AtSrs2					151
NbSrs2					152
SlSrs2					153
OsSrs2_X8					154
ZmSrs2_X2					155
Eucvrd					156
ScSrs2					157
SpSrs2					158
PpSrs2					159
AtSrs2					160
NbSrs2					161
SlSrs2					162
OsSrs2_X8					163
ZmSrs2_X2					164
Eucvrd					165
ScSrs2					166
SpSrs2					167
PpSrs2					168
AtSrs2					169
NbSrs2					170
SlSrs2					171
OsSrs2_X8					172
ZmSrs2_X2					173
Eucvrd					174
ScSrs2					175
SpSrs2					176
PpSrs2					177
AtSrs2					178
NbSrs2					179
SlSrs2					180
OsSrs2_X8					181
ZmSrs2_X2					182
Eucvrd					183
ScSrs2					184
SpSrs2					185
PpSrs2					186
AtSrs2					187
NbSrs2					188
SlSrs2					189
OsSrs2_X8					190
ZmSrs2_X2					191
Eucvrd					192
ScSrs2					193
SpSrs2					194
PpSrs2					195
AtSrs2					196
NbSrs2					197
SlSrs2					198
OsSrs2_X8					199
ZmSrs2_X2					200

[illegible]

■ Helicasa-UvrD-like
■ Interacción con RAD51
■ PIM
■ SIM
■ SAS

Figura S2. Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de UvrD de *E. coli*, Srs2 de levaduras y los homólogos presentes en diferentes especies de plantas. El dominio helicasa UvrD-*like* se ha destacado en dos tonos de azul que corresponden a la parte N- y C-terminal del mismo. Los motivos helicasa se han resaltado en los diferentes colores utilizados en la figura 38, y la región de interacción con RAD51, los motivos SIM, PIM y los sitios SAS como se indica en la leyenda y en la figura 37.



Figura S3. Listado de las proteínas sumoiladas de *Arabidopsis* identificadas por espectrometría de masas en los diferentes estudios mencionados.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, Q., Amin, I., Mansoor, S., Shafiq, M., Wassenegger, M. and Briddon, R.W. (2019) The Rep proteins encoded by alphasatellites restore expression of a transcriptionally silenced green fluorescent protein transgene in *Nicotiana benthamiana*. *Virus disease*, 30, 101–105. <https://doi.org/10.1007/s13337-017-0413-5>.

Abed, M., Bitman-Lotan, E. and Orian, A. (2018) The biology of SUMO-targeted ubiquitin ligases in *Drosophila* development, immunity, and cancer. *Journal of Developmental Biology*, 6. <https://doi.org/10.3390/jdb6010002>

Aboussekhra, A., Chanet, R., Adjiri, A. and Fabre, F. (1992) Semidominant suppressors of Srs2 helicase mutations of *Saccharomyces cerevisiae* map in the RAD51 gene, whose sequence predicts a protein with similarities to procaryotic RecA proteins. *Molecular and cellular biology*, 12, 3224–3234. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.7.3224-3234.1992>.

Aboussekhra, A., Chanet, R., Zgaga, Z., Cassier-Chauvat, C., Heude, M. and Fabre, F. (1989) RADH, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a putative DNA helicase involved in DNA repair. Characteristics of radH mutants and sequence of the gene. *Nucleic acids research*, 17, 7211–7219. <https://doi.org/10.1093/nar/17.18.7211>.

Adie, B.A.T., Pérez-Pérez, J., Pérez-Pérez, M.M., Godoy, M., Sánchez-Serrano, J.-J., Schmelz, E.A., and Solano R. (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 19, 1665–1681. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048041>.

Aguilar, E., Garnelo Gomez, B. and Lozano-Duran, R. (2020) Recent advances on the plant manipulation by geminiviruses. *Current Opinion in Plant Biology*, 56, 56–64.

Aguilar-Hernández, V., Kim, D.Y., Stankey, R.J., Vierstra, R.D., Scalf M., and Smith L.M. (2017) Mass Spectrometric Analyses Reveal a Central Role for Ubiquitylation in Remodeling the *Arabidopsis* Proteome during Photomorphogenesis. *Molecular Plant*, 10, 846–865. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.04.008>.

Aguilera, A. and Klein, H.L. (1988) Genetic control of intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and genetic characterization of hyper-recombination mutations. *Genetics*, 119, 779–790. <https://doi.org/10.1093/genetics/119.4.779>.

Aillet, F., Lopitz-Otsoa, F., Egaña, I., Hjerpe, R., Fraser, P., Hay, R.T., Rodriguez M.S, and Lang V. (2012) Heterologous SUMO-2/3-ubiquitin chains optimize I κ B α degradation and NF- κ B activity. *PLoS one*, 7 (12):e51672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051672>.

Ait Saada, A., Lambert, S.A.E. and Carr, A.M. (2018) Preserving replication fork integrity and competence via the homologous recombination pathway. *DNA Repair*, 71, 135–147.

Akbar, F., Briddon, R.W., Vazquez, F. and Saeed, M. (2012) Transcript mapping of Cotton leaf curl Burewala virus and its cognate betasatellite, Cotton leaf curl Multan betasatellite. *Virology Journal*, 9.(249)

- Alomairi, J., Bonacci, T., Ghigo, E. and Soubeyran, P.** (2015) Alterations of host cell ubiquitination machinery by pathogenic bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00017>.
- Altmannová, V., Kolesár, P. and Krejčí, L.** (2012) SUMO wrestles with recombination. *Biomolecules*, 2, 350–375. <https://doi.org/10.3390/biom2030350>.
- Álvarez, V., Frattini, C., Sacristán, M.P., Gallego-Sánchez, A., Bermejo, R. and Bueno, A.** (2019) PCNA Deubiquitylases Control DNA Damage Bypass at Replication Forks. *Cell reports*, 29, 1323–1335.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.054>.
- Amin, I., Hussain, K., Akbergenov, R., Yadav, J.S., Qazi, J., Mansoor, S., Hohn T, Fauquet C.M, Briddon RW.** (2011) Suppressors of RNA silencing encoded by the components of the cotton leaf curl begomovirus-betasatellite complex. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 24, 973–983. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-11-0001>.
- Anabestani, A., Behjatnia, S.A.A., Izadpanah, K., Tabein, S. and Accotto, G.P.** (2017) Seed Transmission of Beet Curly Top Virus and Beet Curly Top Iran Virus in a Local Cultivar of Petunia in Iran. *Viruses*, 9. <https://doi.org/10.3390/v9100299>.
- Anamika and Spyropoulos, L.** (2016) Molecular Basis for Phosphorylation-dependent SUMO Recognition by the DNA Repair Protein RAP80. *The Journal of biological chemistry*, 291, 4417–4428. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.705061>.
- Anderson, H.J., Vonarx, E.J., Pastushok, L., Nakagawa, M., Katafuchi, A., Gruz, P., Di Rubbo A, Grice D.M, Osmond M.J, Sakamoto A.N, Nohmi T, Xiao W, B.A.** (2008) *Arabidopsis thaliana* Y-family DNA polymerase η catalyses translesion synthesis and interacts functionally with PCNA2. *Plant Journal*, 55, 895–908. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03562.x>.
- Anderson, P.K., Cunningham, A.A., Patel, N.G., Morales, F.J., Epstein, P.R. and Daszak, P.** (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in ecology and evolution*, 19, 535–544. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.021>.
- Andrés, G., Alejo, A., Simón-Mateo, C. and Salas, M.L.** (2001) African swine fever virus protease, a new viral member of the SUMO-1-specific protease family. *The Journal of biological chemistry*, 276, 780–787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006844200>.
- Andriuskevicius, T., Kotenko, O. and Makovets, S.** (2018) Putting together and taking apart: Assembly and disassembly of the Rad51 nucleoprotein filament in DNA repair and genome stability. *Cell Stress*, 2, 96–112. <https://doi.org/10.15698/cst2018.05.134>.
- Antony, E., Tomko, E.J., Xiao, Q., Krejci, L., Lohman, T.M. and Ellenberger, T.** (2009) Srs2 Disassembles Rad51 Filaments by a Protein-Protein Interaction Triggering ATP Turnover and Dissociation of Rad51 from DNA. *Molecular Cell*, 35, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.05.026>.
- Arakawa, H., Moldovan, G.-L., Saribasak, H., Saribasak, N.N., Jentsch, S. and Buerstedde, J.-M.** (2006) A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation. *PLoS biology*, 4, e366. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040366>.

Arbel, M., Bronstein, A., Sau, S., Liefshitz, B. and Kupiec, M. (2020) Access to PCNA by Srs2 and Elg1 controls the choice between alternative repair pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *mBio*, 11(3):e007.

Arbel, M., Choudhary, K., Tfilin, O. and Kupiec, M. (2021) PCNA loaders and unloaders- One ring that rules them all. *Genes*, 12. <https://doi.org/10.3390/genes12111812>.

Aregger, M., Borah, B.K., Seguin, J., Rajeswaran, R., Gubaeva, E.G., Zvereva, A.S., Windels D, Vazquez F, Blevins T, Farinelli L, Pooggin M.M. (2012) Primary and secondary siRNAs in geminivirus-induced gene silencing. *PLoS pathogens*, 8, e1002941. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002941>.

Arguello-Astorga, G., Ascencio-Ibáñez, J.T., Dallas, M.B., Orozco, B.M. and Hanley-Bowdoin, L. (2007) High-frequency reversion of geminivirus replication protein mutants during infection. *Journal of virology*, 81, 11005–11015. <https://doi.org/10.1128/JVI.00925-07>.

Arguello-Astorga, G., Lopez-Ochoa, L., Kong, L.-J., Orozco, B.M., Settlage, S.B. and Hanley-Bowdoin, L. (2004) A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *Journal of virology*, 78, 4817–4826. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.9.4817-4826.2004>.

Armstrong, A.A., Mohideen, F. and Lima, C.D. (2012) Recognition of SUMO-modified PCNA requires tandem receptor motifs in Srs2. *Nature*, 483, 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature10883>.

Arroyo-Mateos, M., Sabarit, B., Maio, F., Sánchez-Durán, M.A., Rosas-Díaz, T., Prins, M., Ruiz-Albert J, Luna A.P, van den Burg H.A, Bejarano E.R. (2018) Geminivirus Replication Protein Impairs SUMO Conjugation of Proliferating Cellular Nuclear Antigen at Two Acceptor Sites. *Journal of Virology*, 92, 1–21. <https://doi.org/10.1128/jvi.00611-18>.

Ascencio-Ibáñez, J.T., Sozzani, R., Lee, T.J., Chu, T.M., Wolfinger, R.D., Cella, R., Hanley-Bowdoin L. (2008) Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiology*, 148, 436–454. <https://doi.org/10.1104/pp.108.121038>.

Augustine, R.C. and Vierstra, R.D. (2018) SUMOylation: re-wiring the plant nucleus during stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 45, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.06.006>.

Augustine, R.C., York, S.L., Rytz, T.C. and Vierstra, R.D. (2016) Defining the SUMO system in maize: SUMOylation is up-regulated during endosperm development and rapidly induced by stress. *Plant Physiology*, 171, 2191–2210. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00353>.

Aylon, Y., Liefshitz, B., Bitan-Banin, G. and Kupiec, M. (2003) Molecular dissection of mitotic recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 23, 1403–1417. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.4.1403-1417.2003>.

Baba, D., Maita, N., Jee, J.-G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugawara, K., Hanaoka F, Tochio H, Hiroaki H, Shirakawa M. (2005) Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature*, 435, 979–982. <https://doi.org/10.1038/nature03634>.

Bacquin, A., Pouvelle, C., Siaud, N., Perderiset, M., Salomé-Desnoulez, S., Tellier-Lebegue, C., Lopez B, Charbonnier J.B, Kannouche P.L. (2013) The helicase FBH1 is

tightly regulated by PCNA via CRL4(Cdt2)-mediated proteolysis in human cells. *Nucleic Acids Research*, 41, 6501–6513. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt397>.

Bagewadi, B., Chen, S., Lal, S.K., Choudhury, N.R. and Mukherjee, S.K. (2004) PCNA Interacts with Indian Mung Bean Yellow Mosaic Virus Rep and Downregulates Rep Activity. *Journal of Virology*, 78, 11890–11903. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.21.11890-11903.2004>.

Baltes, N.J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P.A. and Voytas, D.F. (2014) DNA replicons for plant genome engineering. *The Plant cell*, 26, 151–163. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119792>.

Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A. and Rosen, M.K. (2017) Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18, 285–298.

Banani, S.F., Rice, A.M., Peeples, W.B., Lin, Y., Jain, S., Parker, R., and Michael K. Rosen. (2016) Compositional control of phase-separated cellular bodies. *Cell*, 166, 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.010>.

Barber, L.J., Youds, J.L., Ward, J.D., McIlwraith, M.J., O’Neil, N.J., Petalcorin, M.I.R., Martin, J.S., Collis, S.J., Cantor, S.B., Auclair, M., Tissenbaum, H., West, S.C., Rose, A.M., and Boulton, S.J. (2008) RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. *Cell*, 135, 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.016>.

Bartetzko, V., Sonnwald, S., Vogel, F., Hartner, K., Stadler, R., Hammes, U.Z., et al. (2009) The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effector protein XopJ inhibits protein secretion: evidence for interference with cell wall-associated defense responses. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 22, 655–664. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-6-0655>.

Bass, H.W., Nagar, S., Hanley-Bowdoin, L. and Robertson, D. (2000) Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature plant cells. *Journal of cell science*, 113 (Pt 7, 1149–1160.

Basu, A.K., Pande, P. and Bose, A. (2017) Translesion synthesis of 2’-Deoxyguanosine lesions by eukaryotic DNA polymerases. *Chemical research in toxicology*, 30, 61–72. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00285>.

Basu, S., Kumar Kushwaha, N., Kumar Singh, A., Pankaj Sahu, P., Vinoth Kumar, R. and Chakraborty, S. (2018) Dynamics of a geminivirus-encoded pre-coat protein and host RNA-dependent RNA polymerase 1 in regulating symptom recovery in tobacco. *Journal of experimental botany*, 69, 2085–2102. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery043>.

Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature*, 431, 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature02874>.

Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., et al. (1998) Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *Journal of molecular biology*, 280, 275–286. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1839>.

Beam, K. and Ascencio-Ibáñez, J.T. (2020) Geminivirus resistance: A minireview. *Frontiers in Plant Science*, 11.

Becker, J.R., Gallo, D., Leung, W., Croissant, T., Thu, Y.M., Nguyen, H.D., et al. (2018) Flap endonuclease overexpression drives genome instability and DNA damage hypersensitivity in a PCNA-dependent manner. *Nucleic acids research*, 46, 5634–5650. <https://doi.org/10.1093/nar/gky313>.

Becker, T., Le-Trilling, V.T.K. and Trilling, M. (2019) Cellular cullin RING ubiquitin ligases: Druggable host dependency factors of cytomegaloviruses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20.

Belabess, Z., Urbino, C., Granier, M., Tahiri, A., Blenzar, A. and Peterschmitt, M. (2018) The typical RB76 recombination breakpoint of the invasive recombinant tomato yellow leaf curl virus of Morocco can be generated experimentally but is not positively selected in tomato. *Virus research*, 243, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.10.002>.

Belabess, Z., Peterschmitt, M., Granier, M., Tahiri, A., Blenzar, A. and Urbino, C. (2016) The non-canonical tomato yellow leaf curl virus recombinant that displaced its parental viruses in southern Morocco exhibits a high selective advantage in experimental conditions. *The Journal of general virology*, 97, 3433–3445. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000633>.

Belli, G., Colomina, N., Castells-Roca, L. and Lorite, N.P. (2022) Post-Translational Modifications of PCNA: Guiding for the Best DNA Damage Tolerance Choice. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 8. <https://doi.org/10.3390/jof8060621>.

Benlloch, R. and Maria Lois, L. (2018) Sumoylation in plants: Mechanistic insights and its role in drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 69, 4539–4554.

Bennett, A. and Agbandje-McKenna, M. (2020) Geminivirus structure and assembly. *Advances in virus research*, 108, 1–32. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.09.005>.

Bentz, G.L., Moss, C.R. 2nd, Whitehurst, C.B., Moody, C.A. and Pagano, J.S. (2015) LMP1-induced sumoylation influences the maintenance of Epstein-Barr Virus latency through KAP1. *Journal of virology*, 89, 7465–7477. <https://doi.org/10.1128/JVI.00711-15>.

Bentz, G.L., Shackelford, J. and Pagano, J.S. (2012) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 regulates the function of interferon regulatory factor 7 by inducing its sumoylation. *Journal of virology*, 86, 12251–12261. <https://doi.org/10.1128/JVI.01407-12>.

Bentz, G.L., Whitehurst, C.B. and Pagano, J.S. (2011) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) C-terminal-activating region 3 contributes to LMP1-mediated cellular migration via its interaction with Ubc9. *Journal of virology*, 85, 10144–10153. <https://doi.org/10.1128/JVI.05035-11>.

Berglund, J., Gjondrekaj, R., Verney, E., Maupin-Furlow, J.A. and Edelmann, M.J. (2020) Modification of the host ubiquitome by bacterial enzymes. *Microbiological Research*, 235. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126429>.

Bernstein, K.A., Reid, R.J.D., Sunjevaric, I., Demuth, K., Burgess, R.C. and Rothstein, R. (2011) The Shu complex, which contains Rad51 paralogues, promotes DNA repair through inhibition of the Srs2 anti-recombinase. *Molecular biology of the cell*, 22, 1599–1607. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-08-0691>.

Bhargava, R., Onyango, D.O. and Stark, J.M. (2016) Regulation of single-strand annealing and its role in genome maintenance. *Trends in genetics: TIG*, 32, 566–575. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.06.007>.

Bhattacharjee, S., Zamora, A., Azhar, M.T., Sacco, M.A., Lambert, L.H. and Moffett, P. (2009) Virus resistance induced by NB-LRR proteins involves Argonaute4-dependent translational control. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 58, 940–951. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03832.x>.

Bi, X. (2015) Mechanism of DNA damage tolerance. *World Journal of Biological Chemistry*, 6, 48. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.48>.

Bienko, M., Green, C.M., Crosetto, N., Rudolf, F., Zapart, G., Coull, B., et al. (2005) Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 310, 1821–1824. <https://doi.org/10.1126/science.1120615>.

Bischof, O., Schwamborn, K., Martin, N., Werner, A., Sustmann, C., Grosschedl, R., et al. (2006) The E3 SUMO ligase PIASy is a regulator of cellular senescence and apoptosis. *Molecular cell*, 22, 783–794. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.016>.

Blanck, S., Kobbe, D., Hartung, F., Fengler, K., Focke, M. and Puchta, H. (2009) A SRS2 homolog from *Arabidopsis thaliana* disrupts recombinogenic DNA intermediates and facilitates single strand annealing. *Nucleic Acids Research*, 37, 7163–7176. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp753>.

Blastyák, A., Pintér, L., Unk, I., Prakash, L., Prakash, S. and Haracska, L. (2007) Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Molecular cell*, 28, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.030>.

Blevins, T., Rajeswaran, R., Aregger, M., Borah, B.K., Schepetilnikov, M., Baerlocher, L., et al. (2011) Massive production of small RNAs from a non-coding region of Cauliflower mosaic virus in plant defense and viral counter-defense. *Nucleic acids research*, 39, 5003–5014. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr119>.

Boehm, E.M., Gildenberg, M.S. and Washington, M.T. (2016) The many roles of PCNA in eukaryotic DNA replication. *The Enzymes*, 39, 231–254. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2016.03.003>.

Boggio, R., Colombo, R., Hay, R.T., Draetta, G.F. and Chiocca, S. (2004) A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Molecular cell*, 16, 549–561. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.007>.

Boggio, R., Passafaro, A. and Chiocca, S. (2007) Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation. *The Journal of biological chemistry*, 282, 15376–15382. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700889200>.

Bologna, N.G. and Voinnet, O. (2014) The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annual review of plant biology*, 65, 473–503. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035728>.

- Bomar, M.G., D'Souza, S., Bienko, M., Dikic, I., Walker, G.C. and Zhou, P.** (2010) Unconventional ubiquitin recognition by the ubiquitin-binding motif within the Y family DNA polymerases iota and Rev1. *Molecular cell*, 37, 408–417. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.038>.
- Borah, B.K., Zarreen, F., Baruah, G. and Dasgupta, I.** (2016) Insights into the control of geminiviral promoters. *Virology*, 495, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.04.033>.
- Borges, F. and Martienssen, R.A.** (2015) The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16, 727–741. <https://doi.org/10.1038/nrm4085>.
- Boulton, M.I., Steinkellner, H., Donson, J., Markham, P.G., King, D.I. and Davies, J.W.** (1989) Mutational analysis of the virion-sense genes of maize streak virus. *The Journal of general virology*, 70 (Pt 9), 2309–2323. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-9-2309>.
- Boutell, C. and Everett, R.D.** (2013) Regulation of alphaherpesvirus infections by the ICP0 family of proteins. *The Journal of general virology*, 94, 465–481. <https://doi.org/10.1099/vir.0.048900-0>.
- Boutell, C., Orr, A. and Everett, R.D.** (2003) PML residue lysine 160 is required for the degradation of PML induced by herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0. *Journal of virology*, 77, 8686–8694. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.16.8686-8694.2003>.
- Bowling, S.A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A.S., Klessig, D.F. and Dong, X.** (1994) A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *The Plant cell*, 6, 1845–1857. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.12.1845>.
- Boyko, A., Filkowski, J. and Kovalchuk, I.** (2005) Homologous recombination in plants is temperature and day-length dependent. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 572, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.12.011>.
- Brand, L., Hörler, M., Nüesch, E., Vassalli, S., Barrell, P., Yang, W., et al.** (2006) A versatile and reliable two-component system for tissue-specific gene induction in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 141, 1194–1204. <https://doi.org/10.1104/pp.106.081299>.
- Branzei, D. and Szakal, B.** (2016) DNA damage tolerance by recombination: Molecular pathways and DNA structures. *DNA Repair*, 44, 68–75.
- Branzei, D., Vanoli, F. and Foiani, M.** (2008) SUMOylation regulates Rad18-mediated template switch. *Nature*, 456, 915–920. <https://doi.org/10.1038/nature07587>.
- Braten, O., Livneh, I., Ziv, T., Admon, A., Kehat, I., Caspi, L.H., et al.** (2016) Numerous proteins with unique characteristics are degraded by the 26S proteasome following monoubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, E4639–E4647. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608644113>.
- Briddon, R.W., Bedford, I.D., Tsai, J.H. and Markham, P.G.** (1996) Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology*, 219, 387–394. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0264>.

Briddon, R.W., Brown, J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M., Zhou, X., et al. (2008) Recommendations for the classification and nomenclature of the DNA-beta satellites of begomoviruses. *Archives of virology*, 153, 763–781.

Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J. and Markham, P.G. (1990) Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, 177, 85–94. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90462-z](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90462-z).

Briddon, R.W. and Stanley, J. (2006) Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology*, 344, 198–210. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.042>.

Briddon, R.W. (2003) Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular plant pathology*, 4, 427–434. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00188.x>.

Briddon, R.W., Martin, D.P., Roumagnac, P., Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., Moriones, E., et al. (2018) Alphasatellitidae: a new family with two subfamilies for the classification of geminivirus- and nanovirus-associated alphasatellites. *Archives of virology*, 163, 2587–2600. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3854-2>.

Briddon, R.W., Patil, B.L., Bagewadi, B., Nawaz-ul-Rehman, M.S. and Fauquet, C.M. (2010) Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC evolutionary biology*, 10, 97. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-97>.

Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., et al. (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 320, 1185–1190. <https://doi.org/10.1126/science.1159151>.

Bronstein, A., Bramson, S., Shemesh, K., Liefshitz, B. and Kupiec, M. (2018) Tight regulation of Srs2 helicase activity is crucial for proper functioning of DNA Repair mechanisms. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8, 1615–1626. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200181>.

Bronstein, A., Gershon, L., Grinberg, G., Alonso-Perez, E. and Kupiec, M. (2018) The main role of Srs2 in DNA repair depends on its helicase activity, rather than on its interactions with PCNA or Rad51. *mBio*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01192-18>.

Broomfield, S. and Xiao, W. (2002) Suppression of genetic defects within the RAD6 pathway by srs2 is specific for error-free post-replication repair but not for damage-induced mutagenesis. Vol. 30.

Brown, J.R., Conn, K.L., Wasson, P., Charman, M., Tong, L., Grant, K., et al. (2016) SUMO ligase protein inhibitor of activated STAT1 (PIAS1) is a constituent promyelocytic leukemia nuclear body protein that contributes to the intrinsic antiviral immune response to herpes simplex virus 1. *Journal of virology*, 90, 5939–5952. <https://doi.org/10.1128/JVI.00426-16>.

Brown, J.K., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J.C.F., et al. (2015) Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of virology*, 160, 1593–1619. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2398-y>.

Bruck, I. and O'donnell, M. (2001) The ring-type polymerase sliding clamp family Gene organization and evolutionary history. *Genome Biology*, 2.

Bruning, J.B. and Shamoo, Y. (2004) Structural and thermodynamic analysis of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase-delta p66 subunit and flap endonuclease-1. *Structure* (London, England : 1993), 12, 2209–2219. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.09.018>.

Buchmann, R.C., Asad, S., Wolf, J.N., Mohannath, G. and Bisaro, D.M. (2009) Geminivirus AL2 and L2 proteins suppress transcriptional gene silencing and cause genome-wide reductions in cytosine methylation. *Journal of virology*, 83, 5005–5013. <https://doi.org/10.1128/JVI.01771-08>.

Budhiraja, R., Hermkes, R., Müller, S., Schmidt, J., Colby, T., Panigrahi, K., et al. (2009) Substrates related to chromatin and to RNA-dependent processes are modified by *Arabidopsis* SUMO isoforms that differ in a conserved residue with influence on desumoylation. *Plant Physiology*, 149, 1529–1540. <https://doi.org/10.1104/pp.108.135053>.

Buetow, L. and Huang, D.T. (2016) Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 626–642.

Burgess, R.C., Lisby, M., Altmannova, V., Krejci, L., Sung, P. and Rothstein, R. (2009) Localization of recombination proteins and Srs2 reveals anti-recombinase function in vivo. *Journal of Cell Biology*, 185, 969–981. <https://doi.org/10.1083/jcb.200810055>.

Burgess, R.C., Sebesta, M., Sisakova, A., Marini, V.P., Lisby, M., Damborsky, J., et al. (2013) The PCNA interaction protein box sequence in Rad54 is an integral part of its ATPase domain and is required for efficient DNA repair and recombination. *PLoS ONE*, 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082630>.

Burkovics, P., Dome, L., Juhasz, S., Altmannova, V., Sebesta, M., Pacesa, M., et al. (2016) The PCNA-associated protein PARI negatively regulates homologous recombination via the inhibition of DNA repair synthesis. *Nucleic Acids Research*, 44, 3176–3189. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw024>.

Burkovics, P., Sebesta, M., Sisakova, A., Plault, N., Szukacsov, V., Robert, T., et al. (2013) Srs2 mediates PCNA-SUMO-dependent inhibition of DNA repair synthesis. *EMBO Journal*, 32, 742–755.

Caciagli, P., Medina Piles, V., Marian, D., Vecchiati, M., Masenga, V., Mason, G., et al. (2009) Virion stability is important for the circulative transmission of tomato yellow leaf curl sardinia virus by *Bemisia tabaci*, but virion access to salivary glands does not guarantee transmissibility. *Journal of virology*, 83, 5784–5795. <https://doi.org/10.1128/JVI.02267-08>.

Callis J., Carpenter T., Sun C.-W., V.R. (1995) Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics*, 139, 921–939.

Callis, J., Pollmann, L., Shanklin, J., Wettern, M. and Vierstra, R.D. (1989) Sequence of a cDNA from *Chlamydomonas reinhardtii* encoding a ubiquitin 52 amino acid extension protein. *Nucleic acids research*, 17, 8377. <https://doi.org/10.1093/nar/17.20.8377>.

Callis, J. (2014) The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System. *The Arabidopsis Book*, 12, e0174. <https://doi.org/10.1199/tab.0174>.

Campanaro, A., Battaglia, R., Galbiati, M., Sadanandom, A., Tonelli, C. and Conti, L. (2016) SUMO proteases OTS1 and 2 control filament elongation through a DELLA-dependent mechanism. *Plant reproduction*, 29, 287–290. <https://doi.org/10.1007/s00497-016-0292-8>.

Campbell, M. and Izumiya, Y. (2012) Post-translational modifications of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus regulatory proteins SUMO and KSHV. *Frontiers in microbiology*, 3, 31. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00031>.

Canonne, J., Marino, D., Noël, L.D., Arechaga, I., Pichereaux, C., Rossignol, M., et al. (2010) Detection and functional characterization of a 215 amino acid N-terminal extension in the *Xanthomonas* type III effector XopD. *PloS one*, 5, e15773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015773>.

Canto, T., Aranda, M.A. and Fereres, A. (2009) Climate change effects on physiology and population processes of hosts and vectors that influence the spread of hemipteran-borne plant viruses. *Global Change Biology*, 15, 1884–1894. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01820.x>.

Capili, A.D. and Lima, C.D. (2007) Taking it step by step: mechanistic insights from structural studies of ubiquitin/ubiquitin-like protein modification pathways. *Current opinion in structural biology*, 17, 726–735. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.08.018>.

Cappadocia, L. and Lima, C.D. (2018) Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism. *Chemical Reviews*, 118, 889–918. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00737>.

Cappadocia, L., Pichler, A. and Lima, C.D. (2015) Structural basis for catalytic activation by the human ZNF451 SUMO E3 ligase. *Nature structural and molecular biology*, 22, 968–975. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3116>.

Carlos Vaca-Vaca, J., Fredy Betancur-Pérez, J. and López-López, K. (2012) Distribución y diversidad genética de Begomovirus que infectan tomate (*Solanum lycopersicum*) en Colombia. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting Begomovirus (*Solanum lycopersicum* L) in Colombia.

Carter, S.D., Vigašová, D., Chen, J., Chovanec, M. and Åström, S.U. (2009) Nej1 recruits the Srs2 helicase to DNA double-strand breaks and supports repair by a single-strand annealing-like mechanism. *Proceedings National Academy of Science U S A*, 106, 12037–12042.

Castano-Miquel, L., Seguí, J., Manrique, S., Teixeira, I., Carretero-Paulet, L., Atencio, F., et al. (2013) Diversification of SUMO-activating enzyme in *Arabidopsis*: implications in SUMO conjugation. *Molecular Plant*, 6, 1646–1660. <https://doi.org/10.1093/mp/sst049>.

Castano-Miquel, L., Mas, A., Teixeira, I., Seguí, J., Perearnau, A., Thampi, B.N., et al. (2017) SUMOylation inhibition mediated by disruption of SUMO E1-E2 interactions confers plant susceptibility to necrotrophic fungal pathogens. *Molecular Plant*, 10, 709–720. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.007>.

Castano-Miquel, L., Seguí, J. and Lois, L.M. (2011) Distinctive properties of *Arabidopsis* SUMO paralogues support the *in vivo* predominant role of AtSUMO1/2 isoforms. *Biochemical Journal*, 436, 581–590. <https://doi.org/10.1042/BJ20101446>.

Castillo, A.G., Kong, L.J., Hanley-Bowdoin, L. and Bejarano, E.R. (2004) Interaction between a Geminivirus Replication protein and the plant sumoylation system. *Journal of Virology*, 78, 2758–2769. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.6.2758-2769.2004>.

Castillo, A.G., Collinet, D., Deret, S., Kashoggi, A. and Bejarano, E.R. (2003) Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (REn) and viral replication protein (Rep). *Virology*, 312, 381–394. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00234-4](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00234-4).

Castillo-González, C., Liu, X., Huang, C., Zhao, C., Ma, Z., Hu, T., et al. (2015) Geminivirus-encoded TrAP suppressor inhibits the histone methyltransferase SUVH4/KYP to counter host defense. *eLife*, 4, e06671. <https://doi.org/10.7554/eLife.06671>.

Castro, P.H., Santos, M.Â., Freitas, S., Cana-Quijada, P., Lourenço, T., Rodrigues, M.A.A., et al. (2018) *Arabidopsis thaliana* SPF1 and SPF2 are nuclear-located ULP2-like SUMO proteases that act downstream of SIZ1 in plant development. *Journal of Experimental Botany*, 69, 4633–4649. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery265>.

Castro, P.H., Santos, M.Â., Magalhães, A.P., Tavares, R.M. and Azevedo, H. (2016) Bioinformatics tools for exploring the SUMO gene network. *Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.*, pp. 285–301.

Castro, P.H., Tavares, R.M., Bejarano, E.R. and Azevedo, H. (2012) SUMO, a heavyweight player in plant abiotic stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 3269–3283. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1094-2>.

Castro, P.H., Verde, N., Lourenço, T., Magalhães, A.P., Tavares, R.M., Bejarano, E.R., et al. (2015) SIZ1-dependent post-translational modification by SUMO modulates sugar signaling and metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 56, 2297–2311. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv149>.

Catala, R., Ouyang, J., Abreu, I.A., Hu, Y., Seo, H., Zhang, X., et al. (2007) The *Arabidopsis* E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *Plant Cell*, 19, 2952–2966. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.049981>.

Cazzalini, O., Sommatís, S., Tillhon, M., Dutto, I., Bachi, A., Rapp, A., et al. (2014) CBP and p300 acetylate PCNA to link its degradation with nucleotide excision repair synthesis. *Nucleic Acids Research*, 42, 8433–8448. <https://doi.org/10.1093/nar/gku533>.

Cejnar, P., Ohnoutková, L., Ripl, J., Vlčko, T. and Kundu, J.K. (2018) Two mutations in the truncated Rep gene RBR domain delayed the Wheat dwarf virus infection in transgenic barley plants. *Journal of Integrative Agriculture*, 17, 2492–2500. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62000-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62000-3).

Celen, A.B. and Sahin, U. (2020) Sumoylation on its 25th anniversary: mechanisms, pathology, and emerging concepts. *FEBS Journal*, 287, 3110–3140. <https://doi.org/10.1111/febs.15319>.

Ceniceros-Ojeda, E.A., Rodríguez-Negrete, E.A. and Rivera-Bustamante, R.F. (2016) Two populations of viral minichromosomes are present in a Geminivirus-infected plant showing symptom remission (Recovery). *Journal of virology*, 90, 3828–3838. <https://doi.org/10.1128/JVI.02385-15>.

Chaar, W., Ibrahim, H., Kozah, J. and Chamieh, H. (2017) Comparative analysis data of SF1 and SF2 helicases from three domains of life. *Data in Brief*, 11, 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.02.047>.

Chagin, V.O., Stear, J.H. and Cardoso, M.C. (2010) Organization of DNA replication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2.

Chanet, R., Heude, M., Adjiri, A., Maloisel, L. and Fabre, F. (1996) Semidominant mutations in the yeast Rad51 protein and their relationships with the Srs2 helicase. *Molecular and cellular biology*, 16, 4782–4789. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.9.4782>.

Chang, C.-C., Naik, M.T., Huang, Y.-S., Jeng, J.-C., Liao, P.-H., Kuo, H.-Y., et al. (2011) Structural and functional roles of Daxx SIM phosphorylation in SUMO paralog-selective binding and apoptosis modulation. *Molecular cell*, 42, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.022>.

Chang, D.J., Lupardus, P.J. and Cimprich, K.A. (2006) Monoubiquitination of proliferating cell nuclear antigen induced by stalled replication requires uncoupling of DNA polymerase and mini-chromosome maintenance helicase activities. *The Journal of biological chemistry*, 281, 32081–32088. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606799200>.

Chang, H.M. and Yeh, E.T.H. (2020) SUMO: From bench to bedside. *Physiological Reviews*, 100, 1599–1619.

Chang, L.-K., Lee, Y.-H., Cheng, T.-S., Hong, Y.-R., Lu, P.-J., Wang, J.J., et al. (2004) Post-translational modification of Rta of Epstein-Barr virus by SUMO-1. *The Journal of biological chemistry*, 279, 38803–38812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405470200>.

Chang, P.-C., Cheng, C.-Y., Campbell, M., Yang, Y.-C., Hsu, H.-W., Chang, T.-Y., et al. (2013) The chromatin modification by SUMO-2/3 but not SUMO-1 prevents the epigenetic activation of key immune-related genes during Kaposi's sarcoma associated herpesvirus reactivation. *BMC genomics*, 14, 824. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-824>.

Chang, P.-C., Izumiya, Y., Wu, C.-Y., Fitzgerald, L.D., Campbell, M., Ellison, T.J., et al. (2010) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) encodes a SUMO E3 ligase that is SIM-dependent and SUMO-2/3-specific. *The Journal of biological chemistry*, 285, 5266–5273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.088088>.

Chang, T.-H., Kubota, T., Matsuoka, M., Jones, S., Bradfute, S.B., Bray, M., et al. (2009) Ebola Zaire virus blocks type I interferon production by exploiting the host SUMO modification machinery. *PLoS pathogens*, 5, e1000493. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000493>.

Charlot, F., Chelysheva, L., Kamisugi, Y., Vrielynck, N., Guyon, A., Epert, A., et al. (2014) RAD51B plays an essential role during somatic and meiotic recombination in *Physcomitrella*. *Nucleic Acids Research*, 42, 11965–11978. <https://doi.org/10.1093/nar/gku890>.

Charman, M. and Weitzman, M.D. (2020) Replication compartments of DNA viruses in the nucleus: Location, location, location. *Viruses*, 12.

Chatterji, A., Chatterji, U., Beachy, R.N. and Fauquet, C.M. (2000) Sequence parameters that determine specificity of binding of the replication-associated protein to its cognate site in two strains of tomato leaf curl virus-New Delhi. *Virology*, 273, 341–350. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0434>.

Chavdarova, M., Marini, V., Sisakova, A., Sedlackova, H., Vidasova, D., Brill, S.J., et al. (2015) Srs2 promotes Mus81-Mms4-mediated resolution of recombination intermediates. *Nucleic Acids Research*, 43, 3626–3642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv198>.

Che, J., Hong, X. and Rao, H. (2021) PCNA Ubiquitylation: instructive or permissive to DNA damage tolerance pathways? *Biomolecules*, 11. <https://doi.org/10.3390/biom11101543>.

Chellappan, P., Vanitharani, R., Pita, J. and Fauquet, C.M. (2004) Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *Journal of virology*, 78, 7465–7477. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.14.7465-7477.2004>.

Chen, C.-C., Chen, Y.-Y., Tang, I.-C., Liang, H.-M., Lai, C.-C., Chiou, J.-M., et al. (2011) *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 is involved in excess copper tolerance. *Plant physiology*, 156, 2225–2234. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178996>.

Chen, I.P., Haehnel, U., Altschmied, L., Schubert, I. and Puchta, H. (2003) The transcriptional response of *Arabidopsis* to genotoxic stress - A high-density colony array study (HDCA). *Plant Journal*, 35, 771–786. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01847.x>.

Chen, I.P., Mannuss, A., Orel, N., Heitzeberg, F. and Puchta, H. (2008) A homolog of ScRAD5 is involved in DNA repair and homologous recombination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 146, 1786–1796. <https://doi.org/10.1104/pp.108.116806>.

Chen, Z.Q., Zhao, J.H., Chen, Q., Zhang, Z.H., Li, J., Guo, Z.X., et al. (2020) DNA geminivirus infection induces an imprinted E3 ligase gene to epigenetically activate viral gene transcription. *Plant Cell*, 32, 3256–3272. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00249>.

Cheng, X., Xiong, R., Li, Y., Li, F., Zhou, X. and Wang, A. (2017) Sumoylation of turnip mosaic virus RNA polymerase promotes viral infection by counteracting the host NPR1-mediated immune response. *Plant Cell*, 29, 508–525. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00774>.

Cheng, Y.T. and Li, X. (2012) Ubiquitination in NB-LRR-mediated immunity. *Current opinion in plant biology*, 15, 392–399. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.014>.

Cheong, M.S., Park, H.C., Hong, M.J., Lee, J., Choi, W., Jin, J.B., et al. (2009) Specific domain structures control abscisic acid-, salicylic acid-, and stress-mediated SIZ1 phenotypes. *Plant Physiology*, 151, 1930–1942. <https://doi.org/10.1104/pp.109.143719>.

Chiolo, I., Carotenuto, W., Maffioletti, G., Petrini, J.H.J., Foiani, M. and Liberi, G. (2005) Srs2 and Sgs1 DNA Helicases Associate with Mre11 in Different Subcomplexes following Checkpoint Activation and CDK1-Mediated Srs2 Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 25, 5738–5751. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.13.5738-5751.2005>.

Chiolo, I., Saponaro, M., Baryshnikova, A., Kim, J.-H., Seo, Y.-S. and Liberi, G. (2007) The human F-box DNA helicase FBH1 faces *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 and postreplication repair pathway roles. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 7439–7450. <https://doi.org/10.1128/mcb.00963-07>.

Chiu, R.K., Brun, J., Ramaekers, C., Theys, J., Weng, L., Lambin, P., et al. (2006) Lysine 63-polyubiquitination guards against translesion synthesis-induced mutations. *PLoS genetics*, 2, e116. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020116>.

- Choe, K.N. and Moldovan, G.L.** (2017) Forging ahead through darkness: PCNA, still the principal conductor at the replication fork. *Molecular Cell*, 65, 380–392.
- Choi, C.M., Gray, W.M., Mooney, S. and Hellmann, H.** (2014) Composition, roles, and regulation of cullin-based Ubiquitin E3 ligases. *The Arabidopsis Book*, 12, e0175. <https://doi.org/10.1199/tab.0175>.
- Chosed, R., Mukherjee, S., Lois, L.M. and Orth, K.** (2006) Evolution of a signalling system that incorporates both redundancy and diversity: *Arabidopsis* SUMOylation. *The Biochemical journal*, 398, 521–529. <https://doi.org/10.1042/BJ20060426>.
- Chosed, R., Tomchick, D.R., Brautigam, C.A., Mukherjee, S., Negi, V.S., Machius, M., et al.** (2007) Structural analysis of *Xanthomonas* XopD provides insights into substrate specificity of ubiquitin-like protein proteases. *The Journal of biological chemistry*, 282, 6773–6782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608730200>.
- Choudhury, N.R., Malik, P.S., Singh, D.K., Islam, M.N., Kaliappan, K. and Mukherjee, S.K.** (2006) The oligomeric Rep protein of Mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV) is a likely replicative helicase. *Nucleic acids research*, 34, 6362–6377. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl903>.
- Chun, A.C.S. and Jin, D.Y.** (2010) Ubiquitin-dependent regulation of translesion polymerases. *Biochemical Society transactions*, 38, 110–115. <https://doi.org/10.1042/BST0380110>.
- Ciccia, A. and Elledge, S.J.** (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular Cell*, 40, 179–204.
- Cipolla, L., Maffia, A., Bertoletti, F. and Sabbioneda, S.** (2016) The regulation of DNA damage tolerance by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Frontiers in Genetics*, 7.
- Clérot, D. and Bernardi, F.** (2006) DNA helicase activity is associated with the replication initiator protein rep of tomato yellow leaf curl geminivirus. *Journal of virology*, 80, 11322–11330. <https://doi.org/10.1128/JVI.00924-06>.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 16, 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>.
- Colavito, S., Macris-Kiss, M., Seong, C., Gleeson, O., Greene, E.C., Klein, H.L., et al.** (2009) Functional significance of the Rad51-Srs2 complex in Rad51 presynaptic filament disruption. *Nucleic Acids Research*, 37, 6754–6764. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp748>.
- Colby, T., Matthäi, A., Boeckelmann, A. and Stuible, H.P.** (2006) SUMO-conjugating and SUMO-deconjugating enzymes from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 142, 318–332. <https://doi.org/10.1104/pp.106.085415>.
- Colignon, B., Delaive, E., Dieu, M., Demazy, C., Muhovski, Y., Wallon, C., et al.** (2017) Proteomics analysis of the endogenous, constitutive, leaf SUMOylome. *Journal of proteomics*, 150, 268–280. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.09.012>.

Colombo, R., Boggio, R., Seiser, C., Draetta, G.F. and Chiocca, S. (2002) The adenovirus protein Gam1 interferes with sumoylation of histone deacetylase 1. *EMBO reports*, 3, 1062–1068. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf213>.

Conn, K.L., Wasson, P., McFarlane, S., Tong, L., Brown, J.R., Grant, K.G., et al. (2016) Novel Role for Protein Inhibitor of Activated STAT 4 (PIAS4) in the Restriction of Herpes Simplex Virus 1 by the Cellular Intrinsic Antiviral Immune Response. *Journal of virology*, 90, 4807–4826. <https://doi.org/10.1128/JVI.03055-15>.

Conti, L., Nelis, S., Zhang, C., Woodcock, A., Swarup, R., Galbiati, M., et al. (2014) Small Ubiquitin-like Modifier Protein SUMO Enables Plants to Control Growth Independently of the Phytohormone Gibberellin. *Developmental Cell*, 28, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.004>.

Conti, L., Price, G., O'Donnell, E., Schwessinger, B., Dominy, P. and Sadanandom, A. (2008) Small ubiquitin-like modifier proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and -2 regulate salt stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 20, 2894–2908. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058669>.

Corbalenya, A.E. and Koonin, E. V (1993) Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. Vol. 3.

Coulon, S., Ramasubramanyan, S., Alies, C., Philippin, G., Lehmann, A. and Fuchs, R.P. (2010) Rad8Rad5/Mms2-Ubc13 ubiquitin ligase complex controls translesion synthesis in fission yeast. *The EMBO journal*, 29, 2048–2058. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.87>.

Coursey, T., Regedanz, E., Bisaro, D.M. and Simon, A.E. (2018) *Arabidopsis* RNA polymerase V mediates enhanced compaction and silencing of geminivirus and transposon chromatin during host recovery from infection. *Journal of Virology*, 92, 1320–1337. <https://doi.org/10.1128/JVI>.

Crespo-Bellido, A., Hoyer, J.S., Dubey, D., Jeannot, R.B. and Duffy, S. (2021) Interspecies recombination has driven the macroevolution of Cassava mosaic begomoviruses. *Journal of Virology*, 95. <https://doi.org/10.1128/jvi.00541-21>.

Crickard, J.B. and Greene, E.C. (2019) Helicase mechanisms during homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Biophysics*, 48, 255–273. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115418>.

Csorba, T., Kontra, L. and Burgyán, J. (2015) Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, 479–480, 85–103. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.028>.

Cubeñas-Potts, C. and Matunis, M.J. (2013) SUMO: a multifaceted modifier of chromatin structure and function. *Developmental Cell*, 24, 1–12.

Cuijpers, S.A.G., Willemstein, E. and Vertegaal, A.C.O. (2017) Converging small ubiquitin-like modifier (SUMO) and ubiquitin signaling: improved methodology identifies co-modified target proteins. *Molecular and cellular proteomics: MCP*, 16, 2281–2295. <https://doi.org/10.1074/mcp.TIR117.000152>.

- Culligan, K.M., Robertson, C.E., Foreman, J., Doerner, P. and Britt, A.B.** (2006) ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant Journal*, 48, 947–961. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02931.x>.
- Da Silva, S.J.C. da, Castillo-Urquiza, G.P., Hora Júnior, B.T., Assunção, I.P., Lima, G.S.A., Pio-Ribeiro, G., et al.** (2011) High genetic variability and recombination in a begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. *Archives of virology*, 156, 2205–2213. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1119-4>.
- Daigaku, Y., Etheridge, T.J., Nakazawa, Y., Nakayama, M., Watson, A.T., Miyabe, I., et al.** (2017) PCNA ubiquitylation ensures timely completion of unperturbed DNA replication in fission yeast. *PLoS genetics*, 13, e1006789. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006789>.
- Daley, J.M., Gaines, W.A., Kwon, Y. and Sung, P.** (2014) Regulation of DNA pairing in homologous recombination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6, a017954. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017954>.
- Darwin, K.H.** (2009) Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup), proteasomes and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 485–491. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2148>.
- Das-Bradoo, S., Nguyen, H.D., Wood, J.L., Ricke, R.M., Haworth, J.C. and Bielinsky, A.-K.** (2010) Defects in DNA ligase I trigger PCNA ubiquitylation at Lys 107. *Nature cell biology*, 12, 20–74. <https://doi.org/10.1038/ncb2007>.
- Davies, A.A., Huttner, D., Daigaku, Y., Chen, S. and Ulrich, H.D.** (2008) Activation of ubiquitin-dependent DNA damage bypass is mediated by replication protein a. *Molecular cell*, 29, 625–636. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.12.016>.
- Davino, S., Miozzi, L., Panno, S., Rubio, L., Davino, M. and Accotto, G.P.** (2012) Recombination profiles between Tomato yellow leaf curl virus and Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in laboratory and field conditions: evolutionary and taxonomic implications. *The Journal of general virology*, 93, 2712–2717. <https://doi.org/10.1099/vir.0.045773-0>.
- De Barro, P.J. De, Liu, S.-S., Boykin, L.M. and Dinsdale, A.B.** (2011) *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual review of entomology*, 56, 1–19. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085504>.
- Chiara, A. De, Pederzoli-Ribeil, M., Mocek, J., Candalh, C., Mayeux, P., Millet, A., et al.** (2013) Characterization of cytosolic proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in neutrophils: antiapoptotic role of the monomer. *Journal of leukocyte biology*, 94, 723–731. <https://doi.org/10.1189/jlb.1212637>.
- De March, M. De, Merino, N., Barrera-Vilarmau, S., Crehuet, R., Onesti, S., Blanco, F.J., et al.** (2017) Structural basis of human PCNA sliding on DNA. *Nature communications*, 8, 13935. <https://doi.org/10.1038/ncomms13935>.
- De Tullio, L. De, Kaniecki, K., Kwon, Y., Crickard, J.B., Sung, P. and Greene, E.C.** (2017) Yeast Srs2 helicase promotes redistribution of single-stranded DNA-bound RPA and Rad52 in homologous recombination regulation. *Cell Reports*, 21, 570–577. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.073>.
- De Vega, D. de, Newton, A.C. and Sadanandom, A.** (2018) Post-translational modifications in priming the plant immune system: ripe for exploitation? *FEBS Letters*, 592, 1929–1936.

Deblaere, R., Bytebier, B., Greve, H. De, Deboeck, F., Schell, J., Montagu, M. Van, et al. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic acids research*, 13, 4777–4788. <https://doi.org/10.1093/nar/13.13.4777>.

Del Pozo, J.C. Del, Diaz-Trivino, S., Cisneros, N. and Gutierrez, C. (2006) The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18, 2224–2235. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039651>.

Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. and Voinnet, O. (2006) Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science (New York, N.Y.)*, 313, 68–71. <https://doi.org/10.1126/science.1128214>.

Denison, C., Rudner, A.D., Gerber, S.A., Bakalarski, C.E., Moazed, D. and Gygi, S.P. (2005) A proteomic strategy for gaining insights into protein sumoylation in yeast. *Molecular and Cellular Proteomics*, 4, 246–254. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400154-MCP200>.

Deol, K.K., Lorenz, S. and Strieter, E.R. (2019) Enzymatic logic of ubiquitin chain assembly. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00835>.

Desbiez, C., David, C., Mettouchi, A., Laufs, J. and Gronenborn, B. (1995) Rep protein of tomato yellow leaf curl geminivirus has an ATPase activity required for viral DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 5640–5644. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5640>.

Deshmukh, A.S., Agarwal, M. and Dhar, S.K. (2016) Regulation of DNA replication proteins in parasitic protozoans: possible role of CDK-like kinases. *Current genetics*, 62, 481–486. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0562-2>.

Despras, E., Sittewelle, M., Pouvelle, C., Delrieu, N., Cordonnier, A.M. and Kannouche, P.L. (2016) Rad18-dependent SUMOylation of human specialized DNA polymerase eta is required to prevent under-replicated DNA. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13326>.

Desvoyes, B., Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Chua, N.-H. and Gutierrez, C. (2006) Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during *Arabidopsis* leaf development. *Plant physiology*, 140, 67–80. <https://doi.org/10.1104/pp.105.071027>.

Devendran, R., Namgial, T., Reddy, K.K., Kumar, M., Zarreen, F. and Chakraborty, S. (2022) Insights into the multifunctional roles of geminivirus-encoded proteins in pathogenesis. *Archives of virology*, 167, 307–326. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05338-x>.

Dhingra, N. and Zhao, X. (2019) Intricate SUMO-based control of the homologous recombination machinery. *Genes and development*, 33, 1346–1354. <https://doi.org/10.1101/gad.328534>.

Nunzio, F. Di, Danckaert, A., Fricke, T., Perez, P., Fernandez, J., Perret, E., et al. (2012) Human nucleoporins promote HIV-1 docking at the nuclear pore, nuclear import and integration. *PLoS one*, 7, e46037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046037>.

Diamos, A.G. and Mason, H.S. (2019) Modifying the replication of geminiviral vectors reduces cell death and enhances expression of biopharmaceutical proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01974>.

Díaz-Martínez, L. (2016) Variabilidad genética de cuasiespecies de virus RNA y ssDNA in vivo ante cambios en la tasa de error. Tesis doctoral.

Díaz-Pendón, J.A., Sánchez-Campos, S., Fortes, I.M. and Moriones, E. (2019) Tomato yellow leaf curl sardinia virus, a begomovirus species evolving by mutation and recombination: A challenge for virus control. *Viruses*, 11. <https://doi.org/10.3390/v11010045>.

Díaz-Pendón, J.A., Li, F., Li, W.-X. and 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. *The Plant cell*, 19, 2053–2063. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047449>.

Dieckman, L.M., Freudenthal, B.D. and Washington, M.T. (2012) PCNA structure and function: insights from structures of PCNA complexes and post-translationally modified PCNA. *Sub-cellular biochemistry*, 62, 281–299. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4572-8_15.

Ding, S.-W. and Voinnet, O. (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130, 413–426. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.039>.

Doe, C.L. and Whitby, M.C. (2004) The involvement of Srs2 in post-replication repair and homologous recombination in fission yeast. *Nucleic Acids Research*, 32, 1480–1491. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh317>.

Dogra, S.C., Eini, O., Rezaian, M.A. and Randles, J.W. (2009) A novel shaggy-like kinase interacts with the Tomato leaf curl virus pathogenicity determinant C4 protein. *Plant molecular biology*, 71, 25–38. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9506-x>.

Domingo, E., Escarmís, C., Sevilla, N., Moya, A., Elena, S.F., Quer, J., et al. (1996) Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10, 859–864. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.8.8666162>.

Domingues, P., Golebiowski, F., Tatham, M.H., Lopes, A.M., Taggart, A., Hay, R.T., et al. (2015) Global reprogramming of host SUMOylation during Influenza virus infection. *Cell Reports*, 13, 1467–1480. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.001>.

Donaire, L., Wang, Y., Gonzalez-Ibeas, D., Mayer, K.F., Aranda, M.A. and Llave, C. (2009) Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology*, 392, 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.005>.

Dong, C.-H., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q. and Zhu, J.K. (2006) The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proceedings National Academy of Science U S A*, 103, 8281–8286.

Donson, J., Morris-Krsinich, B.A., Mullineaux, P.M., Boulton, M.I. and Davies, J.W. (1984) A putative primer for second-strand DNA synthesis of maize streak virus is virion-associated. *The EMBO journal*, 3, 3069–3073.

Dorn, A. and Puchta, H. (2019) DNA helicases as safekeepers of genome stability in plants. *Genes*, 10.

Drake, J.W. and Holland, J.J. (1999) Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 13910–13913. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13910>.

Du, Y., He, W., Deng, C., Chen, X., Gou, L., Zhu, F., et al. (2016) Flowering-related RING protein 1 (FRRP1) regulates flowering time and yield potential by affecting histone H2B monoubiquitination in rice (*Oryza sativa*). *PloS one*, 11, e0150458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150458>.

Dubiella, U. and Serrano, I. (2021) The ubiquitin proteasome system as a double agent in plant-virus interactions. *Plants*, 10, 4–7. <https://doi.org/10.3390/plants10050928>.

Dubois, M.L., Meller, A., Samandi, S., Brunelle, M., Frion, J., Brunet, M.A., et al. (2020) UBB pseudogene 4 encodes functional ubiquitin variants. *Nature Communications*, 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15090-6>.

Duda, D.M., Waardenburg, R.C.A.M. van, Borg, L.A., McGarity, S., Nourse, A., Waddell, M.B., et al. (2007) Structure of a SUMO-binding-motif mimic bound to Smt3p-Ubc9p: conservation of a non-covalent ubiquitin-like protein-E2 complex as a platform for selective interactions within a SUMO pathway. *Journal of molecular biology*, 369, 619–630. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.04.007>.

Duechting, A., Tschöpe, C., Kaiser, H., Lamkemeyer, T., Tanaka, N., Aberle, S., et al. (2008) Human parvovirus B19 NS1 protein modulates inflammatory signaling by activation of STAT3/PIAS3 in human endothelial cells. *Journal of virology*, 82, 7942–7952. <https://doi.org/10.1128/JVI.00891-08>.

Duffy, S. and Holmes, E.C. (2008) Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. *Journal of virology*, 82, 957–965. <https://doi.org/10.1128/JVI.01929-07>.

Duffy, S. and Holmes, E.C. (2009) Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *The Journal of general virology*, 90, 1539–1547. <https://doi.org/10.1099/vir.0.009266-0>.

Dupaigne, P., Breton, C. Le, Fabre, F., Gangloff, S., Cam, E. Le and Veaute, X. (2008) The Srs2 helicase activity is stimulated by Rad51 filaments on dsDNA: implications for crossover incidence during mitotic recombination. *Molecular Cell*, 29, 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.033>.

Eamens, A., Wang, M.-B., Smith, N.A. and Waterhouse, P.M. (2008) RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant physiology*, 147, 456–468. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117275>.

Egelkrou, E.M., Robertson, D. and Hanley-Bowdoin, L. (2001) Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. Vol. 13.

Eini, O., Dogra, S., Selth, L.A., Dry, I.B., Randles, J.W. and Rezaian, M.A. (2009) Interaction with a host ubiquitin-conjugating enzyme is required for the pathogenicity of a geminiviral DNA beta satellite. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 22, 737–746. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-6-0737>.

- Elena, S.F., Fraile, A. and García-Arenal, F.** (2014) Evolution and emergence of plant viruses. *Advances in virus research*, 88, 161–191. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800098-4.00003-9>.
- Elia, A.E.H., Boardman, A.P., Wang, D.C., Huttlin, E.L., Everley, R.A., Dephoure, N., et al.** (2015) Quantitative proteomic atlas of ubiquitination and acetylation in the DNA damage response. *Molecular cell*, 59, 867–881. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.006>.
- Elrouby, N.** (2017) Regulation of plant cellular and organismal development by SUMO. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 963, 227–247. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50044-7_14.
- Elrouby, N.** (2015) Analysis of small ubiquitin-like modifier (SUMO) targets reflects the essential nature of protein SUMOylation and provides insight to elucidate the role of SUMO in plant development. *Plant Physiology*, 169, 1006–1017. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01014>.
- Elrouby, N., Bonequi, M.V., Porri, A. and Coupland, G.** (2013) Identification of *Arabidopsis* SUMO-interacting proteins that regulate chromatin activity and developmental transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 19956–19961. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319985110>.
- Elrouby, N. and Coupland, G.** (2010) Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify *Arabidopsis* proteins implicated in diverse biological processes. *Proceedings National Academy of Sciences U S A*, 107, 17415–17420. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005452107>.
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., et al.** (2007) Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes and development*, 21, 2539–2544. <https://doi.org/10.1101/gad.451207>.
- Emilie, M., Maloisel, L., Le Falher, L., Guérois, R., Coïc, E.** (2021) Rad52 oligomeric N-terminal domain stabilizes Rad51 nucleoprotein filaments and contributes to their protection against Srs2. *Cells*, 10(6):1467.
- Enemark, E.J., Joshua-Tor, L.** (2006) Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature*, 442(7100):270-5. <https://doi.org/10.1038/nature04943>.
- Enserink, J.M.** (2015) SUMO and the cellular stress response. *Cell Division*, 10.
- Esparza-Araiza, M.J., Bañuelos-Hernández, B., Argüello-Astorga, G.R., Lara-Ávila, J.P., Goodwin, P.H., Isordia-Jasso, M.I., et al.** (2015) Evaluation of a SUMO E2 conjugating enzyme involved in resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in *Solanum peruvianum*, through a Tomato mottle virus VIGS Assay. *Frontiers in plant science*, 6, 1019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01019>.
- Essers, J., Theil, A.F., Baldeyron, C., Cappellen, W.A. van, Houtsmuller, A.B., Kanaar, R., et al.** (2005) Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Molecular and Cellular Biology*, 25, 9350–9359. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.21.9350-9359.2005>.
- Everett, R.D., Boutell, C. and Hale, B.G.** (2013) Interplay between viruses and host sumoylation pathways. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 400–411.

Fabre, F., Chan, A., Heyer, W.-D. and Gangloff, S. (2002) Alternate pathways involving Sgs1/Top3, Mus81/Mms4, and Srs2 prevent formation of toxic recombination intermediates from single-stranded gaps created by DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 16887–16892. <https://doi.org/10.1073/pnas.252652399>.

Fairman-Williams, M.E., Guenther, U.P. and Jankowsky, E. (2010) SF1 and SF2 helicases: Family matters. *Current Opinion in Structural Biology*, 20, 313–324.

Fan, L., Bi, T., Wang, L. and Xiao, W. (2020) DNA-damage tolerance through PCNA ubiquitination and sumoylation. *The Biochemical journal*, 477, 2655–2677. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190579>.

Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M., et al. (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of virology*, 153, 783–821.

Feng, J. and Shen, W.H. (2014) Dynamic regulation and function of histone monoubiquitination in plants. *Frontiers in plant science*, 5, 83. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00083>.

Ferreira, M.A., Teixeira, R.M. and Fontes, E.P.B. (2021) Geminivirus-host interactions: action and reaction in receptor-mediated antiviral immunity. *Viruses*, 13. <https://doi.org/10.3390/v13050840>.

Ferro, C.G., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J. and Fiallo-Olivé, E. (2021) Revealing the complexity of Sweepovirus-deltasatellite-plant host interactions: expanded natural and experimental helper virus range and effect dependence on virus-host combination. *Microorganisms*, 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051018>.

Fiallo-Olivé, E., Trenado, H.P., Louro, D. and Navas-Castillo, J. (2019) Recurrent speciation of a Tomato yellow leaf curl geminivirus in Portugal by recombination. *Scientific Reports*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37971-z>.

Finley, D., Ulrich, H.D., Sommer, T. and Kaiser, P. (2012) The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 192, 319–360. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.140467>.

Fisher, R.D., Wang, B., Alam, S.L., Higginson, D.S., Robinson, H., Sundquist, W.I., et al. (2003) Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 28976–28984. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302596200>.

Flores-Rozas, H., Clark, D. and Kolodner, R.D. (2000) Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mismatch recognition complex. *Nature genetics*, 26, 375–378. <https://doi.org/10.1038/81708>.

Fondong, V.N., Pita, J.S., Rey, M.E., Kochko, A. de, Beachy, R.N. and Fauquet, C.M. (2000) Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *The Journal of general virology*, 81, 287–297. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-1-287>.

Fondong, V.N. (2013) Geminivirus protein structure and function. *Molecular Plant Pathology*, 14, 635–649.

- Frampton, J., Irmisch, A., Green, C.M., Neiss, A., Trickey, M., Ulrich, H.D., et al.** (2006) Postreplication repair and PCNA modification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 2976–2985. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-11-1008>.
- Franić, D., Zubčić, K. and Boban, M.** (2021) Nuclear ubiquitin-proteasome pathways in proteostasis maintenance. *Biomolecules*, 11, 1–16. <https://doi.org/10.3390/biom11010054>.
- Freudenthal, B.D., Brogie, J.E., Gakhar, L., Kondratich, C.M. and Washington, M.T.** (2011) Crystal structure of SUMO-modified proliferating cell nuclear antigen. *Journal of molecular biology*, 406, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.12.015>.
- Friedl, A.A., Liefshitz, B., Steinlauf, R. and Kupiec, M.** (2001) Deletion of the *SRS2* gene suppresses elevated recombination and DNA damage sensitivity in *rad5* and *rad18* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation research*, 486, 137–146. [https://doi.org/10.1016/s0921-8777\(01\)00086-6](https://doi.org/10.1016/s0921-8777(01)00086-6).
- Frischmuth, S., Wege, C., Hülser, D. and Jeske, H.** (2007) The movement protein BC1 promotes redirection of the nuclear shuttle protein BV1 of Abutilon mosaic geminivirus to the plasma membrane in fission yeast. *Protoplasma*, 230, 117–123. <https://doi.org/10.1007/s00709-006-0223-x>.
- Frizzell, A., Nguyen, J.H.G., Petalcorin, M.I.R., Turner, K.D., Boulton, S.J., Freudenreich, C.H., et al.** (2014) RTEL1 inhibits trinucleotide repeat expansions and fragility. *Cell Reports*, 6, 827–835. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.034>.
- Fugger, K., Mistrik, M., Danielsen, J.R., Dinant, C., Falck, J., Bartek, J., et al.** (2009) Human Fbh1 helicase contributes to genome maintenance via pro- and anti-recombinase activities. *Journal of Cell Biology*, 186, 655–663. <https://doi.org/10.1083/jcb.200812138>.
- Fujise, K., Zhang, D., Liu, J. and Yeh, E.T.** (2000) Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *The Journal of biological chemistry*, 275, 39458–39465. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006626200>.
- Gago, S., Elena, S.F., Flores, R. and Sanjuán, R.** (2009) Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid. *Science (New York, N.Y.)*, 323, 1308. <https://doi.org/10.1126/science.1169202>.
- Gali, H., Juhasz, S., Morocz, M., Hajdu, I., Fatyol, K., Szukacsov, V., et al.** (2012) Role of SUMO modification of human PCNA at stalled replication fork. *Nucleic Acids Research*, 40, 6049–6059. <https://doi.org/10.1093/nar/gks256>.
- Gali, V.K., Balint, E., Serbyn, N., Frittmann, O., Stutz, F. and Unk, I.** (2017) Translesion synthesis DNA polymerase η exhibits a specific RNA extension activity and a transcription-associated function. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12915-1>.
- Gangloff, S., Soustelle, C. and Fabre, F.** (2000) Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases. *Nature genetics*, 25, 192–194. <https://doi.org/10.1038/76055>.
- Gao, Y., Mutter-Rottmayer, E., Zlatanou, A., Vaziri, C. and Yang, Y.** (2017) Mechanisms of post-replication DNA repair. *Genes*, 8.

García, J.A. and Pallás, V. (2015) Viral factors involved in plant pathogenesis. *Current Opinion in Virology*, 11, 21–30.

García-Andrés, S., Monci, F., Navas-Castillo, J. and Moriones, E. (2006) Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology*, 350, 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.028>.

García-Andrés, S., Tomás, D.M., Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. and Moriones, E. (2007) Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of Tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology*, 365, 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.045>.

García-Arenal, F. and Zerbini, F.M. (2019) Life on the edge: Geminiviruses at the interface between crops and wild plant hosts. *Annual Review of Virology*, 6, 411–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015536>.

García-Dominguez, M., March-Díaz, R. and Reyes, J.C. (2008) The PHD domain of plant PIAS proteins mediates sumoylation of bromodomain GTE proteins. *The Journal of biological chemistry*, 283, 21469–21477. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708176200>.

García-Ortiz, M.V., Ariza, R.R., Hoffman, P.D., Hays, J.B. and Roldán-Arjona, T. (2004) *Arabidopsis thaliana* AtPOLK encodes a DinB-like DNA polymerase that extends mispaired primer termini and is highly expressed in a variety of tissues. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 39, 84–97. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2004.02112.x>.

García-Rodríguez, N., Wong, R.P. and Ulrich, H.D. (2016) Functions of ubiquitin and SUMO in DNA replication and replication stress. *Frontiers in Genetics*, 7:87. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00087>.

García-Ruiz, H. (2019) *Host factors against plant viruses*.

Gareau, J.R. and Lima, C.D. (2010) The SUMO pathway: Emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 861–871.

Garg, P. and Burgers, P.M. (2005) Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translesion DNA polymerases and REV1. *Proceedings National Academy of Science U S A*, 102, 18361–18366.

Garrido, E., Srivastava, A. and Sadanandom, A. (2018) Exploiting protein modification systems to boost crop productivity: SUMO proteases in focus. *Journal of Experimental Botany*, 69, 4625–4632. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery222>.

Gary, R., Ludwig, D.L., Cornelius, H.L., MacInnes, M.A. and Park, M.S. (1997) The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *The Journal of biological chemistry*, 272, 24522–24529. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24522>.

Garza, R. and Pillus, L. (2013) STUbLs in chromatin and genome stability. *Biopolymers*, 99, 146–154. <https://doi.org/10.1002/bip.22125>.

Gazy, I. and Kupiec, M. (2012) The importance of being modified: PCNA modification and DNA damage response. *Cell Cycle*, 11, 2620–2623.

Ge, L., Zhang, J., Zhou, X. and Li, H. (2007) Genetic structure and population variability of Tomato yellow leaf curl China virus. *Journal of Virology*, 81, 5902–5907. <https://doi.org/10.1128/jvi.02431-06>.

Gehl, C., Waadt, R., Kudla, J., Mendel, R.-R. and Hänsch, R. (2009) New GATEWAY vectors for high throughput analyses of protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation. *Molecular plant*, 2, 1051–1058. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp040>.

Geiss-Friedlander, R. and Melchior, F. (2007) Concepts in sumoylation: A decade on. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 947–956.

George, B., Ruhel, R., Mazumder, M., Sharma, V.K., Jain, S.K., Gourinath, S., et al. (2014) Mutational analysis of the helicase domain of a replication initiator protein reveals critical roles of Lys 272 of the B' motif and Lys 289 of the β -hairpin loop in geminivirus replication. *The Journal of general virology*, 95, 1591–1602. <https://doi.org/10.1099/vir.0.064923-0>.

Georgescu, R.E., Kim, S.-S., Yurieva, O., Kuriyan, J., Kong, X.-P. and O'Donnell, M. (2008) Structure of a sliding clamp on DNA. *Cell*, 132, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.045>.

Geronimo, C.L., Singh, S.P., Galletto, R. and Zakian, V.A. (2018) The signature motif of the *Saccharomyces cerevisiae* Pif1 DNA helicase is essential *in vivo* for mitochondrial and nuclear functions and *in vitro* for ATPase activity. *Nucleic Acids Research*, 46, 8357–8370. <https://doi.org/10.1093/nar/gky655>.

Ghimire, S., Tang, X., Zhang, N., Liu, W., Qi, X., Fu, X., et al. (2020) Genomic analysis of the SUMO-conjugating enzyme and genes under abiotic stress in potato (*Solanum tuberosum* L.). *International Journal of Genomics*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9703638>.

Ghimire, S., Tang, X., Zhang, N., Liu, W. and Si, H. (2020) SUMO and SUMOylation in plant abiotic stress. *Plant Growth Regulation*, 91, 317–325.

Ghodke, H., Lewis, J.S. and Oijen, A.M. van (2018) Resolving the gordian knot: Srs2 strips intermediates formed during homologous recombination. *Trends in Biochemical Sciences*, 43, 149–151. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.12.004>.

Gibbs, A.J., Fargette, D., García-Arenal, F. and Gibbs, M.J. (2010) Time-the emerging dimension of plant virus studies. *The Journal of general virology*, 91, 13–22. <https://doi.org/10.1099/vir.0.015925-0>.

Gill, S.S., Anjum, N.A., Gill, R., Jha, M. and Tuteja, N. (2015) DNA damage and repair in plants under ultraviolet and ionizing radiations. *Scientific World Journal*, 2015.

Gill, U., Scott, J.W., Shekasteband, R., Ogundiwin, E., Schuit, C., Francis, D.M., et al. (2019) Ty-6, a major begomovirus resistance gene on chromosome 10, is effective against Tomato yellow leaf curl virus and Tomato mottle virus. *Theoretical and Applied Genetics*, 132, 1543–1554. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03298-0>.

Glineburg, M.R., Chavez, A., Agrawal, V., Brill, S.J. and Johnson, F.B. (2013) Resolution by unassisted Top3 points to template switch recombination intermediates during DNA replication. *The Journal of biological chemistry*, 288, 33193–33204. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.496133>.

Gnanasekaran, P., KishoreKumar, R., Bhattacharyya, D., Vinoth Kumar, R. and Chakraborty, S. (2019) Multifaceted role of geminivirus associated betasatellite in pathogenesis. *Molecular plant pathology*, 20, 1019–1033. <https://doi.org/10.1111/mpp.12800>.

Godin, S., Wier, A., Kabbinavar, F., Bratton-Palmer, D.S., Ghodke, H., Houten, B. Van, et al. (2013) The Shu complex interacts with Rad51 through the Rad51 paralogues Rad55-Rad57 to mediate error-free recombination. *Nucleic acids research*, 41, 4525–4534. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt138>.

Gomes, X. V, Schmidt, S.L. and Burgers, P.M. (2001) ATP utilization by yeast replication factor C. II. Multiple stepwise ATP binding events are required to load proliferating cell nuclear antigen onto primed DNA. *The Journal of biological chemistry*, 276, 34776–34783. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011743200>.

Gong, L. and Yeh, E.T.H. (2006) Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *The Journal of biological chemistry*, 281, 15869–15877. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511658200>.

Gong, P., Tan, H., Zhao, S., Li, H., Liu, H., Ma, Y., et al. (2021) Geminiviruses encode additional small proteins with specific subcellular localizations and virulence function. *Nature Communications*, 12, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24617-4>.

González-Magaña, A. and Blanco, F.J. (2020) Human PCNA structure, function and interactions. *Biomolecules*, 10.

González-Prieto, R., Eifler-Olivi, K., Claessens, L.A., Willemstein, E., Xiao, Z., Talavera Ormeno, C.M.P., et al. (2021) Global non-covalent SUMO interaction networks reveal SUMO-dependent stabilization of the non-homologous end joining complex. *Cell Reports*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108691>.

Gopal, P., Pravin Kumar, P., Sinilal, B., Jose, J., Kasin Yadunandam, A. and Usha, R. (2007) Differential roles of C4 and betaC1 in mediating suppression of post-transcriptional gene silencing: evidence for transactivation by the C2 of Bhendi yellow vein mosaic virus, a monopartite begomovirus. *Virus research*, 123, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.07.014>.

Gorbalenya, A.E., Koonin, E. V, Donchenko, A.P. and Blinov, V.M. (1988) A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Letters*, 235, 16–24.

Gorbalenya, A.E., Koonin, E. V, Donchenko, A. and Blinov, V. (1989) Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Research*, 17, 4713–4730.

Gou, M., Huang, Q., Qian, W., Zhang, Z., Jia, Z. and Hua, J. (2017) Sumoylation E3 ligase SIZ1 modulates plant immunity partly through the immune receptor gene SNC1 in *Arabidopsis*.

Molecular plant-microbe interactions: MPMI, 30, 334–342. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-17-0041-R>.

Govantes, F., Molina-López, J.A. and Santero, E. (1996) Mechanism of coordinated synthesis of the antagonistic regulatory proteins NifL and NifA of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 178, 6817–6823. <https://doi.org/10.1128/jb.178.23.6817-6823.1996>.

Green, M. and Sambrook, J. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Editio. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Guerra-Peraza, O., Kirk, D., Seltzer, V., Veluthambi, K., Schmit, A.C., Hohn, T., et al. (2005) Coat proteins of Rice tungro bacilliform virus and Mungbean yellow mosaic virus contain multiple nuclear-localization signals and interact with importin alpha. *The Journal of general virology*, 86, 1815–1826. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80920-0>.

Guerrero, J., Regedanz, E., Lu, L., Ruan, J., Bisaro, D.M. and Sunter, G. (2020) Manipulation of the plant host by the geminivirus AC2/C2 protein, a central player in the infection cycle. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00591>.

Guion, L., Bienkowska-Haba, M., DiGiuseppe, S., Florin, L. and Sapp, M. (2019) PML nuclear body-residing proteins sequentially associate with HPV genome after infectious nuclear delivery. *PLoS Pathogens*, 15. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007590>.

Gulbis, J.M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (1996) Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell*, 87, 297–306. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81347-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81347-1).

Guo, C., Tang, T.-S., Bienko, M., Parker, J.L., Bielen, A.B., Sonoda, E., et al. (2006) Ubiquitin-binding motifs in REV1 protein are required for its role in the tolerance of DNA damage. *Molecular and cellular biology*, 26, 8892–8900. <https://doi.org/10.1128/MCB.01118-06>.

Gupta, N., Reddy, K., Bhattacharyya, D. and Chakraborty, S. (2021) Plant responses to geminivirus infection: guardians of the plant immunity. *Virology Journal*, 18, 1–25. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01612-1>.

Gutierrez, C. (2000) DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *The EMBO Journal*, 19, 792–799.

Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M.M., Sanz-Burgos, A.P., Luque, A. and Missich, R. (2004) Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology*, 98, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.10.012>.

Guzzo, C.M., Berndsen, C.E., Zhu, J., Gupta, V., Datta, A., Greenberg, R.A., et al. (2012) RNF4-dependent hybrid SUMO-ubiquitin chains are signals for RAP80 and thereby mediate the recruitment of BRCA1 to sites of DNA damage. *Science signaling*, 5, ra88. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003485>.

Ha, C., Coombs, S., Revill, P., Harding, R., Vu, M. and Dale, J. (2006) Corchorus yellow vein virus, a New World geminivirus from the Old World. *The Journal of general virology*, 87, 997–1003. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81631-0>.

Haakonsen, D.L. and Rape, M. (2019) Branching out: improved signaling by heterotypic ubiquitin chains. *Trends in cell biology*, 29, 704–716. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.06.003>.

Hak, H., Levy, Y., Chandran, S.A., Belausov, E., Loyter, A., Lapidot, M., et al. (2015) TYLCV-Is movement in planta does not require V2 protein. *Virology*, 477, 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.007>.

Hall, M.C. and Matson, S.W. (1999) Helicase motifs: The engine that powers DNA unwinding. *Molecular Microbiology*, 34, 867–877.

Hammoudi, V., Fokkens, L., Beerens, B., Vlachakis, G., Chatterjee, S., Arroyo-Mateos, M., et al. (2018) The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 mediates the temperature dependent trade-off between plant immunity and growth. *PLoS genetics*, 14, e1007157. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007157>.

Hammoudi, V., Vlachakis, G., Schranz, M.E. and Burg, H.A. van den (2016) Whole-genome duplications followed by tandem duplications drive diversification of the protein modifier SUMO in Angiosperms. *New Phytologist*, 211, 172–185. <https://doi.org/10.1111/nph.13911>.

Han, D., Chen, C., Xia, S., Liu, J., Shu, J., Nguyen, V., et al. (2021) Chromatin-associated SUMOylation controls the transcriptional switch between plant development and heat stress responses. *Plant Communications*, 2, 100091. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100091>.

Han, Y.-F., Zhao, Q.-Y., Dang, L.-L., Luo, Y.-X., Chen, S.-S., Shao, C.-R., et al. (2016) The SUMO E3 ligase-like proteins PIAL1 and PIAL2 interact with MOM1 and form a novel complex required for transcriptional silencing. *The Plant cell*, 28, 1215–1229. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00997>.

Hanawalt, P.C. (2007) Paradigms for the three Rs: DNA Replication, Recombination, and Repair. *Molecular Cell*, 28, 702–707.

Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S. and Robertson, D. (2000) Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 35, 105–140.

Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E.R., Robertson, D. and Mansoor, S. (2013) Geminiviruses: Masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 777–788.

Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S.B. and Robertson, D. (2004) Reprogramming plant gene expression: A prerequisite to geminivirus DNA replication. *Molecular Plant Pathology*, 5, 149–156.

Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature*, 418, 244–251. <https://doi.org/10.1038/418244a>.

Hannoun, Z., Maarifi, G. and Chelbi-Alix, M.K. (2016) The implication of SUMO in intrinsic and innate immunity. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 29, 3–16.

Hansen, L.L., van den Burg, H.A. and van Ooijen, G. (2017) Sumoylation contributes to timekeeping and temperature compensation of the plant circadian clock. *Journal of biological rhythms*, 32, 560–569. <https://doi.org/10.1177/0748730417737633>.

- Haracska, L., Prakash, L. and Prakash, S.** (2002) Role of human DNA polymerase kappa as an extender in translesion synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 16000–16005. <https://doi.org/10.1073/pnas.252524999>.
- Haracska, L., Torres-Ramos, C.A., Johnson, R.E., Prakash, S. and Prakash, L.** (2004) Opposing effects of ubiquitin conjugation and SUMO modification of PCNA on replicational bypass of DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 4267–4274. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.10.4267-4274.2004>.
- Harkins, G.W., Martin, D.P., Duffy, S., Monjane, A.L., Shepherd, D.N., Windram, O.P., et al.** (2009) Dating the origins of the maize-adapted strain of maize streak virus, MSV-A. *The Journal of general virology*, 90, 3066–3074. <https://doi.org/10.1099/vir.0.015537-0>.
- Hateboer, G., Kerkhoven, R.M., Shvarts, A., Bernards, R. and Beijersbergen, R.L.** (1996) Degradation of E2F by the ubiquitin-proteasome pathway: regulation by retinoblastoma family proteins and adenovirus transforming proteins. *Genes and development*, 10, 2960–2970. <https://doi.org/10.1101/gad.10.23.2960>.
- Hatfield, P.M., Gosink, M.M., Carpenter, T.B. and Vierstra, R.D.** (1997) The ubiquitin-activating enzyme (E1) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 11, 213–226. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.11020213.x>.
- He, Y.Z., Wang, Y.M., Yin, T.Y., Fiallo-Olivé, E., Liu, Y.Q., Hanley-Bowdoin, L., et al.** (2020) A plant DNA virus replicates in the salivary glands of its insect vector via recruitment of host DNA synthesis machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117, 16928–16937. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820132117>.
- Heaton, P.R., Deyrieux, A.F., Bian, X.-L. and Wilson, V.G.** (2011) HPV E6 proteins target Ubc9, the SUMO conjugating enzyme. *Virus research*, 158, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.001>.
- Hecker, C.-M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P. and Dikic, I.** (2006) Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *The Journal of biological chemistry*, 281, 16117–16127. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512757200>.
- Hedglin, M., Pandey, B. and Benkovic, S.J.** (2016) Stability of the human polymerase δ holoenzyme and its implications in lagging strand DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, E1777–86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523653113>.
- Hegde, V. and Klein, H.** (2000) Requirement for the SRS2 DNA helicase gene in non-homologous end joining in yeast. *Nucleic acids research*, 28, 2779–2783. <https://doi.org/10.1093/nar/28.14.2779>.
- Hehnlé, S., Wege, C. and Jeske, H.** (2004) Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. *Journal of virology*, 78, 7698–7706. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.14.7698-7706.2004>.
- Hendel, A., Krijger, P.H.L., Diamant, N., Goren, Z., Langerak, P., Kim, J., et al.** (2011) PCNA ubiquitination is important, but not essential for translesion DNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Genetics*, 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002262>.

Hendriks, I.A., D'Souza, R.C., Chang, J.G., Mann, M. and Vertegaal, A.C.O. (2015) System-wide identification of wild-type SUMO-2 conjugation sites. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8289>.

Hendriks, I.A., Lyon, D., Su, D., Skotte, N.H., Daniel, J.A., Jensen, L.J., et al. (2018) Site-specific characterization of endogenous SUMOylation across species and organs. *Nature Communications*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04957-4>.

Hendriks, I.A. and Vertegaal, A.C.O. (2016) A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 581–595. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.81>.

Hendriks, I.A., D'Souza, R.C.J., Yang, B., Verlaan-de Vries, M., Mann, M. and Vertegaal, A.C.O. (2014) Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nature structural and molecular biology*, 21, 927–936. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2890>.

Herhaus, L. and Dikic, I. (2015) Expanding the ubiquitin code through post-translational modification. *EMBO reports*, 16, 1071–1083. <https://doi.org/10.15252/embr.201540891>.

Hesketh, E.L., Saunders, K., Fisher, C., Potze, J., Stanley, J., Lomonosoff, G.P., et al. (2018) The 3.3 Å structure of a plant geminivirus using cryo-EM. *Nature Communications*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04793-6>.

Heude, M., Chanet, R. and Fabre, F. (1995) Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 helicase during the mitotic cell cycle, meiosis and after irradiation. *Molecular and general genetics*: MGG, 248, 59–68. <https://doi.org/10.1007/BF02456614>.

Heyraud-Nitschke, F., Schumacher, S., Laufs, J., Schaefer, S., Schell, J. and Gronenborn, B. (1995) Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic acids research*, 23, 910–916. <https://doi.org/10.1093/nar/23.6.910>.

Hickey, C.M., Wilson, N.R. and Hochstrasser, M. (2012) Function and regulation of SUMO proteases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 755–766. <https://doi.org/10.1038/nrm3478>.

Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H.A., Fujimoto, M., Palvimo, J.J., Nakai, A., et al. (2005) PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proceedings National Academy of Science U S A*, 103, 45–50.

Higginbotham, J.M. and O'Shea, C.C. (2015) Adenovirus E4-ORF3 targets PIAS3 and together with E1B-55K remodels SUMO interactions in the nucleus and at virus genome replication domains. *Journal of virology*, 89, 10260–10272. <https://doi.org/10.1128/JVI.01091-15>.

Hingorani, M.M. and O'donnell, M. (2000) Sliding clamps: A (tail)ored fit new structural information on the architecture of a DNA replisome provides insights into a number of DNA metabolic processes and their modulation by circular “sliding clamps”, which form rings around DNA that play an important role in processive processes such as replication. Vol. 10.

Hipp, K., Grimm, C., Jeske, H. and Böttcher, B. (2017) Near-atomic resolution structure of a plant geminivirus determined by electron cryomicroscopy. *Structure*, 25, 1303-1309.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.06.013>.

- Hipp, K., Rau, P., Schäfer, B., Gronenborn, B. and Jeske, H.** (2014) The RXL motif of the African cassava mosaic virus Rep protein is necessary for rereplication of yeast DNA and viral infection in plants. *Virology*, 462–463, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.06.002>.
- Hirayama, S., Sugihara, M., Morito, D., Iemura, S. ichiro, Natsume, T., Murata, S., et al.** (2018) Nuclear export of ubiquitinated proteins via the UBIN-POST system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, E4199–E4208. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711017115>.
- Hishida, T., Iwasaki, H., Ohno, T., Morishita, T. and Shinagawa, H.** (2001) A yeast gene, MGS1, encoding a DNA-dependent AAA(+) ATPase is required to maintain genome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 8283–8289. <https://doi.org/10.1073/pnas.121009098>.
- Hishiki, A., Hashimoto, H., Hanafusa, T., Kamei, K., Ohashi, E., Shimizu, T., et al.** (2009) Structural basis for novel interactions between human translesion synthesis polymerases and proliferating cell nuclear antigen. *The Journal of biological chemistry*, 284, 10552–10560. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809745200>.
- Hoecker, U.** (2017) The activities of the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA, a key repressor in light signaling. *Current opinion in plant biology*, 37, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.03.015>.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S.** (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 419, 135–141. <https://doi.org/10.1038/nature00991>.
- Holsters, M., Silva, B., Vliet, F. Van, Genetello, C., Block, M. De, Dhaese, P., et al.** (1980) The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid*, 3, 212–230. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(80\)90110-9](https://doi.org/10.1016/0147-619x(80)90110-9).
- Höpfler, M., Kern, M.J., Straub, T., Prytuliak, R., Habermann, B.H., Pfander, B., et al.** (2019) Slx5/Slx8-dependent ubiquitin hotspots on chromatin contribute to stress tolerance. *The EMBO journal*, 38. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100368>.
- Horigome, C., Bustard, D.E., Marcomini, I., Delgosaie, N., Tsai-Pflugfelder, M., Cobb, J.A., et al.** (2016) PolySUMOylation by Siz2 and Mms21 triggers relocation of DNA breaks to nuclear pores through the Slx5/Slx8 STUbL. *Genes and development*, 30, 931–945. <https://doi.org/10.1101/gad.277665.116>.
- Horns, T. and Jeske, H.** (1991) Localization of abutilon mosaic virus (AbMV) DNA within leaf tissue by in situ hybridization. *Virology*, 181, 580–588. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90891-e](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90891-e).
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K. and Mudgett, M.B.** (2003) *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Molecular microbiology*, 50, 377–389. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03730.x>.
- Hotson, A. and Mudgett, M.B.** (2004) Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity. *Current opinion in plant biology*, 7, 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.003>.

Hou, Y.M. and Gilbertson, R.L. (1996) Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology*, 70, 5430–5436. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.8.5430-5436.1996>.

Hu, X., Kong, X., Wang, C., Ma, L., Zhao, J., Wei, J., et al. (2014) Proteasome-mediated degradation of FRIGIDA modulates flowering time in *Arabidopsis* during vernalization. *The Plant cell*, 26, 4763–4781. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132738>.

Hu, Y., Raynard, S., Sehorn, M.G., Lu, X., Bussen, W., Zheng, L., et al. (2007) RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. *Genes and Development*, 21, 3073–3084. <https://doi.org/10.1101/gad.1609107>.

Hua, Z. and Vierstra, R.D. (2011) The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annual review of plant biology*, 62, 299–334. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112256>.

Huang, L., Yang, S., Zhang, S., Liu, M., Lai, J., Qi, Y., et al. (2009) The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase AtMMS21, a homologue of NSE2/MMS21, regulates cell proliferation in the root. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 60, 666–678. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03992.x>.

Huang, X., Chen, S., Yang, Xiaorong, Yang, Xin, Zhang, T. and Zhou, G. (2020) Friend or enemy: a dual role of autophagy in plant virus infection. *Frontiers in Microbiology*, 11.

Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S. and Howley, P.M. (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 5249.

Hunt, L.J., Ahmed, E.A., Kaur, H., Ahuja, J.S., Hulme, L., Chou, T.C., et al. (2019) S. cerevisiae Srs2 helicase ensures normal recombination intermediate metabolism during meiosis and prevents accumulation of Rad51 aggregates. *Chromosoma*, 128, 249–265. <https://doi.org/10.1007/s00412-019-00705-9>.

Hurley, J.H., Lee, S. and Prag, G. (2006) Ubiquitin-binding domains. *The Biochemical journal*, 399, 361–372. <https://doi.org/10.1042/BJ20061138>.

Idris, A.M., Shahid, M.S., Briddon, R.W., Khan, A.J., Zhu, J.-K. and Brown, J.K. (2011) An unusual alphasatellite associated with monopartite begomoviruses attenuates symptoms and reduces betasatellite accumulation. *The Journal of general virology*, 92, 706–717. <https://doi.org/10.1099/vir.0.025288-0>.

Imbert, F. and Langford, D. (2021) Viruses, SUMO, and immunity: the interplay between viruses and the host SUMOylation system. *Journal of neurovirology*, 27, 531–541. <https://doi.org/10.1007/s13365-021-00995-9>.

Indiani, C., McInerney, P., Georgescu, R., Goodman, M.F. and O'Donnell, M. (2005) A sliding-clamp toolbelt binds high- and low-fidelity DNA polymerases simultaneously. *Molecular cell*, 19, 805–815. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.011>.

Ingole, K.D., Dahale, S.K. and Bhattacharjee, S. (2021) Proteomic analysis of SUMO1-SUMOylome changes during defense elicitation in *Arabidopsis*. *Journal of Proteomics*, 232, 104054. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.104054>.

- Iqbal, Z., Sattar, M.N., Kvarnheden, A., Mansoor, S. and Briddon, R.W.** (2012) Effects of the mutation of selected genes of Cotton leaf curl Kokhran virus on infectivity, symptoms and the maintenance of cotton leaf curl Multan betasatellite. *Virus research*, 169, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.07.016>.
- Ira, G. and Haber, J.E.** (2002) Characterization of RAD51-independent break-induced replication that acts preferentially with short homologous sequences. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 6384–6392. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.18.6384-6392.2002>.
- Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M. and Haber, J.E.** (2003) Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell*, 114, 401–411.
- Iribarren, P.A., Marzio, L.A. Di, Berazategui, M.A., Gaudenzi, J.G. De and Alvarez, V.E.** (2018) SUMO polymeric chains are involved in nuclear foci formation and chromatin organization in *Trypanosoma brucei* procyclic forms. *PLoS ONE*, 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193528>.
- Ishida, T., Fujiwara, S., Miura, K., Stacey, N., Yoshimura, M., Schneider, K., et al.** (2009) SUMO E3 ligase HIGH PLOIDY2 regulates endocycle onset and meristem maintenance in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 21, 2284–2297. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068072>.
- Ishida, T., Yoshimura, M., Miura, K. and Sugimoto, K.** (2012) MMS21/HPY2 and SIZ1, two *Arabidopsis* SUMO E3 ligases, have distinct functions in development. *PloS one*, 7, e46897. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046897>.
- Islam, M.N., Paquet, N., Fox, D. 3rd, Dray, E., Zheng, X.-F., Klein, H., et al.** (2012) A variant of the breast cancer type 2 susceptibility protein (BRC) repeat is essential for the RECQL5 helicase to interact with RAD51 recombinase for genome stabilization. *The Journal of biological chemistry*, 287, 23808–23818. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.375014>.
- Isnard, M., Granier, M., Frutos, R., Reynaud, B. and Peterschmitt, M.** (1998) Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *The Journal of general virology*, 79 (Pt 12), 3091–3099. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-12-3091>.
- Isono, E. and Nagel, M.K.** (2014) Deubiquitylating enzymes and their emerging role in plant biology. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00056>.
- Iwakawa, H. and Tomari, Y.** (2013) Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Molecular cell*, 52, 591–601. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.033>.
- Jackel, J.N., Buchmann, R.C., Singhal, U. and Bisaro, D.M.** (2015) Analysis of geminivirus AL2 and L2 proteins reveals a novel AL2 silencing suppressor activity. *Journal of virology*, 89, 3176–3187. <https://doi.org/10.1128/JVI.02625-14>.
- Jalal, D., Chalissery, J. and Hassan, A.H.** (2017) Genome maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*: The role of SUMO and SUMO-targeted ubiquitin ligases. *Nucleic Acids Research*, 45, 2242–2261.
- Jansen, N.S. and Vertegaal, A.C.O.** (2021) A chain of events: regulating target proteins by SUMO polymers. *Trends in Biochemical Sciences*, 46, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.09.002>.

Jardin, C., Horn, A.H.C. and Sticht, H. (2015) Binding properties of SUMO-interacting motifs (SIMs) in yeast. *Journal of Molecular Modeling*, 21, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00894-015-2597-1>.

Jasin, M. and Rothstein, R. (2013) Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5, a012740. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012740>.

Javed, A., Major, B., Stead, J. A., Sanders, C. M. and orlova, E. V. (2021) Unwinding of a DNA replication fork by a hexameric viral. *Nature Communications*, 12: 5535. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25843-6>.

Jenkins, S.S., Gore, S., Guo, X., Liu, J., Ede, C., Veaute, X., et al. (2019) Role of the Srs2–Rad51 interaction domain in crossover Control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 212, 1133–1145. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.302337>.

Jentsch, S. and Psakhye, I. (2013) Control of nuclear activities by substrate-selective and protein-group SUMOylation. *Annual Review of Genetics*, 47, 167–186.

Jeske, H. (2009) Geminiviruses. *Current topics in microbiology and immunology*, 331, 185–226. https://doi.org/10.1007/978-3-540-70972-5_11.

Jeske, H., Lütgemeier, M. and Preiss, W. (2001) DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *The EMBO journal*, 20, 6158–6167. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6158>.

Jesús Santiago, M., Alejandro-Durán, E., Muñoz-Serrano, A. and Ruiz-Rubio, M. (2008) Two translesion synthesis DNA polymerase genes, AtPOLH and AtREV1, are involved in development and UV light resistance in *Arabidopsis*. *Journal of plant physiology*, 165, 1582–1591. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.11.012>.

Jia, Q., Liu, N., Xie, K., Dai, Y., Han, S., Zhao, X., et al. (2016) CLCuMuB β C1 subverts ubiquitination by interacting with NbSKP1s to enhance geminivirus infection in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS Pathogens*, 12, 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005668>.

Jiang, J., Kuo, Y.-W., Salem, N., Erickson, A. and Falk, B.W. (2021) Carrot mottle virus ORF4 movement protein targets plasmodesmata by interacting with the host cell SUMOylation system. *The New phytologist*, 231, 382–398. <https://doi.org/10.1111/nph.17370>.

Jiménez-Góngora, T., Tan, H. and Lozano-Durán, R. (2019) Transient overexpression of E2Fb triggers cell divisions in pavement cells of *Nicotiana benthamiana* leaves. *Plant Cell Reports*, 38, 1465–1471. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02457-3>.

Jiménez-López, D., Muñoz-Belman, F., González-Prieto, J.M., Aguilar-Hernández, V. and Guzmán, P. (2018) Repertoire of plant RING E3 ubiquitin ligases revisited: New groups counting gene families and single genes. *PLoS ONE*, 13, 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203442>.

Jiménez-Martín, A., Saugar, I., Joseph, C.R., Mayer, A., Lehmann, C.P., Szakal, B., et al. (2020) The Mgs1/WRNIP1 ATPase is required to prevent a recombination salvage pathway at damaged replication forks. *Science Advances*, 6, 3327–3335.

- Jin, J.B., Jin, Y.H., Lee, J., Miura, K., Yoo, C.Y., Kim, W.Y., et al.** (2008) The SUMO E3 ligase, AtSIZ1, regulates flowering by controlling a salicylic acid-mediated floral promotion pathway and through affects on FLC chromatin structure. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 53, 530–540. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03359.x>.
- Jmii, S. and Cappadocia, L.** (2021) Plant SUMO E3 ligases: function, structural organization, and connection with DNA. *Frontiers in plant science*, 12, 652170. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.652170>.
- Johnson, E.S.** (2004) Protein modification by SUMO. *Annual review of biochemistry*, 73, 355–382. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074118>.
- Joo, J., Choi, D.H., Lee, Y.H., Seo, H.S. and Song, S.I.** (2019) The rice SUMO conjugating enzymes OsSCE1 and OsSCE3 have opposing effects on drought stress. *Journal of plant physiology*, 240, 152993. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.152993>.
- Kaliappan, K., Choudhury, N.R., Suyal, G. and Mukherjee, S.K.** (2012) A novel role for RAD54: this host protein modulates geminiviral DNA replication. *The FASEB Journal*, 26, 1142–1160. <https://doi.org/10.1096/fj.11-188508>.
- Kamisugi, Y., Whitaker, J.W. and Cuming, A.C.** (2016) The transcriptional response to DNA double-strand breaks in *Physcomitrella patens*. *PLoS ONE*, 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161204>.
- Kanao, R. and Masutani, C.** (2017) Regulation of DNA damage tolerance in mammalian cells by post-translational modifications of PCNA. *Mutation research*, 803–805, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.06.004>.
- Kang, M., Lee, S., Abdelmageed, H., Reichert, A., Lee, H.K., Fokar, M., et al.** (2017) *Arabidopsis* stress associated protein 9 mediates biotic and abiotic stress responsive ABA signaling via the proteasome pathway. *Plant Cell and Environment*, 40, 702–716. <https://doi.org/10.1111/pce.12892>.
- Kaniecki, K., Tullio, L. De, Gibb, B., Kwon, Y., Sung, P. and Greene, E.C.** (2017) Dissociation of Rad51 Presynaptic Complexes and Heteroduplex DNA Joints by Tandem Assemblies of Srs2. *Cell Reports*, 21, 3166–3177. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.047>.
- Karpenshif, Y. and Bernstein, K.A.** (2012) From yeast to mammals: recent advances in genetic control of homologous recombination. *DNA repair*, 11, 781–788. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.07.001>.
- Karran, R.A. and Sanfaçon, H.** (2014) Tomato ringspot virus coat protein binds to ARGONAUTE 1 and suppresses the translation repression of a reporter gene. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 27, 933–943. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-14-0099-R>.
- Karras, G.I. and Jentsch, S.** (2010) The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase. *Cell*, 141, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.028>.
- Karras, G.I., Fumasoni, M., Sienski, G., Vanoli, F., Branzei, D. and Jentsch, S.** (2013) Noncanonical role of the 9-1-1 clamp in the error-free DNA damage tolerance pathway. *Molecular cell*, 49, 536–546. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.016>.

Kath, J.E., Jergic, S., Heltzel, J.M.H., Jacob, D.T., Dixon, N.E., Sutton, M.D., et al. (2014) Polymerase exchange on single DNA molecules reveals processivity clamp control of translesion synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 7647–7652. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321076111>.

Kerscher, O. (2007) SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO reports*, 8, 550–555. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400980>.

Khan, Y. A., White, K. I. and Brunger, A. (2022) The AAA+ superfamily: a review of the structural and mechanistic principles of these molecular machines. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 57(2):156-187. <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1979460>

Kil, E.J., Kim, S., Lee, Y.J., Byun, H.S., Park, J., Seo, H., et al. (2016) Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): A seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep19013>.

Kim, D.Y., Han, Y.J., Kim, S. Il, Song, J.T. and Seo, H.S. (2015) *Arabidopsis* CMT3 activity is positively regulated by AtSIZ1-mediated sumoylation. *Plant Science*, 239, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.08.003>.

Kim, E.T., Kim, Y.-E., Kim, Y.J., Lee, M.K., Hayward, G.S. and Ahn, J.H. (2014) Analysis of human cytomegalovirus-encoded SUMO targets and temporal regulation of SUMOylation of the immediate-early proteins IE1 and IE2 during infection. *PloS one*, 9, e103308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103308>.

Kim, J.Y., Song, J.T. and Seo, H.S. (2017) Post-translational modifications of *Arabidopsis* E3 SUMO ligase AtSIZ1 are controlled by environmental conditions. *FEBS Open Bio*, 7, 1622–1634. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12309>.

Kim, J.-G., Stork, W. and Mudgett, M.B. (2013) *Xanthomonas* type III effector XopD desumoylates tomato transcription factor SlERF4 to suppress ethylene responses and promote pathogen growth. *Cell host and microbe*, 13, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.01.006>.

Kim, J.G., Taylor, K.W. and Mudgett, M.B. (2011) Comparative analysis of the XopD type III secretion (T3S) effector family in plant pathogenic bacteria. *Molecular plant pathology*, 12, 715–730. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00706.x>.

Kim, S.O., Yoon, H., Park, S.O., Lee, M., Shin, J.-S., Ryu, K.-S., et al. (2012) Srs2 possesses a non-canonical PIP box in front of its SBM for precise recognition of SUMOylated PCNA. *Journal of molecular cell biology*, 4, 258–261.

Kim, S.-I., Kwak, J.S., Song, J.T. and Seo, H.S. (2016) The E3 SUMO ligase AtSIZ1 functions in seed germination in *Arabidopsis*. *Physiologia plantarum*, 158, 256–271. <https://doi.org/10.1111/ppl.12462>.

Kim, S.-I., Park, B.S., Kim, D.Y., Yeu, S.Y., Song, S.I., Song, J.T., et al. (2015) E3 SUMO ligase AtSIZ1 positively regulates SLY1-mediated GA signalling and plant development. *The Biochemical journal*, 469, 299–314. <https://doi.org/10.1042/BJ20141302>.

Kim, Y.S. (2006) Analysis of Gene Expression upon DNA Damage in *Arabidopsis*. Vol. 49.

Kimura, S., Suzuki, T., Yanagawa, Y., Yamamoto, T., Nakagawa, H., Tanaka, I., et al. (2001) Characterization of plant proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and flap endonuclease-1 (FEN-1), and their distribution in mitotic and meiotic cell cycles. *Plant Journal*, 28, 643–653.

Kirkin, V. and Dikic, I. (2007) Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling. *Current opinion in cell biology*, 19, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.002>.

Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I. and Dikic, I. (2009) A role for ubiquitin in selective autophagy. *Molecular cell*, 34, 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.026>.

Kittlmann, K., Rau, P., Gronenborn, B. and Jeske, H. (2009) Plant geminivirus Rep protein induces rereplication in fission yeast. *Journal of Virology*, 83, 6769–6778. <https://doi.org/10.1128/jvi.02491-08>.

Klein, H.L. (2001) Mutations in recombinational repair and in checkpoint control genes suppress the lethal combination of srs2Delta with other DNA repair genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 157, 557–565. <https://doi.org/10.1093/genetics/157.2.557>.

Klein, H.L. (2020) Stressed DNA replication generates stressed DNA. *Proceedings National Academy of Science U S A*, 117, 10108–10110. <https://doi.org/10.1073/pnas>.

Klug, H., Xaver, M., Chaugule, V.K., Koidl, S., Mittler, G., Klein, F., et al. (2013) Ubc9 sumoylation controls SUMO chain formation and meiotic synapsis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, 50, 625–636. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.027>.

Knipscheer, P., Flotho, A., Klug, H., Olsen, J. V., Dijk, W.J. van, Fish, A., et al. (2008) Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Molecular cell*, 31, 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.022>.

Knipscheer, P., Dijk, W.J. Van, Olsen, J. V., Mann, M. and Sixma, T.K. (2007) Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation. *EMBO Journal*, 26, 2797–2807. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601711>.

Knoll, A. and Puchta, H. (2011) The role of DNA helicases and their interaction partners in genome stability and meiotic recombination in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1565–1579.

Kodadek, T., Sikder, D. and Nalley, K. (2006) Keeping transcriptional activators under control. *Cell*, 127, 261–264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.002>.

Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U. and Jentsch, S. (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, 96, 635–644. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80574-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80574-7).

Kolesar, P., Altmannova, V., Silva, S., Lisby, M. and Krejci, L. (2016) Pro-recombination role of Srs2 protein requires SUMO (small ubiquitin-like modifier) but is independent of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 7594–7607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.685891>.

Kolesar, P., Sarangi, P., Altmannova, V., Zhao, X. and Krejci, L. (2012) Dual roles of the SUMO-interacting motif in the regulation of Srs2 sumoylation. *Nucleic Acids Research*, 40, 7831–7843. <https://doi.org/10.1093/nar/gks484>.

Komander, D. and Rape, M. (2012) The ubiquitin code. *Annual review of biochemistry*, 81, 203–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060310-170328>.

Kong, L.J., Orozco, B.M., Roe, J.L., Nagar, S., Ou, S., Feiler, H.S., et al. (2000) A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *The EMBO journal*, 19, 3485–3495. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3485>.

Kong, L.J. and Hanley-Bowdoin, L. (2002) A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase and a motor protein that display different expression patterns during plant development and infection. *Plant Cell*, 14, 1817–1832. <https://doi.org/10.1105/tpc.003681>.

Korolev, S., Yao, N., Lohman, T.M., Weber, P.C., Waksman, G. and Waksman, G. (1998) *Comparisons between the structures of HCV and Rep helicases reveal structural similarities between SF1 and SF2 super-families of helicases*. Cambridge University Press.

Kowalczykowski, S.C. (2015) An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016410>.

Kraft, C., Gmachl, M. and Peters, J.M. (2006) Methods to measure ubiquitin-dependent proteolysis mediated by the anaphase-promoting complex. *Methods (San Diego, Calif.)*, 38, 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.07.005>.

Kraft, E., Stone, S.L., Ma, L., Su, N., Gao, Y., Lau, O.-S., et al. (2005) Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 139, 1597–1611. <https://doi.org/10.1104/pp.105.067983>.

Kramarz, K., Mucha, S., Litwin, I., Barg-Wojas, A., Wysocki, R. and Dziadkowiec, D. (2017) DNA damage tolerance pathway choice through Uls1 modulation of Srs2 SUMOylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 206, 513–525. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.196568>.

Krejci, L., Macris, M., Li, Y., Komen, S. Van, Villemain, J., Ellenberger, T., et al. (2004) Role of ATP hydrolysis in the antirecombinase function of *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 23193–23199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402586200>.

Krejci, L., Komen, S. Van, Li, Y., Villemain, J., Reddy, M.S., Klein, H., et al. (2003) DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature*, 423, 305–309. <https://doi.org/10.1038/nature01577>.

Krishna, T.S., Kong, X.P., Gary, S., Burgers, P.M. and Kuriyan, J. (1994) Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell*, 79, 1233–1243. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90014-0).

Kroetz, M.B., Su, D. and Hochstrasser, M. (2009) Essential role of nuclear localization for yeast Ulp2 SUMO protease function. *Molecular biology of the cell*, 20, 2196–2206. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-10-1090>.

Ku, Y.S., Sintaha, M., Cheung, M.Y. and Lam, H.M. (2018) Plant hormone signaling crosstalks between biotic and abiotic stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 19.

- Kubori, T., Kitao, T. and Nagai, H.** (2019) Emerging insights into bacterial deubiquitinases. *Current Opinion in Microbiology*, 47, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.10.001>.
- Kubota, T., Katou, Y., Nakato, R., Shirahige, K. and Donaldson, A.D.** (2015) Replication-coupled PCNA unloading by the Elg1 complex occurs genome-wide and requires Okazaki fragment ligation. *Cell reports*, 12, 774–787. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.066>.
- Kumar, R.V.** (2019) Plant antiviral immunity against geminiviruses and viral counter-defense for survival. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Kumar, R.V.** (2019) Geminiviruses. Impact, challenges and approaches. Springer international publishing.
- Kumar, R., González-Prieto, R., Xiao, Z., Verlaan-de Vries, M. and Vertegaal, A.C.O.** (2017) The STUbL RNF4 regulates protein group SUMOylation by targeting the SUMO conjugation machinery. *Nature communications*, 8, 1809. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01900-x>.
- Kumar, R., Mehta, D., Mishra, N., Nayak, D. and Sunil, S.** (2021) Role of host-mediated post-translational modifications (PTMS) in RNA virus pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms22010323>.
- Kunz, K., Piller, T. and Müller, S.** (2018) SUMO-specific proteases and isopeptidases of the SENP family at a glance. *Journal of Cell Science*, 131. <https://doi.org/10.1242/jcs.211904>.
- Kurepa, J., Walker, J.M., Smalle, J., Gosink, M.M., Davis, S.J., Durham, T.L., et al.** (2003) The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. Accumulation of SUMO1 and SUMO-2 conjugates is increased by stress. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 6862–6872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209694200>.
- Kushwaha, N.K., Bhardwaj, M. and Chakraborty, S.** (2017) The replication initiator protein of a geminivirus interacts with host monoubiquitination machinery and stimulates transcription of the viral genome. *PLoS Pathogens*, 13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006587>.
- Kwak, J.S., Son, G.H., Kim, S.-I., Song, J.T. and Seo, H.S.** (2016) *Arabidopsis* HIGH PLOIDY2 sumoylates and stabilizes flowering locus C through its E3 ligase activity. *Frontiers in plant science*, 7, 530. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00530>.
- Lageix, S., Catrice, O., Deragon, J.-M., Gronenborn, B., Pélissier, T. and Ramírez, B.C.** (2007) The nanovirus-encoded Clink protein affects plant cell cycle regulation through interaction with the retinoblastoma-related protein. *Journal of virology*, 81, 4177–4185. <https://doi.org/10.1128/JVI.02103-06>.
- Lai, J., Chen, H., Teng, K., Zhao, Q., Zhang, Z., Li, Y., et al.** (2009) RKP, a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 57, 905–917. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03737.x>.
- Lambert, S. and Carr, A.M.** (2013) Replication stress and genome rearrangements: lessons from yeast models. *Current opinion in genetics and development*, 23, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.11.009>.

- Lamoliatte, F., McManus, F.P., Maarifi, G., Chelbi-Alix, M.K. and Thibault, P.** (2017) Uncovering the SUMOylation and ubiquitylation crosstalk in human cells using sequential peptide immunopurification. *Nature communications*, 8, 14109. <https://doi.org/10.1038/ncomms14109>.
- Lancey, C., Tehseen, M., Bakshi, S., Percival, M., Takahashi, M., Sobhy, M.A., et al.** (2021) Cryo-EM structure of human Pol κ bound to DNA and mono-ubiquitylated PCNA. *Nature communications*, 12, 6095. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26251-6>.
- Lanet, E., Delannoy, E., Sormani, R., Floris, M., Brodersen, P., Cr  t  , P., et al.** (2009) Biochemical evidence for translational repression by *Arabidopsis* microRNAs. *The Plant cell*, 21, 1762–1768. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063412>.
- Langston, L.D. and O'Donnell, M.** (2006) DNA replication: keep moving and don't mind the gap. *Molecular Cell*, 23, 155–160.
- Lascorz, J., Codina-Fabra, J., Reverter, D. and Torres-Rosell, J.** (2021) SUMO-SIM interactions: From structure to biological functions. *Seminars in cell and developmental biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.11.007>.
- Lau, O.S. and Deng, X.W.** (2012) The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends in plant science*, 17, 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.004>.
- Lau, W.C.Y., Li, Y., Zhang, Q. and Huen, M.S.Y.** (2015) Molecular architecture of the Ub-PCNA/Pol ν complex bound to DNA. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep15759>.
- Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, V., Rogers, S.G., Schell, J., et al.** (1995) In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of Tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 3879–3883. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.9.3879>.
- Lauring, A.S. and Andino, R.** (2010) Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS pathogens*, 6, e1001005. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001005>.
- Lawrence, C.W. and Christensen, R.B.** (1979) Metabolic suppressors of trimethoprim and ultraviolet light sensitivities of *Saccharomyces cerevisiae* rad6 mutants. *Journal of bacteriology*, 139, 866–876. <https://doi.org/10.1128/jb.139.3.866-876.1979>.
- Lazarowitz, S.G. and Beachy, R.N.** (1999) Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *The Plant cell*, 11, 535–548. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.535>.
- Breton, C. Le, Dupaigne, P., Robert, T., Cam, E. Le, Gangloff, S., Fabre, F., et al.** (2008) Srs2 removes deadly recombination intermediates independently of its interaction with SUMO-modified PCNA. *Nucleic Acids Research*, 36, 4964–4974. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn441>.
- Roux, M.L. le, Kunert, K.J., Vyver, C. van der, Cullis, C.A. and Botha, A.M.** (2019) Expression of a small ubiquitin-like modifier protease increases drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00266>.

- Leach, C.A. and Michael, W.M.** (2005) Ubiquitin/SUMO modification of PCNA promotes replication fork progression in *Xenopus laevis* egg extracts. *Journal of Cell Biology*, 171, 947–954. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508100>.
- Lee, C.P., Liu, G.-T., Kung, H.-N., Liu, P.-T., Liao, Y.-T., Chow, L.-P., et al.** (2016) The ubiquitin ligase itch and ubiquitination regulate BFRF1-mediated nuclear envelope modification for Epstein-Barr virus maturation. *Journal of virology*, 90, 8994–9007. <https://doi.org/10.1128/JVI.01235-16>.
- Lee, J.Y. and Yang, W.** (2006) UvrD helicase unwinds DNA one base pair at a time by a two-part power stroke. *Cell*, 127, 1349–1360. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.049>.
- Lee, J., Miura, K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Yun, D.J.** (2007) Regulation of plant innate immunity by SUMO E3 ligase. *Plant signaling and behavior*, 2, 253–254. <https://doi.org/10.4161/psb.2.4.3867>.
- Lefevre, P., Lett, J.-M., Varsani, A. and Martin, D.P.** (2009) Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *Journal of virology*, 83, 2697–2707. <https://doi.org/10.1128/JVI.02152-08>.
- Lefevre, P., Martin, D.P., Hoareau, M., Naze, F., Delatte, H., Thierry, M., et al.** (2007) Begomovirus “melting pot” in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. *The Journal of general virology*, 88, 3458–3468. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83252-0>.
- Lefevre, P., Harkins, G.W., Lett, J.-M., Briddon, R.W., Chase, M.W., Moury, B., et al.** (2011) Evolutionary time-scale of the begomoviruses: evidence from integrated sequences in the *Nicotiana* genome. *PLoS one*, 6, e19193. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019193>.
- Lefevre, P. and Moriones, E.** (2015) Recombination as a motor of host switches and virus emergence: Geminiviruses as case studies. *Current Opinion in Virology*, 10, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.12.005>.
- Lefort, S. and Flamand, L.** (2009) Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus K-bZIP protein is necessary for lytic viral gene expression, DNA replication, and virion production in primary effusion lymphoma cell lines. *Journal of virology*, 83, 5869–5880. <https://doi.org/10.1128/JVI.01821-08>.
- Lefort, S., Gravel, A. and Flamand, L.** (2010) Repression of interferon- α stimulated genes expression by Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus K-bZIP protein. *Virology*, 408, 14–30. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.027>.
- Lehmann, A.R., Niimi, A., Ogi, T., Brown, S., Sabbioneda, S., Wing, J.F., et al.** (2007) Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA repair*, 6, 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.02.003>.
- Lehmann, C.P., Jiménez-Martín, A., Branzei, D. and Tercero, J.A.** (2020) Prevention of unwanted recombination at damaged replication forks. *Current genetics*, 66, 1045–1051. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01095-7>.
- Lett, J.M., Lefevre, P., Couston, L., Hoareau, M., Thierry, M., Reynaud, B., et al.** (2009) Complete genomic sequences of Tomato yellow leaf curl Mali virus isolates infecting tomato

and pepper from the North Province of Cameroon. *Archives of virology*, 154, 535–540. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0313-0>.

Leung, W., Baxley, R.M., Moldovan, G.L. and Bielinsky, A.K. (2019) Mechanisms of DNA damage tolerance: post-translational regulation of PCNA. *Genes*, 10.

Li, B., Lu, D. and Shan, L. (2014) Ubiquitination of pattern recognition receptors in plant innate immunity. *Molecular plant pathology*, 15, 737–746. <https://doi.org/10.1111/mpp.12128>.

Li, F. and Wang, A. (2019) RNA-targeted antiviral Immunity: More than just RNA silencing. *Trends in microbiology*, 27, 792–805. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.05.007>.

Li, F., Xu, X., Li, Z., Wang, Y. and Zhou, X. (2020) Identification of yeast factors involved in the replication of Mungbean yellow mosaic India virus using yeast temperature-sensitive mutants. *Virologica Sinica*, 35, 120–123.

Li, F., Yang, X., Bisaro, D.M. and Zhou, X. (2018) The β C1 protein of geminivirus–betasatellite complexes: a target and repressor of host defenses. *Molecular Plant*, 11, 1424–1426. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.10.007>.

Li, H., Li, Y., Deng, H., Sun, X., Wang, A., Tang, X., et al. (2018) Tomato UV-B receptor SIUVR8 mediates plant acclimation to UV-B radiation and enhances fruit chloroplast development via regulating SIGLK2. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24309-y>.

Li, J., Chai, Q.Y. and Liu, C.H. (2016) The ubiquitin system: A critical regulator of innate immunity and pathogen-host interactions. *Cellular and Molecular Immunology*, 13, 560–576. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.40>.

Li, P., Su, F., Meng, Q., Yu, H., Wu, G., Li, M., et al. (2021) The C5 protein encoded by Ageratum leaf curl Sichuan virus is a virulence factor and contributes to the virus infection. *Molecular plant pathology*, 22, 1149–1158. <https://doi.org/10.1111/mpp.13103>.

Li, R., Wang, L., Liao, G., Guzzo, C.M., Matunis, M.J., Zhu, H., et al. (2012) SUMO binding by the Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 is crucial for BGLF4 function. *Journal of virology*, 86, 5412–5421. <https://doi.org/10.1128/JVI.00314-12>.

Li, S.J. and Hochstrasser, M. (1999) A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature*, 398, 246–251. <https://doi.org/10.1038/18457>.

Li, S.J. and Hochstrasser, M. (2000) The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Molecular and cellular biology*, 20, 2367–2377. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.7.2367-2377.2000>.

Li, S., Lin, Mengmeng, Wang, J., Zhang, L., Lin, Meijing, Hu, Z., et al. (2019) Regulation of soybean SUMOylation system in response to *Phytophthora sojae* infection and heat shock. *Plant Growth Regulation*, 87, 69–82. <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0452-y>.

Li, S.J. and Hochstrasser, M. (2003) The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity. *The Journal of cell biology*, 160, 1069–1081. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212052>.

- Li, X., Clarke, J.D., Zhang, Y. and Dong, X.** (2001) Activation of an EDS1-mediated R-gene pathway in the *snc1* mutant leads to constitutive, NPR1-independent pathogen resistance. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 14, 1131–1139. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.10.1131>.
- Li, Y.J., Stark, J.M., Chen, D.J., Ann, D.K., and Chen, Y.** (2014) Role of SUMO:SIM-mediated protein–protein interaction in non-homologous end joining. *Oncogene*, 29, 3509–3518. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.108>.
- Li, Y., Wang, G., Xu, Z., Li, J., Sun, M., Guo, J., et al.** (2017) Organization and regulation of soybean SUMOylation system under abiotic stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01458>.
- Li, Z., Du, Z., Tang, Y., She, X., Wang, X., Zhu, Y., et al.** (2020) C4, the pathogenic determinant of Tomato leaf curl guangdong virus, may suppress post-transcriptional gene silencing by interacting with BAM1 protein. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00851>.
- Liang, Y.C., Lee, C.C., Yao, Y.L., Lai, C.C., Schmitz, M.L. and Yang, W.M.** (2016) SUMO5, a novel poly-SUMO isoform, regulates PML nuclear bodies. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep26509>.
- Liang, Z., Diamond, M., Smith, J.A., Schnell, M. and Daniel, R.** (2011) Proliferating cell nuclear antigen is required for loading of the SMCX/KMD5C histone demethylase onto chromatin. *Epigenetics and chromatin*, 4, 18. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-4-18>.
- Liberi, G., Chiolo, I., Pellicoli, A., Lopes, M., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., et al.** (2000) Srs2 DNA helicase is involved in checkpoint response and its regulation requires a functional Mec1-dependent pathway and Cdk1 activity. *The EMBO journal*, 19, 5027–5038. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.18.5027>.
- Liebelt, F. and Vertegaal, A.C.O.** (2016) Ubiquitin-dependent and independent roles of SUMO in proteostasis. *American journal of physiology. Cell physiology*, 311, C284–96. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00091.2016>.
- Lim, Y.-J., Kim, K.-T. and Lee, Y.-H.** (2018) SUMOylation is required for fungal development and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular plant pathology*, 19, 2134–2148. <https://doi.org/10.1111/mpp.12687>.
- Lima, A.T.M., Silva, J.C.F., Silva, F.N., Castillo-Urquiza, G.P., Silva, F.F., Seah, Y.M., et al.** (2017) The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics. *Virus evolution*, 3, vex005. <https://doi.org/10.1093/ve/vex005>.
- Lima, A.T.M., Sobrinho, R.R., González-Aguilera, J., Rocha, C.S., Silva, S.J.C., Xavier, C.A.D., et al.** (2013) Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. *The Journal of general virology*, 94, 418–431. <https://doi.org/10.1099/vir.0.047241-0>.
- Lin, X.-L., Niu, D., Hu, Z.-L., Kim, D.H., Jin, Y.H., Cai, B., et al.** (2016) An *Arabidopsis* SUMO E3 ligase, SIZ1, negatively regulates photomorphogenesis by promoting COP1 activity. *PLoS genetics*, 12, e1006016. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006016>.

Lin, X., Sun, R., Zhang, F., Gao, Y., Bin, L. and Lan, K. (2017) The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibits expression of SUMO/sentrin-specific peptidase 6 to facilitate establishment of latency. *Journal of virology*, 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.00806-17>.

Lin, Y.H. and Machner, M.P. (2017) Exploitation of the host cell ubiquitin machinery by microbial effector proteins. *Journal of Cell Science*, 130, 1985–1996.

Ling, Q., Broad, W., Trösch, R., Töpel, M., Sert, T.D., Lymperopoulos, P., et al. (2019) Ubiquitin-dependent chloroplast-associated protein degradation in plants. *Science*, 363. <https://doi.org/10.1126/science.aav4467>.

Ling, Y., Zhang, C., Chen, T., Hao, H., Liu, P., Bressan, R.A., et al. (2012) Mutation in SUMO E3 ligase, SIZ1, disrupts the mature female gametophyte in *Arabidopsis*. *PloS one*, 7, e29470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029470>.

Linnik, O., Liesche, J., Tilsner, J. and Oparka, K.J. (2013) Unraveling the structure of viral replication complexes at super-resolution. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00006>.

Liptay, M., Barbosa, J.S. and Rottenberg, S. (2020) Replication fork remodeling and therapy escape in DNA damage response-deficient cancers. *Frontiers in Oncology*, 10.

Liu, B., Maria Lois, L. and Reverter, D. (2019) Structural insights into SUMO E1–E2 interactions in *Arabidopsis* uncovers a distinctive platform for securing SUMO conjugation specificity across evolution. *Biochemical Journal*, 476, 2127–2139. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190232>.

Liu, F.-Y., Liu, Y.-F., Yang, Y., Luo, Z.-W., Xiang, J.-W., Chen, Z.-G., et al. (2017) SUMOylation in Neurological Diseases. *Current molecular medicine*, 16, 893–899. <https://doi.org/10.2174/1566524017666170109125256>.

Liu, J., Ede, C., Wright, W.D., Gore, S.K., Jenkins, S.S., Freudenthal, B.D., et al. (2017) Srs2 promotes synthesis-dependent strand annealing by disrupting DNA polymerase d-extending D-loops. *eLife*, 6, 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.22195>.

Liu, J., Renault, L., Veaute, X., Fabre, F., Stahlberg, H. and Heyer, W.D. (2011) Rad51 paralogues Rad55–Rad57 balance the antirecombinase Srs2 in Rad51 filament formation. *Nature*, 479, 245–248. <https://doi.org/10.1038/nature10522>.

Liu, J., Qian, C. and Cao, X. (2016) Post-Translational Modification Control of Innate Immunity. *Immunity*, 45, 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.020>.

Liu, L., Pinner, M.S., Davies, J.W. and Stanley, J. (1999) Adaptation of the geminivirus bean yellow dwarf virus to dicotyledonous hosts involves both virion-sense and complementary-sense genes. *The Journal of general virology*, 80 (Pt 2), 501–506. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-501>.

Liu, L., Tonder, T. van, Pietersen, G., Davies, J.W. and Stanley, J. (1997) Molecular characterization of a subgroup I geminivirus from a legume in South Africa. *The Journal of general virology*, 78 (Pt 8), 2113–2117. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-8-2113>.

- Liu, W., Tang, X., Qi, X., Fu, X., Ghimire, S., Ma, R., et al.** (2020) The ubiquitin conjugating enzyme: An important ubiquitin transfer platform in ubiquitin-proteasome system. *International Journal of Molecular Sciences*, 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21082894>.
- Liu, X., Huang, W., Zhai, Z., Ye, T., Yang, C. and Lai, J.** (2021) Protein modification: A critical modulator in the interaction between geminiviruses and host plants. *Plant Cell and Environment*, 44, 1707–1715. <https://doi.org/10.1111/pce.14008>.
- Liu, Y., Jin, W., Wang, L. and Wang, X.** (2014) Replication-associated proteins encoded by Wheat dwarf virus act as RNA silencing suppressors. *Virus research*, 190, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.014>.
- Liu, Y., Zhu, J., Sun, S., Cui, F., Han, Y., Peng, Z., et al.** (2019) Defining the function of SUMO system in pod development and abiotic stresses in Peanut. *BMC Plant Biology*, 19. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2136-9>.
- Liu, Z. Bin, Wang, J.M., Yang, F.X., Yang, L., Yue, Y.F., Xiang, J.B., et al.** (2014) A novel membrane-bound E3 ubiquitin ligase enhances the thermal resistance in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 12, 93–104. <https://doi.org/10.1111/pbi.12120>.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lois, L.M.** (2010) Diversity of the SUMOylation machinery in plants. *Biochemical Society Transactions*, 38, 60–64.
- Lois, L.M. and Lima, C.D.** (2005) Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1. *The EMBO journal*, 24, 439–451. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600552>.
- Lois, L.M., Lima, C.D. and Chua, N.-H.** (2003) Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 15, 1347–1359. <https://doi.org/10.1105/tpc.009902>.
- López-Torrejón, G., Guerra, D., Catalá, R., Salinas, J. and Pozo, J.C. Del** (2013) Identification of SUMO targets by a novel proteomic approach in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55, 96–107. <https://doi.org/10.1111/jipb.12012>.
- Lorenz, A., Osman, F., Folkyte, V., Sofueva, S. and Whitby, M.C.** (2009) Fbh1 limits Rad51-dependent recombination at blocked replication forks. *Molecular and Cellular Biology*, 29, 4742–4756. <https://doi.org/10.1128/mcb.00471-09>.
- Loriato, V.A.P., Martins, L.G.C., Euclides, N.C., Reis, P.A.B., Duarte, C.E.M. and Fontes, E.P.B.** (2020) Engineering resistance against geminiviruses: A review of suppressed natural defenses and the use of RNAi and the CRISPR/Cas system. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, 292, 110410. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110410>.
- Lork, M., Lieber, G. and Hale, B.G.** (2021) Proteomic approaches to dissect host sumoylation during innate antiviral immune responses. *Viruses*, 13. <https://doi.org/10.3390/v13030528>.

Lowrey, A.J., Cramblet, W. and Bentz, G.L. (2017) Viral manipulation of the cellular sumoylation machinery. *Cell Communication and Signaling*, 15.

Lozano, G., Trenado, H.P., Fiallo-Olivé, E., Chirinos, D., Geraud-Pouey, F., Briddon, R.W., et al. (2016) Characterization of non-coding DNA satellites associated with Sweepoviruses (genus *Begomovirus*, *Geminiviridae*) - definition of a distinct class of begomovirus-associated satellites. *Frontiers in microbiology*, 7, 162. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00162>.

Lozano-Duran, R. and Bejarano, E.R. (2011) Geminivirus C2 protein might be the key player for geminiviral co-option of SCF-mediated ubiquitination. *Plant Signaling and Behavior*, 6, 999–1001. <https://doi.org/10.4161/psb.6.7.15499>.

Lozano-Durán, R., Rosas-Díaz, T., Gusmaroli, G., Luna, A.P., Taconnat, L., Deng, X.W., et al. (2011) Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated derubylation of SCF E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 23, 1014–1032. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080267>.

Lu, C.H., Yeh, H.Y., Su, G.C., Ito, K., Kurokawa, Y., Iwasaki, H., et al. (2018) Swi5-Sfr1 stimulates Rad51 recombinase filament assembly by modulating Rad51 dissociation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, E10059–E10068. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812753115>.

Luna, A.P. and Lozano-Durán, R. (2020) Geminivirus-Encoded Proteins: Not All Positional Homologs Are Made Equal. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00878>.

Luna, A.P., Rodríguez-Negrete, E.A., Morilla, G., Wang, L., Lozano-Durán, R., Castillo, A.G., et al. (2017) V2 from a curtovirus is a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *Journal of General Virology*, 98, 2607–2614. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000933>.

Luna, A.P., Morilla, G., Voinnet, O. and Bejarano, E.R. (2012) Functional analysis of gene-silencing suppressors from tomato yellow leaf curl disease viruses. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 25, 1294–1306. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-12-0094-R>.

Luque, A., Sanz-Burgos, A.P., Ramirez-Parra, E., Castellano, M.M. and Gutierrez, C. (2002) Interaction of geminivirus Rep protein with replication factor C and its potential role during geminivirus DNA replication. *Virology*, 302, 83–94. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1599>.

Lydeard, J.R., Jain, S., Yamaguchi, M. and Haber, J.E. (2007) Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32. *Nature*, 448, 820–823. <https://doi.org/10.1038/nature06047>.

Lytle, A.K., Origanti, S.S., Qiu, Y., VonGermeten, J., Myong, S. and Antony, E. (2014) Context-dependent remodeling of Rad51-DNA complexes by Srs2 is mediated by a specific protein-protein interaction. *Journal of molecular biology*, 426, 1883–1897. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.02.014>.

Lyzenga, W.J. and Stone, S.L. (2012) Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination. *Journal of Experimental Botany*, 63, 599–616.

Ma, E., Dupaigne, P., Maloisel, L., Guerois, R., Cam, E. Le and Coïc, E. (2018) Rad52-Rad51 association is essential to protect Rad51 filaments against Srs2, but facultative for filament formation. *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.32744>.

Ma, E., Maloisel, L., Falher, L. Le, Guérois, R. and Coïc, E. (2021) Rad52 oligomeric N-terminal domain stabilizes Rad51 nucleoprotein filaments and contributes to their protection against Srs2. *Cells*, 10. <https://doi.org/10.3390/cells10061467>.

Ma, X., Nicole, M.-C., Meteignier, L.-V., Hong, N., Wang, G. and Moffett, P. (2015) Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants. *Journal of experimental botany*, 66, 919–932. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru447>.

Macedo, M.A., Albuquerque, L.C., Maliano, M.R., Souza, J.O., Rojas, M.R., Inoue-Nagata, A.K., et al. (2018) Characterization of tomato leaf curl purple vein virus, a new monopartite New World begomovirus infecting tomato in Northeast Brazil. *Archives of virology*, 163, 737–743. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3662-0>.

Macho, A.P. and Zipfel, C. (2014) Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular cell*, 54, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.028>.

Madu, I.G., Li, S., Li, B., Li, H., Chang, T., Li, Y.-J., et al. (2015) A novel class of HIV-1 antiviral agents targeting HIV via a SUMOylation-dependent mechanism. *Scientific reports*, 5, 17808. <https://doi.org/10.1038/srep17808>.

Maeda, A., Lee, B.H., Yoshimatsu, K., Saijo, M., Kurane, I., Arikawa, J., et al. (2003) The intracellular association of the nucleocapsid protein (NP) of hantaan virus (HTNV) with small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) conjugating enzyme 9 (Ubc9). *Virology*, 305, 288–297. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1767>.

Maga, G. and Hübscher, U. (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A dancer with many partners. *Journal of Cell Science*, 116, 3051–3060.

Magori, S. and Citovsky, V. (2011) Hijacking of the host SCF ubiquitin ligase machinery by plant pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 2.

Mailand, N., Gibbs-Seymour, I. and Bekker-Jensen, S. (2013) Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 269–282.

Maio, F., Arroyo-Mateos, M., Bobay, B.G., Bejarano, E.R., Prins, M. and van den Burg, H.A. (2019) A lysine residue essential for Geminivirus replication also controls nuclear localization of the Tomato yellow leaf curl virus Rep protein. *Journal of Virology*, 93, 1–22. <https://doi.org/10.1128/jvi.01910-18>.

Majka, J. and Burgers, P.M.J. (2004) The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 78, 227–260. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(04\)78006-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(04)78006-X).

Malathi, V.G. and Renuka Devi, P. (2019) ssDNA viruses: key players in global virome. *VirusDisease*, 30, 3–12. <https://doi.org/10.1007/s13337-019-00519-4>.

Malik, P.S., Kumar, V., Bagewadi, B. and Mukherjee, S.K. (2005) Interaction between coat protein and replication initiation protein of Mung bean yellow mosaic India virus might lead to control of viral DNA replication. *Virology*, 337, 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.04.030>.

Malkova, A. and Ira, G. (2013) Break-induced replication: functions and molecular mechanism. *Current opinion in genetics and development*, 23, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.05.007>.

Mandahar, C.L. (2006) Multiplication of RNA plant viruses. Springer.

Mandal, A., Sarkar, D., Kundu, S. and Kundu, P. (2015) Mechanism of regulation of tomato TRN1 gene expression in late infection with tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV). *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 241, 221–237. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.10.008>.

Mandal, A., Sharma, N., Muthamilarasan, M. and Prasad, M. (2018) Ubiquitination: a tool for plant adaptation to changing environments. *Nucleus (India)*, 61, 253–260.

Mangwende, T., Wang, M.L., Borth, W., Hu, J., Moore, P.H., Mirkov, T.E., et al. (2009) The P0 gene of Sugarcane yellow leaf virus encodes an RNA silencing suppressor with unique activities. *Virology*, 384, 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.10.034>.

Manova, V. and Gruszka, D. (2015) DNA damage and repair in plants – From models to crops. *Frontiers in Plant Science*, 6.

Mansi, Kushwaha, N.K., Singh, A.K., Karim, M.J. and Chakraborty, S. (2019) *Nicotiana benthamiana* phosphatidylinositol 4-kinase type II regulates chilli leaf curl virus pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, 20, 1408–1424. <https://doi.org/10.1111/mpp.12846>.

Mansoor, S., Briddon, R.W., Zafar, Y. and Stanley, J. (2003) Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends in plant science*, 8, 128–134. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00007-4).

Mar, T.B., Mendes, I.R., Lau, D., Fiallo-Olivé, E., Navas-Castillo, J., Alves, M.S., et al. (2017) Interaction between the New World begomovirus Euphorbia yellow mosaic virus and its associated alphavirus: effects on infection and transmission by the whitefly *Bemisia tabaci*. *The Journal of general virology*, 98, 1552–1562. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000814>.

March, E. and Farrona, S. (2018) Splant deubiquitinases and their role in the control of gene expression through modification of histones. *Frontiers in Plant Science*, 8.

Marín, I. (2010) Diversification and specialization of plant RBR ubiquitin ligases. *PLoS ONE*, 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011579>.

Marini, V. and Krejci, L. (2012) Unwinding of synthetic replication and recombination substrates by Srs2. *DNA repair*, 11, 789–798. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.05.007>.

Marini, V. and Krejci, L. (2010) Srs2: The “Odd-Job Man” in DNA repair. *DNA Repair*, 9, 268–275.

Marino, D., Peeters, N. and Rivas, S. (2012) Ubiquitination during plant immune signaling. *Plant Physiology*, 160, 15–27. <https://doi.org/10.1104/pp.112.199281>.

Markmann-Mulisch, U., Hadi, M.Z., Koepchen, K., Alonso, J.C., Russo, V.E.A., Schell, J., et al. (2002) The organization of *Physcomitrella patens* RAD51 genes is unique among eukaryotic organisms. *Genetics*, 99, 2959–2964.

Martin, D.P., Lefeuvre, P., Varsani, A., Hoareau, M., Semegni, J.Y., Dijoux, B., et al. (2011) Complex recombination patterns arising during geminivirus coinfections preserve and demarcate biologically important intra-genome interaction networks. *PLoS Pathogens*, 7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002203>.

Martín, V., Chahwan, C., Gao, H., Blais, V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., et al. (2006) Sws1 is a conserved regulator of homologous recombination in eukaryotic cells. *EMBO Journal*, 25, 2564–2574. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601141>.

Martino, J. and Bernstein, K.A. (2016) The Shu complex is a conserved regulator of homologous recombination. *FEMS yeast research*, 16. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow073>.

Martín-Rufo, R., la Vega-Barranco, G. de and Lecona, E. (2022) Ubiquitin and SUMO as timers during DNA replication. *Seminars in cell and developmental biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.02.013>.

Martins, L.G.C., Raimundo, G.A.S., Ribeiro, N.G.A., Silva, J.C.F., Euclides, N.C., Loriato, V.A.P., et al. (2020) A Begomovirus nuclear shuttle protein-interacting immune hub: Hijacking host transport activities and suppressing incompatible functions. *Frontiers in Plant Science*, 11.

Marwal, A; Prajapat, R; Sahu, A; and Gaur, R.K. (2012) In silico recombination analysis: A study for geminivirus host mobility. *Asian Journal of Biological Sciences*, 5(1), 1–8.

Masclé, X.H., Lussier-Price, M., Cappadocia, L., Estephan, P., Raiola, L., Omichinski, J.G., et al. (2013) Identification of a non-covalent ternary complex formed by PIAS1, SUMO1, and UBC9 proteins involved in transcriptional regulation. *The Journal of biological chemistry*, 288, 36312–36327. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.486845>.

Mathiasen, D.P. and Lisby, M. (2014) Cell cycle regulation of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 38, 172–184.

Mathieu, J., Schwizer, S. and Martin, G.B. (2014) Pto kinase binds two domains of AvrPtoB and its proximity to the effector E3 ligase determines if it evades degradation and activates plant immunity. *PLoS Pathogens*, 10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004227>.

Matsuzaki, K., Kondo, S., Ishikawa, T. and Shinohara, A. (2019) Human RAD51 paralogue SWSAP1 fosters RAD51 filament by regulating the anti-recombinase FIGL1 AAA+ ATPase. *Nature Communications*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09190-1>.

Matzke, M.A. and Mosher, R.A. (2014) RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics*, 15, 394–408. <https://doi.org/10.1038/nrg3683>.

Mazur, M.J., Kwaaitaal, M., Mateos, M.A., Maio, F., Kini, R.K., Prins, M., et al. (2019) The SUMO conjugation complex self-assembles into nuclear bodies independent of SIZ1 and COP1. *Plant Physiology*, 179, 168–183. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00910>.

Mazur, M.J., Spears, B.J., Djajasaputra, A., Gragt, M. Van Der, Vlachakis, G., Beerens, B., et al. (2017) *Arabidopsis* TCP transcription factors interact with the SUMO conjugating machinery in nuclear foci. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02043>.

McVey, M., Khodaverdian, V.Y., Meyer, D., Cerqueira, P.G. and Heyer, W.-D. (2016) Eukaryotic DNA polymerases in homologous recombination. *Annual review of genetics*, 50, 393–421. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035243>.

Medina-Puche, L., Orílio, A.F., Zerbini, F.M. and Lozano-Durán, R. (2021) Small but mighty: Functional landscape of the versatile geminivirus-encoded C4 protein. *PLoS pathogens*, 17, e1009915. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009915>.

Mei, Y., Wang, Y., Hu, T., Yang, X., Lozano-Duran, R., Sunter, G., et al. (2018) Nucleocytoplasmic shuttling of Geminivirus C4 protein mediated by phosphorylation and myristoylation is critical for viral pathogenicity. *Molecular Plant*, 11, 1466–1481. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.10.004>.

Mei, Y., Zhang, F., Wang, M., Li, F., Wang, Y. and Zhou, X. (2020) Divergent symptoms caused by Geminivirus-encoded C4 proteins correlate with their ability to bind NbSK η . *Journal of Virology*, 94. <https://doi.org/10.1128/jvi.01307-20>.

Meir, A. and Greene, E.C. (2021) Srs2 and Pif1 as Model Systems for Understanding Sfla and Sflb Helicase Structure and Function. *Genes*, 12(9), 131.

Meister, G. and Tuschl, T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431, 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature02873>.

Meister, P., Taddei, A., Ponti, A., Baldacci, G. and Gasser, S.M. (2007) Replication foci dynamics: Replication patterns are modulated by S-phase checkpoint kinases in fission yeast. *EMBO Journal*, 26, 1315–1326. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601538>.

Melchior, F. (2000) SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annual review of cell and developmental biology*, 16, 591–626. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.591>.

Melgarejo, T.A., Kon, T., Rojas, M.R., Paz-Carrasco, L., Zerbini, F.M. and Gilbertson, R.L. (2013) Characterization of a new world monopartite Begomovirus Causing leaf curl disease of tomato in Ecuador and Peru reveals a new direction in Geminivirus evolution. *Journal of Virology*, 87, 5397–5413. <https://doi.org/10.1128/jvi.00234-13>.

Mencía, M. and De Lorenzo, V. (2004) Functional transplantation of the sumoylation machinery into *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 37, 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.07.001>.

Menéndez-arias, L. (2007) Antiviral drug discovery and development.

Wu, M., Wei, H., Tan, H., Pan., S, Liu, Q., Bejarano, E.R., Lozano-Duran R. (2021) Plant DNA polymerases alpha and delta mediate replication of geminiviruses. *Nat Commun*, 12(1):2780. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23013-2>.

Michelle, C., Vourc'h, P., Mignon, L. and Andres, C.R. (2009) What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *Journal of molecular evolution*, 68, 616–628. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9225-6>.

- Miller, M.J., Barrett-Wilt, G.A., Hua, Z. and Vierstra, R.D.** (2010) Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 16512–16517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004181107>.
- Miller, M.J., Scalf, M., Rytz, T.C., Hubler, S.L., Smith, L.M. and Vierstra, R.D.** (2013) Quantitative proteomics reveals factors regulating RNA biology as dynamic targets of stress-induced SUMOylation in *Arabidopsis*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12, 449–463. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.025056>.
- Mills-Lujan, K. and Deom, C.M.** (2010) Geminivirus C4 protein alters *Arabidopsis* development. *Protoplasma*, 239, 95–110. <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0086-z>.
- Milne, G.T., Ho, T. and Weaver, D.T.** (1995) Modulation of *Saccharomyces cerevisiae* DNA double-strand break repair by SRS2 and RAD51. *Genetics*, 139, 1189–1199.
- Minca, E.C. and Kowalski, D.** (2010) Multiple Rad5 activities mediate sister chromatid recombination to bypass DNA damage at stalled replication forks. *Molecular cell*, 38, 649–661. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.020>.
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M. and Caput, D.** (2000) Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *The Journal of biological chemistry*, 275, 36316–36323. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004293200>.
- Miricescu, A., Goslin, K. and Graciet, E.** (2018) Ubiquitylation in plants: Signaling hub for the integration of environmental signals. *Journal of Experimental Botany*, 69, 4511–4527. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery165>.
- Mishra, N., Sun, L., Zhu, X., Smith, J., Prakash Srivastava, A., Yang, X., et al.** (2017) Overexpression of the rice SUMO E3 ligase gene OsSIZ1 in cotton enhances drought and heat tolerance, and substantially improves fiber yields in the field under reduced irrigation and rainfed conditions. *Plant and cell physiology*, 58, 735–746. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx032>.
- Mitchel, K., Lehner, K. and Jinks-Robertson, S.** (2013) Heteroduplex DNA position defines the roles of the Sgs1, Srs2, and Mph1 helicases in promoting distinct recombination outcomes. *PLoS genetics*, 9, e1003340. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003340>.
- Miura, K., Jin, J.B. and Hasegawa, P.M.** (2007) Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants. *Current opinion in plant biology*, 10, 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.07.002>.
- Miura, K., Lee, J., Gong, Q., Ma, S., Jin, J.B., Yoo, C.Y., et al.** (2011) SIZ1 Regulation of phosphate starvation-induced root architecture remodeling involves the control of auxin accumulation. *Plant Physiology*, 155, 1000–1012. <https://doi.org/10.1104/pp.110.165191>.
- Miura, K., Lee, J., Miura, T. and Hasegawa, P.M.** (2010) SIZ1 controls cell growth and plant development in *Arabidopsis* through salicylic acid. *Plant and cell physiology*, 51, 103–113. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp171>.
- Miura, K., Renhu, N. and Suzaki, T.** (2020) The PHD finger of *Arabidopsis* SIZ1 recognizes trimethylated histone H3K4 mediating SIZ1 function and abiotic stress response. *Communications Biology*, 3. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0746-2>.

Miura, K., Rus, A., Sharkhuu, A., Yokoi, S., Karthikeyan, A.S., Raghothama, K.G., et al. (2005) The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 7760–7765. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500778102>.

Miura, T., Shibata, T. and Kusano, K. (2013) Putative antirecombinase Srs2 DNA helicase promotes noncrossover homologous recombination avoiding loss of heterozygosity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 16067–16072. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303111110>.

Miura, T., Yamana, Y., Usui, T., Ogawa, H.I., Yamamoto, M.T. and Kusano, K. (2012) Homologous recombination via synthesis-dependent strand annealing in yeast requires the IRC20 and SRS2 DNA helicases. *Genetics*, 191, 65–78. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.139105>.

Moarefi, I., Jeruzalmi, D., Turner, J., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (2000) Crystal structure of the DNA polymerase processivity factor of T4 bacteriophage. *Journal of molecular biology*, 296, 1215–1223. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3511>.

Mochizuki, A.L., Katanaya, A., Hayashi, E., Hosokawa, M., Moribe, E., Motegi, A., et al. (2017) PARI regulates stalled replication fork processing to maintain genome stability upon replication stress in mice. *Molecular and Cellular Biology*, 37. <https://doi.org/10.1128/mcb.00117-17>.

Mohiuddin, M., Evans, T.J., Rahman, M.M., Keka, I.S., Tsuda, M., Sasanuma, H., et al. (2018) SUMOylation of PCNA by PIAS1 and PIAS4 promotes template switch in the chicken and human B cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, 12793–12798. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716349115>.

Moissiard, G. and Voinnet, O. (2006) RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four *Arabidopsis* Dicer-like proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 19593–19598. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604627103>.

Mok, Y.K., Clark, D.R., Kam, K.M. and Shaw, P.C. (1991) BsiY I, a novel thermophilic restriction endonuclease that recognizes 5' CCNNNNNNNGG 3' and the discovery of a wrongly sequenced site in pACYC177. *Nucleic acids research*, 19, 2321–2323. <https://doi.org/10.1093/nar/19.9.2321>.

Moldovan, G.L., Dejsuphong, D., Petalcorin, M.I.R., Hofmann, K., Takeda, S., Boulton, S.J., et al. (2012) Inhibition of homologous recombination by the PCNA-interacting protein PARI. *Molecular Cell*, 45, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.010>.

Moldovan, G.-L., Pfander, B. and Jentsch, S. (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, 129, 665–679. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.003>.

Monaghan, J. and Zipfel, C. (2012) Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current opinion in plant biology*, 15, 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.006>.

Monci, F., Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. and Moriones, E. (2002) A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato

yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, 303, 317–326. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1633>.

Monjane, A.L., Martin, D.P., Lakay, F., Muhire, B.M., Pande, D., Varsani, A., et al. (2014) Extensive recombination-induced disruption of genetic interactions is highly deleterious but can be partially reversed by small numbers of secondary recombination events. *Journal of virology*, 88, 7843–7851. <https://doi.org/10.1128/JVI.00709-14>.

Morilla, G., Castillo, A.G., Preiss, W., Jeske, H. and Bejarano, E.R. (2006) A versatile transreplication-based system to identify cellular proteins involved in Geminivirus replication. *Journal of Virology*, 80, 3624–3633. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.7.3624-3633.2006>.

Morrell, R. and Sadanandom, A. (2019) Dealing with stress: A review of plant SUMO Proteases. *Frontiers in Plant Science*, 10.

Morrow, C., Whitby, M., Tamang, S., Kishkevich, A., Jalan, M. and Osman, F. (2019) The PCNA unloader Elg1 promotes recombination at collapsed replication forks in fission yeast. *eLife*, 8, 47277. <https://doi.org/10.7554/eLife.47277.001>.

Moutty, M.C., Sakin, V. and Melchior, F. (2011) Importin α/β mediates nuclear import of individual SUMO E1 subunits and of the holo-enzyme. *Molecular biology of the cell*, 22, 652–660. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-05-0461>.

Mubin, M., Amin, I., Amrao, L., Briddon, R.W. and Mansoor, S. (2010) The hypersensitive response induced by the V2 protein of a monopartite begomovirus is countered by the C2 protein. *Molecular plant pathology*, 11, 245–254. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00601.x>.

Mubin, M., Briddon, R.W. and Mansoor, S. (2019) The V2 protein encoded by a monopartite begomovirus is a suppressor of both post-transcriptional and transcriptional gene silencing activity. *Gene*, 686, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.002>.

Mukhopadhyay, D., Ayaydin, F., Kolli, N., Tan, S.-H., Anan, T., Kametaka, A., et al. (2006) SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species. *The Journal of cell biology*, 174, 939–949. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510103>.

Mukhopadhyay, D. and Dasso, M. (2007) Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends in biochemical sciences*, 32, 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.05.002>.

Müller, R., Misund, K., Holien, T., Bachke, S., Gilljam, K.M., Våtsveen, T.K., et al. (2013) Targeting proliferating cell nuclear antigen and its protein interactions induces apoptosis in multiple myeloma cells. *PloS one*, 8, e70430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070430>.

Murtas, G., Reeves, P.H., Fu, Y.-F., Bancroft, I., Dean, C. and Coupland, G. (2003) A nuclear protease required for flowering-time regulation in *Arabidopsis* reduces the abundance of small ubiquitin-related modifier conjugates. *The Plant cell*, 15, 2308–2319. <https://doi.org/10.1105/tpc.015487>.

Myron F.Woodgate and Roger Goodman (2013) Translesion DNA polymerases. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Nacerddine, K., Lehenbre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., et al. (2005) The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Developmental cell*, 9, 769–779. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.10.007>.

Nagar, S., Pedersen, T.J., Carrick, K.M., Hanley-Bowdoin, L. and Robertson, D. (1995) A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell*, 7, 705–719. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.6.705>.

Nagar, S., Hanley-Bowdoin, L. and Robertson, D. (2002) Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. *Plant Cell*, 14, 2995–3007. <https://doi.org/10.1105/tpc.005777>.

Nair, A., Chatterjee, K.S., Jha, V., Das, R. and Shivaprasad, P. V. (2020) Stability of Begomoviral pathogenicity determinant $\beta c1$ is modulated by mutually antagonistic SUMOylation and SIM interactions. *BMC Biology*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00843-y>.

Nakahara, K.S. and Masuta, C. (2014) Interaction between viral RNA silencing suppressors and host factors in plant immunity. *Current opinion in plant biology*, 20, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.004>.

Nash, T.E., Dallas, M.B., Reyes, M.I., Buhrman, G.K., Ascencio-Ibañez, J.T. and Hanley-Bowdoin, L. (2011) Functional analysis of a novel motif conserved across geminivirus Rep proteins. *Journal of virology*, 85, 1182–1192. <https://doi.org/10.1128/JVI.02143-10>.

Nawaz-Ul-Rehman, M.S., Nahid, N., Mansoor, S., Briddon, R.W. and Fauquet, C.M. (2010) Post-transcriptional gene silencing suppressor activity of two non-pathogenic alphasatellites associated with a begomovirus. *Virology*, 405, 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.06.024>.

Nedal, A., Ræder, S.B., Dalhus, B., Helgesen, E., Forstrøm, R.J., Lindland, K., et al. (2020) Peptides containing the PCNA interacting motif APIM bind to the β -clamp and inhibit bacterial growth and mutagenesis. *Nucleic acids research*, 48, 5540–5554. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa278>.

Nelis, S., Conti, L., Zhang, C. and Sadanandom, A. (2015) A functional small ubiquitin-like modifier (SUMO) interacting motif (SIM) in the gibberellin hormone receptor GID1 is conserved in cereal crops and disrupting this motif does not abolish hormone dependency of the DELLA-GID1 interaction. *Plant Signaling and Behavior*, 10, 20–23. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.987528>.

Nelson, J.R., Lawrence, C.W. and Hinkle, D.C. (1996) Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science (New York, N.Y.)*, 272, 1646–1649. <https://doi.org/10.1126/science.272.5268.1646>.

Nelson, S.K. and Steber, C.M. (2016) Gibberellin hormone signal perception: Down-regulating DELLA repressors of plant growth and development. *Annual Plant Reviews: The Gibberellins*. John Wiley and Sons, Ltd., pp. 153–188.

Newman, H.A., Meluh, P.B., Lu, J., Vidal, J., Carson, C., Lagesse, E., et al. (2017) A high throughput mutagenic analysis of yeast sumo structure and function. *PLoS Genetics*, 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006612>.

- Nguyen, H.D., Becker, J., Thu, Y.M., Costanzo, M., Koch, E.N., Smith, S., et al.** (2013) Unligated Okazaki fragments induce PCNA ubiquitination and a requirement for Rad59-dependent replication fork progression. *PLoS one*, 8, e66379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066379>.
- Ning, Y., Jantasuriyarat, C., Zhao, Q., Zhang, H., Chen, S., Liu, J., et al.** (2011) The SINA E3 ligase OsDIS1 negatively regulates drought response in rice. *Plant Physiology*, 157, 242–255. <https://doi.org/10.1104/pp.111.180893>.
- Niu, D., Lin, X.L., Kong, X., Qu, G.P., Cai, B., Lee, J., et al.** (2019) SIZ1-mediated SUMOylation of TPR1 suppresses plant immunity in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 12, 215–228. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.12.002>.
- Niu, H. and Klein, H.L.** (2017) Multifunctional roles of *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 protein in replication, recombination and repair. *FEMS Yeast Research*, 17, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow111>.
- Noris, E., Vaira, A.M., Caciagli, P., Masenga, V., Gronenborn, B. and Accotto, G.P.** (1998) Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. *Journal of virology*, 72, 10050–10057. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.12.10050-10057.1998>.
- Novatchkova, M., Budhiraja, R., Coupland, G., Eisenhaber, F. and Bachmair, A.** (2004) SUMO conjugation in plants. *Planta*, 220, 1–8.
- Novatchkova, M., Tomanov, K., Hofmann, K., Stuible, H.-P. and Bachmair, A.** (2012) Update on sumoylation: defining core components of the plant SUMO conjugation system by phylogenetic comparison. *New Phytologist*, 195, 23–31.
- Nukarinen, E., Tomanov, K., Ziba, I., Weckwerth, W. and Bachmair, A.** (2017) Protein sumoylation and phosphorylation intersect in Arabidopsis signaling. *Plant Journal*, 91, 505–517. <https://doi.org/10.1111/tip.13575>.
- Nurdiani, D., Widyajayantie, D. and Nugroho, S.** (2018) OsSCE1 encoding SUMO E2-conjugating enzyme involves in drought stress response of *Oryza sativa*. *Rice Science*, 25, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2017.11.002>.
- O'Donnell, M.E. and Li, H.** (2018) The ring-shaped hexameric helicases that function at DNA replication forks. *Nature structural and molecular biology*, 25, 122–130. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0024-x>.
- Ohayon, D., Chiara, A. De, Chapuis, N., Candalh, C., Mocek, J., Ribeil, J.-A., et al.** (2016) Cytoplasmic proliferating cell nuclear antigen connects glycolysis and cell survival in acute myeloid leukemia. *Scientific reports*, 6, 35561. <https://doi.org/10.1038/srep35561>.
- Ohi, M.D., Kooi, C.W. Vander, Rosenberg, J.A., Chazin, W.J. and Gould, K.L.** (2003) Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nature structural biology*, 10, 250–255. <https://doi.org/10.1038/nsb906>.
- Ohkuni, K., Pasupala, N., Peek, J., Holloway, G.L., Sclar, G.D., Levy-Myers, R., et al.** (2018) SUMO-targeted ubiquitin ligases (STUbLs) reduce the toxicity and abnormal transcriptional activity associated with a mutant, aggregation-prone fragment of huntingtin. *Frontiers in Genetics*, 9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00379>.

Ohtake, F., Saeki, Y., Sakamoto, K., Ohtake, K., Nishikawa, H., Tsuchiya, H., et al. (2015) Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO reports*, 16, 192–201. <https://doi.org/10.15252/embr.201439152>.

Okada, S., Nagabuchi, M., Takamura, Y., Nakagawa, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J.I., et al. (2009) Reconstitution of *Arabidopsis thaliana* SUMO pathways in *E. coli*: Functional evaluation of SUMO machinery proteins and mapping of SUMOylation sites by mass spectrometry. *Plant and Cell Physiology*, 50, 1049–1061. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp056>.

Olaisen, C., Kvitvang, H.F.N., Lee, S., Almaas, E., Bruheim, P., Drabløs, F., et al. (2018) The role of PCNA as a scaffold protein in cellular signaling is functionally conserved between yeast and humans. *FEBS open bio*, 8, 1135–1145. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12442>.

Olaisen, C., Müller, R., Nedal, A. and Otterlei, M. (2015) PCNA-interacting peptides reduce Akt phosphorylation and TLR-mediated cytokine secretion suggesting a role of PCNA in cellular signaling. *Cellular signalling*, 27, 1478–1487. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.03.009>.

Olsen, S.K., Capili, A.D., Lu, X., Tan, D.S. and Lima, C.D. (2010) Active site remodelling accompanies thioester bond formation in the SUMO E1. *Nature*, 463, 906–912. <https://doi.org/10.1038/nature08765>.

Olsen, S.K. and Lima, C.D. (2013) Structure of a ubiquitin E1-E2 complex: insights to E1-E2 thioester transfer. *Molecular cell*, 49, 884–896. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.013>.

Ooi, S.L., Shoemaker, D.D. and Boeke, J.D. (2003) DNA helicase gene interaction network defined using synthetic lethality analyzed by microarray. *Nature genetics*, 35, 277–286. <https://doi.org/10.1038/ng1258>.

Orosa-Puente, B., Leftley, N., Wangenheim, D. von, Banda, J., Srivastava, A.K., Hill, K., et al. (2018) Root branching toward water involves posttranslational modification of transcription factor ARF7. *Science*, 362, 1407–1410.

Orozco, B.M., Miller, A.B., Settlege, S.B. and Hanley-Bowdoin, L. (1997) Functional domains of a geminivirus replication protein. *The Journal of biological chemistry*, 272, 9840–9846. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.15.9840>.

Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M.B., Bao, Z.Q., Palmer, L.E., Bliska, J.B., et al. (2000) Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science (New York, N.Y.)*, 290, 1594–1597. <https://doi.org/10.1126/science.290.5496.1594>.

Osman, F., Dixon, J., Barr, A.R. and Whitby, M.C. (2005) The F-Box DNA helicase Fbh1 prevents Rhp51-dependent recombination without mediator proteins. *Molecular and cellular biology*, 25, 8084–8096. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.18.8084-8096.2005>.

Owor, B.E., Martin, D.P., Shepherd, D.N., Edema, R., Monjane, A.L., Rybicki, E.P., et al. (2007) Genetic analysis of maize streak virus isolates from Uganda reveals widespread distribution of a recombinant variant. *The Journal of general virology*, 88, 3154–3165. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83144-0>.

Padidam, M., Beachy, R.N. and Fauquet, C.M. (1996) The role of AV2 (“precoat”) and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology*, 224, 390–404. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0546>.

Padidam, M., Sawyer, S. and Fauquet, C.M. (1999) Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, 265, 218–225. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0056>.

Pal, S., Santos, A., Rosas, J.M., Ortiz-Guzman, J. and Rosas-Acosta, G. (2011) Influenza A virus interacts extensively with the cellular SUMOylation system during infection. *Virus research*, 158, 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.02.017>.

Paliwal, S., Kanagaraj, R., Sturzenegger, A., Burdova, K. and Janscak, P. (2014) Human RECQ5 helicase promotes repair of DNA double-strand breaks by synthesis-dependent strand annealing. *Nucleic acids research*, 42, 2380–2390. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1263>.

Palladino, F. and Klein, H.L. (1992) Analysis of mitotic and meiotic defects in *Saccharomyces cerevisiae* SRS2 DNA helicase mutants. *Genetics*, 132, 23–37. <https://doi.org/10.1093/genetics/132.1.23>.

Palukaitis, P., Groen, S.C. and Carr, J.P. (2013) The Rumsfeld paradox: Some of the things we know that we don't know about plant virus infection. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 513–519.

Pan Gong, Huang Tan, Siwen Zhao, Hao Li, Hui Liu, Yu Ma, Xi Zhang, Junjie Rong, Xing Fu, Rosa Lozano-Durán, Fangfang Li, X.Z. (2021) Geminiviral genomes encode additional proteins with specific subcellular localizations and virulence function. *Nat Commun*, 12(1):4278.

Panno, S., Caruso, A.G. and Davino, S. (2018) The nucleotide sequence of a recombinant tomato yellow leaf curl virus strain frequently detected in Sicily isolated from tomato plants carrying the Ty-1 resistance gene. *Archives of virology*, 163, 795–797. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3674-9>.

Pant, V., Gupta, D., Choudhury, N.R., Malathi, V.G., Varma, A. and Mukherjee, S.K. (2001) Molecular characterization of the Rep protein of the blackgram isolate of Indian mungbean yellow mosaic virus. *The Journal of general virology*, 82, 2559–2567. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2559>.

Papouli, E., Chen, S., Davies, A.A., Huttner, D., Krejci, L., Sung, P., et al. (2005) Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Molecular Cell*, 19, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.001>.

Park, B.S., Song, J.T. and Seo, H.S. (2011) *Arabidopsis* nitrate reductase activity is stimulated by the E3 SUMO ligase AtSIZ1. *Nature communications*, 2, 400. <https://doi.org/10.1038/ncomms1408>.

Park, C.H., Chen, S., Shirsekar, G., Zhou, B., Khang, C.H., Songkumarn, P., et al. (2012) The magnaporthe oryzae effector avrpiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice. *Plant Cell*, 24, 4748–4762. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105429>.

Park, H.J., Kim, W.-Y., Park, H.C., Lee, S.Y., Bohnert, H.J. and Yun, D.-J. (2011) SUMO and SUMOylation in Plants. *Molecules and Cells*, 32, 305–316.

Park, H.C., Choi, W., Park, H.J., Cheong, M.S., Koo, Y.D., Shin, G., et al. (2011) Identification and molecular properties of SUMO-binding proteins in *Arabidopsis*. *Molecules and Cells*, 32, 143–151. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-2297-3>.

Park, H.C., Kim, H., Koo, S.C., Park, H.J., Cheong, M.S., Hong, H., et al. (2010) Functional characterization of the SIZ/PIAS-type SUMO E3 ligases, OsSIZ1 and OsSIZ2 in rice. *Plant, Cell and Environment*, 33, 1923–1934. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02195.x>.

Park, J., Hwang, H., Shim, H., Im, K., Auh, C.-K., Lee, S., et al. (2004) Altered cell shapes, hyperplasia, and secondary growth in *Arabidopsis* caused by Beet curly top geminivirus infection. *Molecules and cells*, 17, 117–124.

Parker, J.L., Bucci, A., Davies, A.A., Heidrich, K., Windecker, H. and Ulrich, H.D. (2008) SUMO modification of PCNA is controlled by DNA. *The EMBO journal*, 27, 2422–2431. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.162>.

Parker, J.L. and Ulrich, H.D. (2014) SIM-dependent enhancement of substrate-specific SUMOylation by a ubiquitin ligase *in vitro*. *The Biochemical journal*, 457, 435–440. <https://doi.org/10.1042/BJ20131381>.

Parnas, O., Zipin-Roitman, A., Pfander, B., Liefshitz, B., Mazor, Y., Ben-Aroya, S., et al. (2010) Elg1, an alternative subunit of the RFC clamp loader, preferentially interacts with SUMOylated PCNA. *The EMBO journal*, 29, 2611–2622. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.128>.

Pasumathy, K.K., Mukherjee, S.K. and Choudhury, N.R. (2011) The presence of Tomato leaf curl Kerala virus AC3 protein enhances viral DNA replication and modulates virus induced gene-silencing mechanism in tomato plants. *Virology Journal*, 8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-178>.

Pasumathy, K.K., Choudhury, N.R. and Mukherjee, S.K. (2010) Tomato leaf curl Kerala virus (ToLCKeV) AC3 protein forms a higher order oligomer and enhances ATPase activity of replication initiator protein (Rep/AC1). *Virology journal*, 7, 128. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-128>.

Pauwels, L., Ritter, A., Goossens, J., Durand, A.N., Liu, H., Gu, Y., et al. (2015) The RING E3 ligase KEEP ON GOING modulates JASMONATE ZIM-DOMAIN12 stability. *Plant Physiology*, 169, 1405–1417. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00479>.

Pennella, M.A., Liu, Y., Woo, J.L., Kim, C.A. and Berk, A.J. (2010) Adenovirus E1B 55-kilodalton protein is a p53-SUMO1 E3 ligase that represses p53 and stimulates its nuclear export through interactions with promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Journal of virology*, 84, 12210–12225. <https://doi.org/10.1128/JVI.01442-10>.

Pérez Berrocal, D.A., Witting, K.F., Ova, H. and Mulder, M.P.C. (2020) Hybrid chains: A collaboration of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers introducing cross-functionality to the ubiquitin code. *Frontiers in Chemistry*, 7.

Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., et al. (2000) *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, 103, 1111–1120. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00213-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00213-0).

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., et al. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25, 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.

Pfander, B., Moldovan, G.L., Sacher, M., Hoege, C. and Jentsch, S. (2005) SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature*, 436, 428–433. <https://doi.org/10.1038/nature03665>.

Piazza, A., Shah, S.S., Wright, W.D., Gore, S.K., Koszul, R. and Heyer, W.D. (2019) Dynamic processing of displacement loops during recombinational DNA repair. *Molecular Cell*, 73, 1255–1266.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.005>.

Pichler, A., Fatouros, C., Lee, H. and Eisenhardt, N. (2017) SUMO conjugation - A mechanistic view. *Biomolecular Concepts*, 8, 13–36.

Pichler, A., Knipscheer, P., Oberhofer, E., Dijk, W.J. van, Körner, R., Olsen, J.V., et al. (2005) SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nature structural and molecular biology*, 12, 264–269. <https://doi.org/10.1038/nsmb903>.

Pickart, C.M. (2001) Ubiquitin enters the new millennium. *Molecular cell*, 8, 499–504. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00347-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00347-1).

Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Ent, S. Van der and Wees, S.C.M. Van (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 5, 308–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>.

Pilartz, M. and Jeske, H. (2003) Mapping of abutilon mosaic geminivirus minichromosomes. *Journal of virology*, 77, 10808–10818. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.20.10808-10818.2003>.

Pinto, M.P., Carvalho, A.F., Grou, C.P., Rodríguez-Borges, J.E., Sá-Miranda, C. and Azevedo, J.E. (2012) Heat shock induces a massive but differential inactivation of SUMO-specific proteases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823, 1958–1966. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.07.010>.

Plosky, B.S., Vidal, A.E., Fernández de Henestrosa, A.R., McLenigan, M.P., McDonald, J.P., Mead, S., et al. (2006) Controlling the subcellular localization of DNA polymerases ι and η via interactions with ubiquitin. *The EMBO journal*, 25, 2847–2855. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601178>.

Pooggin, M.M. (2013) How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing? *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 15233–15259.

Poornima Priyadarshini, C.G., Ambika, M. V, Tippeswamy, R. and Savithri, H.S. (2011) Functional characterization of coat protein and V2 involved in cell to cell movement of Cotton leaf curl Kokhran virus-Dabawali. *PloS one*, 6, e26929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026929>.

Povlsen, L.K., Beli, P., Wagner, S.A., Poulsen, S.L., Sylvestersen, K.B., Poulsen, J.W., et al. (2012) Systems-wide analysis of ubiquitylation dynamics reveals a key role for PAF15 ubiquitylation in DNA-damage bypass. *Nature cell biology*, 14, 1089–1098. <https://doi.org/10.1038/ncb2579>.

Pradhan, B., Tien, V. Van, Dey, N. and Mukherjee, S.K. (2017) Molecular biology of Geminivirus DNA replication. *Viral Replication*. pp. 2–35.

Prado, F. (2018) Homologous recombination: To fork and beyond. *Genes*, 9.

Prakash, R., Satory, D., Dray, E., Papusha, A., Scheller, J., Kramer, W., et al. (2009) Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination. *Genes and development*, 23, 67–79. <https://doi.org/10.1101/gad.1737809>.

Prakash, S., Johnson, R.E. and Prakash, L. (2005) Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annual review of biochemistry*, 74, 317–353. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133250>.

Preiss, W. and Jeske, H. (2003) Multitasking in replication is common among Geminiviruses. *Journal of Virology*, 77, 2972–2980. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.5.2972-2980.2003>.

Prestel, A., Wichmann, N., Martins, J.M., Marabini, R., Kassem, N., Broendum, S.S., et al. (2019) The PCNA interaction motifs revisited: thinking outside the PIP-box. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76, 4923–4943. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03150-0>.

Psakhye, I. and Jentsch, S. (2012) Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell*, 151, 807–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.021>.

Pumplin, N. and Voinnet, O. (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: Defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 745–760.

Qian, J., Chen, Y., Xu, Y., Zhang, X., Kang, Z., Jiao, J., et al. (2019) Interactional similarities and differences in the protein complex of PCNA and DNA replication factor C between rice and Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 19. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1874-z>.

Qin, X., Huang, S., Liu, Y., Bian, M., Shi, W., Zuo, Z., et al. (2017) Overexpression of a RING finger ubiquitin ligase gene AtATR1 enhances aluminium tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology*, 60, 66–74. <https://doi.org/10.1007/s12374-016-0903-9>.

Qin, Z., Bai, Z., Sun, Y., Niu, X. and Xiao, W. (2016) PCNA-Ub polyubiquitination inhibits cell proliferation and induces cell-cycle checkpoints. *Cell Cycle*, 15, 3390–3401. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1245247>.

Qiu, Y., Antony, E., Doganay, S., Koh, H.R., Lohman, T.M. and Myong, S. (2013) Srs2 prevents Rad51 filament formation by repetitive motion on DNA. *Nature communications*, 4, 2281. <https://doi.org/10.1038/ncomms3281>.

Raja, P., Jackel, J.N., Li, S., Heard, I.M. and Bisaro, D.M. (2014) *Arabidopsis* double-stranded RNA binding protein DRB3 participates in methylation-mediated defense against geminiviruses. *Journal of virology*, 88, 2611–2622. <https://doi.org/10.1128/JVI.02305-13>.

Raja, P., Wolf, J.N. and Bisaro, D.M. (2010) RNA silencing directed against geminiviruses: post-transcriptional and epigenetic components. *Biochimica et biophysica acta*, 1799, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.01.004>.

Ramachandran, P., J., B.J., Maupin-Furlow, J.A. and Uthandi, S. (2021) Bacterial effectors mimicking ubiquitin-proteasome pathway tweak plant immunity. *Microbiological Research*, 250, 126810. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126810>.

- Raney, K.D., Byrd, A.K. and Aarattuthodiyil, S.** (2013) Structure and mechanisms of SF1 DNA helicases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 767, 17–46. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5037-5_2.
- Rangasamy, D. and Wilson, V.G.** (2000) Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 30487–30495. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003898200>.
- Ranjha, L., Howard, S.M. and Cejka, P.** (2018) Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma*, 127, 187–214. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0658-1>.
- Ranjha, L., Levikova, M., Altmannova, V., Krejci, L. and Cejka, P.** (2019) Sumoylation regulates the stability and nuclease activity of *Saccharomyces cerevisiae* Dna2. *Communications Biology*, 2. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0428-0>.
- Raorane, M.L., Mutte, S.K., Varadarajan, A.R., Pabuayon, I.M. and Kohli, A.** (2013) Protein SUMOylation and plant abiotic stress signaling: In silico case study of rice RLKs, heat-shock and Ca²⁺-binding proteins. *Plant Cell Reports*, 32, 1053–1065.
- Rasheed, M.S., Selth, L.A., Koltunow, A.M.G., Randles, J.W. and Rezaian, M.A.** (2006) Single-stranded DNA of Tomato leaf curl virus accumulates in the cytoplasm of phloem cells. *Virology*, 348, 120–132. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.054>.
- Recker, J., Knoll, A. and Puchta, H.** (2014) The *Arabidopsis thaliana* homolog of the helicase RTEL1 plays multiple roles in preserving genome stability. *Plant Cell*, 26, 4889–4902. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132472>.
- Regad, T. and Chelbi-Alix, M.K.** (2001) Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene*, 20, 7274–7286.
- Regnard, G.L., Halley-Stott, R.P., Tanzer, F.L., Hitzeroth, I.I. and Rybicki, E.P.** (2010) High level protein expression in plants through the use of a novel autonomously replicating geminivirus shuttle vector. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 38–46. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00462.x>.
- Remigi, P., Anisimova, M., Guidot, A., Genin, S. and Peeters, N.** (2011) Functional diversification of the GALA type III effector family contributes to *Ralstonia solanacearum* adaptation on different plant hosts. *New Phytologist*, 192, 976–987. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03854.xi>.
- Ren, B., Kühn, J., Meslet-Cladiere, L., Briffotiaux, J., Norais, C., Lavigne, R., et al.** (2009) Structure and function of a novel endonuclease acting on branched DNA substrates. *The EMBO journal*, 28, 2479–2489. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.192>.
- Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., et al.** (2008) The genome of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*, 319, 64–69.
- Retanal, C., Ball, B. and Geddes-Mcalister, J.** (2021) Post-translational modifications drive success and failure of fungal–host interactions. *Journal of Fungi*, 7, 1–15. <https://doi.org/10.3390/jof7020124>.

Reuter, N., Schilling, E.-M., Scherer, M., Müller, R. and Stamminger, T. (2017) The ND10 component promyelocytic leukemia protein acts as an E3 ligase for SUMOylation of the major immediate early protein IE1 of human Cytomegalovirus. *Journal of Virology*, 91. <https://doi.org/10.1128/jvi.02335-16>.

Reyes, M.I., Nash, T.E., Dallas, M.M., Ascencio-Ibanez, J.T. and Hanley-Bowdoin, L. (2013) Peptide aptamers that bind to geminivirus replication proteins confer a resistance phenotype to Tomato yellow leaf curl virus and Tomato mottle virus infection in tomato. *Journal of Virology*, 87, 9691–9706. <https://doi.org/10.1128/jvi.01095-13>.

Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H. and Wilkinson, K.D. (2009) Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annual review of biochemistry*, 78, 363–397. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526>.

Ribet, D. and Cossart, P. (2018) Ubiquitin, SUMO, and NEDD8: Key targets of bacterial pathogens. *Trends in Cell Biology*, 28, 926–940. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.07.005>.

Richard, G.-F., Kerrest, A., Lafontaine, I. and Dujon, B. (2005) Comparative genomics of hemiascomycete yeasts: genes involved in DNA replication, repair, and recombination. *Molecular biology and evolution*, 22, 1011–1023. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi083>.

Richter, K.S., Kleinow, T. and Jeske, H. (2014) Somatic homologous recombination in plants is promoted by a geminivirus in a tissue-selective manner. *Virology*, 452–453, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.01.024>.

Richter, K.S., Götz, M., Winter, S. and Jeske, H. (2016) The contribution of translesion synthesis polymerases on geminiviral replication. *Virology*, 488, 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.10.027>.

Richter, K.S. and Jeske, H. (2015) KU80, a key factor for non-homologous end-joining, retards geminivirus multiplication. *Journal of General Virology*, 96, 2913–2918. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000224>.

Richter, K.S., Serra, H., White, C.I. and Jeske, H. (2016) The recombination mediator RAD51D promotes geminiviral infection. *Virology*, 493, 113–127. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.014>.

Ripley, B.M., Gildenberg, M.S. and Todd Washington, M. (2020) Control of DNA damage bypass by ubiquitylation of PCNA. *Genes*, 11.

Rishishwar, R. and Dasgupta, I. (2019) Suppressors of RNA silencing encoded by geminiviruses and associated DNA satellites. *VirusDisease*, 30, 58–65. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0418-8>.

Rizvi, I., Choudhury, N.R. and Tuteja, N. (2014) Insights into the functional characteristics of geminivirus rolling-circle replication initiator protein and its interaction with host factors affecting viral DNA replication. *Archives of Virology*, 160, 375–387.

Robert, T., Dervins, D., Fabre, F. and Gangloff, S. (2006) Mrc1 and Srs2 are major actors in the regulation of spontaneous crossover. *The EMBO journal*, 25, 2837–2846. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601158>.

Rodelo-Urrego, M., García-Arenal, F. and Pagán, I. (2015) The effect of ecosystem biodiversity on virus genetic diversity depends on virus species: A study of chiltépín-infecting begomoviruses in Mexico. *Virus evolution*, 1, vev004. <https://doi.org/10.1093/ve/vev004>.

Roden, J., Eardley, L., Hotson, A., Cao, Y. and Mudgett, M.B. (2004) Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 17, 633–643. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.6.633>.

Rodríguez-Negrete, E., Lozano-Durán, R., Piedra-Aguilera, A., Cruzado, L., Bejarano, E.R. and Castillo, A.G. (2013) Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing. *The New phytologist*, 199, 464–475. <https://doi.org/10.1111/nph.12286>.

Rojas, M.R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-Cázares, B., Sudarshana, M.R., Lucas, W.J., et al. (2001) Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, 291, 110–125. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1194>.

Rojas, M.R., Hagen, C., Lucas, W.J. and Gilbertson, R.L. (2005) Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 361–394.

Rojas, M.R., Macedo, M.A., Maliano, M.R., Soto-Aguilar, M., Souza, J.O., Briddon, R.W., et al. (2018) World management of Geminiviruses. *Annual Reviews Phytopathology*, 56, 637–677. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto>.

Romay, G., Geraud-Pouey, F., Chirinos, D.T., Mahillon, M., Gillis, A., Mahillon, J., et al. (2019) Tomato twisted leaf virus: A novel indigenous new world monopartite begomovirus infecting tomato in Venezuela. *Viruses*, 11. <https://doi.org/10.3390/v11040327>.

Rong, L. and Klein, H.L. (1993) Purification and characterization of the SRS2 DNA helicase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 268, 1252–1259.

Rong, L., Palladino, F., Aguilera, A. and Klein, H.L. (1991) The hyper-gene conversion hpr5-1 mutation of *Saccharomyces cerevisiae* is an allele of the SRS2/RADH gene. *Genetics*, 127, 75–85. <https://doi.org/10.1093/genetics/127.1.75>.

Rosas-Acosta, G., Russell, W.K., Deyrieux, A., Russell, D.H. and Wilson, V.G. (2005) A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Molecular and Cellular Proteomics*, 4, 56–72. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400149-MCP200>.

Roumagnac, P., Granier, M., Bernardo, P., Deshoux, M., Ferdinand, R., Galzi, S., et al. (2015) Alfalfa leaf curl virus: An aphid-transmitted geminivirus. *Journal of Virology*, 89, 9683–9688. <https://doi.org/10.1128/jvi.00453-15>.

Roy, D. and Sadanandom, A. (2021) SUMO mediated regulation of transcription factors as a mechanism for transducing environmental cues into cellular signaling in plants. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 78, 2641–2664. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03723-4>.

Roy, U., Kwon, Y., Marie, L., Symington, L., Sung, P., Lisby, M., et al. (2021) The Rad51 paralog complex Rad55-Rad57 acts as a molecular chaperone during homologous recombination. *Molecular cell*, 81, 1043-1057.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.019>.

Rubio, L., Galipienso, L. and Ferriol, I. (2020) Detection of plant viruses and disease management: Relevance of genetic diversity and evolution. *Frontiers in plant science*, 11, 1092. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01092>.

Ruhel, R. and Chakraborty, S. (2019) Multifunctional roles of geminivirus encoded replication initiator protein. *VirusDisease*, 30, 66–73. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0458-0>.

Ruhel, R., Mazumder, M., Gnanasekaran, P., Kumar, M., Gourinath, S. and Chakraborty, S. (2021) Functional implications of residues of the B' motif of geminivirus replication initiator protein in its helicase activity. *The FEBS journal*, 288, 6492–6509. <https://doi.org/10.1111/febs.16053>.

Rybicki, E.P. (1994) A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of *Geminiviridae*. *Archives of virology*, 139, 49–77. <https://doi.org/10.1007/BF01309454>.

Rybicki, E.P. (2015) A Top Ten list for economically important plant viruses. *Archives of virology*, 160, 17–20. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2295-9>.

Rytz, T.C., Miller, M.J., McLoughlin, F., Augustine, R.C., Marshall, R.S., Juan, Y.T., et al. (2018) SUMOylation profiling reveals a diverse array of nuclear targets modified by the SUMO ligase SIZ1 during heat stress. *Plant Cell*, 30, 1077–1099. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00993>.

Rytz, T.C., Miller, M.J. and Vierstra, R.D. (2016) Purification of SUMO conjugates from *Arabidopsis* for mass spectrometry analysis. *Methods in Molecular Biology*, 1475, 257–281. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6358-4_18.

Sadanandom, A., Ádám, É., Orosa, B., Viczián, A., Klose, C., Zhang, C., et al. (2015) SUMOylation of phytochrome-B negatively regulates light-induced signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 11108–11113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415260112>.

Sadanandom, A., Bailey, M., Ewan, R., Lee, J. and Nelis, S. (2012) The ubiquitin-proteasome system: central modifier of plant signalling. *The New phytologist*, 196, 13–28. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04266.x>.

Sakamoto, A., Lan, V.T.T., Hase, Y., Shikazono, N., Matsunaga, T. and Tanaka, A. (2003) Disruption of the AtREV3 gene causes hypersensitivity to ultraviolet B light and gamma-rays in *Arabidopsis*: implication of the presence of a translesion synthesis mechanism in plants. *The Plant cell*, 15, 2042–2057. <https://doi.org/10.1105/tpc.012369>.

Sale, J.E. (2012) Competition, collaboration and coordination - Determining how cells bypass DNA damage. *Journal of Cell Science*, 125, 1633–1643. <https://doi.org/10.1242/jcs.094748>.

Saleh, A., Withers, J., Mohan, R., Marqués, J., Gu, Y., Yan, S., et al. (2015) Posttranslational modifications of the master transcriptional regulator NPR1 enable dynamic but tight control of plant immune responses. *Cell Host and Microbe*, 18, 169–182. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.07.005>.

Salghetti, S.E., Caudy, A.A., Chenoweth, J.G. and Tansey, W.P. (2001) Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science (New York, N.Y.)*, 293, 1651–1653. <https://doi.org/10.1126/science.1062079>.

Salman, A., Kotb, A., Ghazy, A.I., Ibrahim, E.I. and Al-Ateeq, T.K. (2020) Structural and functional characterization of tomato SUMO1 gene. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, 352–357. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.10.004>.

Salomon, D. and Orth, K. (2013) What pathogens have taught us about posttranslational modifications. *Cell Host Microbe*, 14, 26–279. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.008>.What.

San Filippo, J., Sung, P. and Klein, H. (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 229–257.

San, C., Pastrana, M., María, J. and García, C. (2007) Estudios estructurales en la proteína helicasa MCM de *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Universidad Autónoma de Madrid.

Sánchez-Campos, S., Martínez-Ayala, A., Márquez-Martín, B., Aragón-Caballero, L., Navas-Castillo, J. and Moriones, E. (2013) Fulfilling Koch's postulates confirms the monopartite nature of tomato leaf deformation virus: a begomovirus native to the New World. *Virus research*, 173, 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.02.002>.

Sánchez-Campos, S., Domínguez-Huerta, G., Díaz-Martínez, L., Tomás, D.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., et al. (2018) Differential shape of geminivirus mutant spectra across cultivated and wild hosts with invariant viral consensus sequences. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00932>.

Sanchez-Duran, M.A., Dallas, M.B., Ascencio-Ibanez, J.T., Reyes, M.I., Arroyo-Mateos, M., Ruiz-Albert, J., et al. (2011) Interaction between geminivirus replication protein and the SUMO-conjugating enzyme is required for viral infection. *Journal of Virology*, 85, 9789–9800. <https://doi.org/10.1128/jvi.02566-10>.

Sanderfoot, A.A., Ingham, D.J. and Lazarowitz, S.G. (1996) A viral movement protein as a nuclear shuttle. The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant physiology*, 110, 23–33. <https://doi.org/10.1104/pp.110.1.23>.

Sanderfoot, A.A. and Lazarowitz, S.G. (1995) Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *The Plant cell*, 7, 1185–1194. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.8.1185>.

Sanfaçon, H. (2017) Grand challenge in plant virology: Understanding the impact of plant viruses in model plants, in agricultural crops, and in complex ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00860>.

Sanjuán, R. (2012) From molecular genetics to phylodynamics: evolutionary relevance of mutation rates across viruses. *PLoS pathogens*, 8, e1002685. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002685>.

Sanjuán, R. and Domingo-Calap, P. (2016) Mechanisms of viral mutation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73, 4433–4448. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>.

Sanjuán, R., Nebot, M.R., Chirico, N., Mansky, L.M. and Belshaw, R. (2010) Viral mutation rates. *Journal of virology*, 84, 9733–9748. <https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10>.

Sano, Y., Wada, M., Hashimoto, Y., Matsumoto, T. and Kojima, M. (1998) Sequences of ten circular ssDNA components associated with the milk vetch dwarf virus genome. *Journal of General Virology*, 79, 3111–3118.

Santiago, M.J., Ruiz-Rubio, M., Dio, L. Di, González-Reyes, J.A. and Alejandro-Durán, E. (2008) Ubiquitous expression of two translesion synthesis DNA polymerase genes in *Arabidopsis*. *Planta*, 227, 1269–1277. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0698-0>.

Santner, A. and Estelle, M. (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, 459, 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08122>.

Sanz, A.I., Fraile, A., Gallego, J.M., Malpica, J.M. and Garcia-Arenal, F. (1999) Genetic variability of natural populations of Cotton leaf curl geminivirus, a single-stranded DNA virus. *Journal of molecular evolution*, 49, 672–681. <https://doi.org/10.1007/pl00006588>.

Saponaro, M., Callahan, D., Zheng, X., Krejci, L., Haber, J.E., Klein, H.L., et al. (2010) Cdk1 targets Srs2 to complete synthesis-dependent strand annealing and to promote recombinational repair. *PLoS genetics*, 6, e1000858. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000858>.

Saracco, S.A., Miller, M.J., Kurepa, J. and Vierstra, R.D. (2007) Genetic analysis of SUMOylation in *Arabidopsis*: Conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential. *Plant Physiology*, 145, 119–134. <https://doi.org/10.1104/pp.107.102285>.

Sarangi, P. and Zhao, X. (2015) SUMO-mediated regulation of DNA damage repair and responses. *Trends in Biochemical Sciences*, 40, 233–242.

Sasanuma, H., Furihata, Y., Shinohara, M. and Shinohara, A. (2013) Remodeling of the Rad51 DNA strand-exchange protein by the Srs2 helicase. *Genetics*, 194, 859–872. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.150615>.

Sasanuma, H., Sakurai, H.S.M., Furihata, Y., Challa, K., Palmer, L., Gasser, S.M., et al. (2019) Srs2 helicase prevents the formation of toxic DNA damage during late prophase I of yeast meiosis. *Chromosoma*, 128, 453–471. <https://doi.org/10.1007/s00412-019-00709-5>.

Saunders, K., Bedford, I.D., Briddon, R.W., Markham, P.G., Wong, S.M. and Stanley, J. (2000) A unique virus complex causes Ageratum yellow vein disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 6890–6895. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6890>.

Saunders, K., Lucy, A. and Stanley, J. (1992) RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic acids research*, 20, 6311–6315. <https://doi.org/10.1093/nar/20.23.6311>.

Saunders, K., Bedford, I.D., Yahara, T. and Stanley, J. (2003) The earliest recorded plant virus disease. *Nature*, 422, 831–831.

Scherer, M. and Stamminger, T. (2016) Emerging role of PML nuclear bodies in innate immune signaling. *Journal of Virology*, 90, 5850–5854. <https://doi.org/10.1128/jvi.01979-15>.

Schiestl, R.H., Prakash, S. and Prakash, L. (1990) The SRS2 suppressor of rad6 mutations of *Saccharomyces cerevisiae* acts by channeling DNA lesions into the RAD52 DNA repair pathway. *Genetics*, 124, 817–831. <https://doi.org/10.1093/genetics/124.4.817>.

Schild, D. (1995) Suppression of a new allele of the yeast RAD52 gene by overexpression of RAD51, mutations in srs2 and ccr4, or mating-type heterozygosity. *Genetics*, 140, 115–127. <https://doi.org/10.1093/genetics/140.1.115>.

Schimmel, J., Eifler, K., Sigursson, J.O., Cuijpers, S.A.G., Hendriks, I.A., Verlaan-de Vries, M., et al. (2014) Uncovering SUMOylation dynamics during cell-cycle progression reveals foxM1 as a key mitotic SUMO target protein. *Molecular Cell*, 53, 1053–1066. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.001>.

Schmid, M., Speiseder, T., Dobner, T. and Gonzalez, R.A. (2014) DNA Virus replication compartments. *Journal of Virology*, 88, 1404–1420. <https://doi.org/10.1128/jvi.02046-13>.

Scholthof, K.B.G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., et al. (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12, 938–954.

Schulz, S., Chachami, G., Kozaczekiewicz, L., Winter, U., Stankovic-Valentin, N., Haas, P., et al. (2012) Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO reports*, 13, 930–938. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.125>.

Schwendener, S., Raynard, S., Paliwal, S., Cheng, A., Kanagaraj, R., Shevelev, I., et al. (2010) Physical interaction of RECQ5 helicase with RAD51 facilitates its anti-recombinase activity. *The Journal of biological chemistry*, 285, 15739–15745. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110478>.

Sebesta, M., Burkovics, P., Haracska, L. and Krejci, L. (2011) Reconstitution of DNA repair synthesis in vitro and the role of polymerase and helicase activities. *DNA repair*, 10, 567–576. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.03.003>.

Selby, T.L., Biel, N., Varn, M., Patel, S., Patel, A., Hilding, L., et al. (2019) The Epstein-Barr virus oncoprotein, LMP1, regulates the function of SENP2, a SUMO-protease. *Scientific reports*, 9, 9523. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45825-5>.

Selth, L.A., Dogra, S.C., Rasheed, M.S., Healy, H., Randles, J.W. and Rezaian, M.A. (2005) A NAC domain protein interacts with tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication. *The Plant cell*, 17, 311–325. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.027235>.

Sengupta, I., Das, D., Singh, S.P., Chakravarty, R. and Das, C. (2017) Host transcription factor Speckled 110 kDa (Sp110), a nuclear body protein, is hijacked by hepatitis B virus protein X for viral persistence. *The Journal of biological chemistry*, 292, 20379–20393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.796839>.

Seong, C., Colavito, S., Kwon, Y., Sung, P. and Krejci, L. (2009) Regulation of Rad51 recombinase presynaptic filament assembly via interactions with the Rad52 mediator and the Srs2 anti-recombinase. *The Journal of biological chemistry*, 284, 24363–24371. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.032953>.

Settlage, S.B., Miller, A.B., Gruissem, W. and Hanley-Bowdoin, L. (2001) Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. *Virology*, 279, 570–576. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0719>.

Settlage, S.B., Miller, A.B. and Hanley-Bowdoin, L. (1996) Interactions between geminivirus replication proteins. *Journal of virology*, 70, 6790–6795. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.10.6790-6795.1996>.

Settlage, S.B., See, R.G. and Hanley-Bowdoin, L. (2005) Geminivirus C3 protein: Replication enhancement and protein interactions. *Journal of Virology*, 79, 9885–9895. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.15.9885-9895.2005>.

Shabalina, S.A. and Koonin, E.V (2008) Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in ecology and evolution*, 23, 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.005>.

Shachar, S., Ziv, O., Avkin, S., Adar, S., Wittschieben, J., Reißner, T., et al. (2009) Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO Journal*, 28, 383–393. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.281>.

Shaheen, M., Shanmugam, I. and Hromas, R. (2010) The role of PCNA posttranslational modifications in translesion synthesis. *Journal of Nucleic Acids*, 2010.

Sharma, B., Joshi, D., Yadav, P.K., Gupta, A.K. and Bhatt, T.K. (2016) Role of ubiquitin-mediated degradation system in plant biology. *Frontiers in Plant Science*, 7.

Sharma, M., Fuertes, D., Perez-Gil, J. and Lois, L.M. (2021) SUMOylation in phytopathogen interactions: Balancing invasion and resistance. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 703795. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.703795>.

Sharma, P. and Ikegami, M. (2010) Tomato leaf curl Java virus V2 protein is a determinant of virulence, hypersensitive response and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Virology*, 396, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.10.012>.

Shaw, P.J. and Brown, J.W. (2004) Plant nuclear bodies. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 614–620.

Shemesh, K., Sebesta, M., Pacesa, M., Sau, S., Bronstein, A., Parnas, O., et al. (2017) A structure-function analysis of the yeast Elg1 protein reveals the importance of PCNA unloading in genome stability maintenance. *Nucleic acids research*, 45, 3189–3203. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1348>.

Shen, Q., Hu, T., Bao, M., Cao, L., Zhang, H., Song, F., et al. (2016) Tobacco RING E3 Ligase NtRFP1 Mediates Ubiquitination and Proteasomal Degradation of a Geminivirus-Encoded β C1. *Molecular plant*, 9, 911–925. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.03.008>.

Shen, W. and Hanley-Bowdoin, L. (2006) Geminivirus infection up-regulates the expression of two Arabidopsis protein kinases related to yeast SNF1- and mammalian AMPK-activating kinases. *Plant physiology*, 142, 1642–1655. <https://doi.org/10.1104/pp.106.088476>.

- Shin, E.J., Shin, H.M., Nam, E., Kim, W.S., Kim, J.-H., Oh, B.-H., et al.** (2012) DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO reports*, 13, 339–346. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.3>.
- Shiomi, N., Mori, M., Tsuji, H., Imai, T., Inoue, H., Tateishi, S., et al.** (2007) Human RAD18 is involved in S phase-specific single-strand break repair without PCNA monoubiquitination. *Nucleic Acids Research*, 35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl979>.
- Shivaprasad, P. V., Akbergenov, R., Trinks, D., Rajeswaran, R., Veluthambi, K., Hohn, T., et al.** (2005) Promoters, transcripts, and regulatory proteins of Mungbean yellow mosaic geminivirus. *Journal of virology*, 79, 8149–8163. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8149-8163.2005>.
- Shu, K. and Yang, W.** (2017) E3 ubiquitin ligases: Ubiquitous actors in plant development and abiotic stress responses. *Plant and Cell Physiology*, 58, 1461–1476.
- Shung, C.-Y. and Sunter, G.** (2007) AL1-dependent repression of transcription enhances expression of Tomato golden mosaic virus AL2 and AL3. *Virology*, 364, 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.006>.
- Silva, F.N., Lima, A.T., Rocha, C.S., Castillo-Urquiza, G.P., Alves-Júnior, M. and Zerbini, F.M.** (2014) Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses Tomato severe rugose virus (ToSRV) and Tomato rugose mosaic virus (ToRMV): Two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B. *Virology Journal*, 11. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-66>.
- Silva, S.J.C., Castillo-Urquiza, G.P., Hora-Júnior, B.T., Assunção, I.P., Lima, G.S.A., Pio-Ribeiro, G., et al.** (2012) Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. *Plant Pathology*, 61, 457–467. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02543.x>.
- Simandlova, J., Zagelbaum, J., Payne, M.J., Chu, W.K., Shevelev, I., Hanada, K., et al.** (2013) FBH1 helicase disrupts RAD51 filaments in vitro and modulates homologous recombination in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 288, 34168–34180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484493>.
- Simon-Loriere, E. and Holmes, E.C.** (2011) Why do RNA viruses recombine? *Nature reviews. Microbiology*, 9, 617–626. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2614>.
- Singh, A.K. and Chamovitz, D.A.** (2019) Role of Cop9 signalosome subunits in the environmental and hormonal balance of plant. *Biomolecules*, 9. <https://doi.org/10.3390/biom9060224>.
- Singh, D.K., Islam, M.N., Choudhury, N.R., Karjee, S. and Mukherjee, S.K.** (2007) The 32 kDa subunit of replication protein A (RPA) participates in the DNA replication of Mung bean yellow mosaic India virus (MYMIV) by interacting with the viral Rep protein. *Nucleic acids research*, 35, 755–770. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1088>.
- Singleton, M.R. and Wigley, D.B.** (2002) Modularity and specialization in superfamily 1 and 2 helicases. *Journal of Bacteriology*, 184, 1819–1826.
- Sinigalia, E., Alvisi, G., Segré, C. V., Mercorelli, B., Muratore, G., Winkler, M., et al.** (2012) The human cytomegalovirus DNA polymerase processivity factor UL44 is modified by SUMO

in a DNA-dependent manner. *PloS one*, 7, e49630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049630>.

Skaar, J.R., Pagan, J.K. and Pagano, M. (2014) SCF ubiquitin ligase-targeted therapies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13, 889–903.

Skelly, M.J., Malik, S.I., Bihan, T. Le, Bo, Y., Jiang, J., Spoel, S.H., et al. (2019) A role for S-nitrosylation of the SUMO-conjugating enzyme SCE1 in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 17090–17095. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900052116>.

Skubacz, A., Daszkowska-Golec, A. and Szarejko, I. (2016) The role and regulation of ABI5 (ABA-insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01884>.

Slade, D. (2018) Maneuvers on PCNA rings during DNA replication and repair. *Genes*, 9.

Sloan, E., Tatham, M.H., Gros Lambert, M., Glass, M., Orr, A., Hay, R.T., et al. (2015) Analysis of the SUMO2 Proteome during HSV-1 Infection. *PLoS pathogens*, 11, e1005059. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005059>.

Smith, M., Bhaskar, V., Fernandez, J. and Courey, A.J. (2004) *Drosophila* Ulp1, a nuclear pore-associated SUMO protease, prevents accumulation of cytoplasmic SUMO conjugates. *The Journal of biological chemistry*, 279, 43805–43814. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404942200>.

Snider, Natasha T ; Omary, M.B. (2014) Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 163–77. <https://doi.org/10.1038/nrm3753>.Post-translational.

Sohn, S.-Y. and Hearing, P. (2016) The adenovirus E4-ORF3 protein functions as a SUMO E3 ligase for TIF-1 γ sumoylation and poly-SUMO chain elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 6725–6730. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603872113>.

Son, G.H., Park, B.S., Song, J.T. and Seo, H.S. (2014) FLC-mediated flowering repression is positively regulated by sumoylation. *Journal of experimental botany*, 65, 339–351. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert383>.

Song, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G. and Chen, Y. (2004) Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proceedings National Academy of Sciences U S A*, 101, 14373–14378.

Song, L. and Luo, Z.Q. (2019) Post-translational regulation of ubiquitin signaling. *Journal of Cell Biology*, 218, 1776–1786. <https://doi.org/10.1083/JCB.201902074>.

Spratt, D.E., Walden, H. and Shaw, G.S. (2014) RBR E3 ubiquitin ligases: New structures, new insights, new questions. *Biochemical Journal*, 458, 421–437.

Srikanth, C. V and Verma, S. (2017) Sumoylation as an integral mechanism in bacterial infection and disease progression. *Advances in experimental medicine and biology*, 963, 389–408. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50044-7_22.

Sriramachandran, A.M. and Dohmen, R.J. (2014) SUMO-targeted ubiquitin ligases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843, 75–85.

Sriramachandran, A.M., Meyer-Teschendorf, K., Pabst, S., Ulrich, H.D., Gehring, N.H., Hofmann, K., et al. (2019) Arkadia/RNF111 is a SUMO-targeted ubiquitin ligase with preference for substrates marked with SUMO1-capped SUMO2/3 chain. *Nature Communications*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11549-3>.

Srivastava, A.K., Zhang, C., Caine, R.S., Gray, J. and Sadanandom, A. (2017) Rice SUMO protease Overly Tolerant to Salt 1 targets the transcription factor, OsbZIP23 to promote drought tolerance in rice. *Plant Journal*, 92, 1031–1043. <https://doi.org/10.1111/tpj.13739>.

Srivastava, A.K., Zhang, C., Yates, G., Bailey, M., Brown, A. and Sadanandom, A. (2016) SUMO is a critical regulator of salt stress responses in rice. *Plant Physiology*, 170, 2378–2391. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01530>.

Srivastava, M., Verma, V. and Srivastava, A.K. (2021) The converging path of protein SUMOylation in phytohormone signalling: highlights and new frontiers. *Plant Cell Reports*. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02732-2>.

Stanley, J. (1995) Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology*, 206, 707–712. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(95\)80093-x](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(95)80093-x).

Stanley, J. (1993) Geminiviruses: plant viral vectors. *Current opinion in genetics and development*, 3, 91–96. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(05\)80347-8](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(05)80347-8).

Stanley, J., Latham, J.R., Pinner, M.S., Bedford, I. and Markham, P.G. (1992) Mutational analysis of the monopartite geminivirus beet curly top virus. *Virology*, 191, 396–405. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90201-y](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90201-y).

Stark, J.M. and Jasin, M. (2003) Extensive loss of heterozygosity is suppressed during homologous repair of chromosomal breaks. *Molecular and cellular biology*, 23, 733–743. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.2.733-743.2003>.

Stehmeier, P. and Muller, S. (2009) Phospho-regulated SUMO interaction modules connect the SUMO system to CK2 signaling. *Molecular cell*, 33, 400–409. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.013>.

Stelter, P. and Ulrich, H.D. (2003) Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature*, 425, 188–191. <https://doi.org/10.1038/nature01965>.

Stenger, D.C., Davis, K.R. and Bisaro, D.M. (1994) Recombinant Beet curly top virus genomes exhibit both parental and novel pathogenic phenotypes. *Virology*, 200, 677–685. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1231>.

Stenger, D.C. and McMahon, C.L. (1997) Genotypic diversity of Beet curly top virus populations in the Western United States. *Phytopathology*, 87, 737–744. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.7.737>.

Stenger, D.C., Revington, G.N., Stevenson, M.C. and Bisaro, D.M. (1991) Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 8029–8033. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.18.8029>.

Stodola, J.L. and Burgers, P.M. (2016) Resolving individual steps of Okazaki-fragment maturation at a millisecond timescale. *Nature structural and molecular biology*, 23, 402–408. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3207>.

Stokes, T.L., Kunkel, B.N. and Richards, E.J. (2002) Epigenetic variation in *Arabidopsis* disease resistance. *Genes and development*, 16, 171–182. <https://doi.org/10.1101/gad.952102>.

Stolz, A. and Dikic, I. (2018) Heterotypic ubiquitin chains: seeing is believing. *Trends in cell biology*, 28, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.11.005>.

Strange, R.N. and Scott, P.R. (2005) Plant disease: a threat to global food security. *Annual review of phytopathology*, 43, 83–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>.

Streich, F.C. and Lima, C.D. (2016) Capturing a substrate in an activated RING E3/E2-SUMO complex. *Nature*, 536, 304–308. <https://doi.org/10.1038/nature19071>.

Strzalka, W. and Aggarwal, C. (2013) *Arabidopsis thaliana* Proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 possibly form homo-and hetero-trimeric complexes in the plant cell. *Plant Signaling and Behavior*, 8. <https://doi.org/10.4161/psb.24837>.

Strzalka, W., Bartnicki, F., Pels, K., Jakubowska, A., Tsurimoto, T. and Tanaka, K. (2013) RAD5a ubiquitin ligase is involved in ubiquitination of *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Experimental Botany*, 64, 859–869. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers368>.

Strzalka, W., Labecki, P., Bartnicki, F., Aggarwal, C., Rapala-Kozik, M., Tani, C., et al. (2012) *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen has several potential sumoylation sites. *Journal of Experimental Botany*, 63, 2971–2983. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers002>.

Strzalka, W., Oyama, T., Tori, K. and Morikawa, K. (2009) Crystal structures of the *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 proteins complexed with the human p21 C-terminal segment. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 18, 1072–1080. <https://doi.org/10.1002/pro.117>.

Strzalka, W. and Ziemienowicz, A. (2011) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany*, 107, 1127–1140.

Suh, H.-Y., Kim, J.-H., Woo, J.-S., Ku, B., Shin, E.J., Yun, Y., et al. (2012) Crystal structure of DeSI-1, a novel deSUMOylase belonging to a putative isopeptidase superfamily. *Proteins*, 80, 2099–2104. <https://doi.org/10.1002/prot.24093>.

Sun, J., Sun, Y., Ahmed, R.I., Ren, A. and Xie, M. (2019) Research progress on plant RING-finger proteins. *Genes*, 10. <https://doi.org/10.3390/genes10120973>.

Sun, M., Jiang, K., Li, C., Du, J., Li, M., Ghanem, H., et al. (2020) Tobacco curly shoot virus C3 protein enhances viral replication and gene expression in *Nicotiana benthamiana* plants. *Virus Research*, 281, 197939. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197939>.

- Sun, T.** (2010) Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant physiology*, 154, 567–570. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161554>.
- Sundvall, M.** (2020) Role of ubiquitin and SUMO in intracellular trafficking. *Current Issues in Molecular Biology*, 35, 99–108. <https://doi.org/10.21775/cimb.035.099>.
- Sung, Y.K. and Coutts, R.H.** (1995) Mutational analysis of Potato yellow mosaic geminivirus. *The Journal of general virology*, 76 (Pt 7), 1773–1780. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-7-1773>.
- Sunter, G. and Bisaro, D.M.** (1992) Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *The Plant cell*, 4, 1321–1331. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.10.1321>.
- Sunter, G., Hartitz, M.D., Hormuzdi, S.G., Brough, C.L. and Bisaro, D.M.** (1990) Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology*, 179, 69–77. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90275-v](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90275-v).
- Suyal, G., Mukherjee, S.K., Srivastava, P.S. and Choudhury, N.R.** (2013) *Arabidopsis thaliana* MCM2 plays role(s) in Mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV) DNA replication. *Archives of virology*, 158, 981–992. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1563-9>.
- Suzuki, K., Kato, A., Sakuraba, Y. and Inoue, H.** (2005) Srs2 and RecQ homologs cooperate in mei-3-mediated homologous recombination repair of *Neurospora crassa*. *Nucleic acids research*, 33, 1848–1858. <https://doi.org/10.1093/nar/gki326>.
- Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E. and Mittler, R.** (2014) Abiotic and biotic stress combinations. *The New phytologist*, 203, 32–43. <https://doi.org/10.1111/nph.12797>.
- Suzuki, R., Shindo, H., Tase, A., Kikuchi, Y., Shimizu, M. and Yamazaki, T.** (2009) Solution structures and DNA binding properties of the N-terminal SAP domains of SUMO E3 ligases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Oryza sativa*. *Proteins*, 75, 336–347. <https://doi.org/10.1002/prot.22243>.
- Swapna Geetanjali, A., Shilpi, S. and Mandal, B.** (2013) Natural association of two different betasatellites with Sweet potato leaf curl virus in wild morning glory (*Ipomoea purpurea*) in India. *Virus genes*, 47, 184–188. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-0901-7>.
- Swatek, K.N. and Komander, D.** (2016) Ubiquitin modifications. *Cell Research*, 26, 399–422. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.39>.
- Symington, L.S., Rothstein, R. and Lisby, M.** (2014) Mechanisms and regulation of mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 198, 795–835. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.166140>.
- Takahashi, H., Hatakeyama, S., Saitoh, H. and Nakayama, K.I.** (2005) Noncovalent SUMO-1 binding activity of thymine DNA glycosylase (TDG) is required for its SUMO-1 modification and colocalization with the promyelocytic leukemia protein. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 5611–5621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408130200>.

Takahashi, T.S., Wollscheid, H.-P., Lowther, J. and Ulrich, H.D. (2020) Effects of chain length and geometry on the activation of DNA damage bypass by polyubiquitylated PCNA. *Nucleic acids research*, 48, 3042–3052. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa053>.

Tamang, S., Kishkevich, A., Morrow, C.A., Osman, F., Jalan, M. and Whitby, M.C. (2019) The PCNA unloader Elg1 promotes recombination at collapsed replication forks in fission yeast. *eLife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.47277>.

Tamaoki, D., Seo, S., Yamada, S., Kano, A., Miyamoto, A., Shishido, H., et al. (2013) Jasmonic acid and salicylic acid activate a common defense system in rice. *Plant signaling and behavior*, 8, e24260. <https://doi.org/10.4161/psb.24260>.

Tammsalu, T., Matic, I., Jaffray, E.G., Ibrahim, A.F.M., Tatham, M.H. and Hay, R.T. (2014) Proteome-wide identification of SUMO2 modification sites. *Science signaling*, 7, rs2. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005146>.

Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doère, M. and Linder, P. (2003) The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Molecular cell*, 11, 127–138. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00006-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00006-6).

Tarasova, E., Dhidwal, S., Popp, M., Sakeenah, H. and Khayat, R. (2021). Mechanism of DNA Interaction and Translocation by the Replicase of a Circular Rep-Encoding Single-Stranded DNA Virus. *mBio*, 12(4): e00763-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.00763-21>.

Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M.P., Botting, C.H., Naismith, J.H., et al. (2001) Polymeric Chains of SUMO-2 and SUMO-3 are Conjugated to Protein Substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 35368–35374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104214200>.

Tatham, M.H., Geoffroy, M.-C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E.G., et al. (2008) RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nature cell biology*, 10, 538–546. <https://doi.org/10.1038/ncb1716>.

Teixeira, R.M., Ferreira, M.A., Raimundo, G.A.S. and Fontes, E.P.B. (2021) Geminiviral triggers and suppressors of plant antiviral immunity. *Microorganisms*, 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040775>.

Terai, K., Abbas, T., Jazaeri, A.A. and Dutta, A. (2010) CRL4Cdt2 E3 Ubiquitin Ligase Monoubiquitinates PCNA to Promote Translesion DNA Synthesis. *Molecular Cell*, 37, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.018>.

Thakar, T., Leung, W., Nicolae, C.M., Clements, K.E., Shen, B., Bielinsky, A.K., et al. (2020) Ubiquitinated-PCNA protects replication forks from DNA2-mediated degradation by regulating Okazaki fragment maturation and chromatin assembly. *Nature Communications*, 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16096-w>.

Theis, J.F., Yang, C., Schaefer, C.B. and Newlon, C.S. (1999) DNA sequence and functional analysis of homologous ARS elements of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. carlsbergensis*. *Genetics*, 152, 943–952. <https://doi.org/10.1093/genetics/152.3.943>.

Theos, A.C., Martina, A., Hurbain, I., Peden, A.A., Sviderskaya, E. V, Stewart, A., et al. (2005) Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 5356–5372. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05>.

Thomas, J.J., Abed, M., Heuberger, J., Novak, R., Zohar, Y., Beltran Lopez, A.P., et al. (2016) RNF4-dependent oncogene activation by protein stabilization. *Cell reports*, 16, 3388–3400. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.024>.

Thu, Y.M., Riper, S.K. Van, Higgins, L., Zhang, T., Becker, J.R., Markowski, T.W., et al. (2016) Slx5/Slx8 Promotes Replication Stress Tolerance by Facilitating Mitotic Progression. *Cell reports*, 15, 1254–1265. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.017>.

Tomanov, K., Nehlin, L., Ziba, I. and Bachmair, A. (2018) SUMO chain formation relies on the amino-terminal region of SUMO-conjugating enzyme and has dedicated substrates in plants. *Biochemical Journal*, 475, 61–74. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170472>.

Tomanov, K., Zeschmann, A., Hermkes, R., Eifler, K., Ziba, I., Grieco, M., et al. (2014) *Arabidopsis* PIAL1 and 2 promote SUMO chain formation as E4-type SUMO ligases and are involved in stress responses and sulfur metabolism. *The Plant cell*, 26, 4547–4560. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.131300>.

Truong, K., Lee, T.D., Li, B. and Chen, Y. (2012) Sumoylation of SAE2 C terminus regulates SAE nuclear localization. *The Journal of biological chemistry*, 287, 42611–42619. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.420877>.

Tsutakawa, S.E., Yan, C., Xu, X., Weinacht, C.P., Freudenthal, B.D., Yang, K., et al. (2015) Structurally distinct ubiquitin- and sumo-modified PCNA: Implications for their distinct roles in the DNA damage response. *Structure*, 23, 724–733. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.02.008>.

Tsutsui, Y., Kurokawa, Y., Ito, K., Siddique, M.S.P., Kawano, Y., Yamao, F., et al. (2014) Multiple regulation of Rad51-mediated homologous recombination by fission yeast Fbh1. *PLoS Genetics*, 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004542>.

Ubersax, J.A., Woodbury, E.L., Quang, P.N., Paraz, M., Blethrow, J.D., Shah, K., et al. (2003) Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*, 425, 859–864. <https://doi.org/10.1038/nature02062>.

Ullmann, R., Chien, C.D., Avantaggiati, M.L. and Muller, S. (2012) An acetylation switch regulates SUMO-dependent protein interaction networks. *Molecular cell*, 46, 759–770. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.04.006>.

Ulrich, H.D. (2001) The srs2 suppressor of UV sensitivity acts specifically on the RAD5-and MMS2-dependent branch of the RAD6 pathway. Vol. 29.

Ulrich, H.D. and Takahashi, T. (2013) Readers of PCNA modifications. *Chromosoma*, 122, 259–274.

Ulrich, H.D., Vogel, S. and Davies, A.A. (2005) SUMO keeps a check on recombination during DNA replication. *Cell Cycle*, 4, 1699–1702.

Ulrich, H.D. and Walden, H. (2010) Ubiquitin signalling in DNA replication and repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 479–489.

Umaharan, P., Padidam, M., Phelps, R.H., Beachy, R.N. and Fauquet, C.M. (1998) Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and tobago. *Phytopathology*, 88, 1262–1268. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.12.1262>.

Unsel, S., Ringel, M., Höfer, P., Höhnle, M., Jeske, H., Bedford, I.D., et al. (2000) Host range and symptom variation of pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite geminiviruses. *Archives of virology*, 145, 1449–1454. <https://doi.org/10.1007/s007050070101>.

Unsel, S., Ringel, M., Konrad, A., Lauster, S. and Frischmuth, T. (2000) Virus-specific adaptations for the production of a pseudorecombinant virus formed by two distinct bipartite geminiviruses from Central America. *Virology*, 274, 179–188. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0454>.

Urbino, C., Gutiérrez, S., Antolik, A., Bouazza, N., Doumayrou, J., Granier, M., et al. (2013) Within-host dynamics of the emergence of Tomato yellow leaf curl virus recombinants. *PloS one*, 8, e58375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058375>.

Urbino, C., Regragui, Z.F., Granier, M. and Peterschmitt, M. (2020) Fitness advantage of inter-species TYLCV recombinants induced by beneficial intra-genomic interactions rather than by specific mutations. *Virology*, 542, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.002>.

Urulangi, M., Sebesta, M., Menolfi, D., Szakal, B., Sollier, J., Sisakova, A., et al. (2015) Local regulation of the Srs2 helicase by the SUMO-like domain protein Esc2 promotes recombination at sites of stalled replication. *Genes and Development*, 29, 2067–2080. <https://doi.org/10.1101/gad.265629.115>.

Uversky, V. (2013) Postranslational modifications. In: Stanley Maloy, K.H. (Ed.) *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Academic Press.

Uzunova, K., Götsche, K., Miteva, M., Weisshaar, S.R., Glanemann, C., Schnellhardt, M., et al. (2007) Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates. *The Journal of biological chemistry*, 282, 34167–34175. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706505200>.

Vaghi Medina, C.G. (2015) Diversidad genética, recombinación y filogeografía de begomovirus que infectan tomate en Argentina. 203.

Vaisman, A. and Woodgate, R. (2017) Translesion DNA polymerases in eukaryotes: what makes them tick? *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52, 274–303.

Valerdi, K.M., Hage, A., Tol, S. van, Rajsbaum, R. and Giraldo, M.I. (2021) The role of the host ubiquitin system in promoting replication of emergent viruses. *Viruses*, 13, 1–14. <https://doi.org/10.3390/v13030369>.

van den Burg, H.A., Kini, R.K., Schuurink, R.C. and Takken, F.L.W. (2010) Arabidopsis small ubiquitin-like modifier paralogs have distinct functions in development and defense. *Plant Cell*, 22, 1998–2016. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.070961>.

van den Burg, H.A. and Takken, F.L.W. (2009) Does chromatin remodeling mark systemic acquired resistance? *Trends in plant science*, 14, 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.02.003>.

- van der Walt, E., Martin, D.P., Varsani, A., Polston, J.E. and Rybicki, E.P.** (2008) Experimental observations of rapid Maize streak virus evolution reveal a strand-specific nucleotide substitution bias. *Virology journal*, 5, 104. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-104>.
- Van Komen, S., Reddy, M.S., Krejci, L., Klein, H. and Sung, P.** (2003) ATPase and DNA helicase activities of the *Saccharomyces cerevisiae* anti-recombinase Srs2. *The Journal of biological chemistry*, 278, 44331–44337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307256200>.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J.S. and Fauquet, C.M.** (2004) Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of virology*, 78, 9487–9498. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.17.9487-9498.2004>.
- Vanoli, F., Fumasoni, M., Szakal, B., Maloisel, L. and Branzei, D.** (2010) Replication and recombination factors contributing to recombination-dependent bypass of DNA lesions by template switch. *PLoS Genetics*, 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001205>.
- Varadaraj, A., Mattoscio, D. and Chiocca, S.** (2014) SUMO Ubc9 enzyme as a viral target. *IUBMB Life*, 66, 27–33.
- Varsani, A., Lefevre, P., Roumagnac, P. and Martin, D.** (2018) Notes on recombination and reassortment in multipartite/segmented viruses. *Current opinion in virology*, 33, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.013>.
- Varsani, A., Shepherd, D.N., Monjane, A.L., Owor, B.E., Erdmann, J.B., Rybicki, E.P., et al.** (2008) Recombination, decreased host specificity and increased mobility may have driven the emergence of maize streak virus as an agricultural pathogen. *The Journal of general virology*, 89, 2063–2074. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003590-0>.
- Vaze, M.B., Pelliccioli, A., Lee, S.E., Ira, G., Liberi, G., Arbel-Eden, A., et al.** (2002) Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Molecular cell*, 10, 373–385. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00593-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00593-2).
- Veaute, X., Delmas, S., Selva, M., Jeusset, J., Cam, E. Le, Matic, I., et al.** (2005) UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in *Escherichia coli*. *The EMBO journal*, 24, 180–189. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600485>.
- Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S.C., Cam, E. Le and Fabre, F.** (2003) The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature*, 423, 309–312. <https://doi.org/10.1038/nature01585>.
- Velankar, S.S., Soultanas, P., Dillingham, M.S., Subramanya, H.S. and Wigley, D.B.** (1999) Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell*, 97, 75–84. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80716-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80716-3).
- Veluthambi, K. and Sunitha, S.** (2021) Targets and mechanisms of geminivirus silencing suppressor protein AC2. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645419>.
- Verchot, J.** (2016) Plant virus infection and the ubiquitin proteasome machinery: Arms race along the endoplasmic reticulum. *Viruses*, 8.

Verma, V., Croley, F. and Sadanandom, A. (2018) Fifty shades of SUMO: its role in immunity and at the fulcrum of the growth–defence balance. *Molecular Plant Pathology*, 19, 1537–1544.

Verma, V., Srivastava, A.K., Gough, C., Campanaro, A., Srivastava, M., Morrell, R., et al. (2021) SUMO enables substrate selectivity by mitogen-activated protein kinases to regulate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021351118>.

Vierstra, R.D. (2012) The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiology*, 160, 2–14. <https://doi.org/10.1104/pp.112.200667>.

Villajuana-Bonequi, M., Elrouby, N., Nordström, K., Griebel, T., Bachmair, A. and Coupland, G. (2014) Elevated salicylic acid levels conferred by increased expression of Isochorismate synthase 1 contribute to hyperaccumulation of SUMO1 conjugates in the *Arabidopsis* mutant early in short days 4. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 79, 206–219. <https://doi.org/10.1111/tjp.12549>.

Vinoth Kumar, R. and Shivaprasad, P. V. (2020) Plant-virus-insect tritrophic interactions: Insights into the functions of geminivirus virion-sense strand genes: Geminivirus-plant-insect interactions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1846>.

Vítor, A.C., Huertas, P., Legube, G. and de Almeida, S.F. (2020) Studying DNA double-strand break repair: An ever-growing toolbox. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 24. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00024>.

Vivelo, C.A., Ayyappan, V. and Leung, A.K.L. (2019) Poly(ADP-ribose)-dependent ubiquitination and its clinical implications. *Biochemical pharmacology*, 167, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.05.006>.

Voigt, C.A. (2014) Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00168>.

Voinnet, O., Pinto, Y.M. and Baulcombe, D.C. (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 14147–14152. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.14147>.

Voinnet, O. (2005) Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature reviews. Genetics*, 6, 206–220. <https://doi.org/10.1038/nrg1555>.

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 33, 949–956. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01676.x>.

Vozandychova, V., Stojkova, P., Hercik, K., Rehulka, P. and Stulik, J. (2021) The ubiquitination system within bacterial host-pathogen interactions. *Microorganisms*, 9, 1–22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030638>.

Wagner, K., Kunz, K., Piller, T., Tascher, G., Hölper, S., Stehmeier, P., et al. (2019) The SUMO isopeptidase SENP6 functions as a rheostat of chromatin residency in genome

maintenance and chromosome dynamics. *Cell Reports*, 29, 480-494.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.106>.

Walker, G.C., Kenyon, C.J., Bagg, A., Elledge, S.J., Perry, K.L. and Shanabruch, W.G. (1982) Regulation and functions of *Escherichia coli* genes induced by DNA damage. *Basic life sciences*, 20, 43–63. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3476-7_2.

Wang, B., Yang, X., Wang, Y., Xie, Y. and Zhou, X. (2018) Tomato yellow leaf curl virus V2 interacts with host histone deacetylase 6 to suppress methylation-mediated transcriptional gene silencing in plants. *Journal of virology*, 92. <https://doi.org/10.1128/JVI.00036-18>.

Wang, H., Zhang, X., Liu, J., Kiba, T., Woo, J., Ojo, T., et al. (2011) Deep sequencing of small RNAs specifically associated with *Arabidopsis* AGO1 and AGO4 uncovers new AGO functions. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 67, 292–304. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2011.04594.x>.

Wang, H., Wang, M. and Xia, Z. (2019) Overexpression of a maize SUMO conjugating enzyme gene (ZmSCE1e) increases sumoylation levels and enhances salt and drought tolerance in transgenic tobacco. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 281, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.01.020>.

Wang, H., Buckley, K.J., Yang, X., Buchmann, R.C. and Bisaro, D.M. (2005) Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Journal of virology*, 79, 7410–7418. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7410-7418.2005>.

Wang, L., Wansleeben, C., Zhao, S., Miao, P., Paschen, W. and Yang, W. (2014) SUMO2 is essential while SUMO3 is dispensable for mouse embryonic development. *EMBO reports*, 15, 878–885. <https://doi.org/10.15252/embr.201438534>.

Wang, L., Tan, H., Wu, M., Jimenez-Gongora, T., Tan, L. and Lozano-Duran, R. (2017) Dynamic virus-dependent subnuclear localization of the capsid protein from a geminivirus. *Frontiers in plant science*, 8, 2165. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02165>.

Wang, Q., Zang, Y., Zhou, X. and Xiao, W. (2017) Characterization of four rice UEV1 genes required for Lys63-linked polyubiquitination and distinct functions. *BMC Plant Biology*, 17, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1073-8>.

Wang, S.-W., Goodwin, A., Hickson, I.D. and Norbury, C.J. (2001) Involvement of *Schizosaccharomyces pombe* Srs2 in cellular responses to DNA damage.

Wang, Y., Dang, M., Hou, H., Mei, Y., Qian, Y. and Zhou, X. (2014) Identification of an RNA silencing suppressor encoded by a mastrevirus. *The Journal of general virology*, 95, 2082–2088. <https://doi.org/10.1099/vir.0.064246-0>.

Wang, Y., Du, S., Zhu, C., Wang, C., Yu, N., Lin, Z., et al. (2020) STUB1 is targeted by the SUMO-interacting motif of EBNA1 to maintain Epstein-Barr Virus latency. *PLoS Pathogens*, 16. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008447>.

Wani, S.H., Kumar, V., Shriram, V. and Sah, S.K. (2016) Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop Journal*, 4, 162–176.

Warbrick, E. (2000) The puzzle of PCNA's many partners. John Wiley and Sons, Inc.

Wartig, L., Kheyr-Pour, A., Noris, E., Kouchkovsky, F. De, Jouanneau, F., Gronenborn, B., et al. (1997) Genetic analysis of the monopartite tomato yellow leaf curl geminivirus: roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis. *Virology*, 228, 132–140. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.8406>.

Watts, F.Z. (2006) Sumoylation of PCNA: Wrestling with recombination at stalled replication forks. *DNA Repair*, 5, 399–403. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.11.002>.

Weber, C.A., Salazar, E.P., Stewart, S.A. and Thompson, L.H. (1990) ERCC2: cDNAs cloning and molecular characterization of a human nucleotide excision repair gene with high homology to yeast RAD3. *EMBO Journal*, 9, 1437–1447. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08260.x>.

Weitao, T., Budd, M. and Campbell, J.L. (2003) Evidence that yeast SGS1, DNA2, SRS2, and FOB1 interact to maintain rDNA stability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 532, 157–172. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.08.015>.

Wen, D., Wu, J., Wang, L. and Fu, Z. (2017) SUMOylation promotes nuclear import and stabilization of polo-like kinase 1 to support its mitotic function. *Cell Reports*, 21, 2147–2159. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.085>.

Wenzel, D.M., Stoll, K.E. and Klevit, R.E. (2011) E2s: structurally economical and functionally replete. *The Biochemical journal*, 433, 31–42. <https://doi.org/10.1042/BJ20100985>.

West, C.E., Waterworth, W.M., Sunderland, P.A. and Bray, C.M. (2004) *Arabidopsis* DNA double-strand break repair pathways. *Biochemical Society Transactions*, 32, 964–966.

Westerbeck, J.W., Pasupala, N., Guillotte, M., Szymanski, E., Matson, B.C., Esteban, C., et al. (2014) A SUMO-targeted ubiquitin ligase is involved in the degradation of the nuclear pool of the SUMO E3 ligase Siz1. *Molecular Biology of the Cell*, 25, 1–16. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-05-0291>.

Whalen, J.M., Dhingra, N., Wei, L., Zhao, X. and Freudenreich, C.H. (2020) Relocation of collapsed forks to the nuclear pore complex depends on sumoylation of DNA repair proteins and permits Rad51 association. *Cell Reports*, 31, 107635. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107635>.

Wiechmann, S., Gärtner, A., Kniss, A., Stengl, A., Behrends, C., Rogov, V. V., et al. (2017) Site-specific inhibition of the small ubiquitin-like modifier (SUMO)-conjugating enzyme Ubc9 selectively impairs SUMO chain formation. *Journal of Biological Chemistry*, 292, 15340–15351. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.794255>.

Wilczynska, A. and Bushell, M. (2015) The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell death and differentiation*, 22, 22–33. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.112>.

Wilkinson, K.A. and Henley, J.M. (2010) Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *The Biochemical journal*, 428, 133–145. <https://doi.org/10.1042/BJ20100158>.

Williams, G.J., Johnson, K., Rudolf, J., McMahon, S.A., Carter, L., Oke, M., et al. (2006) Structure of the heterotrimeric PCNA from *Sulfolobus solfataricus*. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 62, 944–948. <https://doi.org/10.1107/S1744309106034075>.

- Wilson, V.G.** (2017) SUMO Regulation of Cellular Processes. Second. Springer International Publishing.
- Wimmer, P. and Schreiner, S.** (2015) Viral mimicry to usurp ubiquitin and sumo host pathways. *Viruses*, 7, 4854–4877.
- Wright, C.M., Whitaker, R.H., Onuiri, J.E., Blackburn, T., McGarity, S., Bjornsti, M.A., et al.** (2019) UBC9 mutant reveals the impact of protein dynamics on substrate selectivity and sumo chain linkages. *Biochemistry*, 58, 621–632. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b01045>.
- Wu, B., Shang, X., Schubert, J., Habekuß, A., Elena, S.F. and Wang, X.** (2015) Global-scale computational analysis of genomic sequences reveals the recombination pattern and coevolution dynamics of cereal-infecting geminiviruses. *Scientific Reports*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep08153>.
- Wu, M., Wei, H., Tan, H., Pan, S., Liu, Q., Bejarano, E.R., et al.** (2021) Plant DNA polymerases α and δ mediate replication of geminiviruses. *Nature Communications*, 12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23013-2>.
- Wu, Y.-C., Roark, A.A., Bian, X.-L. and Wilson, V.G.** (2008) Modification of papillomavirus E2 proteins by the small ubiquitin-like modifier family members (SUMOs). *Virology*, 378, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.06.008>.
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Guo, H., García, J.A. and Gutiérrez, C.** (1999) GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant molecular biology*, 39, 647–656. <https://doi.org/10.1023/a:1006138221874>.
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Hannon, G.J. and Gutiérrez, C.** (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *The EMBO journal*, 15, 4900–4908.
- Xie, Q., Suárez-López, P. and Gutiérrez, C.** (1995) Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. *The EMBO journal*, 14, 4073–4082.
- Xiong, R. and Wang, A.** (2013) SCE1, the SUMO-conjugating enzyme in plants that interacts with NIB, the RNA-dependent RNA polymerase of Turnip Mosaic Virus, is required for viral infection. *Journal of Virology*, 87, 4704–4715. <https://doi.org/10.1128/jvi.02828-12>.
- Xu, G., Paige, J.S. and Jaffrey, S.R.** (2010) Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. *Nature biotechnology*, 28, 868–873. <https://doi.org/10.1038/nbt.1654>.
- Xu, H., Zhang, P., Liu, L. and Lee, M.Y.** (2001) A novel PCNA-binding motif identified by the panning of a random peptide display library. *Biochemistry*, 40, 4512–4520. <https://doi.org/10.1021/bi010103+>.
- Xu, H., Boone, C. and Klein, H.L.** (2004) Mrc1 is required for sister chromatid cohesion to aid in recombination repair of spontaneous damage. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 7082–7090. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.16.7082-7090.2004>.

Xu, P. and Yang, C. (2013) Emerging role of SUMOylation in plant development. *Plant Signaling and Behavior*, 8.

Xu, X., Zhang, Q., Hong, J., Li, Z., Zhang, X. and Zhou, X. (2019) Cryo-EM structure of a begomovirus geminate particle. *International Journal of Molecular Sciences*, 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20071738>.

Xu, Y.P., Zhao, Y., Song, X.Y., Ye, Y.F., Wang, R.G., Wang, Z.L., et al. (2019) Ubiquitin extension protein UEP1 modulates cell death and resistance to various pathogens in tobacco. *Phytopathology*, 109, 1257–1269. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-18-0212-R>.

Yagi, T., Fujikawa, Y., Sawai, T., Takamura-Enya, T., Ito-Harashima, S. and Kawanishi, M. (2017) Error-prone and error-free translesion DNA synthesis over site-specifically created DNA adducts of aryl hydrocarbons (3-nitrobenzanthrone and 4-aminobiphenyl). *Toxicological Research*, 33, 265–272.

Yan, N., Doelling, J.H., Falbel, T.G., Durski, A.M. and Vierstra, R.D. (2000) The ubiquitin-specific protease family from *Arabidopsis*. AtUBP1 and 2 are required for the resistance to the amino acid analog canavanine 1. *Plant Physiology*, 124, 1828–1843.

Yang, K., Weinacht, C.P. and Zhuang, Z. (2013) Regulatory role of ubiquitin in eukaryotic DNA translesion synthesis. *Biochemistry*, 52, 3217–3228. <https://doi.org/10.1021/bi400194r>.

Yang, S.H., Galanis, A., Witty, J. and Sharrocks, A.D. (2006) An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO Journal*, 25, 5083–5093. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601383>.

Yang, W.-S., Hsu, H.-W., Campbell, M., Cheng, C.-Y. and Chang, P.-C. (2015) K-bZIP mediated SUMO-2/3 specific modification on the KSHV genome negatively regulates lytic gene expression and viral reactivation. *PLoS pathogens*, 11, e1005051. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005051>.

Yang, X., Guo, W., Li, F., Sunter, G. and Zhou, X. (2019) Geminivirus-associated betasatellites: exploiting chinks in the antiviral arsenal of plants. *Trends in Plant Science*, 24, 519–529.

Yang, X., Ren, Y., Sun, S., Wang, D., Zhang, F., Li, D., et al. (2018) Identification of the potential virulence factors and RNA silencing suppressors of Mulberry mosaic dwarf-associated geminivirus. *Viruses*, 10. <https://doi.org/10.3390/v10090472>.

Yang, X., Xie, Y., Raja, P., Li, S., Wolf, J.N., Shen, Q., et al. (2011) Suppression of methylation-mediated transcriptional gene silencing by β C1-SAHH protein interaction during geminivirus-betasatellite infection. *PLoS pathogens*, 7, e1002329. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002329>.

Yasuhira, S. (2009) Redundant roles of Srs2 helicase and replication checkpoint in survival and rDNA maintenance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 281, 497–509. <https://doi.org/10.1007/s00438-009-0426-x>.

Yates, G., Srivastava, A.K. and Sadanandom, A. (2016) SUMO proteases: uncovering the roles of deSUMOylation in plants. *Journal of experimental botany*, 67, 2541–2548. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw092>.

- Yokoyama, R., Hirakawa, T., Hayashi, S., Sakamoto, T. and Matsunaga, S.** (2016) Dynamics of plant DNA replication based on PCNA visualization. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep29657>.
- Yoo, C.Y., Miura, K., Jin, J.B., Lee, J., Park, H.C., Salt, D.E., et al.** (2006) SIZ1 small ubiquitin-like modifier E3 ligase facilitates basal thermotolerance in *Arabidopsis* independent of salicylic acid. *Plant Physiology*, 142, 1548–1558. <https://doi.org/10.1104/pp.106.088831>.
- Yousef, A.F., Fonseca, G.J., Pelka, P., Ablack, J.N.G., Walsh, C., Dick, F.A., et al.** (2010) Identification of a molecular recognition feature in the E1A oncoprotein that binds the SUMO conjugase UBC9 and likely interferes with polySUMOylation. *Oncogene*, 29, 4693–4704. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.226>.
- Yunus, A.A. and Lima, C.D.** (2009) Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA. *Molecular Cell*, 35, 669–682. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.013>.
- Zarreen, F. and Chakraborty, S.** (2020) Epigenetic regulation of geminivirus pathogenesis: A case of relentless recalibration of defence responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 71, 6890–6906. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa406>.
- Zeng, L.-R., Vega-Sánchez, M.E., Zhu, T. and Wang, G.-L.** (2006) Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell research*, 16, 413–426. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310053>.
- Zerbini, F.M., Briddon, R.W., Idris, A., Martin, D.P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., et al.** (2017) ICTV virus taxonomy profile: *Geminiviridae*. *Journal of General Virology*, 98, 131–133. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000738>.
- Zhan, B., Zhao, W., Li, S., Yang, X. and Zhou, X.** (2018) Functional scanning of apple geminivirus proteins as symptom determinants and suppressors of posttranscriptional gene silencing. *Viruses*, 10. <https://doi.org/10.3390/v10090488>.
- Zhan, E., Zhou, H., Li, S., Liu, L., Tan, T. and Lin, H.** (2018) OTS1-dependent deSUMOylation increases tolerance to high copper levels in *Arabidopsis*. *Journal of integrative plant biology*, 60, 310–322. <https://doi.org/10.1111/jipb.12618>.
- Zhang, H.** (2016) *The Function of a Putative SUMO E2 Enzyme in Plant Immunity*.
- Zhang, J., Dong, J., Xu, Y. and Wu, J.** (2012) V2 protein encoded by Tomato yellow leaf curl China virus is an RNA silencing suppressor. *Virus research*, 163, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.08.009>.
- Zhang, L., Du, L., Shen, C., Yang, Y. and Poovaiah, B.W.** (2014) Regulation of plant immunity through ubiquitin-mediated modulation of Ca²⁺-calmodulin-AtSR1/CAMTA3 signaling. *Plant Journal*, 78, 269–281. <https://doi.org/10.1111/tpj.12473>.
- Zhang, R.-F., Guo, Y., Li, Y.-Y., Zhou, L.-J., Hao, Y.-J. and You, C.-X.** (2016) Functional identification of MdSIZ1 as a SUMO E3 ligase in apple. *Journal of plant physiology*, 198, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.04.007>.

Zhang, S., Qi, Y., Liu, M. and Yang, C. (2013) SUMO E3 ligase AtMMS21 regulates drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55, 83–95. <https://doi.org/10.1111/jipb.12024>.

Zhang, S., Wang, S., Lv, J., Liu, Z., Wang, Y., Ma, N., et al. (2018) SUMO E3 ligase SISIZ1 facilitates heat tolerance in tomato. *Plant and cell physiology*, 59, 58–71. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx160>.

Zhang, W., Qin, Z., Zhang, X. and Xiao, W. (2011) Roles of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance. *FEBS Letters*, 585, 2786–2794.

Zhang, Y. and Zeng, L. (2020) Crosstalk between ubiquitination and other post-translational protein modifications in plant immunity. *Plant Communications*, 1, 100041. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100041>.

Zhang, Z., Li, J., Liu, H., Chong, K. and Xu, Y. (2015) Roles of ubiquitination-mediated protein degradation in plant responses to abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 114, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.07.005>.

Zhang, Z., Chen, H., Huang, X., Xia, R., Zhao, Q., Lai, J., et al. (2011) BSCTV C2 attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23, 273–288. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081695>.

Zhao, L. and Washington, M.T. (2017) Translesion synthesis: insights into the selection and switching of DNA polymerases. *Genes*, 8. <https://doi.org/10.3390/genes8010024>.

Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W., et al. (2014) GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic acids research*, 42, W325–30. <https://doi.org/10.1093/nar/gku383>.

Zhao, W., Ji, Y., Wu, S., Ma, X., Li, S., Sun, F., et al. (2018) Single amino acid in V2 encoded by TYLCV is responsible for its self-interaction, aggregates and pathogenicity. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21446-2>.

Zhao, X. (2018) SUMO-mediated regulation of nuclear functions and signaling processes. *Molecular Cell*, 71, 409–418.

Zheng, N. and Shabek, N. (2017) Ubiquitin ligases: Structure, function, and regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 129–157. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014922>.

Zheng, Y. and Gao, C. (2019) E3 ubiquitin ligases, the powerful modulator of innate antiviral immunity. *Cellular Immunology*, 340, 103915. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.04.003>.

Zheng, Y., Jayappa, K.D., Ao, Z., Qiu, X., Su, R.C. and Yao, X. (2019) Noncovalent SUMO-interaction motifs in HIV integrase play important roles in SUMOylation, cofactor binding, and virus replication. *Virology Journal*, 16. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1134-8>.

Zheng, Y., Chen, Z., Ma, L. and Liao, C. (2018) The ubiquitin E3 ligase RHA2b promotes degradation of MYB30 in abscisic acid signaling. *Plant Physiology*, 178, 428–440. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00683>.

- Zheng, Y., Schumaker, K.S. and Guo, Y.** (2012) Sumoylation of transcription factor MYB30 by the small ubiquitin-like modifier E3 ligase SIZ1 mediates abscisic acid response in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 12822–12827. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202630109>.
- Zhou, B., Mural, R. V., Chen, X., Oates, M.E., Connor, R.A., Martin, G.B., et al.** (2017) A subset of ubiquitin-conjugating enzymes is essential for plant immunity. *Plant Physiology*, 173, 1371–1390. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01190>.
- Zhou, B. and Zeng, L.** (2017) Conventional and unconventional ubiquitination in plant immunity. *Molecular Plant Pathology*, 18, 1313–1330.
- Zhou, X.** (2013) Advances in understanding begomovirus satellites. *Annual review of phytopathology*, 51, 357–381. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102234>.
- Zhu, J.K.** (2016) Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167, 313–324.
- Zhu, Z., Yang, F., Zhang, K., Cao, W., Jin, Y., Wang, G., et al.** (2015) Comparative Proteomic analysis of wild-type and SAP domain mutant foot-and-mouth disease virus-infected porcine cells identifies the ubiquitin-activating enzyme UBE1 required for virus replication. *Journal of proteome research*, 14, 4194–4206. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00310>.
- Zhuang, Z., Yoder, B.L., Burgers, P.M.J. and Benkovic, S.J.** (2006) The structure of a ring-opened proliferating cell nuclear antigen-replication factor C complex revealed by fluorescence energy transfer.
- Ziegler-Graff, V.** (2020) Molecular insights into host and vector manipulation by plant viruses. *Viruses*, 12. <https://doi.org/10.3390/v12030263>.
- Zou, B., Yang, D.-L., Shi, Z., Dong, H. and Hua, J.** (2014) Monoubiquitination of histone 2B at the disease resistance gene locus regulates its expression and impacts immune responses in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 165, 309–318. <https://doi.org/10.1104/pp.113.227801>.
- Zou, C. and Mallampalli, R.K.** (2014) Regulation of histone modifying enzymes by the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et biophysica acta*, 1843, 694–702. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.016>.
- Zrachya, A., Glick, E., Levy, Y., Arazi, T., Citovsky, V. and Gafni, Y.** (2007) Suppressor of RNA silencing encoded by Tomato yellow leaf curl virus-Israel. *Virology*, 358, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.08.016>.
- Zu, S., Xue, Q., He, Z., Shi, C., Zhang, J., Wu, W., et al.** (2020) Duck PIAS2 promotes H5N1 Avian Influenza virus replication through its SUMO E3 ligase activity. *Frontiers in microbiology*, 11, 1246. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01246>.
- Zuo, J., Niu, Q.W. and Chua, N.H.** (2000) Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 24, 265–273. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00868.x>.

