



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

Efecto de alteraciones en la secuencia de la E1B 55kDa sobre la exportación de mRNA virales y la degradación de sustratos de la Cullin5-E3 ubiquitina ligasa

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

LIC. BERTO TEJERA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA-CONDE

Jurado de Examen

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres (CINVESTAV, Zacatenco)

Presidente

Dra. Carmen Nina Pastor Colón (CIDC-UAEM)

Secretario

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano (CINVESTAV, Zacatenco)

Vocal

Dr. Iván Martínez-Duncker (CIDC-UAEM)

Vocal

Dr. Carlos Sandoval Jaime (IBT-UNAM)

Vocal

Dr. Carlos Amero Tello (CIQ-UAEM)

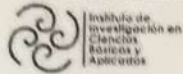
Suplente

Dr. Ramón Antonio González García-Conde (CIDC-UAEM)

Suplente



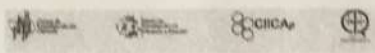
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias



DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "Efecto de alteraciones en la secuencia de la E1B 55kDa sobre la exportación de mRNA virales y la degradación de sustratos de la Cullin5-E3 ubiquitina ligasa" que presenta el alumno **Berto Tejera Hernández (5920120701)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres CINVESTAV Zacatenco	Aprobado	
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM	Aprobado	NINA PASTOR
Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano CINVESTAV Zacatenco	Aprobado	Ana Lorena Gutiérrez
Dr. Iván Martínez-Duncker CIDC-UAEM	Aprobado	
Dr. Carlos Sandoval Jaime IBT-UNAM	Aprobado	
Dr. Carlos Amero Tello CIQ-UAEM	Aprobado	Carlos Amero Tello
Dr. Ramón Antonio Gonzalez García-Conde CIDC-UAEM	APROBADO	

Agradecimientos

Agradezco a México la oportunidad que me dio de recibirme y aceptarme como hijo adoptivo.

Al Dr. Ramón A. González García-Conde por su guía, ejemplo de dedicación y hasta por sus regaños oportunos que me permitieron lograr esta meta como mejor profesional y mejor persona.

A los miembros del Comité tutorial:

Dra. Nina Pastor

Dr. Tomás Lopez

Dr. Susana Castro

Dr. Ramón A. González

Muchas gracias por sus críticas constructivas que permitieron la mejora del trabajo de investigación, e incluso, mi superación personal.

A la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano (la Jefa) por haberme aceptado en su laboratorio y ser parte importante en mi formación académica. Muchas gracias por sus consejos y su guía.

A los miembros del Jurado de examen

Dra. Rosa María de Ángel Nuñez de Cáceres

Dra. Nina Pastor Colón

Dr. Iván Martínez-Duncker

Dr. Carlos Sandoval Jaime

Dr. Carlos Amero Tello

Dr. Ramón A. González García-Conde

Muchas gracias por su interés, por sus críticas y por sus aportaciones al documento de tesis.

A mis compañeros de laboratorio, los que están y los que ya pasaron, por su apoyo y por soportarme. En especial a Raúl por su apoyo invaluable sobretodo en esta última etapa.

A mi esposa Rosario por su apoyo incondicional en todo momento, por sus consejos, su amor y hasta jalones de orejas. Gracias por estar ahí para mí siempre. A mi hija Sofi, cuyo nacimiento vino a darle un impulso a nuestras vidas.

A mis padres y familia cubana y mexicana que nunca me abandonaron y siempre creyeron en mí.

A mis amigos cubanos con los que inicié esta travesía y a los amigos mexicanos que acogieron como uno de ellos.

A CONACyT por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al Posgrado en Ciencias y a la UAEM por brindarme los medios necesarios para continuar mi desarrollo profesional.

A todos mi agradecimiento y gratitud.

Resumen

La proteína adenoviral E1B 55kDa (E1B) es una proteína multifuncional que está involucrada en regular la producción de mRNA virales tardíos y en la inhibición de defensas celulares mediadas por p53 y Mre11. Esta proteína es modificada postraduccionalmente mediante SUMOilación y fosforilación. Estas modificaciones regulan las actividades de la E1B y están situadas hacia el amino (N) y carboxilo (C) terminal de la proteína, respectivamente. Esta proteína se localiza entre núcleo y citoplasma debido a la presencia de secuencias de importe (NLS) y exporte (NES) nuclear. El N y C terminal de E1B son intrínsecamente desordenados y algunos estudios de predicción de estructura tridimensional sugieren que la región central es un “core” hidrofóbico que podría ser importante para el plegamiento correcto de la proteína y para su interacción con proteínas y potencialmente ácidos nucleicos, debido a la presencia de un dominio putativo de ribonucleoproteína (RNP). Sin embargo el impacto de esta región sobre las actividades de la proteína no se conoce claramente. La E1B forma un complejo E3 ubiquitina ligasa junto con la proteína adenoviral E4orf6 que induce la poliubiquitinación y degradación de varios sustratos celulares que incluyen a p53 y Mre11. Además el complejo E1B-E4orf6 participa en la regulación del tráfico intranuclear de mRNAs virales tardíos así como en su estabilidad y splicing. Hasta el momento no se ha detectado la interacción de la E1B con RNA en el contexto de la infección y no se sabe cuál es su contribución en el ciclo replicativo de adenovirus. En este trabajo se construyeron adenovirus recombinantes con sustituciones de aminoácidos en el dominio putativo de RNP de la E1B con el objetivo de determinar e identificar su interacción con RNA y su impacto en el ciclo de replicación viral, específicamente, sobre la producción de progenie viral, la eficiencia de síntesis de proteínas tempranas y tardías, así como su contribución en la degradación de p53 y Mre11. Los resultados muestran que E1B interacciona con RNA en el contexto de la infección y que las sustituciones en el RNP afectan la producción de DNA y progenie viral, pero no la degradación de p53 y Mre11, ni la localización intranuclear de E1B. Por otra parte, se encontró una correlación entre la interacción de E1B con RNA y la producción y splicing de mRNAs virales tardíos, así como los tiempos en los que proteínas virales tempranas y tardías se sintetizan. Los resultados muestran que la interacción de E1B con RNA está implicada en la producción de los mRNA virales tardíos.

Abstract

The early adenoviral E1B 55kDa (E1B) is a multifunctional protein involved in the regulation of viral late mRNAs expression and the inhibition of cellular defenses mediated by p53 and Mre11. This protein is modified post-translationally by SUMOylation and phosphorylation. These modifications regulate E1B activities and are located towards the N- and C-termini of the protein, respectively. This protein shuttles between the nucleus and cytoplasm due to the presence of a NES (Nuclear Export Signal) and a NLS (Nuclear Localization Signal). The N- and C-termini of E1B are intrinsically disordered and three-dimensional structure prediction suggest that the central region could form a hydrophobic core that may be important for the proper folding of the protein and for its interaction with proteins and potentially nucleic acids, due to the presence of a putative ribonucleoprotein (RNP) domain. However, the impact of this region on the activities of the protein is not known. On the other hand, E1B assembles an E3 ubiquitin ligase complex together with the adenoviral protein E4orf6 inducing the polyubiquitination and degradation of several cellular substrates including p53 and Mre11. In addition, E1B participates in regulation of intranuclear trafficking of viral late mRNAs as well as their stability and splicing. So far, the interaction of E1B with RNA in the context of the infection has not been detected and its contribution to the adenovirus replication cycle is not known. In this work, recombinant adenoviruses with amino acid substitutions in the putative RNP motif were constructed to determine the possible interaction with RNA and its impact on the viral replication cycle, specifically, on the production of viral progeny, the efficiency of synthesis of early and late proteins and degradation of p53 and Mre11. The results showed that E1B interacts with RNA in the context of the infection and substitutions in the E1B RNP affect the accumulation of DNA and viral progeny production, but not the degradation of p53 and Mre11, nor the intranuclear localization of E1B. We found a correlation between the E1B-RNA interaction and the accumulation and splicing of viral late mRNAs, as well as the times in which early and late viral proteins are synthesized.

Índice

1.1 Estructura del virión	10
1.2 Ciclo de replicación viral	11
1.2.1 Unión y entrada a la célula	11
1.2.2 Expresión de genes tempranos	12
1.2.2.1 Unidad transcripcional E1A	13
1.2.2.2 Unidad transcripcional E1B	14
1.2.2.3 Unidad transcripcional E2	15
1.2.2.4 Unidad transcripcional E3	16
1.2.2.5 Unidad transcripcional E4	16
1.2.3 Expresión de genes tardíos	18
2. Antecedentes	19
2.1 La E1B como proteína de unión a RNA	19
3. Hipótesis	23
4. Objetivo General	23
4.1 Objetivos Particulares	24
5. Materiales y Métodos.	24
5.1 Virus y células	24
5.1.1 Construcción de virus recombinantes con mutaciones en el E1B RNP	25
5.1.2 Obtención de virus recombinantes	27
5.1.3 Inmunofluorescencia	27
5.2 Anticuerpos	28
5.3 Primers	28
5.4 Purificación de DNA y qPCR	30
5.5 Producción de progenie viral	30
5.6 Acumulación de proteínas virales temprana y tardía	31
5.7 Evaluación de la acumulación y procesamiento del mRNA viral tardío L5	32
5.8 Evaluación de la degradación de p53 y Mre11	33
5.9 Determinación de la interacción de E1B con RNA <i>in vitro</i>	33
5.9.1 Obtención de la sonda de RNA marcado con ³² P	33
5.9.2 Ensayo de retardamiento	34
5.9.3 Ensayo de entrecruzamiento proteína-RNA	35
5.10 Inmunoprecipitación de RNA	35
5.11 Síntesis y purificación de péptidos	36
5.12 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	36
5.15 Análisis estadístico	37
6. Resultados	38
6.1 Obtención de adenovirus recombinantes con mutaciones en el motivo putativo RNP de la E1B	38
6.2 E1B interacciona con RNA en células infectadas con adenovirus	38
6.3 E1B afecta la formación de complejos proteína-RNA	40

6.4 Ensayo de entrecruzamiento proteína-RNA	42
6.5 El péptido E1B 55K RNP se une al RNA <i>in vitro</i>	43
6.6 Sustituciones en el E1B RNP alteran la temporalidad de la producción de progenie viral	46
6.7 Mutaciones en el motivo E1B RNP no afecta la actividad de la E3 Ubiquitina ligasa	47
6.8 Mutaciones en el E1B RNP alteran la temporalidad de la acumulación de proteínas virales tempranas y tardías	48
6.9 Mutaciones en el motivo RNP no afectan la localización intranuclear de la E1B	49
6.10 Mutaciones en el E1B RNP alteran la temporalidad en la acumulación de DNA viral	51
6.11 El incremento de la interacción E1B 55K-RNA correlaciona con el nivel del mRNA L5 y su procesamiento por splicing	52
7. Discusión	54
8. Conclusiones	59
9. Perspectivas	59
10. Referencias	59
11. Anexos	72
11.1 Anexo 1. Artículo de investigación aceptado por la revista <i>PLOS ONE</i> , 2019	72
11.2 Anexo 2. Artículo de divulgación científica publicado en la revista <i>Inventio</i> 2016, 21 (10): 23-32	138

Abreviaturas

Ad	Adenovirus
HAd	Adenovirus humano
FBS	Suero fetal bovino
RNP	Motivo de ribonucleoproteína
CAR	Receptor de Coxsackie - Adenovirus
TP	Proteína terminal
DAPI	4',6 - diamidino - 2 - fenilindol
DBP	Proteína de unión a DNA de cadena sencilla
DMEM	Medio Dulbecco's Modified Eagle's
E1B	E1B 55kDa
HFF	Fibroblastos de prepucio humano
hpi	Horas post-infección
MAb	Anticuerpo monoclonal
ML	Promotor Mayor Tardío
MOI	Multiplicidad de infección
PBS	Buffer de fosfatos salino
FFU	Unidades formadoras de focos
IFN	Interferón
TPL	Secuencia del líder tripartita
MLTU	Unidad de Transcripción Mayor Tardía
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
ITR	Secuencias repetidas invertidas
NES	Señal de exportación nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
v/v	Volumen por volumen
w/v	Peso por volumen
RMN	Resonancia magnética nuclear
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica

1. Introducción

Los adenovirus (Ad) son virus tumorales pequeños pertenecientes a la familia *Adenoviridae*, los cuales incluyen más de 90 serotipos humanos divididos en 6 subgrupos (A-F) de acuerdo a su capacidad de aglutinar eritrocitos. La familia *Adenoviridae* comprende cinco géneros: *Mastadenovirus*, *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* y recientemente se incluyó el género *Ichtadenovirus* que comprende virus que infectan peces (Carstens, 2010). Los Ads humanos (HAd) causan enfermedades de vías respiratorias y gastrointestinales, además de síndrome conjuntival. A su vez, se conoce que los pacientes inmunocomprometidos son especialmente susceptibles a complicaciones severas por la infección con Ad (Hierholzer, 1992). Los miembros de la familia *Adenoviridae* infectan una amplia variedad de células quiescentes, incluso las de tejidos diferenciados como pulmón, cerebro, corazón y músculo esquelético. Hasta la fecha, las evidencias acumuladas sugieren que los Ads no son tumorigénicos en humanos; sin embargo, son capaces de inducir la formación de tumores en ratones inmunodeficientes y en hamsters recién nacidos (Trentin et al., 1962). Estas potencialidades carcinogénicas son mediadas por proteínas virales que interfieren con las vías de supresores tumorales y de regulación de proliferación celular.

1.1 Estructura del virión

Los adenovirus se caracterizan por ser desnudos y con una cápside icosaédrica que contiene un genoma de DNA lineal, doble cadena de 36 kb (Rekosh et al., 1977) (Fig. 1).

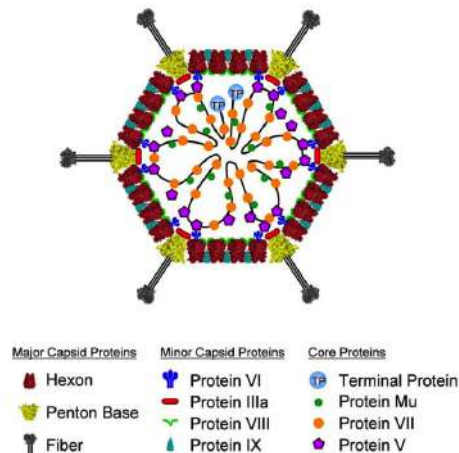


Figura 1. Representación esquemática de la estructura del virión. Tomado de Nemerow et al., 2009.

La cápside está compuesta por 240 capsómeros hexón y 12 capsómeros pentón. Cada capsómero hexón a su vez está formado por un trímero del polipéptido II y cada pentón está formado por una base pentón constituida por un trímero del polipéptido III a partir de la cual se proyecta una fibra formada por el polipéptido IV, que interacciona con la molécula receptora presente en la membrana de la célula diana (Rusell et al., 2000).

Su genoma interacciona con varias proteínas, como la proteína viral VII que funciona como una proteína tipo histona ya que está involucrada en el empaquetamiento del genoma viral. También se encuentra asociada la proteína μ (mu), cuya función todavía no ha sido determinada. Además, presenta la proteína terminal (TP terminal protein) la cual está covalentemente asociada a los extremos 5' del DNA viral y funciona como cebador en la replicación del DNA viral. Esta proteína permite el anclaje del genoma viral a la matriz nuclear de la célula infectada. Otra de las proteínas que interacciona con el DNA es la proteína V la cual asocia la cápside con el genoma viral (Shenk, 1996).

1.2 Ciclo de replicación viral

1.2.1 Unión y entrada a la célula

El ciclo de replicación comienza con la interacción de la proteína viral fibra con el receptor de adenovirus y Coxsackie virus (CAR) (Bergelson et al., 1997). Posteriormente la base pentón interacciona con las integrinas $\alpha\beta 3$ o $\alpha\beta 5$ presentes en la superficie celular donde estas últimas reconocen motivos RGD (Arginina-Glicina-Ácido aspártico) presentes en el polipéptido III (Wickham et al., 1993). A continuación, la partícula viral se internaliza mediante la formación de vesículas cubiertas por clatrina y la posterior formación del endosoma temprano (Wang et al., 1998). Este proceso induce un desensamblaje parcial en el que las proteínas que forman los vértices (pentón, la proteína IIIa, fibra, y hexones que están en la periferia de pentón) son liberadas de la partícula viral. La exposición al ambiente ácido del endosoma temprano, permite la activación de la proteasa viral; esta última permite el corte proteolítico de la proteína VI que une la cápside con la nucleocápside, lo que permite el escape del endosoma hacia el citoplasma (Wiethoff et al., 2005). La partícula viral parcialmente desensamblada migra a núcleo vía microtúbulos por la acción de la proteína motora dineína.

Posteriormente el genoma viral penetra al núcleo a través del complejo del poro nuclear (Leopold et al., 2000). La Fig. 2 muestra una representación esquemática de este proceso.

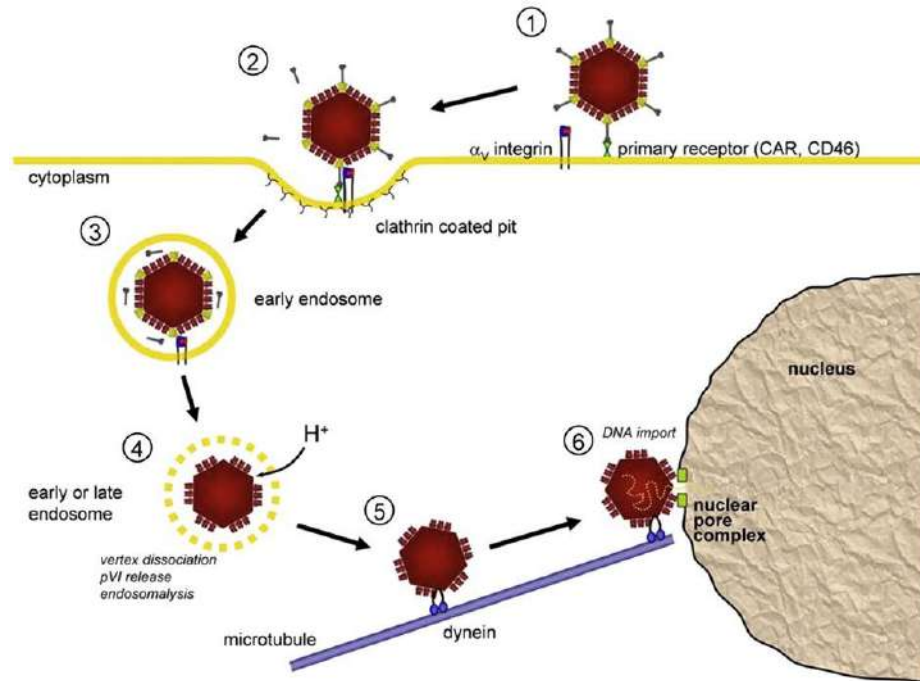


Figura 2. Entrada de adenovirus a la célula huésped. Paso 1 Unión de la fibra al receptor primario, que está en la mayoría de los tipos celulares y para la mayoría de los Ads es CAR o CD46. Paso 2 Endocitosis mediada por vesículas cubiertas por clatrina. Paso 3 desensamblaje parcial de la partícula viral. Paso 4 Acidificación del endosoma temprano y escape de la partícula viral parcialmente desensamblada. Paso 5 El virión parcialmente desensamblado es transportado por la proteína motora dineína a través de microtúbulos hacia complejo del poro nuclear. Paso 6 Entrada del DNA viral al núcleo a través del complejo del poro nuclear. Tomado de Nemerow et al., 2009.

1.2.2 Expresión de genes tempranos

El genoma de Ads se encuentra organizado en unidades transcripcionales que son transcritas por la RNA polimerasa II (Fig. 3). Por convención, los transcritos son nombrados de acuerdo al momento del ciclo de replicación en el que se sintetizan: temprano (E) y tardío (L) siendo la replicación del DNA viral el proceso que marca la transición entre ambas fases.

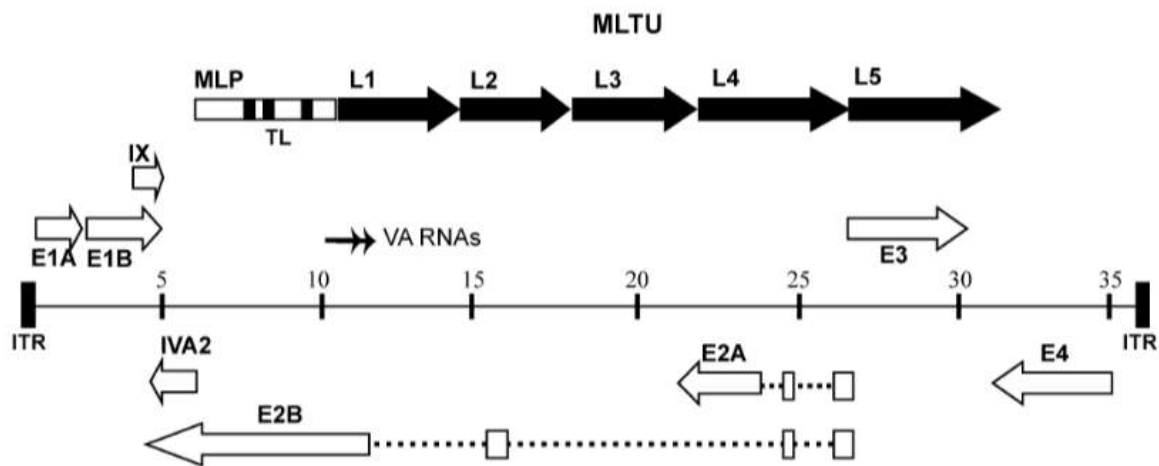


Figura 3. Organización del genoma de adenovirus 5. Organización de las unidades de transcripcionales tempranas (E1A, E1B, E2A / B, E3, E4, IX y IVA2) y tardía (MLTU) en ambas cadenas de ADN del genoma viral se muestran mediante flechas. Las unidades tardías (L1-L5) codifican principalmente proteínas estructurales. MLTU: unidad de transcripción tardía mayor; MLP: promotor tardío principal; TPL: líder tripartita; VA-RNAs: RNAs asociados a virus; ITR: repetición terminal invertida.

Durante la etapa temprana de la infección con Ads se expresan los genes tempranos, cuyos productos proteicos están involucrados en la regulación de tres funciones principales: 1) Inducción de la fase S del ciclo celular para favorecer el estado proliferativo de la célula; 2) la inhibición de la respuesta antiviral de la célula; y 3) regulación de la expresión de genes virales y celulares.

1.2.2.1 Unidad transcripcional E1A

La primera unidad transcripcional que se expresa es la E1A, que es eficientemente transcrita por proteínas celulares. A partir de ésta se sintetiza un pre-mRNA que es procesado por splicing alternativo. Entre las proteínas que se sintetizan a partir de los mRNAs de E1A se encuentran los productos 12S y 13S. E1A activa la transcripción del resto de los genes tempranos además de activar al promotor viral principal tardío o Major Late. Por otra parte, E1A funciona como activador del promotor de L4, en combinación con otras proteínas virales como E4orf3 y IVA2 favoreciendo la expresión de las proteínas virales tardías L4 22k y L4 33k (Morris *et al.*, 2010).

Las proteínas E1A presentan 4 regiones conservadas denominadas CR (Avvkumov et al., 2004). Específicamente CR3 sólo se encuentra en E1A 13S y se ha visto que mutaciones en esta región traen consigo una disminución de alrededor de 20 veces en la transcripción del resto de las unidades de transcripción temprana (Jones y Shenk, 1979). A su vez, se ha demostrado que la presencia de esta región promueve el ensamblaje de complejos de pre-iniciación compuesto por la RNA pol II y factores generales de transcripción (Cantin et al., 2003). Las regiones CR1 y CR2 a su vez inducen a la célula a entrar a fase S (Howe et al., 1990). En este sentido se ha observado que CR2 interacciona con la proteína supresora tumoral de retinoblastoma (pRb). pRb regula de forma negativa a factores transcripcionales de la familia E2F (Nevins, 2001). La interacción E1A-pRb desplaza la interacción pRb-E2F, por lo que E2F puede activar la transcripción de genes cuyos productos proteicos están involucrados en la progresión del ciclo celular hacia fase S (por ejemplo, CDK2, ciclina E). Sin embargo, a pesar que CR2 interacciona con pRb y se desplaza la interacción pRb-E2F, se ha demostrado que la región CR1 también es requerida para este desplazamiento aunque su papel en la inducción de la entrada de la célula a fase S todavía no está claro (Wang et al., 1993). Probablemente su contribución a esta función está ligada a la interacción con CKI como p21 (Chattopadhyay et al., 2011) y p27 (Mal et al., 1996). CR1 también se ha demostrado que interacciona con una serie de proteínas que regulan el estado de la cromatina, entre ellas p300 y CBP (Stein et al., 1990; Arany et al., 1995). Además, inhibe a la proteína HDM2 contribuyendo a la estabilización de p53 (Zhang et al., 2004).

1.2.2.2 Unidad transcripcional E1B

La unidad de transcripción E1B por su parte codifica para 5 mRNAs, producidos por splicing alternativo. Dentro de los productos de estos mRNA se encuentran las oncoproteínas E1B-55kDa y E1B-19kDa que juegan un papel importante en el ciclo replicativo del virus. Estas proteínas no comparten secuencias de aminoácidos debido a que usan diferente sitio de inicio de traducción y se encuentran en marcos de lectura diferentes.

E1B-19kDa es homólogo en secuencia y función a la proteína celular Bcl-2 (Cuconati y White, 2002). Esta proteína interacciona con las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak evitando que éstas oligomericen y formen poros en la membrana mitocondrial externa.

En células infectadas, la ausencia de la E1B-19kDa trae consigo la oligomerización de Bax y Bak y la formación de poros en la membrana mitocondrial externa, llevando a la liberación de citocromo c y de Smac/DIABLO y la activación de las caspasas 3 y 9 (White, 2001).

La E1B-55kDa (a la que a lo largo de este trabajo se le llamará E1B) promueve la expresión de genes virales y bloquea la respuesta antiviral de la célula (Berk, 2013; Blackford y Grand, 2009). En este sentido se ha demostrado que en ausencia de la E1B, la expresión de los genes blanco de interferón (IFN) como GBP1-5, IF1H1 (MDA5), IFIT2, MX2 y TAP1 se incrementa (Miller et al., 2009). A su vez, se ha identificado un dominio de represión de la respuesta a interferón ubicado hacia el C terminal de la E1B (Chahal et al., 2013). A la fecha no se ha podido clasificar a la E1B de acuerdo a su función. Los experimentos sugieren que podría funcionar como una E3 SUMO1 ligasa para p53 (Pennella et al., 2010).

Recientemente se reportó el interactoma de esta proteína que incluye más de 30 proteínas, tanto virales (E4orf3, E4orf6, E2 72K-DBP, L4 100K, pVI, pVII) como celulares (Rad50, Cul5, Mre11, USP7 entre otras) . Estas últimas están involucradas en la regulación del ciclo celular, splicing y la poliubiquitinación de sustratos (Hung y Flint, 2017). El papel de la E1B en la expresión selectiva de genes virales tardíos y la poliubiquitinación de sustratos celulares será descrito adelante.

1.2.2.3 Unidad transcripcional E2

La región E2 codifica una serie de productos que son responsables de la replicación del genoma viral y se nombran E2A (DBP), E2B (DNA polimerasa viral) y TP (proteína terminal). La proteína de unión a DNA de cadena sencilla (DBP) participa en la replicación del genoma viral estabilizando el DNA de cadena sencilla una vez que ambas hebras se separan. Se ha demostrado que existe una interacción funcional entre DBP y el factor nuclear I (NFI) (De Vries et al., 1985) y esto hace que NFI tenga mayor afinidad por el sitio de reconocimiento en el origen de replicación (Cleat and Hay, 1989). DBP también está encargada de la remoción de estructuras terciarias en el DNA lo que permite el acceso a la DNA polimerasa viral (Stuiver et al., 1992). Esta proteína se localiza en el núcleo de células infectadas formando parte de los centros de replicación viral (sitios donde se replica y se transcribe el genoma viral y, donde comienza el

procesamiento postranscripcional de los mRNA virales tardíos) por lo que ha sido empleada como un marcador *bona fide* de los centros de replicación viral.

La DNA polimerasa viral, por su parte, presenta dominios conservados que son característicos de todas las DNA polimerasas, además presenta actividad de exonucleasa 3'-5'. Esta DNA polimerasa emplea como cebador para la síntesis del DNA a la proteína viral TP la cual se encuentra unida covalentemente al extremo 5' del DNA viral. Funciona como cebador mediante un enlace fosfodiéster establecido entre la S580 de TP y el grupo fosforil de una dexocitidina monofosfato (dCTP) para formar un complejo TP-dCMP en una reacción que requiere secuencias de DNA específicas del origen de replicación (Smart y Stillman, 1982; Challberg et al., 1982).

1.2.2.4 Unidad transcripcional E3

Las proteínas codificadas por la unidad transcripcional E3 regulan la respuesta inmune adaptativa (Revisado en Burgert et al., 2002; Horwitz, 2004; Lichtenstein et al., 2004). La glicoproteína E3-gp19K, codificada en esta región, bloquea el transporte de MHC I a la membrana plasmática, y de ese modo reduce el ataque de los leucocitos a las células infectadas. E3-gp19K también reduce los niveles de receptores de células Natural Killer (NK) en la membrana plasmática, lo que aumenta la supervivencia de las células infectadas (McSharry et al., 2008). Las proteínas E3-14.7K E3-10.4K, E3-14.5K y E3-6.7K bloquean la apoptosis extrínseca mediante regulación negativa de los receptores de muerte (Revisado en Hendrickx et al., 2014).

1.2.2.5 Unidad transcripcional E4

A partir de la región E4 se expresan 6 productos proteicos (E4orf1, E4orf2, E4orf3, E4orf4, E4orf6 y E4orf6/7), los cuales están involucrados en la regulación de procesos celulares como el splicing de RNAs virales, la inhibición de defensas celulares, la regulación del metabolismo celular y la replicación del DNA viral. Por su relevancia en el ciclo replicativo del virus y su relación con la E1B se describirán brevemente las actividades y funciones de E4orf3 y E4orf6.

La proteína E4orf3 se localiza en el núcleo de células infectadas. Esta proteína se encuentra involucrada en múltiples funciones que incluyen la supresión de la respuesta a interferón (Ullman et al., 2007); la estimulación del splicing de RNA virales (Nordqvist et

al., 1994); y la prevención de la concatamerización del DNA viral (Stracker et al., 2005). E4orf3 interactúa con una amplia gama de proteínas celulares que incluyen a TRIM24, TRIM33 (Yondola and Hearing, 2007), TIF1 γ (Forrester et al., 2012) entre otras. También reorganiza complejos proteicos involucrados en la respuesta antiviral como los cuerpos de PML (Doucas et al., 1996), además de tener como blanco al complejo de reparación de daño en DNA (MRN) (Stracker et al., 2002). En este sentido, se ha demostrado que E4orf3 regula la sumoilación de Mre11 y Nbs1 (componentes del complejo MRN) en células transformadas, lo cual está relacionado con la relocalización del complejo MRN y por lo tanto la regulación de la respuesta al DNA dañado (Sohn y Hearing, 2012).

Por otra parte, E4orf3 reprime la activación de genes blanco de p53 ya que promueve su heterocromatinización (Soria et al., 2010). Se conoce su estructura cristalográfica a 2.1Å de resolución y se demostró que forma una estructura filamentosa en el núcleo de las células infectadas que rodean los centros de replicación viral (Ou et al., 2012).

Por otra parte, E4orf6 interactúa con E1B formando un complejo E3 ubiquitina ligasa, el cual también incluye las proteínas celulares culina 5 (Cul5), RING-box 1 (Rbx1) y las elonginas B y C (Querido et al., 2001). Los blancos de este complejo incluyen proteínas que regulan el ciclo celular, la respuesta al DNA dañado, la remodelación de la cromatina las cuales serán descritas más adelante.

La acción fundamental de este complejo sobre sus proteínas blanco es la poliubiquitilación, lo que constituye una señal para la degradación por proteosoma. El complejo E1B-E4orf6 también es necesario para la acumulación de mRNA virales tardíos en citoplasma. Se ha propuesto que su papel fundamental podría ser el reclutamiento de proteínas necesarias para procesamiento post-transcripcional hacia los centros de replicación viral (Flint y González, 2003).

Sin embargo, hasta ahora no está claro si estas actividades están relacionadas, o si existe un nexo funcional entre la exportación selectiva de mRNA y la poliubiquitilación de sustratos celulares mediados por E1B. Esta proteína también se ha observado que está involucrada en el splicing de los mRNA virales tardíos (Nordqvist et al., 1994) además de inhibir la función transactivadora de p53 a través de la interacción con su C terminal (Dobner et al., 1996).

1.2.3 Expresión de genes tardíos

La expresión de los genes tardíos de adenovirus comienza de manera eficiente al inicio de la replicación del DNA viral. Las moléculas de DNA viral recién sintetizadas, funcionan como templado para la replicación y transcripción de los genes virales tardíos. Estos están bajo la regulación del promotor Major Late que tiene una actividad muy baja al inicio de la infección y aumenta alrededor de cien veces en la fase tardía con el inicio de la replicación del DNA viral.

Las regiones codificantes tardías están organizadas en una única unidad de transcripción (Major Late) con una longitud aproximada de 29,000 nucleótidos (Evans et al., 1977; Nevins y Darnell, 1978). Este transcrito presenta una secuencia 5' no traducida que es común en todos los mRNAs virales tardíos denominado Leader Tripartita (TPL). Este transcrito se procesa mediante la selección diferencial de sitios de poliadenilación y splicing para generar múltiples mRNAs virales tardíos. Estos mRNAs se han agrupado en cinco familias, denominadas L1 a L5, definidos por el uso de sitios de adición de poli (A) comunes (Chow et al., 1977, Ziff y Frasser., 1978) y su expresión está controlada por el promotor Major Late. Recientemente se describió un promotor en la región de L4 que dirige la expresión de las proteínas L4 22K y L4 33K de manera independiente del promotor Major Late (Morris et al., 2010) en el que la proteína p53 podría funcionar como activador de este promotor (Wright y Leppard, 2013).

Durante esta etapa del ciclo replicativo de adenovirus se establece un programa de expresión selectiva de genes en el que se bloquea la exportación de la mayoría de los mRNAs celulares a citoplasma (Beltz y Flint, 1979). El bloqueo a la acumulación de mRNAs celulares está mediado por la E1B (Babiss y Ginsberg, 1984; Pilder et al., 1986) y por la proteína E4orf6 (Halbert et al., 1985; Weinberg y Ketner, 1986) y se requiere de ambas proteínas y de su interacción para la acumulación eficiente de mRNAs virales tardíos en el citoplasma (Cutt et al., 1987; Pilder et al., 1986; Bridge y Ketner, 1990).

Por otra parte, en esta fase se establece la traducción selectiva de los mRNAs virales tardíos. Este proceso depende de dos mecanismos: la fosforilación de la subunidad eIF4E del complejo RNA helicasa-Cap dependiente eIF4F y la fosforilación del factor eIF2 α por PKR. En ambos casos se inhibe la traducción dependiente de Cap. A pesar de que todos los mRNA virales de adenovirus poseen Cap en el extremo 5', su traducción

no se afecta debido al líder tripartita que favorece el mecanismo de *ribosome shunting*, que permite al ribosoma reconocer directamente el codón de inicio (Yueh y Schneider, 2000). Por otra parte, el virus expresa dos RNAs pequeños conocidos como RNA-VA I y II. Particularmente, el RNA-VA I inhibe la activación de PKR y esto a su vez evita la fosfatación de eIF-2a, promoviendo la traducción de los mRNAs virales tardíos (Mathews, 1980). Adicionalmente, la proteína viral tardía L4 100k interacciona con los mRNAs virales tardíos y se sugiere que facilita su traducción (Adam y Dryefuss, 1987). En este sentido se ha demostrado L4-100K favorece la traducción selectiva de mRNAs virales tardíos (Xi et al., 2004; Xi et al., 2005) y este proceso implica la interacción de L4 100K con la secuencia del líder tripartita que poseen todos los mRNAs virales tardíos y con el elemento de andamiaje del complejo de iniciación de la traducción dependiente de la cap, eIF4G.

2. Antecedentes

2.1 La E1B como proteína de unión a RNA

La E1B es una fosfoproteína multifuncional de 496 aminoácidos. Hasta la fecha no se conoce su estructura tridimensional, sin embargo estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y de dicroísmo circular han demostrado que el N-terminal es intrínsecamente desordenado (Sieber et al., 2011). Por otra parte, la proteína puede formar dímeros y tetrámeros y posee una conformación elongada (Martin y Berk, 1998). Estudios mutacionales han permitido identificar algunos motivos funcionales. Hacia el N-terminal presenta una señal de exportación nuclear (NES) ubicada entre los residuos 83 y 93 que le permite hacer localizarse entre el núcleo-citoplasma (Dobbelstein et al., 1997). También se ha descrito una señal de localización nuclear (NLS) hacia el carboxilo terminal sin embargo no se han reportado los aminoácidos implicados en la relocalización de la proteína al núcleo (Kratzer et al., 2000). La E1B es modificada postraduccionalmente por SUMOilación en el residuo K104 (Endter et al., 2001) y por fosforilación en los residuos S490/S491/T495 (Teodoro et al., 1994; Teodoro y Branton, 1997) mediante la cinasa CK2 (Ching et al., 2012). Análisis fenotípicos de mutantes en estos residuos indican que la fosforilación de la E1B es importante para su localización intranuclear y para la interacción e inducción de degradación de p53 (Schwartz et al.,

2008; Querido et al., 2001), y que la sumoilación regula la localización intranuclear de la E1B y su exportación a citoplasma (Kindsmuller et al., 2007). Ambas modificaciones postraduccionales parecen estar conectadas. Estudios con mutantes en los sitios de fosforilación y sumoilación demuestran que la fosforilación favorece la sumoilación de E1B y que esta conexión es importante para la regulación de p53 (Wimmer et al., 2013). Datos de nuestro laboratorio sugieren que la fosforilación de E1B tiene un componente intrínseco. Parecería que existe un orden de fosforilación en el que la T495 juega un papel fundamental pues su fosforilación favorece la fosforilación de ambas serinas (S490 y 491) lo cual a su vez favorece la producción de progenie viral (López, 2016). La región central de la E1B (aminoácidos 215-345) parecería funcionar como un *core* hidrofóbico debido a la naturaleza de los aminoácidos que lo conforman (González y Flint, 2002) y es justo dentro de esta región donde presenta un motivo similar a ribonucleoproteínas (RNP) ubicado entre los residuos 250 y 308 (Horridge y Leppard, 1998) (Fig. 4).

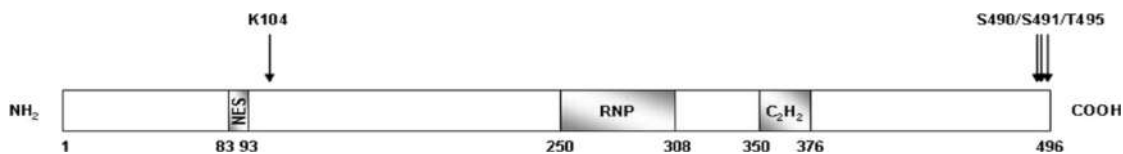


Figura 4. Representación esquemática de la proteína E1B 55kDa. Tomado de Blackford et al., 2009.

El análisis de alineamiento de la secuencia de E1B con proteínas de unión al RNA (RBP; del inglés RNA binding proteins) celulares muestra que existe similitud en la secuencia de interacción con RNA (Horridge y Leppard, 1998) (Fig. 5). En las RBP celulares esta región corresponde a un RRM o motivo de reconocimiento de RNA (RNA Recognition Motif). Se conoce que para este tipo de motivo las interacciones electrostáticas y de apilamiento (stacking) son fundamentales por lo que aminoácidos con carga positiva o aromáticos juegan un papel importante en la interacción. El alineamiento indica que los residuos R281, G282, A284 y F285 ocupan posiciones similares a algunas RNP celulares y la C288 ocupa una posición variable.

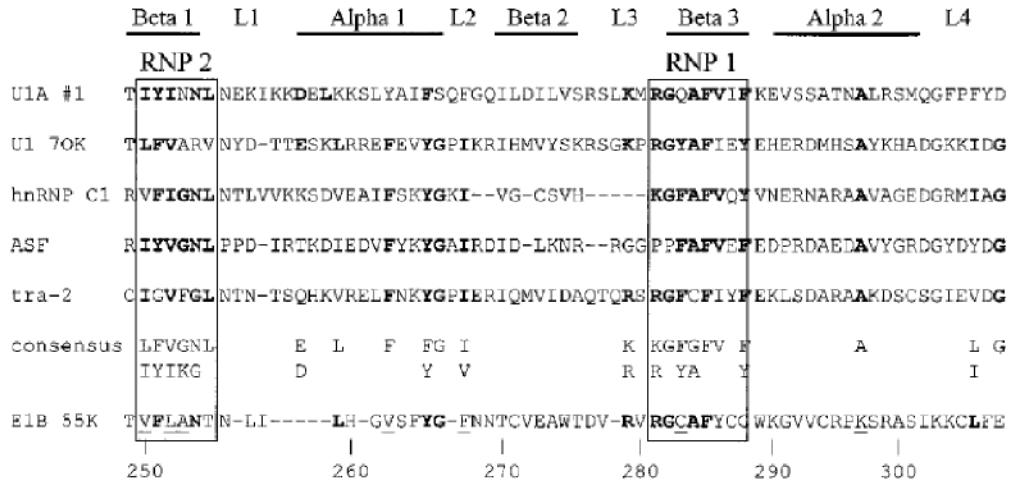


Figura 5. Alineamiento de secuencia de la proteína E1B 55kDa y miembros de la familia de las RBP. Tomado de Horridge y Leppard, 1998.

Estos autores demostraron que la proteína sobre-expresada y purificada a partir de *E. coli* puede interactuar con diferentes sondas de RNA cuyas secuencias corresponden a fragmentos de RNAs virales indicando que la interacción no es secuencia específica. También observaron que mutaciones en los aminoácidos A284, F285, C288 y W289 (región RNP1) traen consigo variaciones en su asociación a moléculas de RNA. Las mutaciones A284S, F285L-del287 (cambio de la fenilalanina 285 por leucina y delección del aminoácido 287) y C288A disminuyen la interacción de la E1B con el RNA alrededor de 3 veces mientras que en la mutación W289F la interacción con RNA aumenta casi 4 veces comparado con la proteína silvestre.

Posteriormente, Kato et al. (2011) evaluaron la interacción de E1B con RNA en el contexto de la infección e introdujeron las mutaciones A284S y F285L en el genoma viral. Estos autores no detectaron la interacción de E1B con RNA y reportaron que estas mutaciones no afectaban el ciclo replicativo del virus. Ellos plantean que la interacción de E1B con RNA *in vivo* puede ser dinámica y transitoria y que al menos con los experimentos que realizaron no pueden concluir que la proteína interaccione con RNA *in vivo*.

Como se describió anteriormente, E1B se asocia con E4orf6 y ensamblan un complejo E3 ubiquitina ligasa junto con proteínas celulares como Culina 5, Elonguinas B y C, y Rbx1 que induce la degradación de proteínas que son clave en la respuesta antiviral de la célula (Harada et al., 2002; Querido et al., 2001). La evidencia sugiere que E1B

reconoce los sustratos que serán poliubiquitinados y posteriormente degradados (Schwartz et al., 2008) y que E4orf6 interacciona con las elonginas B y C (Blanchette et al., 2004). Dentro de estos sustratos se encuentra el supresor tumoral p53 (Cathomen y Weitzman, 2000; Grand et al., 1994; Harada et al., 2002; Querido et al., 2001), proteínas relacionadas con la respuesta al DNA dañado como Mre11, Rad50 (Carson et al., 2003; Stracker et al., 2002), DNA ligasa IV (Baker et al., 2007), Tab182 (Hagkarim et al., 2018), y la helicasa Bloom (Orazio et al., 2011). Otros sustratos incluyen a remodeladores de cromatina como ATRX (Shreiner et al. 2013a), SPOC1 (Schreiner et al., 2013b) y Tip 60 (Gupta et al., 2013). También se ha descrito que la integrina $\alpha 3$ es un sustrato de este complejo (Dallaire et al., 2009); sin embargo, la implicación que esto tiene en el ciclo replicativo del virus no está clara. Aún cuando ambas proteínas componentes del complejo E3 ubiquitina ligasa (E1B y E4orf6) hacen shuttling núcleo-citoplasma, se ha demostrado que cuando se inhibe el transporte núcleo-citoplasma de proteínas mediado por CRM1, los sustratos p53 y Mre11 son degradados sugiriendo una separación de funciones entre el transporte mediado por CRM1 y la exportación y degradación de p53 y Mre11 (Schmid et al., 2011). Por otra parte, E1B induce la poliubiquitinación del componente de los cuerpos de PML, Daxx, sin el ensamblaje de la E3 ubiquitina ligasa previamente descrita (Shreiner et al., 2013). Como se mencionó antes, hasta el momento E1B no se ha podido clasificar de acuerdo a su función. Experimentos *in vitro* han demostrado que podría funcionar como una E3 SUMO1 ligasa para p53, pero esta actividad no se ha demostrado en el contexto de la infección. Parecería que E1B también regula la sumoilación de Mre11, sin embargo los datos sugieren que se requiere de la cooperación de E4orf3 y E4orf6 (Castillo et al., 2014).

E1B es importante para el establecimiento de un programa de expresión selectiva de genes virales tardíos. Después de su maduración en el núcleo, los mRNA virales tardíos son exportados a citoplasma. La acumulación de estos mRNA virales en el citoplasma requiere de las proteínas virales E1B y E4orf6 (Beltz y Flint, 1979; Bridge y Ketner, 1990; Flint y González, 2003). Estudios con mutantes que no expresan E1B han mostrado una reducción en la acumulación de mRNA virales tardíos en citoplasma (González y Flint, 2002). Ambas proteínas (E1B y E4orf6) interaccionan físicamente y además pueden hacer shuttling núcleo-citoplasma por lo que inicialmente se propuso que el complejo estaba involucrado directamente en la exportación de mRNA virales tardíos (Dobbelstein

et al., 1997). Experimentos de Leppard y Shenk (1989) demostraron que la ausencia de la E1B trae consigo que los mRNA virales tardíos sean retenidos en una fracción de matriz nuclear y no puedan ser liberados eficientemente a nucleoplasma. Esto indica que E1B influye sobre etapas anteriores a la exportación de mRNAs virales tardíos. En centros de replicación viral aislados de células infectadas con el virus silvestre (WT) y un mutante que no expresa E1B (E1B⁻), se determinó que E1B es importante para la replicación del DNA viral, el procesamiento por splicing de mRNAs virales y su estabilidad.

E1B también funciona como activador de promotores de genes virales como IVa2, E1B (su propio promotor) y como represor de E1A y el promotor ML. Esta actividad de regulación de la expresión de genes virales parece estar regulada por la fosforilación de E1B sugiriendo un papel importante en el metabolismo de RNAs virales (Hidalgo, 2018). Por otra parte, la localización intranuclear de la E1B correlaciona con la exportación selectiva de los mRNA virales tardíos y este proceso tiene lugar antes que los sustratos de la E3 ubiquitina ligasa (p53 y Mre11) sean degradados (Cardoso et al., 2008), por lo que parecería que existe una separación temporal de ambos procesos. Esto, unido a que la interacción de E1B con RNA podría estar directamente relacionada con la regulación de la expresión de genes virales tardíos indicaría que ambas actividades (poliubiquitinación de sustratos y expresión selectiva de genes virales tardíos) podrían ser genéticamente separables.

3. Hipótesis

La interacción de la proteína E1B 55kDa con ácidos nucleicos es necesaria para su actividad asociada con procesamiento postranscripcional de mRNA virales, pero no con la actividad del complejo E1B-E4orf6-Cullin5-E3 Ubiquitina ligasa.

4. Objetivo General

Determinar el efecto de alteraciones en la secuencia RNP de la E1B 55kDa sobre la exportación de mRNA virales y la degradación de sustratos de la Cullin5-E3 Ubiquitina ligasa.

4.1 Objetivos Particulares

1. Construir adenovirus recombinantes con sustituciones C288A, C288S, W289F y Δ 284-289 en la secuencia de la E1B 55kDa.
2. Evaluar la capacidad de la E1B 55kDa, silvestre y mutantes de interaccionar con RNA.
3. Evaluar la eficiencia de replicación de los adenovirus recombinantes: eficiencia de síntesis de proteínas tempranas y tardías, eficiencia de replicación del DNA viral y producción de progenie viral.
4. Evaluar la degradación de sustratos conocidos de la Cullin5-E3 Ubiquitina ligasa, p53 y Mre11.
5. Determinar el efecto de mutaciones en el E1B RNP sobre la localización intracelular de E1B
6. Evaluar el efecto del E1B RNP sobre la acumulación y el procesamiento postranscripcional de los mRNAs virales tardíos.

5. Materiales y Métodos.

5.1 Virus y células

En este trabajo se emplearon células HFF (fibroblastos de prepucio humano). Éstas se cultivaron en medio Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10%. Se emplearon células 2E2 para la obtención y amplificación de los virus recombinantes. Estas células presentan el mismo fondo genético que las HEK 293 (células embrionarias de riñón humano) excepto que en su genoma tiene integrada la región que codifica para E4orf6 y E2 (TP, DNA polimerasa viral y DBP) bajo el control de un promotor que responde a tetraciclina por lo que 4 horas antes de poner la mezcla de transfección se adicionó tetraciclina (10mg/ml) (Catalucci *et al.*, 2005). Las células HEK 293 se emplearon para las titulaciones virales. Ambos tipos celulares fueron cultivados en DMEM suplementado con 5% de suero bovino fetal y 5% de suero bovino. Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Se empleó como modelo de estudio HAd5. Para entender la contribución del RNP de E1B en el ciclo replicativo de adenovirus se diseñaron y obtuvieron los siguientes virus recombinantes mutantes en esta región: C288S, C288A, W289F, Δ 284-289. El nombre de cada virus mutante indica la mutación

en E1B que presenta. El Ad5 2250 sirvió como virus silvestre (WT), y todos los virus mutantes en E1B 55kDa (E1B) se construyeron usando el método descrito previamente (Groitl y Dobner, 2007). El H5pg4100 sirvió como virus parental Ad5 para todas las construcciones. La unidad de transcripción E3 de Ad5 se insertó en el genoma de H5pg4100 generando el Ad5 2250, el cual se utilizó para la construcción de los mutantes en E1B 55K. El virus H5pm4149 (E1B⁻) sirvió control negativo debido a que no expresa la proteína E1B pues su RNA codificante presenta cuatro codones de paro prematuros consecutivos hacia el 5. Para todos los experimentos se empleó una multiplicidad de infección (MOI) de 30 FFU/célula.

5.1.1 Construcción de virus recombinantes con mutaciones en el E1B RNP

La construcción de los recombinantes de adenovirus se realizó empleando la metodología desarrollada por Groitl y Dobner (2007). Esta metodología implica la utilización de un vector que contiene la región E1 (pE1-1235) el cual es empleado como templado para hacer las mutaciones mediante mutagénesis dirigida. Seguidamente se secuenció el DNA para corroborar que la mutación fue exitosa. La construcción mutagenizada se liberó de pE1-1235 mediante el empleo de las enzimas de restricción Swa I y BstZ 17I y se introdujo en el vector que contiene el genoma viral completo excepto la región E1 (Fig. 6). Posteriormente, las construcciones se secuenciaron parcialmente con el objetivo de confirmar la presencia de la mutación. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Thomas Dobner, Heinrich Pette Institute, Leibniz Institute for Experimental Virology, Hamburg, Germany.

Posteriormente el genoma viral se liberó empleando la enzima de restricción Pac I y finalmente se transfectó en las células 2E2. Todos los pasos de clonación se llevaron a cabo en *E. coli*.

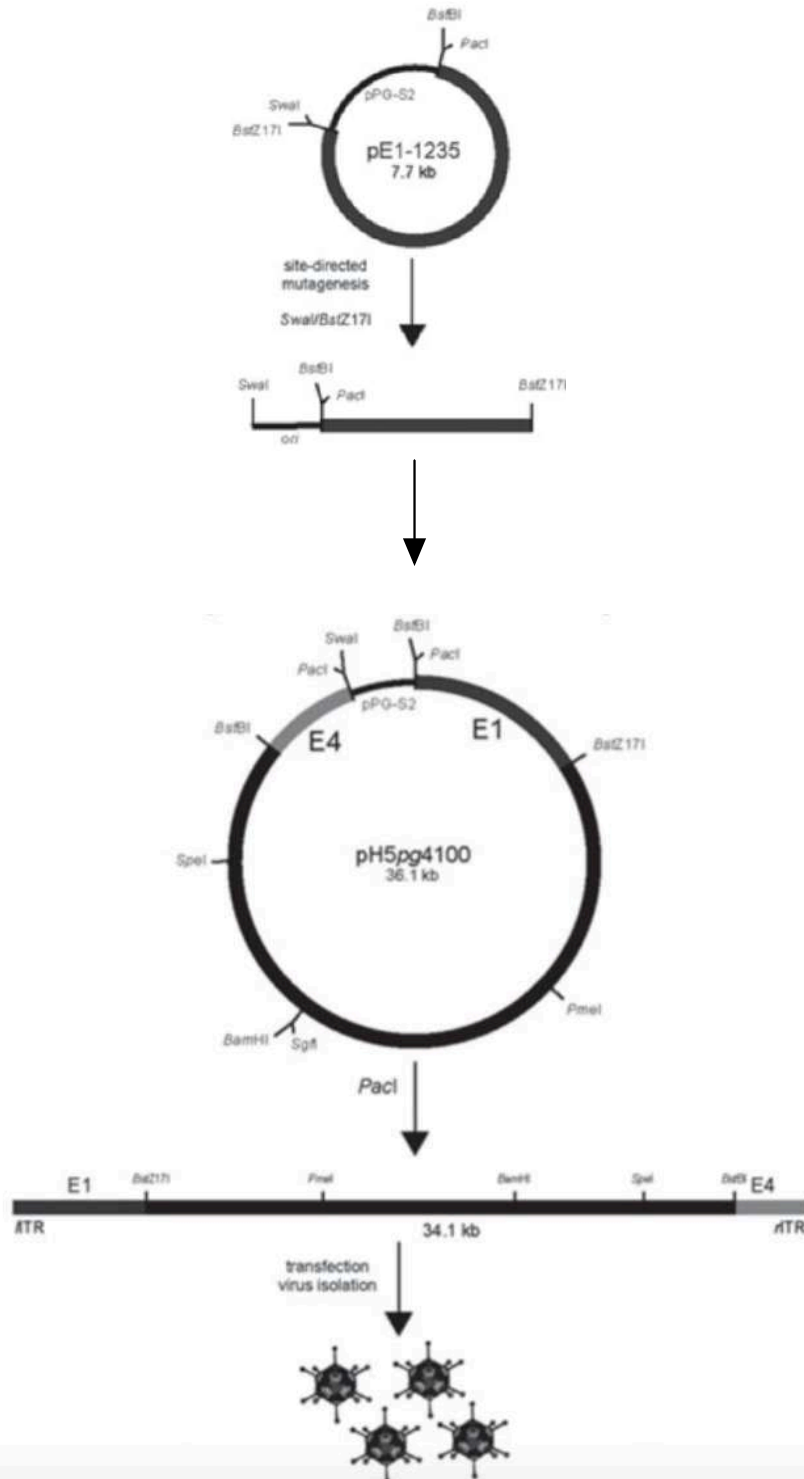


Figura 6. Representación esquemática del proceso de obtención de adenovirus recombinantes. Tomado de Groitl y Dobner, 2007.

5.1.2 Obtención de virus recombinantes

Se cultivaron clonas de *E. coli* transformadas con cada uno de los bácmidos en medio Luria-Bertani (LB)/ampicilina (100 µg/ml) sólido y se incubaron a 30°C durante 24 horas. A continuación se picaron colonias y se pasaron a medio LB/ampicilina líquido para incubarlas a 30°C, 200 rpm durante 24 horas. Se realizó la extracción del DNA mediante minipreps (Thermo Scientific) para corroborar la presencia del bácmido y se sometieron a digestión con la enzima de restricción Hind III (Thermo Scientific), donde se observó el patrón de restricción con las bandas esperadas de los siguientes tamaños: 8009, 5825, 5660, 5324, 4598, 3437, 2944, 2031 y 75 pb. Posteriormente se realizó un Maxiprep (Wizard plus Maxipreps DNA purifications systems, Promega) con aquellas que cumplieron con este patrón de bandas con el objetivo de obtener mayor cantidad de bácmido con calidad de transfección.

Se diseñaron cebadores que flanquean el sitio mutado en el genoma de adenovirus con el objetivo de corroborar la mutación. Para ello se empleó el software CLC sequence viewer 6 y primerblast. FW: GGTGGAGATAGATACGGAGG, RV: TATGCTTAATCACAGCC. Posteriormente se realizó una PCR con cebadores que flanquean las mutaciones y los productos amplificados fueron secuenciados en la Unidad de Secuenciación del IBT, UNAM.

Los bácmidos purificados fueron transfectados en células 2E2 empleando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). La mezcla de transfección se dejó 120 horas, a 37°C, 5% CO₂ y posteriormente se cosecharon en buffer IV USB (10 mM Tris HCL pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1% w/v dextrosa) empleando para ello 3 ciclos de choque térmico (5 minutos nitrógeno líquido, 10 minutos a 37°C). El stock de virus obtenido para cada mutante se almacenó a -70°C.

5.1.3 Inmunofluorescencia

Para detectar los adenovirus recombinantes se infectaron las células HEK293 con los sobrenadantes obtenidos en el paso anterior y se fijaron a las 24hpi. Se retiró el medio de cada uno de los pozos y las células se lavaron con 1ml de PBS (NaCl 8g/l, KCl 0.2g/l, Na₂HPO₄ 1.44 g/l, KH₂PO₄ 0.24 g/l, pH 7.4). Se retiró el PBS y se fijaron las células adicionando 1 ml de paraformaldehído al 3.7% en PBS, incubando a temperatura

ambiente por 30 minutos. Se retiró el paraformaldehído y se hicieron tres lavados con 2ml de PBS por pozo. Las células se permeabilizaron con 400µl de PBS-Tritón X-100 (PBS, 0.5% Tritón X-100 ICN Biomedical Inc.), incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavó dos veces con 1ml de PBS por pozo, se adicionó 500µl del anticuerpo primario anti-DBP (B6) 1:1,500 y se incubó toda la noche (O/N) a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación se lavó tres veces con PBS y se adicionó 400µl de un anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón producido en cabra acoplado al fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen) en una dilución 1:1,500 y se incubó por 4 horas a temperatura ambiente. Se lavó dos veces con 1 ml de PBS por pozo y se adicionó 1 ml/pozo de DAPI (4'6-diamidino-2-fenil-indol) a 1 mg/ml (SIGMA) en una dilución 1:20,000 en PBS y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se hicieron dos lavados con 1ml de PBS/pozo y se procedió al montaje del cubreobjetos. Para esto se invirtió cada cubreobjetos sobre 2 µl de una solución PBS/glicerol 10% y se selló con barniz. Cada una de las muestras se analizaron por microscopía de fluorescencia, con el objetivo 20x, en un microscopio Axiovert Zeiss.

5.2 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpo monoclonal anti-E2 72kDa DBP B6 (ratón) (Reich *et al.*, 1983); anticuerpo policlonal anti-DBP (conejo) (provisto por el Dr. Thomas Dobner); anticuerpo monoclonal anti-E1B 55kDa, 2A6 (ratón) (Sarnow *et al.*, 1984); anticuerpo monoclonal anti-p53 (ratón) (DO-1 Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo policlonal anti-Mre11 (ratón) (Novus Biologicals), anticuerpo monoclonal anti-β actina (ratón) (Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo monoclonal anti-fibra (ratón) (Abcam). Los anticuerpos secundarios usados fueron anticuerpos anti-ratón y anti-conejo conjugados con peroxidasa (HRP) (ambos de Jackson ImmunoResearch), Alexa Fluor 568 anti-ratón y Alexa Fluor 488 anti-conejo (ambos de Invitrogen).

5.3 Primers

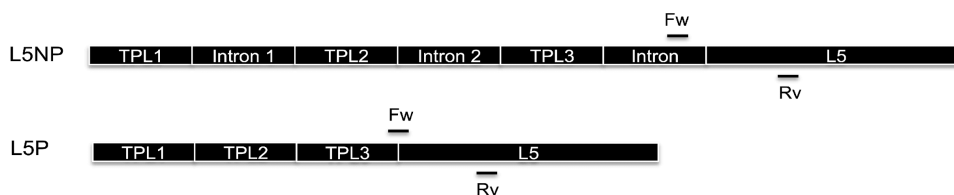
Los primers se diseñaron usando los software CLC sequence viewer y primer-BLAST (NCBI). Los primers usados para detectar el pre-mRNA de L5 (L5NP) reconocen una región dentro del transcrito primario de L5 río arriba de la secuencia codificante,

nucleótidos 31,007-31,123. Para detectar el mRNA de L5 (L5P) se diseñaron primers que reconocen el sitio de splicing entre el tercer exón del TPL y el exón L5. El mRNA de β actina (875-1013 nts) se usó como control de carga. (Fig 7A)

Para determinar la acumulación del DNA viral, se diseñaron primers para amplificar el segundo intrón en la secuencia del TPL del genoma de adenovirus (nucleótidos 7,273-7,353). Estos últimos también se usaron para los RT qPCR en los experimentos de inmunoprecipitación de RNA.

Para los ensayos de transcripción *in vitro*, los primers se diseñaron para reconocer la unión intrón-exón entre el segundo intrón y el tercer exón del TPL (9,601-9,796 nts). El primer forward contiene la secuencia promotora T7 río arriba de la secuencia complementaria. El producto de PCR sirvió como templado de DNA para obtener el RNA correspondiente (RNA TPL 196 nts). Por otra parte, se obtuvo una sonda de RNA más corta (20 nts), cuya secuencia está incluida en el RNA TPL 196 nts y corresponde a la unión entre el segundo intrón y el tercer exón del TPL. El primer forward (usado para obtener el RNA TPL de 196 nts) también sirvió para obtener la sonda de RNA de 20 nts (RNA TPL 20 nts) y corresponde a los nucleótidos 9,632-9,651. La secuencia de cada uno de los primers usados se encuentra en la Fig 7B.

A



B

Name	Fw Primer	Rv Primer	Size (bp)	Position (nts)
TPL RNA 81nts	5' GAGCGAGGTGTGGGTGAGC 3'	5' GGATGCGACGACACTGACTTCA 3'	81	7,273-7,353
TPL RNA 196nts	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGGGAT ACGGCGCTAACGATGC 3'	5' GCACCTCCGCCAGAAACAACC 3'	196	9,601-9,796
Pre-mRNA L5 (L5NP)	5' GTCCATCCGCACCCACTATCTTC 3'	5' AAGGCACAGTTGGAGGACCG 3'	117	31,007-31,123
mRNA L5 (L5P)	5' GTCACAGTCGCAAGATGAAGCG 3'	5' GGTAAGTACGAGTTCCGGATAGGCG 3'	185	9,720-31,212
rDNA 18S	5' CGATGCCGACCGCGATG 3'	5' CTCCTGGTGGTGCCTTC 3'	140	1,085-1,224
mRNA β actin	5' CTTCTTCTCTGGGCATGGAGTCC 3'	5' GCAATGCCAGGGTACATGGTGG 3'	139	875-1,013
Viral DNA	5' GAGCGAGGTGTGGGTGAGC 3'	5' GGATGCGACGACACTGACTTCA 3'	81	7,273-7,353

Figura 7. Representación esquemática del diseño de primers y su secuencia. A) Diagrama que muestra los sitios de reconocimiento de los primers que permiten discernir entre el pre-mRNA L5 y mRNA L5 (no está a escala). B) Secuencia de todos los primers empleados en este trabajo.

5.4 Purificación de DNA y qPCR

Se infectaron células HFF, a 90% de confluencia con el virus WT y cada uno de los mutantes. Las células infectadas se cosecharon a 16, 24 y 36 horas post-infección (hpi) en medio (DMEM, 10% FBS). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 300 g, 4°C durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet de células en 1 ml de PBS1X. Se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante.

El pellet de células se resuspendió en una solución acuosa con Proteinasa K (1mg/ml)/0.5% Tween 20. Se homogeneizó con movimientos suaves y se incubó a 55°C durante 1 hora. Posteriormente se inactivó la Proteinasa K calentando 10 minutos a 95°C y se centrifugó 2 minutos, 4°C a 14,000 g. Se tomó el sobrenadante y se precipitó el DNA añadiendo 1/10 vol/vol de acetato de sodio (3M, pH 5.2), 1 vol/vol de isopropanol y se incubó over-night (O/N) a 4°C. A continuación, se centrifugó 20 minutos a 14,000 g, 4°C. Se eliminó el sobrenadante y los pellets se lavaron con 1ml de etanol 70%. Finalmente se centrifugó 10 minutos, 14,000 g, 4°C y el pellet se resuspendió en 10 µl de Tris HCl (10 mM, pH 7.4).

Para el ensayo de qPCR se emplearon volúmenes iguales de DNA total y se amplificó la región de Major Late (nts 7,273-7,353) en el genoma de adenovirus descrito en la sección Primers. El procedimiento se realizó como describe el fabricante (Applied Biosystem). Se preparó una mezcla del master mix con el DNA previamente extraído y los primers en un volumen final de 10 µl. El equipo StepOne (Applied Biosystems) fue usado como termociclador. Se realizó la cuantificación absoluta del número de copias de DNA viral mediante el método de la curva estándar usando como referencia un fragmento de DNA viral correspondiente a la región de Major Late (nts 7,007-7,480). Se realizaron dos experimentos independientes por triplicado cada uno.

5.5 Producción de progenie viral

Se infectaron células HFF con cada uno de los virus WT y mutantes a una MOI de 30 FFU/célula. Las células infectadas se cosecharon a 36 y 48 hpi. Seguidamente se centrifugaron a 300 g, 5 minutos a 4°C. El pellet de células obtenido se resuspendió en 100 µl de buffer IV USB (10 mM Tris HCL pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1% w/v dextrosa). Posteriormente se incubaron 5 minutos en nitrógeno líquido y después 10 minutos a 37°C. Esto se repitió tres veces. Finalmente se centrifugó a 14,000 g, 5 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se guardó a -20°C. Para la titulación viral se infectaron células HEK 293 con un volumen fijo de los sobrenadantes previamente obtenidos. A 24 hpi, se retiró el medio de cada uno de los pozos y las células se lavaron con 1 ml de PBS frío. Se retiró el PBS y se fijaron las células adicionando 1 ml de paraformaldehído al 3.7% en PBS, incubando a temperatura ambiente por 30 minutos. Se retiró el paraformaldehído y se hicieron tres lavados con 2ml de PBS por pozo. Las células se permeabilizaron con 400µl de PBS-Tritón X-100 (PBS, 0.5% Tritón X-100 ICN Biomedical Inc.) incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavó dos veces con 1 ml de PBS por pozo, se adicionó 500 µl del anticuerpo primario anti-DBP 1:1,500 (B6) y se incubó toda la noche (O/N) a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación se lavó tres veces con PBS y se adicionó 400 µl de un anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón producido en cabra acoplado al fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen) en una dilución 1:1,500 y se incubó por 4 horas a temperatura ambiente. Se lavó dos veces con 1 ml de PBS por pozo y se adicionó 1ml/pozo de DAPI (4'6-diamidino-2-fenil-indol) a 1 mg/ml (SIGMA) en una dilución 1:20,000 en PBS y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se hicieron dos lavados con 1 ml de PBS/pozo y se procedió al montaje del cubreobjetos. Para esto se invirtió cada cubreobjetos sobre 2 µl de una solución PBS/glicerol 10% y se selló con barniz. Cada una de las muestras se analizaron por microscopía de fluorescencia, con el objetivo 20x, en un microscopio Axiovert Zeiss. La progenie viral se cuantificó y se reportó como FFU/célula. Se realizó la titulación de dos experimentos independientes.

5.6 Acumulación de proteínas virales temprana y tardía

Las células HFF se infectaron y se cosecharon a 16, 24 y 36 hpi. Las células se centrifugaron a 300 g, 5 minutos a 4°C. El pellet obtenido se lavó con 5 ml PBS 1X y se resuspendió en 500 µl de buffer de lisis RIPA (50 mM NaCl, 25 mM Tris HCl pH 8, 0.1%

SDS (Dodecilsulfato de sodio), 0.5% deoxicolato de sodio, 2 mM EDTA, 0.5% NP40, 20 µg/ml PMSF (Fenilmetilsulfonilfluoruro), 20 µg/ml Leupeptina, 20 mg/ml aprotinina). Se incubaron por 1 hora en hielo, y se centrifugaron 5 minutos, 14,000 g a 4°C. El sobrenadante se preservó a -20°C. Los lisados se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron a membrana de PDVF, por electrotransferencia húmeda, por 1.5 h, a 400 mA. La membrana se bloqueó con PBS 1X, 3% leche descremada/ 0.5% Tween 20, a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se incubó O/N a 4°C con el anticuerpo primario anti-DBP (B6) (1:250), o anti-fibra (1:7,500) diluidos en PBS 1X, 0.3% leche descremada/ 0.05% Tween 20. Después de 3 lavados con PBS1X, la membrana se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa a una dilución 1:10,000 (Jackson InmunoResearch). La señal se reveló con un sustrato quimioluminiscente (ECL), como lo describe el fabricante (Invitrogen) y la membrana se expuso a películas autorradiográficas (Kodak).

5.7 Evaluación de la acumulación y procesamiento del mRNA viral tardío L5

Se infectaron células HFF con el virus WT y mutantes y se cosecharon a 36 hpi. Las células se centrifugaron a 300 g, 5 minutos a 4°C. El pellet obtenido se lavó con 5 ml PBS 1X y resuspendió en Trizol. La purificación del RNA total se realizó como describe el fabricante (Invitrogen). A partir de 100 ng de RNA total se realizó una reacción de reverso-transcripción para obtener cDNA. Para esto se emplearon primers previamente descritos que reconocen uniones exón-exón para evaluar RNA procesados (L5P) y primers que reconocen uniones intron-exón (L5NP) para evaluar RNA no procesados en el mRNA L5. A continuación, se realizó una qPCR y los datos se analizaron utilizando el método $\Delta\Delta C_t$. El mRNA de β actina se usó como control endógeno. Posteriormente se determinó el cociente L5 procesado (L5P): L5 no procesado (L5NP) como medida de splicing. Se realizaron dos experimentos independientes por triplicado cada uno.

5.8 Evaluación de la degradación de p53 y Mre11

Se infectaron células HFF con el virus WT y mutantes y se cosecharon a 16, 24 y 36 hpi. Las células se centrifugaron a 300 g, 5 minutos a 4°C. El pellet se lavó con 5 ml PBS 1X y las células se resuspendieron en 500 µl de buffer de lisis RIPA (50mM NaCl, 25mM Tris pH 8, 0.1% SDS (Dodecilsulfato de sodio), 0.5% deoxicolato de sodio, 2 mM EDTA, 0.5% NP40, 20 µg/ml PMSF (Fenilmetilsulfonilfluoruro), 20 µg/ml Leupeptina, 20 mg/ml aprotinina). Se incubaron por 1 hora en hielo, y se centrifugaron 5 minutos, 14,000 g a 4°C. El sobrenadante se preservó a -20°C. Los lisados proteicos se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron a membrana de PVDF, por electrotransferencia húmeda, por 1.5 horas, a 400 mA. La membrana se bloqueó con PBS 1X 3% leche descremada/ 0.5% Tween 20, a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se incubó O/N a 4°C con el anticuerpo primario anti-p53 (1:200) o anti-Mre11 (1:5000) diluidos en PBS 1X, 0.3% leche descremada/ 0.05% Tween 20. Después de 3 lavados con PBS1X, la membrana se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa a una dilución 1:10,000 (para p53) y anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa a una dilución 1:20,000 (para Mre11) (ambos Jackson ImmunoResearch). La señal se reveló con un sustrato quimioluminiscente (ECL), como lo describe el fabricante (Invitrogen) y la membrana se expuso a películas autorradiográficas (Kodak).

5.9 Determinación de la interacción de E1B con RNA *in vitro*

5.9.1 Obtención de la sonda de RNA marcado con ³²P

Las células HFF se infectaron con el virus WT y se cosecharon a 36 hpi. La muestra se centrifugó a 300 g, 4°C durante 5min. El pellet de células se lavó con 5 ml de PBS y posteriormente se incubó en una solución acuosa de Proteinasa K (1mg/ml)/Tween 20 (0.5%) y se incubaron a 55°C durante 1 hora. La Proteinasa K se inactivó mediante incubación a 95°C durante 10 minutos. El DNA total se precipitó usando 1:10 vol/vol de acetato de sodio (3 M, pH 5.2) y 1 vol/vol de isopropanol. El pellet de DNA se

resuspendió en Tris HCl (10 mM, pH 7.5) y se amplificaron 100 ng de DNA mediante PCR punto final (Thermo Scientific). Para ello, se empleó el primer forward que contiene la secuencia del promotor de T7 fusionada a la secuencia complementaria al DNA viral descrito anteriormente. El amplicón de DNA cuya secuencia corresponde a una unión entre el intrón 2-exón 3 en la región del TPL (nucleótidos 9,601-9,796) sirvió como templado para la transcripción *in vitro* (Ribomax Large Scale RNA Production Kit Promega) en presencia de 10 μ Ci de α -³²P UTP. El RNA marcado se precipitó usando 1:10 vol/vol de acetato de sodio (3 M, pH 5.2) y 1 vol/vol de isopropanol. La sonda de RNA precipitada se resuspendió en agua libre de nucleasa y se almacenó a -70°C.

5.9.2 Ensayo de retardamiento

Este ensayo se realizó siguiendo el método descrito por Cancio-Lonches *et al.* (2011). Las células HFF se infectaron con el virus WT y los virus mutantes en E1B y se cosecharon a 36 hpi en Buffer RIPA (Tris-HCl 25 mM, pH 8.0, NaCl 50 mM, deoxicolato sódico al 0.5% (p/v), 0.5% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM) y se incubaron 30 minutos a 4°C. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 14,000 g a 4°C durante 5 minutos. A continuación, se incubaron 20 μ g de cada extracto proteico con 1 μ g de tRNA (Thermo Scientific) en un buffer que contiene HEPES (10 mM, pH 7.4), EDTA 0.1 mM, ditioneitol 0.2 mM (DTT), MgCl₂ 8 mM, espermidina 4 mM, ATP 3 mM, GTP 2 mM y glicerol al 10% (vol/vol) en un volumen final de 10 μ l. Posteriormente se añadió la sonda de RNA marcado (3×10^5 cpm) a cada mezcla de reacción y se incubaron durante 15 minutos en hielo. Las mezclas de reacción se trataron con RNasa A (20 U) y 20 μ g de RNasa T1 durante 30 minutos a 37°C para eliminar el RNA no unido. Los complejos de RNA-proteína se analizaron en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones nativas. Los geles previamente deshidratados se expusieron a películas autorradiográficas (Kodak). Como control negativo se utilizó solo RNA marcado. Este control se incluyó para descartar el cambio de movilidad propio de la sonda de RNA. Todas las imágenes fueron escaneadas y analizadas utilizando Adobe Photoshop CC. Estos experimentos se hicieron en colaboración con la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, CINVESTAV.

5.9.3 Ensayo de entrecruzamiento proteína-RNA

Los ensayos de entrecruzamiento con luz UV se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Gutiérrez-Escolano et al., (2000). Se preparó una mezcla de reacción que contenía la sonda de RNA marcado con α -³²P UTP previamente descrito y 40 μ g de extracto proteico total proveniente de células HFF infectadas con el virus WT y mutantes en E1B, a una MOI de 30 FFU/célula y cosechadas a 36 hpi. La mezcla se incubó 15 minutos en hielo y se expuso 15 minutos a luz UV. Posteriormente las mezclas se cargaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10%. A continuación, se deshidrató el gel y se visualizó por autorradiografía. Como control se utilizó solo RNA marcado.

5.10 Inmunoprecipitación de RNA

Las células HFF se infectaron con Ad5 WT o los mutantes en E1B y se cosecharon a 36 hpi. Los sedimentos celulares se resuspendieron en Buffer de lisis (HEPES 50 mM, pH 7.5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, 1% de Triton X-100, 0.1% de desoxicolato de sodio). Las muestras se sonicaron usando un SONIC-Ruptor 4000 (OMNI International), a una amplitud del 40% durante 60 segundos. Este proceso fue repetido dos veces. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 14,000 g a 4°C durante 5 minutos. Todas las muestras se trataron con 1U DNAsa (10 U/ μ l, Promega) durante 15 minutos a 37°C. Se tomó el 10% del lisado como Input.

Para la inmunoprecipitación, las muestras se incubaron O/N a 4°C con el anticuerpo primario anti-E1B 2A6 (1:50). Posteriormente, se añadió 50 μ l de proteína A-Sepharosa y se incubó durante 1 hora a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 300 g, 3 minutos, 4°C y la resina se lavó usando cuatro buffers consecutivos. Buffer 1: HEPES 50 mM, pH 7.5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, desoxicolato de sodio 0,1%; Buffer 2: HEPES 50 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, desoxicolato de sodio al 0,1%; Buffer 3: Tris HCl 10 mM, pH 8, LiCl 250 mM, NP40 al 0,5%, EDTA 1 mM; Buffer 4: Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM. Las perlas se resuspendieron en el Buffer de elución (Tris HCl 100 mM, pH 8, EDTA 10 mM, SDS al 1%). A continuación, se centrifugaron a 300 g, 4°C durante 3 minutos y se preservó el sobrenadante. A este último se le adicionó Trizol y las muestras se procesaron de

acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Se analizaron volúmenes iguales de RNA total mediante RT-qPCR (Applied Biosystems) usando primers que reconocen el segundo intrón de la secuencia de TPL (nucleótidos 7,273-7,353). Se incluyó un control RT- para descartar contaminación de DNA en el inmunoprecipitado. Los datos de la IP se normalizaron al E1B⁻, los datos del Input se normalizaron al mRNA de actina y posteriormente al WT. Finalmente los datos normalizados de la IP se relacionaron a los datos normalizados del Input y se expresaron como porcentaje del Input.

5.11 Síntesis y purificación de péptidos

Los péptidos que corresponden a la región del RNP1 entre los residuos 281 a 289 de la secuencia de proteína Ad5 WT E1B 55K (RGCAFYCCW) y un péptido mutante con sustituciones, C287S/C288S (RGCAFYSSW), se sintetizaron mediante fase sólida y estrategia de Fmoc, descrita previamente (Sigel y Martin, 1982; Kállay et al., 2011). Todos los péptidos fueron amidados en el extremo carboxilo y se purificaron hasta alcanzar una pureza mayor al 95% mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa. Finalmente se caracterizaron por MALDI-TOF. Estos experimentos se realizaron con la colaboración de la Dra. Lina Rivillas y la MSc. Leydis French, ambas del Laboratorio de Bioquímica y Resonancia Magnética Nuclear, Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

5.12 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de RMN tanto del péptido WT como del péptido mutante se registraron a 25°C en un espectrómetro Bruker 500MHz DRX equipado con una criosonda de resonancia triple de 5mm con gradientes z. La espectroscopía de correlación total bidimensional [¹H-¹H] (2D TOCSY) (tiempos de bloqueo de giro de 80Ms) se recogió en una solución peptídica 0.5 mM en KCl 25 mM, MgCl₂ 2 mM y D₂O al 15%, en ausencia o presencia de RNA TPL 196 nts 0,16 μM (nts 9,601-9,796) o RNA TPL 20 nts (nts 9,632-9,651). Los espectros se procesaron y analizaron con NMRPipe y CARRA. Todos los residuos pudieron asignarse; sin embargo, no se observó la señal de la Gly 282 HN,

pero se evaluó la HA. Estos experimentos se relizaron con la colaboración de la Dra. Lina Rivillas y la MSc. Leydis French, ambas del Laboratorio de Bioquímica y Resonancia Magnética Nuclear, Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

5.13 Calorimetría de titulación isotérmica

Los experimentos de ITC se realizaron a 25°C en un instrumento Malvern ITC200, cada experimento consistió en 20 inyecciones cada una con 2.0µl, con un espacio de inyección de 180 segundos. Se inyectó un total de 1.6 M péptido (WT o mutante) en la célula que contenía RNA 0.156 mM (RNA TPL 196 nts o RNA TPL 20 nts). Todas las muestras se intercambiaron en un buffer idéntico para asegurar una discrepancia mínima. Para tener en cuenta el calor de la dilución, se restó la titulación de fondo, que consiste en la solución titulante idéntica en solo la solución tampón. Los datos se analizaron posteriormente con los paquetes de software integrados de dominio público NITPIC, SEDPHAT y GUSSE (Keller et al., 2012; Zhao et al., 2015; Brautigam, 2015). Estos experimentos se relizaron con la colaboración de la Dra. Lina Rivillas y la MSc. Leydis French, ambas del Laboratorio de Bioquímica y Resonancia Magnética Nuclear, Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

5.15 Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron en el software Prism 7.0. El ANOVA y la prueba t-student se usaron para determinar la significancia estadística.

6. Resultados

6.1 Obtención de adenovirus recombinantes con mutaciones en el motivo putativo RNP de la E1B

Para la obtención de los adenovirus recombinantes con las mutaciones en el motivo putativo RNP se partió de clonas de *E. coli* con el bÁcrido clonado con la mutaci3n. Estos fueron purificados y posteriormente se corrobor3 el patr3n de restricci3n empleando Hind III. Se seleccionaron los que cumplían con el patr3n esperado para ser digeridos con la enzima de restricci3n *PacI* con el objetivo de liberar el genoma viral del bÁcrido. A continuaci3n, fueron transfectados en c3lulas 2E2 y la presencia de virus se determin3 a trav3s de ensayos de inmunofluorescencia empleando como anticuerpo primario anti-DBP. Una vez que se observ3 la presencia de c3lulas infectadas se llev3 a cabo la amplificaci3n viral en c3lulas 2E2 con el objetivo de obtener altos títulos virales.

6.2 E1B interacciona con RNA en c3lulas infectadas con adenovirus

La E1B es una proteína importante para la regulaci3n del tráfic3 intranuclear de mRNAs virales tardíos (Leppard y Shenk, 1989). Datos no publicados de nuestro laboratorio sugieren un posible papel en el procesamiento postranscripcional y estabilidad de los mRNAs virales. El mecanismo mediante el cual E1B ejerce este efecto no se conoce. Inicialmente se propuso que la interacci3n E1B-RNA podría ser clave en la regulaci3n de estos procesos; sin embargo, dicha interacci3n no ha podido ser detectada en el contexto de la infecci3n (Kato et al., 2011).

Como se describi3 en la introducci3n, la interacci3n E1B-RNA parece ser débil y/o transitoria, la cual podría estar mediada por el motivo RNP. Para detectarla se diseñaron experimentos de inmunoprecipitaci3n seguida de amplificaci3n del RNA viral. A partir de c3lulas infectadas con el virus WT o mutantes cosechadas a 36 hpi se inmunoprecipit3 E1B seguido de una reacci3n de RT qPCR (Fig. 8). Esta última permiti3 la amplificaci3n de una secuencia de un intr3n del TPL que comparten todos los RNA virales tardíos previamente descrita en Materiales y Métodos.

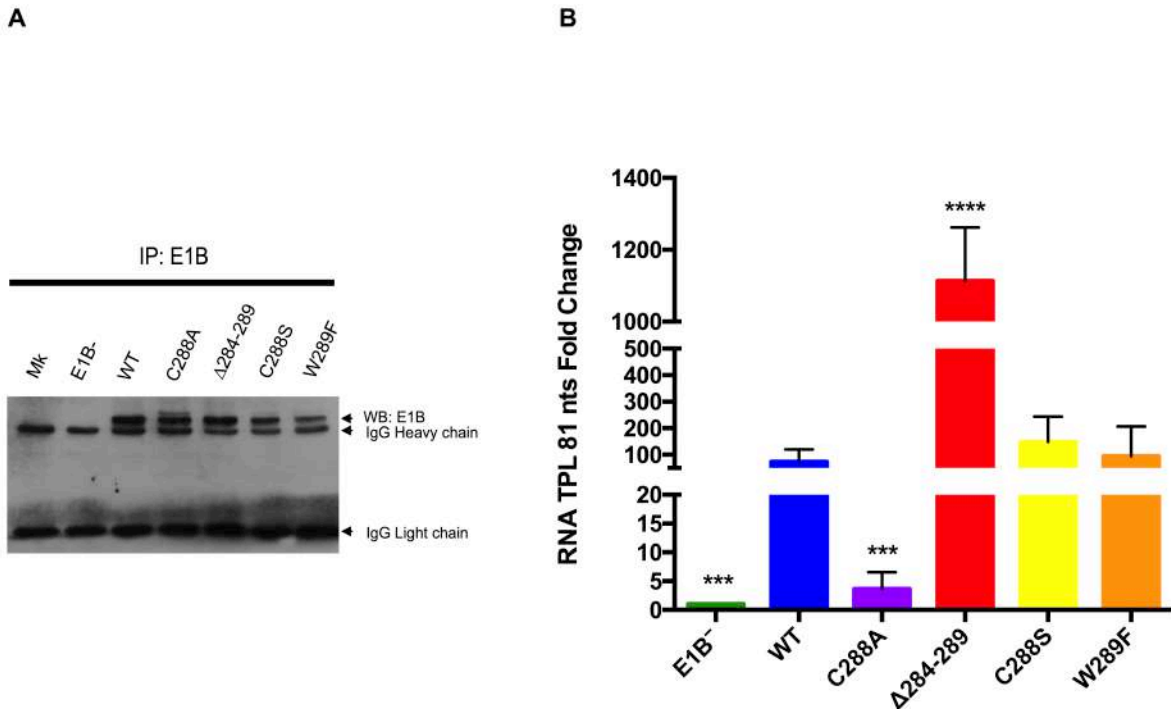


Figura 8. E1B 55K interacciona con RNA en las células infectadas con en virus WT y mutantes. Se infectaron células HFF y se cosecharon a 36 hpi. E1B 55K se inmunoprecipitó con el MAb 2a6. A partir de este inmunoprecipitado se obtuvo RNA y se realizó una reacción de RTqPCR para amplificar la secuencia correspondiente al intrón 2 en el TPL (TPL RNA 81 nts). A. Western blot de muestras de células no infectadas (Mk) e infectadas con el virus silvestre y mutantes de E1B, inmunoprecipitadas con el MAb anti-E1B 55K 2A6. B) RT qPCR de RNA viral inmunoprecipitado. La normalización de los datos se realizó como se describe en Materiales y Métodos. Se muestran las desviaciones estándar de dos experimentos independientes realizados por triplicado. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

El Western blot del inmunoprecipitado mostró niveles similares de la proteína E1B 55K a partir de los lisados de células infectadas con el virus Ad5 WT o cada uno de los mutantes E1B 55K-RNP1 (Figura 8A), y a excepción del mutante que no codifica para E1B 55K; en contraste, la cantidad de RNA amplificado de cada muestra fue significativamente diferente. La diferencia en la cantidad de RNA inmunoprecipitada en estos ensayos comparando células infectadas con WT y con E1B⁻ fue de casi 100 veces, lo que demuestra que, bajo las condiciones probadas, E1B 55K se asocia con RNA (Figura 8B). La secuencia que se seleccionó corresponde al TPL RNA 81nts descrito en Materiales y Métodos que comparten todos los mRNA virales tardíos (Berget et al., 1977). El virus mutante E1B⁻ funcionó como control negativo debido a que la

secuencia de RNA seleccionada y el anticuerpo contra E1B estaban presentes, pero la proteína E1B 55K no se expresa. Para el mutante C288A la inmunoprecipitación de la secuencia TPL-RNA 81nts fue casi 20 veces menor que en el WT. Este resultado podría esperarse teniendo en cuenta la unión reducida de la proteína E1B al RNA previamente detectado *in vitro* (Horridge y Leppard, 1998). Curiosamente, las sustituciones C288S y W289F mostraron solo variaciones menores en su capacidad para asociarse con el RNA. En marcado contraste, se recuperó una cantidad casi 10 veces mayor de RNA viral con el mutante Δ 284-289 en comparación con WT. Este resultado fue inesperado, ya que con la eliminación del RNP, se eliminan todos los residuos que anteriormente se sugirieron que participan en el contacto directo del E1B RNP con RNA. Tomados en conjunto, estos resultados indican que E1B interacciona con RNA en las células normales infectadas, y que mutaciones en el RNP traen consigo variaciones en cuanto a la asociación de E1B con RNA. Por otra parte, la delección del E1B RNP favorece esta interacción.

6.3 E1B afecta la formación de complejos proteína-RNA

Para caracterizar la influencia de las mutaciones en el RNP sobre la interacción E1B-RNA, se evaluó el cambio de movilidad en gel (EMSA) enfrentando un lisado de células infectadas con el virus WT y mutantes con una sonda de RNA marcada con ^{32}P (Fig 9). Esta secuencia corresponde a la unión entre el intrón 2 y el exón 3 del TPL (RNA TPL 196nts) y se encuentra en los mRNAs virales tardíos no procesados por splicing. El lisado de células infectadas se obtuvo a 36 hpi y se cuantificó mediante el método de Bradford.

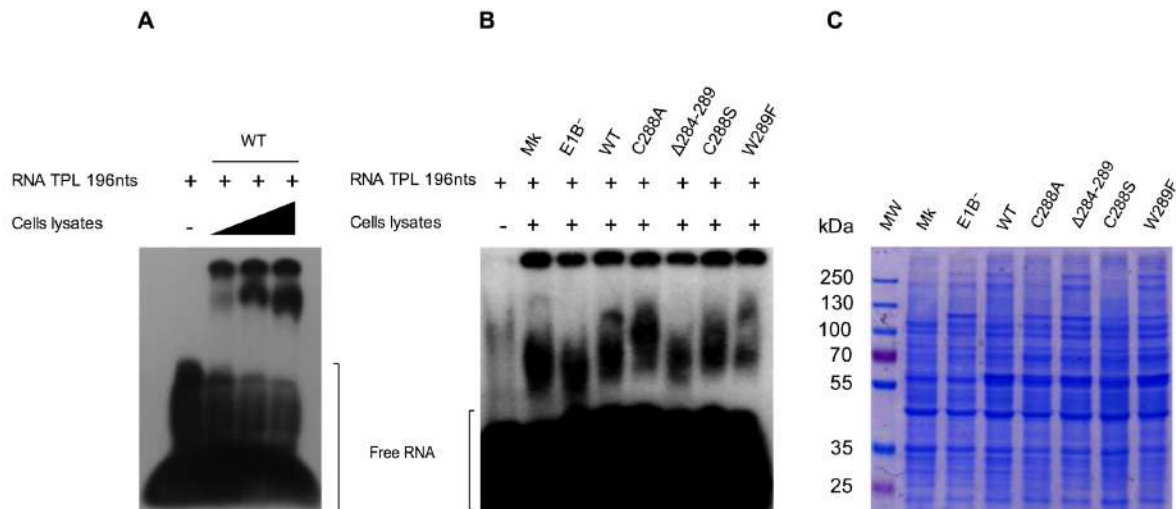


Figura 9. Las sustituciones de aminoácidos en el E1B RNP afectan la formación de complejos proteína-RNA. A) Concentraciones crecientes de lisados de células infectadas con el virus WT (5, 10, 15µg de lisados totales, respectivamente) incubados con 3×10^5 cpm (cuentas por minuto) de la sonda TPL-RNA 196nts marcada con ^{32}P . B) Los extractos de proteínas de las células infectadas con los virus E1B-, Ad5 WT (WT), C288A, Δ 284-289, C288S y W289F a 36 hpi, o no infectadas (Mk) se incubaron con la sonda ^{32}P TPL-RNA 196nts y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes para el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA). C) SDS-PAGE de lisados de células totales teñidos con azul de Coomassie .

Los resultados muestran que el lisado de células infectadas con el virus WT cambian la movilidad de la sonda de RNA marcada y que este efecto es dependiente de la concentración del lisado proteico total (Fig 9A). Posteriormente se enfrentaron los lisados de células infectadas y no infectadas, que provenían del mismo número de células usando cantidades de proteínas totales similares para cada condición (Fig 9C), con la sonda de RNA marcada. Las muestras se separaron en gel de poliacrilamida bajo condiciones nativas y se pudo detectar el cambio de movilidad del RNA cuando se enfrentaba a lisado de células no infectadas e infectadas; como control negativo se empleó un carril de solo RNA (Fig 9B). Aún cuando las bandas no están claramente definidas, se observaron patrones de movilidad diferentes comparando células no infectadas vs WT y WT vs mutantes en el RNP. Con estos experimentos no se puede determinar si E1B forma parte de los complejos proteína-RNA; sin embargo, estos datos sugieren que proteínas celulares y/o virales podrían asociarse a la sonda de RNA y que

RNA por lo que es un resultado esperado. Sin embargo, en el mutante C288S en el que se cambia un aminoácido por otro que posee características similares también se observa el mismo efecto (Fig 10A).

6.5 El péptido E1B 55K RNP se une al RNA *in vitro*

La interacción E1B-RNA determinada *in vitro*, mostró que las sustituciones en la secuencia del E1B RNP aumentan o disminuyen la unión de la proteína con RNA (Horridge y Leppard, 1998). Cuando los residuos A284S y F285Ldel287 (en el que se eliminó C287) se sustituyeron, las proteínas E1B 55K resultantes mostraron una unión al RNA reducida, mientras que la sustitución C288A mostró solo una reducción menor, y W289F mostró una unión aumentada (Horridge y Leppard, 1998), lo que sugiere que estos residuos pueden participar directamente en el contacto con el RNA o contribuir a la conformación adecuada de RNP. Para determinar si el E1B RNP puede participar en la interacción directa con el RNA, decidimos evaluar si un péptido sintético correspondiente a los residuos 281 a 289 del polipéptido E1B 55K puede unir el RNA *in vitro*, usando Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC). La misma sonda de RNA de 196 nts (TPL RNA 196 nts) que se empleó en los experimentos de EMSA y entrecruzamiento se sintetizó como se describe en materiales y métodos. Como se mencionó anteriormente, la secuencia se seleccionó porque las cinco familias de mRNAs virales tardíos de la unidad de transcripción tardía (Major Late) de adenovirus contienen esta secuencia en su región 5' no codificante y es necesaria para la exportación y traducción eficiente de estos mRNAs (Berkner y Sharp, 1985; Logan y Shenk, 1984). Se probaron dos péptidos en los experimentos de RMN e ITC: un péptido con la secuencia Ad5 WT (WT) (RGCAFYCCW) y un péptido con sustituciones en C287S y C288S (RGCAFYSSW), denominado péptido C287S/C288S, en el que los residuos de cisteína se sustituyeron para evitar la formación de puentes disulfuro y porque su sustitución (C288A) o supresión (F285Ldel287) afecta la unión del RNA (Horridge y Leppard, 1998). Los péptidos WT y C287S/C288S se titularon con la sonda TPL RNA 196 nts y la interacción fue seguida por RMN e ITC (Fig 11).

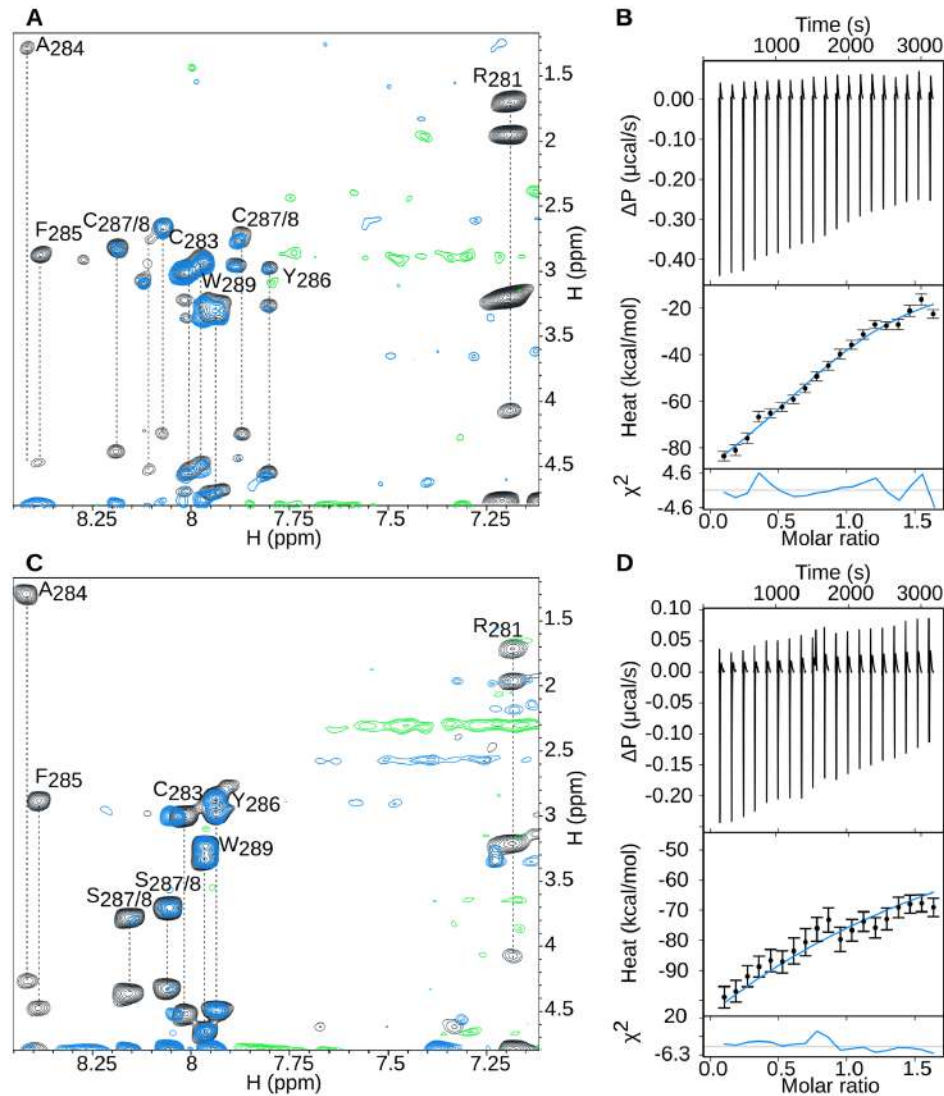


Figura 11. Los péptidos correspondientes al E1B RNP interaccionan con TPL-RNA 196 nts *in vitro*. A) Región expandida de una superposición de espectros TOCSY de péptido WT libre (negro) y péptido WT unido a la sonda TPL RNA de 196 nts (azul). B) Intercambio de calor de cada inyección de péptido WT en una solución que contiene la sonda TPL-RNA de 196 nts. C) Región expandida de una superposición de espectros TOCSY de péptido C287S/C288S libre (negro) y péptido C287S/C288S unido al TPL RNA 196 nts (azul). D) Intercambio de calor de cada inyección de péptido C287S/C288S en una solución que contiene el TPL RNA de 196 nts. Los termogramas se ajustaron mejor al modelo de un sitio de unión.

Las diferencias en el cambio entre los espectros TOCSY de ambos péptidos, con y sin RNA, indican los residuos cuyo entorno químico fue afectado por la unión. Estos cambios muestran que ambos péptidos interaccionan con el RNA, y los residuos más afectados fueron R281, A284, F285 en ambos péptidos (Figs 11A y C). Además, la

titulación por ITC confirmó la unión de ambos péptidos con RNA mediante un proceso exotérmico (Figs 11B y D), con intercambios de calor ligeramente más altos para el péptido WT, lo que sugiere una mayor afinidad por la interacción comparado con el péptido mutante. La unión de WT y el péptido mutante también se probó frente a una sonda de 20 nts de RNA (TPL RNA 20 nts) cuya secuencia está incluida en el TPL RNA 196nts y corresponde a la unión intrón-exón; sin embargo, en este caso los espectros de RMN y los resultados de ITC indican que no hubo unión con esta secuencia (Fig 12).

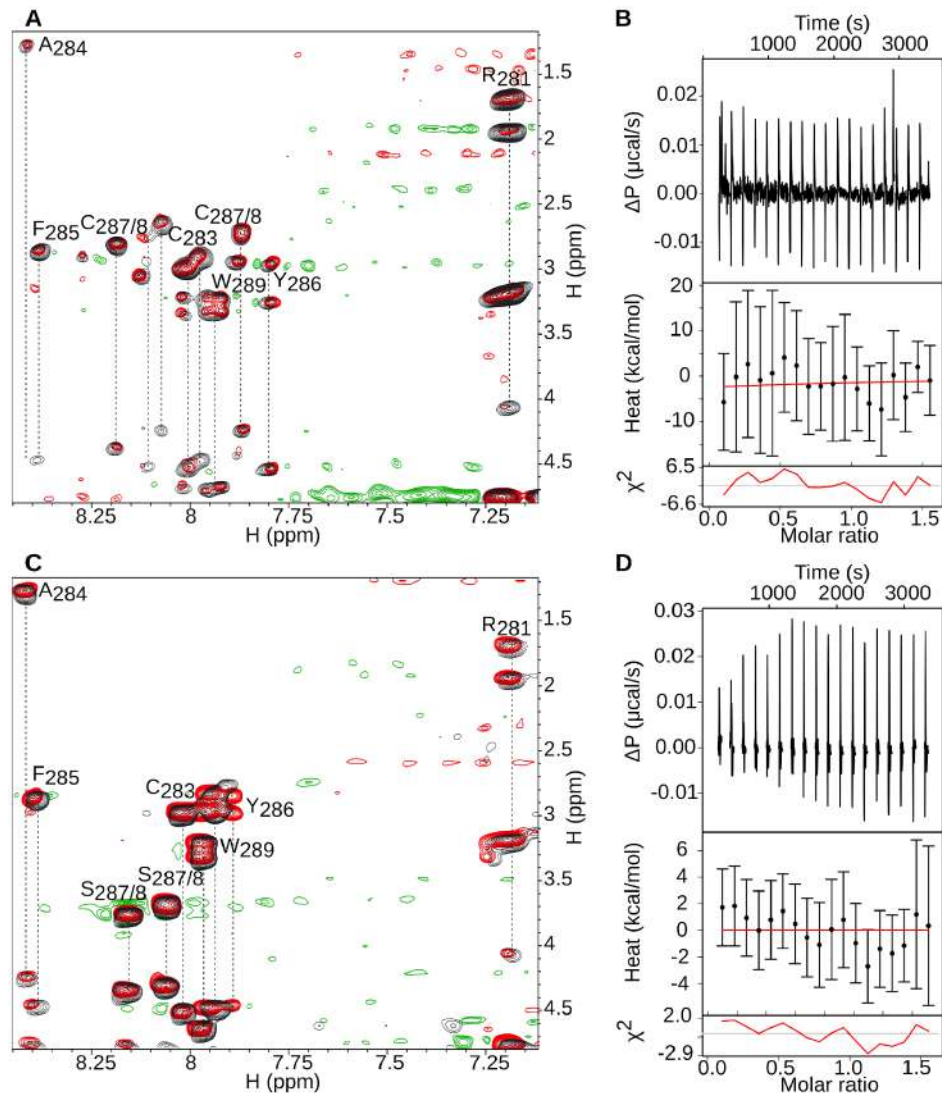


Figura 12. Los péptidos correspondientes al E1B RNP no interaccionan con TPL-RNA 20 nts *in vitro*. A) Región expandida de una superposición de espectros TOCSY de péptido WT libre (negro) y péptido WT unido a la sonda TPL RNA de 196 nts (azul). B) Intercambio de calor de cada inyección de péptido WT en una solución que contiene la sonda TPL-RNA 20 nts. C) Región expandida de una superposición de espectros TOCSY de péptido C287S/C288S libre (negro) y péptido C287S/C288S unido al TPL RNA 20

nts (azul). D) Intercambio de calor de cada inyección de péptido C287S/C288S en una solución que contiene el TPL RNA 20 nts. Los termogramas se ajustaron mejor al modelo de un sitio de unión.

Estos resultados concuerdan con Horridge y Leppard (1998), que mostraron que la sustitución de C288A tiene un efecto leve y que A284S o F285LdelC287 reducen severamente la unión de E1B-RNA. Los resultados obtenidos confirman estas observaciones y sugieren que los aminoácidos A284 y F285 pueden participar en el contacto directo de la E1B con RNA.

6.6 Sustituciones en el E1B RNP alteran la temporalidad de la producción de progenie viral

La E1B 55K es una proteína multifuncional implicada en varios procesos clave durante la replicación viral que finalmente afectan la producción de progenie viral. Para determinar el efecto de las sustituciones de E1B RNP sobre la replicación del virus, se analizaron los virus mutantes para determinar su capacidad para producir progenie viral en comparación con el virus WT. Las células infectadas se cosecharon a dos tiempos tardíos del ciclo de replicación de Ad (36 y 48 hpi) y los títulos virales se determinaron mediante inmunofluorescencia (Fig 13).

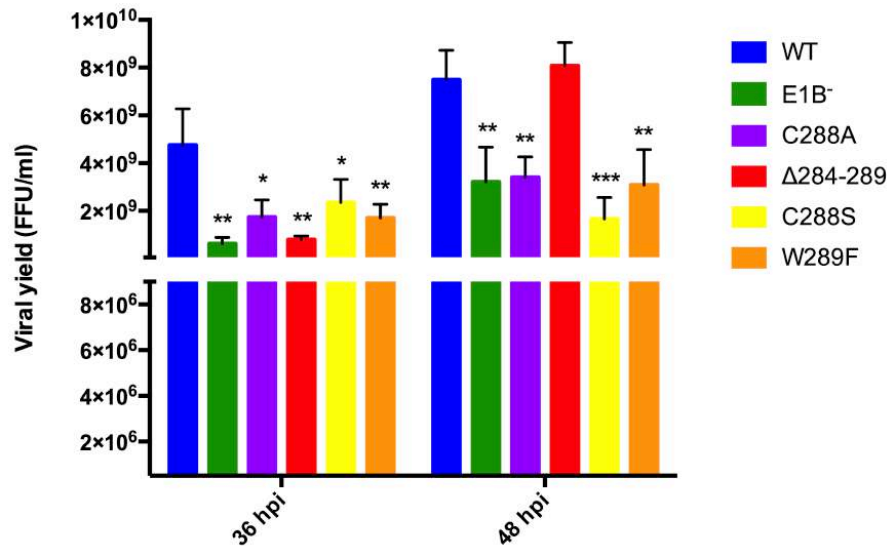


Figura 13. Producción de progenie viral en mutantes del E1B RNP . Células HFF infectadas a una MOI 30 FFU/célula con cada uno de los virus WT y mutantes, se cosecharon a 36 y 48 hpi. Se titularon en células HEK 293 mediante la detección de focos fluorescentes, empleando como anticuerpo primario anti-DBP..

Las barras de desviación estándar representan las titulaciones de dos experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Todos los virus mutantes mostraron una reducción de alrededor de la mitad en la producción de progenie viral en comparación con el virus WT a 36 hpi. En el caso del mutante $\Delta 284-289$ el defecto fue ligeramente más severo, incluso se observa un fenotipo similar al E1B⁻. Las disminuciones en la progenie viral fueron estadísticamente significativas, y fueron similares a las reportadas para otros mutantes en el E1B-RNP (Kato et al., 2011).

Para las 48 hpi, la producción de progenie viral se mantuvo afectada para los mutantes en E1B, sin embargo el mutante $\Delta 284-289$ mostró niveles de partículas virales infecciosas similares al virus WT sugiriendo que mutaciones en el E1B RNP alteran la eficiencia y la regulación temporal de la producción de progenie viral.

Estos resultados indican que el RNP de la E1B impacta el ciclo replicativo de adenovirus, por lo que se prosiguió a determinar las posibles funciones afectadas con el objetivo de esclarecer la contribución del RNP de E1B al ciclo replicativo de adenovirus.

6.7 Mutaciones en el motivo E1B RNP no afecta la actividad de la E3 Ubiquitina ligasa

La proteína E1B ensambla un complejo de E3 ubiquitina ligasa encargado de la poliubiquitinación de varias proteínas blanco que incluyen a p53 y Mre11. Mutaciones en la secuencia de E1B que impide el ensamblaje de este complejo, resultan en una disminución de la producción de progenie viral. Es por esto que se decidió determinar si las mutaciones el E1B RNP afectan la degradación de dos sustratos de la E3 ubiquitina ligasa bien caracterizados, p53 y Mre11 con el objetivo de correlacionar el fenotipo de degradación con la deficiencia en producción de progenie viral. Se infectaron células HFF en un tiempo temprano (16 hpi), un tiempo que corresponde a la transición a la fase tardía (24 hpi) y un tiempo tardío (36 hpi). Se realizaron ensayos de Western blot para determinar los niveles de p53 y Mre11 para comparar virus WT y mutantes (Fig 14).

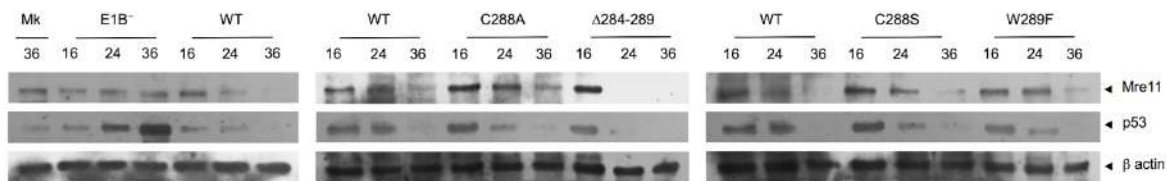


Figura 14. Sustituciones en el E1B RNP no afectan la cinética de degradación de Mre11 y p53. Las células HFF se infectaron y se cosecharon a 16, 24 y 36 hpi. Se obtuvieron extractos de proteínas totales y se realizaron ensayos de Western blot empleando los anticuerpos anti-Mre11 (Novus Biologicals) y anti-p53 DO1 (Santa Cruz Biotechnology). Se usó β actina (Santa Cruz Biotechnology) como control de carga.

Como se esperaba, para el virus WT los niveles de p53 y Mre11 disminuyen a partir de las 24 hpi, haciéndose prácticamente imperceptibles a 36 hpi. El virus que no expresa E1B (E1B⁻) muestra un fenotipo de acumulación de p53 a 36 hpi y los niveles de Mre11 se mantienen prácticamente invariables tal y como se espera. Excepto por el mutante Δ 284-289, el resto de los mutantes en el E1B RNP muestran un fenotipo similar al virus WT. El mutante Δ 284-289 muestra un fenotipo interesante pues parecería que la degradación de p53 y Mre11 es más eficiente debido a que a 24 hpi no se detectan ninguna de las proteínas.

Estos resultados indican que, aunque la delección del RNP dió como resultado una disminución más temprana de ambos blancos de la E3 ubiquitina ligasa, la actividad de este complejo no se afectó con las mutaciones en el RNP.

6.8 Mutaciones en el E1B RNP alteran la temporalidad de la acumulación de proteínas virales tempranas y tardías

Uno de los defectos mejor caracterizados para Ads mutantes que no expresan E1B es la reducción en la síntesis de proteínas virales tardías, las cuales son resultado de la reducción en la acumulación de los mRNAs virales tardíos en el citoplasma. Es por esto que se decidió evaluar si las mutaciones en E1B RNP impactaban la acumulación de la proteína viral tardía fibra. En estos experimentos se incluyó el análisis de la acumulación de la proteína temprana DBP (Fig 15). Los niveles de acumulación de ambas proteínas fue comparado entre el virus WT y mutantes mediante ensayos de Western blot a partir de extractos proteicos obtenidos de células infectadas y cosechadas en un tiempo

temprano (16 hpi), un tiempo en la transición a la fase tardía (24 hpi) y un tiempo tardío (36 hpi) del ciclo de replicación viral.

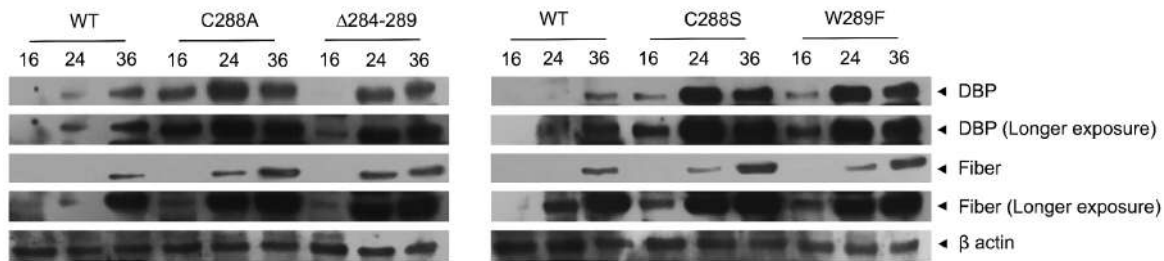


Figura 15. Efecto de sustituciones E1B 55K RNP sobre la cinética de acumulación de la proteínas virales DBP y fibra. Se infectaron células HFF y se cosecharon a 16, 24 y 36 hpi. El extracto proteico total se analizó por ensayo de Western blot usando los anticuerpos anti-DBP (B6) y anti-fiber (Abcam) respectivamente. β actina (Santa Cruz Biotechnology) fue usado como control de carga.

En células infectadas con el virus WT, la proteína DBP muestra un fenotipo de acumulación, con un incremento progresivo a 24 y 36 hpi. En ambas proteínas, DBP y fibra, los niveles de acumulación se incrementan a medida que avanza el ciclo replicativo; sin embargo, los mutantes muestran mayores niveles de DBP comparado con el virus WT en los tres tiempos analizados. Para el caso de fibra, esta proteína fue detectada antes en los mutantes; y los niveles de acumulación a las 36 hpi son ligeramente superiores comprados con el virus WT. Estos resultados sugieren que las sustituciones en el RNP de E1B afectan la temporalidad en cuanto a la expresión de ambas proteínas.

6.9 Mutaciones en el motivo RNP no afectan la localización intranuclear de la E1B

La localización intranuclear de la E1B en los centros de replicación viral (CRV), sitios intranucleares donde se replica y expresa el genoma viral, es necesaria para la replicación eficiente del DNA viral (Chahal y Flint, 2012), la biogénesis de los mRNAs virales tardíos y la producción de progenie viral (Ornelles y Shenk, 1991, Leppard y Shenk, 1989, González et al., 2006, Schmid et al., 2014).

Para determinar si las mutaciones en el RNP de E1B afectan la distribución de la proteína a los CRV, se infectaron células HFF con el virus WT y mutantes y se analizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia a 24 y 36 hpi (Fig 16). La

proteína viral DBP se usó como marcador *bona fide* de los CRV debido a que participa en la estabilización del DNA viral de cadena sencilla durante la replicación del genoma viral. La distribución de esta proteína está bien caracterizada y se conoce que forma estructuras en forma de anillos o donas en el núcleo de las células infectadas.

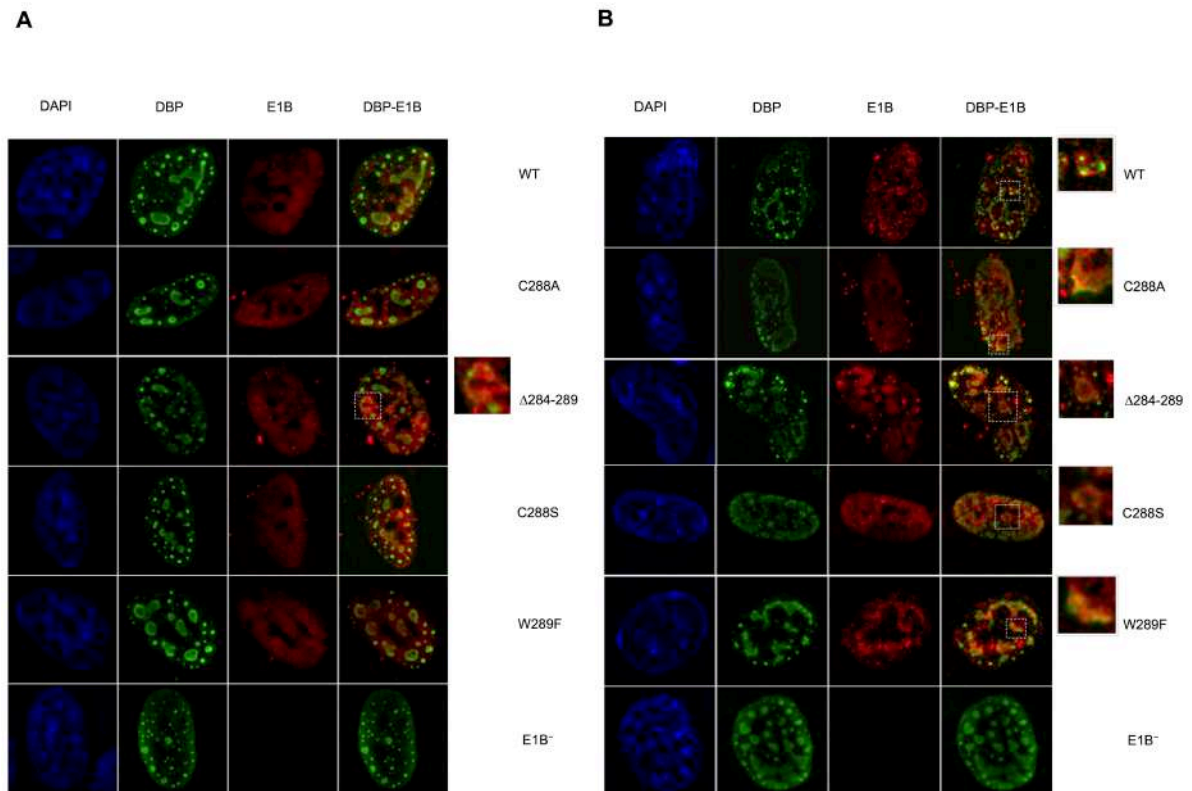


Figura 16. Localización de DBP y E1B 55K en centros de replicación en células HFF infectadas con el virus WT y mutantes. Las células HFF infectadas se fijaron a 24 y 36 hpi y procesaron para su análisis por ensayos de inmunofluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Azul (DAPI), verde (DBP), rojo (E1B). Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

Las células infectadas con el virus WT a 24 hpi mostraron la distribución esperada de DBP en forma de anillos, incluso comienza a detectarse coalescencia entre éstos. Este fenotipo se hace más evidente a 36 hpi. E1B muestra una colocación parcial con DBP que es más clara a 36 hpi. Para el resto de los mutantes E1B RNP se observan diferencias muy sutiles. Parecería que en el mutante $\Delta 284-289$, la colocación E1B-DBP está más definida comparando con el virus WT y el resto de los mutantes.

6.10 Mutaciones en el E1B RNP alteran la temporalidad en la acumulación de DNA viral

Como se describió anteriormente, DBP participa directamente en la replicación del DNA viral. Teniendo en cuenta que las mutaciones en el E1B RNP trajeron consigo una disminución en la producción de progenie viral y que además se detectaron cambios en la acumulación y temporalidad de la expresión de DBP se decidió determinar la eficiencia de acumulación del DNA viral. Se realizaron experimentos de qPCR para determinar la cinética de acumulación del DNA viral durante el curso de la infección (Fig 17).

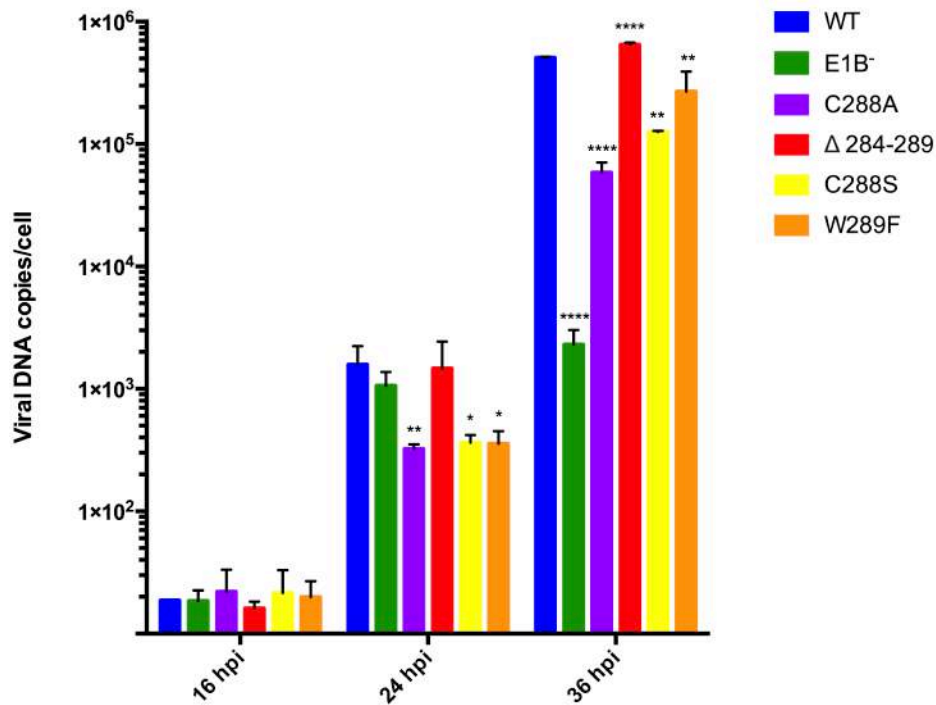


Figura 17. Alteración de la cinética de acumulación de DNA viral por mutaciones del motivo E1B55K RNP. Las células HFF infectadas se cosecharon en diferentes tiempos post-infección y se purificó el DNA total. El DNA viral se amplificó a través de una qPCR y los datos se analizaron mediante el método de la curva estándar y se expresaron en número de copias de DNA viral por célula. Se muestran la desviaciones estándar de dos experimentos independientes por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Se observó el patrón de acumulación de DNA viral esperado en las células HFF infectadas con el virus WT. Se detectó DNA viral a 16 hpi y no se observaron diferencias entre el WT y mutantes con valores cercanos a las 20 copias de DNA viral por célula, por lo que podemos tomarlo como el Input, tomando en cuenta que las células se infectaron

a una MOI de 30 como se describe en Materiales y Métodos. Seguidamente se detectaron incrementos de 10 y 1000 veces a 24 y 36 hpi, respectivamente. El virus que no expresa E1B (E1B⁻) muestra una disminución del número de copias de DNA viral de hasta 100 veces.

Curiosamente, los mutantes RNP mostraron un comportamiento variable en cuanto a los niveles de acumulación del DNA viral y la regulación temporal del mismo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos virus y el WT a las 24 hpi, y las 36 hpi produjeron niveles más bajos de DNA viral que el virus WT en células infectadas con los mutantes C288A, C288S y W289F. Estos resultados se correlacionan con la eficiencia reducida de la producción de progenie en estos virus. En contraste, las células infectadas con Δ 284-289 produjeron niveles similares de DNA viral en comparación con el virus WT a las 24 y 36 hpi.

6.11 El incremento de la interacción E1B 55K-RNA correlaciona con el nivel del mRNA L5 y su procesamiento por splicing

La alteración en la acumulación de proteínas tempranas (DBP) y tardías (Fibra) unido a defectos en la acumulación en el DNA viral sugieren que las mutaciones en el E1B RNP podrían afectar la expresión de genes virales. Para determinar el posible papel del E1B RNP en la biogénesis de los mRNA virales tardíos, se determinaron los niveles de pre-mRNA y el mRNA de L5 (codifica para la proteína fibra), así como el cociente de ambos como medida de procesamiento por splicing. Se extrajo RNA total a partir de células HFF infectadas con el virus WT y mutantes a 36 hpi y se analizaron mediante RTqPCR empleando primers que permiten diferenciar el RNA L5 no procesado (L5NP) y procesado (L5P) (Fig 18). El mRNA L5 se escogió porque se ha sugerido que es el mRNA viral tardío que más depende de E1B para acumularse en citoplasma, además codifica la proteína viral fibra la cual mostró un patrón de acumulación alterado comparado con el virus WT.

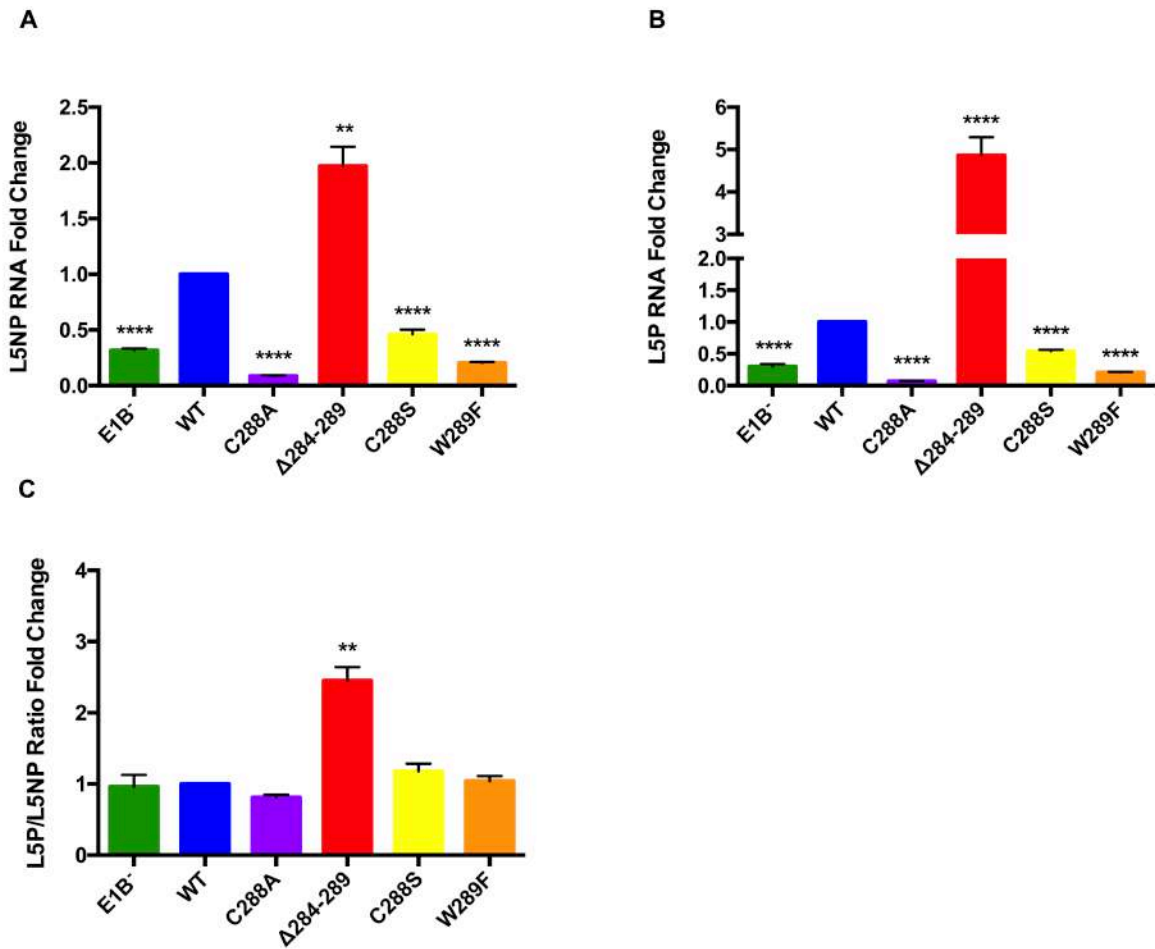


Figura 18. Las sustituciones en E1B RNP afectan la biogénesis de los mRNAs virales tardíos. Se infectaron células HFF con el virus WT y mutantes y se cosecharon a 36 hpi. El RNA total fue extraído. Los niveles de L5 pre-mRNA se determinaron mediante RT qPCR empleando primers que reconocen una unión exón-intrón (L5NP) A) o unión exón-exón (L5P) B). C) Para comparar la eficiencia del splicing, se calcularon los cocientes L5P:L5NP. El mRNA de β actina se usó como control endógeno. Se muestran los datos de dos experimentos independientes por triplicado cada uno. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

La ausencia de E1B (E1B⁻) resultó en una disminución de 3 veces en cuanto a la acumulación tanto del L5NP como el L5P sin embargo el cociente L5P:L5NP mostró niveles similares al WT. El mutante C288S mostró un fenotipo similar al mutante E1B⁻, con una disminución de 2 veces en cuanto a la acumulación del L5NP y L5P. Para los mutantes C288A y W289F mostraron una disminución de 14 y 5 veces respectivamente para ambos tipos de L5 RNA respectivamente (Figs 18A y B). Similar al virus mutante que no expresa E1B, ninguna de estas mutaciones afectaron la eficiencia de splicing

(Fig 18C). Para el mutante en el que se deleta el RNP (⊗284-289) se observó un incremento de 2 y 5 veces en los niveles de acumulación del RNA L5NP y L5P respectivamente. Este efecto es opuesto al esperado dado el fenotipo observado en los mutantes en los residuos C288 y W289. A diferencia del resto de los mutantes, en el mutante ⊗284-289 el cociente L5P:L5NP fue 2.5 veces mayor comparado con el virus WT. Los datos de inmunoprecipitación de RNA muestran que este mutante es más eficiente en cuanto a la interacción con RNA por lo que se puede establecer una correlación entre la interacción de E1B con RNA, la acumulación de RNA virales tardíos y su procesamiento por splicing.

7. Discusión

Los adenovirus han sido un modelo de estudio importante para entender funciones celulares. En las últimas décadas su papel como agente oncolítico ha sido demostrado y los datos indican que la proteína adenoviral E1B es importante para el diseño de nuevos vectores con mayor eficiencia en cuanto a la eliminación de tumores. Dada su importancia, E1B ha sido extensivamente estudiada; sin embargo, los mecanismos en los que está involucrada durante la infección no están claros.

Los estudios sobre las funciones y la estructura de E1B 55K son relevantes para comprender las contribuciones de esta proteína al ciclo de replicación viral. Mutantes que no expresan la E1B se han propuesto como agentes oncolíticos para usarse en terapias combinadas contra el cáncer, ya que muestran replicación selectiva en células tumorales frente a células normales (Bischoff et al., 1996; Lu et al., 2004). Se han realizado varios ensayos clínicos de fase II y III con adenovirus oncolíticos (Yu y Fang, 2007; Lu et al., 2004); sin embargo, la base para la selectividad tumoral sigue sin estar clara (Rothmann et al., 1998; Turnell et al., 1999).

Una de las actividades en las que E1B participa y que menos se entiende es la regulación de la expresión genética. Inicialmente se consideró la posibilidad de que E1B interaccionara directamente con RNA y que esta manera fuera uno de los posibles mecanismos de regulación, es decir, regulación mediante interacción directa. Incluso, se demostró *in vitro* que E1B expresada a partir de *E. coli* interaccionaba con sondas de RNA cuyas secuencias corresponden a secuencias de RNAs virales. Los resultados

mostraron la interacción E1B-RNA de manera inespecífica y a su vez se identificaron residuos, y se propuso un motivo de ribonucleoproteína (RNP), en el que mutaciones puntuales afectaban la asociación E1B-RNA (Horridge y Leppard, 1998). Sin embargo, estas interacciones no se habían podido detectar en el contexto de la infección (Kato et al., 2011), sugiriendo que podrían ser interacciones débiles y/o transientes difíciles de detectar pues podrían depender del momento del ciclo replicativo y la localización de E1B.

En nuestros experimentos pudimos detectar la interacción E1B-RNA en el contexto de la infección probablemente por la estrategia experimental que se siguió. La inmunoprecipitación de E1B, seguido de una RT qPCR resulta una técnica mucho más sensible que permite detectar pequeñas cantidades de RNA específico en una muestra. También la elección de la secuencia a detectar fue un proceso clave. Los experimentos de acumulación del RNA L5 procesado, no procesado y el cociente RNA L5 Procesado: no procesado como medida de splicing sugirieron que el RNP es importante para el metabolismo de RNA, específicamente para el splicing (Fig 18). Esto unido a que las secuencias empleadas por Horridge y Leppard (1998) incluían sitios de splicing o intrones, indicó que la secuencia a detectar tendría que corresponder a un RNA no procesado. Por otra parte se escogió la secuencia de un intrón incluido en el TPL pues esta secuencia está compartida en todos los mRNA virales tardíos y es importante para su acumulación en citoplasma y traducción. Además, E1B es importante para el tránsito de los mRNA virales dentro del núcleo y hacia el citoplasma (Leppard y Shenk, 1989), además de influir sobre la traducción de los mismos (Harada y Berk, 1999). Los resultados muestran que E1B se asocia con RNA virales tardíos no procesados por splicing en células infectadas. Sin embargo, fue inesperado que la delección de todos los residuos involucrados en la interacción con RNA previamente descritos resultara en un incremento en la interacción de E1B con RNA. Hasta el momento no se conoce la estructura de E1B es por ello que, en colaboración con el Grupo de Dinámica de Proteínas, CIDC-UAEM, se decidió realizar un análisis estructural de E1B con el objetivo de escalear la contribución del RNP a la estructura de la proteína empleando para ello el servidor i-TASSER. Para el análisis se utilizó como templado a la proteína de Atadenovirus, LH3 (Menéndez et al., 2017) la cual ocupa una posición equivalente en el genoma viral a la E1B de HAd, sugiriendo un ancestro común. Se obtuvo que E1B

muestra una estructura de solenoide β y seguido a esto se modeló el mutante $\Delta 284-289$, con el objetivo de determinar la contribución del RNP a la estructura de E1B, sin embargo el modelo no muestra un cambio significativo en la estructura comparado con la proteína silvestre. También se realizó el *docking* E1B-RNA comparando la E1B WT y la E1B con delección del RNP. El mutante en el E1B RNP exhibe un mayor número de poses o conformaciones lo que podría explicar el incremento de la interacción con RNA por un aumento en la entropía del sistema (Anexo 1 Fig 10).

Es probable que la naturaleza multifuncional de E1B 55K dependa de las modificaciones postraduccionales y de la variedad de interacciones moleculares en las que está involucrada. Se puede esperar que tales interacciones moleculares determinen tanto la localización intracelular de la proteína como sus actividades, que probablemente sean interdependientes. La fosforilación del C terminal de E1B 55K promueve la SUMOilación de la proteína, una modificación que aumenta su localización en el RC viral (Kindsmuller et al., 2007; Wimmer et al., 2013), el sitio donde la proteína probablemente ejerza su papel en la replicación del DNA viral y la expresión de genes virales (Schmid et al., 2014), así como en el procesamiento de los mRNA virales. Otras actividades, como el ensamblaje del complejo E3 ubiquitina ligasa pueden depender de la localización nucleoplásmica o la translocación de la proteína al citoplasma. Recientemente se describió el interactoma de E1B 55K en células infectadas (Hung y Flint, 2017), y aunque no está claro cómo cada una de las moléculas reportadas puede influir en la localización o actividad de la proteína, se puede esperar que al menos algunas de las interacciones ocurran en diferentes momentos del ciclo de replicación viral y probablemente, en diferentes sitios subcelulares. En consecuencia, pueden coexistir diferentes subpoblaciones de E1B 55K durante el ciclo de replicación viral, ya que la proteína está involucrada en diferentes interacciones y actividades.

Las sustituciones en el RNP alteraron la eficiencia o la producción oportuna de la progenie viral. En el caso de los mutantes C288A, C288S y W289F, los niveles de progenie viral fueron comparables a los producidos por el virus que no expresa E1B, ambos a 36 y 48 hpi. En contraste, el mutante $\Delta 284-289$ mostró una producción de virus reducida solo a 36 hpi, ya que en 48 hpi la producción de virus alcanzó niveles similares a los del virus WT. La producción de progenie menos eficiente o retrasada podría originarse a partir de cambios en la expresión de genes virales, la replicación del DNA

viral, la degradación de sustratos de la E3 ubiquitina ligasa, la formación adecuada de los centros de replicación o el ensamblaje de partículas virales. Se sabe que todos menos este último requieren de E1B.

Hasta el momento, la E3 ubiquitina ligasa estaba relacionada directamente con la poliubiquitinación de sustratos y la regulación de la expresión de genes virales tardíos sin embargo, en nuestros experimentos la degradación de p53 y Mre11 no se afectó por sustituciones en el motivo RNP, lo que indica que la interacción E1B 55K-RNA no está implicada en el ensamblaje de la E3 ubiquitina ligasa y si en la regulación de la expresión de genes virales tardíos (L5) y su procesamiento postranscripcional sugiriendo que ambas funciones son genéticamente separables.

Por otra parte, la expresión de genes virales y la replicación del DNA viral parecen estar directamente afectadas. Curiosamente, los mutantes C288A, C288S y W289F mostraron una reducción en la acumulación del DNA viral a 24 hpi, a niveles tres veces más bajos que el virus nulo para E1B, lo que sugiere un efecto de dominante negativo. En contraste, el mutante Δ 284-289 no mostró tal defecto en este tiempo post-infección. Mientras que de 24 a 36 hpi, el aumento en el número de copias de DNA viral en el virus nulo E1B fue mínimo, todos los mutantes en el RNP mostraron incrementos comparables al virus WT, lo que sugiere que todos menos el mutante de delección del RNP muestran un defecto en la replicación inicial del DNA viral. Tal efecto podría estar relacionado con el papel que juega la E1B en la regulación temporal de la formación de centros de replicación viral, que a su vez impacta en la replicación eficaz de DNA viral (Chahal y Flint, 2012), y con la cinética bifásica de la replicación del DNA viral recientemente descrita (Komatsu et al., 2018). Aunque los experimentos de inmunofluorescencia no mostraron un efecto claro sobre la localización de E1B o DBP en CRV, es posible que las mutaciones que afectan el motivo RNP puedan dificultar las actividades de E1B incluso cuando la proteína pueda asociarse con CRV, donde las mutaciones de RNP pueden afectar replicación del DNA viral temprana, pero no la tardía.

Las diferencias en la eficiencia y el tiempo de la replicación del DNA viral no son suficientes para explicar los bajos niveles de progenie producidos por los mutantes C288S, C288A y W289F, lo que sugiere un defecto adicional en estos virus que no fue mostrado por el mutante con la delección del RNP. Aunque no se ha informado de la

participación de E1B en la encapsidación o el ensamblaje del DNA viral, las proteínas virales implicadas en el ensamblaje de la partícula viral están asociadas a la periferia del RC virales (Condezo y San Martin, 2017). Además, el hallazgo de que la proteína E4 orf6 está asociada a la superficie de la partícula viral y puede funcionar como un portal para el empaquetamiento del genoma (Ahí et al., 2017) sugiere además que E1B puede afectar el empaquetamiento viral. Por lo tanto, será de interés determinar si la unión de E1B 55K-RNA puede alterar la organización adecuada de CRV, así como la interacción con E4 orf6 y su posible impacto en el ensamblaje de la partícula viral.

Dado que E1B 55K está implicada en la regulación de la respuesta antiviral, los fenotipos de pérdida de función de los mutantes del motivo RNP, la disminución de la progenie viral, pueden deberse a la incapacidad de inhibir eficientemente los mecanismos de defensa celular, como la expresión de genes estimulados por interferón (ISG) (Miller et al., 2009; Chahal et al., 2012). Este fue de hecho el caso del mutante $\Delta 284-289$, para el que se detectó un incremento en el nivel del mRNA IFIT2, (ISG reprimido de E1B 55K reportado previamente (Miller et al., 2009; Chahal et al., 2012) indicando un defecto en la represión de la respuesta de la célula a la infección (Anexo 1 S12 Fig). Otros mecanismos antivirales podrían verse afectados y deberían evaluarse, como la regulación del factor Daxx (Shreiner et al., 2010) o la regulación de KAP1, cada uno de los cuales también puede afectar la producción de la progenie viral (Burck et al., 2016). Por otra parte, la degradación de p53 y Mre11 no se afectó al eliminar el motivo RNP, pero la represión de IFIT2 fue defectuosa. Estos hallazgos indican que las actividades asociadas a la E3 Ubiquitina ligasa no están relacionadas con las actividades de E1B 55K asociadas a la represión de ISG.

Aunque se evaluó el efecto de las mutaciones en el motivo RNP sobre diferentes fenotipos durante la infección, en nuestros experimentos se evaluó la interacción de E1B 55K con RNA solo a 36 hpi, por lo que sería interesante determinar el efecto de la interacción E1B-RNA en otros tiempos del ciclo de replicación viral. Sin embargo, el aumento de 10 veces en la unión de RNA observado para el mutante de delección de RNP se correlacionó con una acumulación más eficiente de mRNAs viral tardíos, lo que confirma aún más la idea de que la proteína participa en el metabolismo de RNAs (Leppard y Shenk, 1989; Ornelles y Shenk, 1991) y que la interacción E1B-RNA es necesaria para el procesamiento intranuclear de los mRNAs virales tardíos.

8. Conclusiones

1. La E1B 55kDa interacciona con RNA virales en el contexto de la infección.
2. La interacción E1B-RNA correlaciona con un incremento en el nivel de acumulación de pre-mRNA L5 y mRNA L5, y su procesamiento por splicing.
3. Mutaciones en el RNP de la E1B 55kDa no interfieren con el ensamblaje del complejo Cullin 5 E3 Ubiquitina ligasa ni con la localización intranuclear de E1B.
4. Mutaciones en el RNP de la E1B alteran la temporalidad y acumulación de DNA viral así como la acumulación de proteínas virales tempranas y tardías.
5. Sustituciones en el E1B RNP disminuyen la producción de progenie viral probablemente por un defecto en la regulación de la respuesta antiviral de la célula.

9. Perspectivas

1. Analizar la interacción de E1B con RNA en varios tiempos del ciclo replicativo del virus y su correlación con el procesamiento postranscripcional de RNAs virales tardíos.
2. Determinar el efecto de las mutaciones en el RNP de E1B sobre la expresión de otros genes sensibles a interferón como GBP1-5, IF1H1 (MDA5), MX2 y TAP1.
3. Determinar el efecto de las mutaciones en el RNP de E1B sobre la degradación de Daxx y KAP1.
4. Determinar el papel de E1B en el ensamblaje de la partícula viral.

10. Referencias

1. Adam SA, Dreyfuss G. Adenovirus proteins associated with mRNA and hnRNA in infected Hela cells. *J. Virol.* 1987; 61: 3276-3283.
2. Ahí YS, Hassan AO, Vemula SV, Li K, Jiang W et al. Adenoviral E4 34K protein interacts with virus packaging components and may serve as the putative portal. *Scientific Reports* 2017; 7: 7582

3. Arany Z, Newsome D, Oldread E, Livingston DM, Eckner R. A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature*. 1995; 374 (6517): 81–84.
4. Avvakumov N, Kajon AE, Hoeben RC, Mymryk, JS. Comprehensive sequence analysis of the E1A proteins of human and simian adenoviruses. *Virology*. 2004; 329, 477–492.
5. Babiss LE, Ginsberg HS. Adenovirus type 5 early region E1b gene product is required for efficient shut off of host protein synthesis. *J Virol*. 1984; 50, 202-212.
6. Baker A, Rohleder KJ, Hanakahi LA, Ketner G. Adenovirus E4 34k and E1b 55k oncoproteins target host DNA ligase IV for proteasomal degradation. *J. Virol*. 2007; 81: 7034-7040.
7. Beltz GA, Flint SJ. Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection: restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus. *J Mol Biol*. 1979;131: 353-373.
8. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Cantin, GT, et al. Activation domain-mediator interactions promote transcription preinitiation complex assembly on promoter DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100:12003-12008.
9. Berk AJ. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene*. 2005; 24:7673-7685.
10. Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*. 1996; 274: 373-376.
11. Blackford AN, Grand RJA. Adenovirus E1B 55-kilodalton protein: Multiple roles in viral infection and cell transformation. *J Virol*. 2009; 83 (9): 4000-4012.
12. Blanchette P, Cheng CY, Yan Q, Ketner G, Ornelles DA, Dobner T, et al. Both BC-box motifs of adenovirus protein E4orf6 are required to efficiently assemble an E3 ligase complex that degrades p53. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(21): 9619-9629.
13. Brautigam CA. Calculations and publication-quality illustrations for analytical ultracentrifugation data. *Methods Enzymol*. 2015; 562: 109-133.
14. Bridge E, Ketner G. Redundant control of adenovirus late gene expression by early region 4. *J Virol*. 1989; 63:631–638.

15. Burck C, Mund A, Berscheminski J, Kieweg L, Muncieberg S, et al. KAP1 is a Host Restriction Factor That Promotes Human Adenovirus E1B-55K SUMO Modification. *J Virol.* 2016; 90: 930-946.
16. Burgert HG, Ruzsics Z, Obermeier S, Hilgendorf A, Windheim M, Elsing A. Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002; 269: 273-318.
17. Cancio C, Yocupicio M, Sandoval JC, Galvan I, Urena L, Vashist S et al. Nucleolin interacts with the feline calicivirus 3' untranslated region and the protease-polymerase NS6 and NS7 proteins, playing a role in virus replication. *J. Virol.* 2011; 85: 8056-8068
18. Cantin GT, Stevens JL, Berk AJ. Activation domain-mediator interactions promote transcription preinitiation complex assembly on promoter DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(21): 12003-8.
19. Cardoso FM, Kato SE, Huang W, Flint SJ, Gonzalez RA. An early function of the adenoviral E1B 55 kDa protein is required for the nuclear relocalization of the cellular p53 protein in adenovirus-infected normal human cells. *Virology.* 2008; 378: 339-346.
20. Carson CT, Schwartz RA, Stracker TH, Lilley CE, Lee DV, Weitzman MD. The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *EMBO J.* 2003; 22(24): 6610-6620.
21. Carstens, EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.* 2010; 155(1): 133-46.
22. Castillo E, Ballesteros G, Schmid M, Hidalgo P, Schreiner S, Dobner T, Gonzalez RA. The Mre11 Cellular Protein Is Modified by Conjugation of Both SUMO-1 and SUMO-2/3 during Adenovirus Infection. *ISRN Virology* 2014, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/989160>.
23. Catalucci D, Sporeno E, Cirillo A, Ciliberto G, Nicosia A, Colloca S. An adenovirus type 5 (Ad5) amplicon-based packaging cell line for production of high-capacity helper-independent deltaE1-E2-E3-E4 Ad5 vectors. *J Virol.* 2005; 79(10): 6400-9.
24. Cathomen T, Weitzman MD. A functional complex of adenovirus proteins E1B-55kDa and E4orf6 is necessary to modulate the expression level of p53 but not its transcriptional activity. *J Virol.* 2000;74(23):11407-12.

25. Chahal JS, Gallagher C, DeHart CJ, Flint SJ. The repression domain of the E1B 55-kilodalton protein participates in countering interferon-induced inhibition of adenovirus replication. *J. Virol.* 2013; 87(8): 4432-4444.
26. Chahal JS, Qi J, Flint SJ. The Human Adenovirus Type 5 E1B 55 kDa Protein Obstructs Inhibition of Viral Replication by Type I Interferon in Normal Human Cells. 2012; *PLoS Pathog* 8(8): e1002853. Doi: 10.1371/journal.ppat.1002853.
27. Challberg MMD, Ostrove JM, Kelly Jr TJ. Initiation of adenovirus DNA replication: detection of covalent complexes between nucleotide and the 80-kilodalton terminal protein. *J Virol.* 1982; 41: 265-270.
28. Chattopadhyay D, Ghosh MK, Mal A, Harter ML. Inactivation of p21 by E1A leads to the induction of apoptosis in DNA-damaged cells. *J Virol.* 2001; 75: 9844-9856.
29. Ching W, Dobner T, Koyuncu E. The human adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton protein is phosphorylated by protein kinase CK2. *J Virol.* 2012; 86(5): 2400-2415.
30. Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, Roberts RJ. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell.* 1977; 12(1): 1-8.
31. Cleat PH and RT, Hay. Co-operative interactions between NF- κ B and the adenovirus DNA binding protein at the origin of DNA replication. *EMBO J.* 1989; 8: 1841-8.
32. Condezo GN, San Martin C. Localization of adenovirus morphogenesis players, together with visualization of assembly intermediates and failed products, favor a model where assembly and packaging occur concurrently at the periphery of the replication center. *PLoS Pathog.* 2017; 13(4): e1006320.
33. Cuconati A, White E. Homologues of Bcl-2: role of apoptosis in the regulation of virus infection. *Genes & Dev.* 2002; 16: 2465–2478.
34. Cutt JR, Shenk T, Hearing P. Analysis of adenovirus early region 4-encoded polypeptides synthesized in productively infected cells. *J Virol.* 1987; 61(2): 543-552.
35. Dallaire, F., Blanchette, P., Goritl, P., Dobner, T. y P.E. Branton. Identification of integrin subunit α 3 as a new substrate of the adenovirus E4orf6/E1B 55 kilodalton E3 Ubiquitin ligase complex. *J. Virol.* 2009; 83: 5329-5338.

36. De Vries E, van Driel W, Tromp M, van Boom J, van der Vliet PC. Adenovirus DNA replication in vitro: site directed mutagenesis of the nuclear factor I binding site of the Ad origin. *Nucleic acids Res.* 1985; 13: 4943-4952.
37. Dobbelstein M, Roth J, Kimberly WT, Levine AJ, Shenk T. Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *EMBO J.* 1997; 16: 4276–84.
38. Dobner T, Horikoshi N, Rubenwolf S, Shenk T. Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science.* 1996; 272(5267): 1470-1473.
39. Doucas V, Ishov AM, Romo A, Juguilon H, Weitzman MD, Evans RM, Maul GG. Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes D.* 1996; 10: 196-207.
40. Endter C, Kzhyshkowska J, Stauber R, Dobner T. SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98:11312–17.
41. Evans RM, Fraser N, Ziff E, Weber J, Wilson M, Darnell JE. The initiation sites for RNA transcription in Ad2 DNA. *Cell.* 1977; 12(3): 733-739.
42. Flint SJ, González RA. Regulation of mRNA production by the adenoviral E1B 55-kDa and E4 Orf6 proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2003; 272: 287–330.
43. Forrester NA, Patel RN, Speiseder T, et al. Adenovirus E4orf3 targets transcriptional intermediary factor 1 γ for proteasome-dependent degradation during infection. *J Virol.* 2012; 86(6): 3167-3179.
44. Gonzalez R, Huang W, Finnen R, Bragg C, Flint SJ. Adenovirus E1B 55-kilodalton protein is required for both regulation of mRNA export and efficient entry into the late phase of infection in normal human fibroblasts. *J Virol.* 2006;80(2):964-74.
45. Gonzalez RA, Flint SJ. Effects of mutations in the adenoviral E1B 55-kilodalton protein coding sequence on viral late mRNA metabolism. *J Virol.* 2002;76(9):4507-19.
46. Grand RJ, Grant ML, Gallimore PH. Enhanced expression of p53 in human cells infected with mutant adenoviruses. *Virology.* 1994; 203:229-240.
47. Groitl P, Dobner T. Construction of adenovirus type 5 early region 1 and 4 virus mutants. *Methods in Molecular Medicine.* 2007; 130: 29-39.

48. Gupta A, Jha S, Engel DA, Ornelles DA, Dutta A. Tip60 degradation by adenovirus relieves transcriptional repression of viral transcriptional activator E1A. *Oncogene*. 2012; 32(42): 5017-25.
49. Gutierrez-Escolano AL, Brito ZU, del Angel RM, Jiang X. Interaction of cellular proteins with the 5 end of Norwalk virus genomic RNA. *J. Virol.* 2000; 74: 8558-62.
50. Hagkarim NC, Ryan EL, Byrd PJ, Hollingworth R, Shimwell NJ, Agathangelou A, et al. Degradation of a novel DNA damage response protein, tankyrase 1 binding protein 1 (Tab182), following adenovirus infection. *J Virol.* 2018; 92(12): e02034-17. doi: 10.1128/JVI.02034-17.
51. Halbert DN, Cutt JR, Shenk T. Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J Virol.* 1985; 56(1): 250-257.
52. Harada JN, Berk AJ. p53-independent and dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J. Virol.* 1999; 73: 5333-5344.
53. Harada JN, Shevchenko A, Shevchenko A, Pallas DC, Berk AJ. Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J. Virol.* 2002; 76 (18): 9194-9206.
54. Hendrickx R, Stichling N, Koelen J, Kuryk L, Lipiec A, Greber UF. Innate immunity to adenovirus. *Hum Gene Ther.* 2014; 25(4): 265-84.
55. Hidalgo PR. Papel de la oncoproteína E1B 55k en la replicación y expresión del genoma de adenovirus. 2018. Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología, UNAM.
56. Hierholzer JC. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5(3): 262-74.
57. Horridge JJ, Leppard KN. RNA-binding activity of the E1B 55-kilodalton protein from human adenovirus type 5. *J Virol.* 1998; 72 (11): 9374-9379.
58. Horwitz, MS. Function of adenovirus E3 proteins and their interactions with immunoregulatory cell proteins. *J. Gene Med.* 2004; 6(Suppl. 1):S172-S183.
59. Howe JA, Mymryk JS, Egan C, Branton PE, Bayley ST. Retinoblastoma growth suppressor and a 300-kDa protein appear to regulate cellular DNA synthesis. *Proc. Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87 (15): 5883–5887.

60. Hung G, Flint SJ. Normal human cell proteins that interact with the adenovirus type 5 E1B 55 kDa protein. *Virology*. 2017; 504: 12-24.
61. Jones N, Shenk, T. An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 1979; 76: 3665-3669.
62. Kállay C, Dávid, A, Rimári S, Nagy EM, Sanna D, Garribba E et al. Copper (II) complexes of rat amylin fragments. *Chem Soc., Dalton Trans*. 2011; 40: 9711-9721.
63. Kato SE, Huang W, Flint SJ. Role of the RNA recognition motif of the E1B 55 kDa protein in the adenovirus type 5 infectious cycle. *Virology*. 2011; 417(1): 9-17.
64. Keller S, Vargas C, Zhao H, Piszczek G, Brautigam C, Schuck P. High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak shape analysis. *Anal. Chem*. 2012; 84: 5066-5073.
65. Kindsmuller K, Groitl P, Hartl B, Blanchette P, Hauber J, Dobner T. Intranuclear targeting and nuclear export of the adenovirus E1B-55K protein are regulated by SUMO1 conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104: 6684-6689.
66. Komatsu T, Quentin-Froignant C, Carlon-Andres I, Lagadec F et al. In vivo labelling of adenovirus DNA identifies chromatin anchoring and biphasic genome replication. *J Virol* 2018; 92.
67. Kratzer F, Rosorius O, Heger P, Hirschmann N, Dobner T, Hauber J, et al. The adenovirus type 5 E1B-55K oncoprotein is a highly active shuttle protein and shuttling is independent of E4orf6, p53 and Mdm2. *Oncogene*. 2000; 19: 850-857.
68. Leopold PL, Kreitzer G, Miyazawa N, Rempel S, Pfister KK, Rodriguez-Boulan E, et al. Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum Gene Ther*. 2000; 11: 151-165.
69. Leppard KN, Shenk T. The adenovirus E1B 55kD protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *EMBO Journal*. 1989; 8, 2329-2336.
70. Lichtenstein DL, Doronin K, Toth K, Kuppuswamy M, Wold WS, Tollefson AE. Adenovirus E3-6.7K protein is required in conjunction with the E3-RID protein complex for the internalization and degradation of TRAIL receptor 2. *J Virol*. 2004; 78(22): 12297-307.

71. López RE. Regulación de las actividades de la proteína adenoviral E1B 55-kDa por fosforilación. 2016. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
72. Lu W, Zheng S, Li XF, Huang JJ, Zheng X, Li Z. Intra-tumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: a pilot phase II clinical trial. *World J Gastroenterol*. 2004; 10(24): 3634-8.
73. Mal A, Poon RYC, Howe PH, Toyoshima H, Hunter T, Harter ML. The E1A oncoprotein disables the CDK inhibitor p27 Kip1 in TGF- α treated cells. *Nature*. 1996; 380: 262-265.
74. Martin ME, Berk AJ. Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. *J. Virol*. 1998; 72: 3146-3154.
75. Mathews MB. Binding of adenovirus VA RNA to mRNA: a possible role in splicing. *Nature*. 1980; 285: 575-577
76. McSharry BP, Burgert HG, Owen DP, et al. Adenovirus E3/19K promotes evasion of NK cell recognition by intracellular sequestration of the NKG2D ligands major histocompatibility complex class I chain-related proteins A and B. *J Virol*. 2008; 82(9): 4585-94.
77. Menéndez R, Nguyen TH, Singh AK, Condezo GN, Marschang RE, Van Raaij MJ et al. Structure of a reptilian adenovirus reveals a phage tailspike fold stabilizing a vertebrate virus capsid. *Structure*. 2017; 25(10): 1562-1573.
78. Miller DL, Rickards B, Mashiba M, Huang W, Flint SJ. The adenoviral E1B 55-Kilodalton protein controls expression of immune response genes but not p53-dependent transcription. *J. Virol*. 2009; 83(8): 3591-3603.
79. Morris SJ, Scott GE, Leppard KN. Adenovirus late-phase infection is controlled by a novel L4 promoter. *J Virol*. 2010; 84(14): 7096-104.
80. Nemerow GR, Pache L, Reddy V, Stewart PL. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology*. 2008; 384(2): 380-388.
81. Nevins JR, Darnell JE. Groups of adenovirus type 2 mRNA's derived from a large primary transcript: probable nuclear origin and possible common 3' ends. *J Virol*. 1978; 25(3): 811-823.
82. Nevins, J.R. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum.Mol. Genet*. 2001; 10: 699-703.

83. Nodqvist K, Ohman K, Akusjarvi G. Human adenovirus encodes two proteins, which have opposite effects on accumulation of alternatively spliced mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 437-445.
84. Orazio NI, Naeger CM, Karlseder J, Weitzman MMD. The adenovirus E1b55K/E4orf6 complex induces degradation of the Bloom helicase during infection. *J Virol.* 2011; 85(4): 1887-92.
85. Ornelles DA, Shenk T. Localization of the adenovirus early region 1B 55-kilodalton protein during lytic infection: association with nuclear viral inclusions requires the early region 4 34-kilodalton protein. *J Virol.* 1991; 65 (1): 424-429.
86. Ou HD, Kwiatkoski W, Deerinck TJ et al. A structural basis for the assembly and the functions of a polymer that inactivates multiple tumor suppressors. *Cell.* 2012; 151: 304-319.
87. Pennella MA, Liu Y, Woo JL, Kim CA, Berk AJ. 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. *J. Virol.* 2010; 84 (23): 12210-12225.
88. Pilder S, Moore M, Logan J, Shenk T. The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol Cell Biol.* 1986; 6(2): 470-6.
89. Querido E, Blanchette P, Yan Q, Kamura T, Morrison M, Boivin D et al. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev.* 2001; 15: 3104-3117.
90. Reich NC, Sarnow P, Duprey E, Levine AJ. Monoclonal antibodies which recognise native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein. *Virology.* 1983; 128: 480-484
91. Rekosh, DM, Russell WC, Bellet AJ, Robinson AJ. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell.* 1977; 11: 283-295.
92. Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, Scheffner M, zur Hausen H. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J. Virol.* 1998; 72: 9470–9478.

93. Russell WC, Hay RT, Freeman A, Leith I, Monaghan A, Webster A. Update on adenovirus and its vectors. Molecular interactions during adenovirus DNA replication. *J Gen Virol.* 2000; 81: 2573-2604.
94. Sarnow P, Hearing P, Anderson CW, Halbert DN, Shenk T, Levine AJ. Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4 25,000-dalton protein in productively infected cells. *J. Virol.* 1984; 49: 692-700.
95. Schmid M, Kindsmüller K, Wimmer P, Groitl P, Gonzalez RA, Dobner T. The E3 ubiquitin ligase activity associated with the adenoviral E1B-55K-E4orf6 complex does not require CRM1-dependent export. *J Virol.* 2011; 85(14): 7081-7094.
96. Schmid M, Speiseder T, Dobner T, Gonzalez RA. DNA virus replication compartments. *J Virol.* 2014; 88(3): 1404-1420.
97. Schreiner S, Burck C, Glass M et al. 2013a. Control of human adenovirus type 5 gene expression by cellular Daxx/ATRAX chromatin-associated complexes. *Nucleic Acids Research* 41(6): 3532-3550.
98. Schreiner S, Kinkley S, Bürck C, Mund A, Wimmer P, Schubert T, et al. SPOC1-mediated antiviral host cell response is antagonized early in human adenovirus type 5 infection. *PLoS Pathog.* 2013b; 9(11):e1003775. doi: 10.1371/journal.ppat.1003775.
99. Schreiner S, Wimmer P, Sirma H, Everett RD, Blanchette P, Groitl P, et al. Proteasome-dependent degradation of Daxx by the viral E1B-55K protein in human adenovirus-infected cells. *J Virol.* 2010; 84(14): 7029-38.
100. Schwartz, R., S Eshleman, H, MM .Carson, MM and MM.D. Weitzman. (2008). Distinct Requirements of Adenovirus E1b55K Protein for Degradation of Cellular Substrates. *J Virol* 82 (18): 9043–9055.
101. Shenk T. Adenoviridae: the viruses and their replication. In: BN F, editor. *Fundamental Virology.* 1996; p. 979-1016.
102. Sieber T, Scholz R, Spoerner M, Schumann F, Kalbitzer HR, Dobner T. Intrinsic disorder in the common N-terminus of human adenovirus 5 E1B-55K and its related E1BN proteins indicated by studies on E1B-93R. *Virology.* 2011; 418(2): 133-43.

103. Sigel H, Martin RB. Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands. *Chem. Rev.* 1982; 82: 385-426.
104. Smart JE, Stillman BW. Adenovirus terminal protein precursor. Partial amino acid sequence and the site of covalent linkage to virus DNA. *J Biol Chem.* 1982; 257:13499-13506.
105. Sohn SY, Hearing P. Adenovirus regulates sumoylation of Mre11-Rad50-Nbs1 components through a paralog-specific mechanism. *J Virol.* 2012; 86(18): 9656-65.
106. Soria C, Estermann, FE, Espantman KC, OShea CC. Heterochromatin silencing of p53 target genes by a small viral protein. *Nature.* 2010; 466: 1076-81
107. Stein RW, Corrigan M, Yaciul P, Whelan J, Moran, E. Analysis of E1A-mediated growth regulation functions: binding of the p300-kilodalton cellular product correlates with E1A enhancer repression function and DNA synthesis-inducing activity. *J. Virol.* 1990; 64: 4421- 4427.
108. Stracker TH, Carson CT, Weitzman MD. Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad 50- NBS1 DNA repair complex. *Nature.* 2002; 418: 348-352.
109. Stracker TH, Lee DV, Carson CT, Araujo FD, Ornelles DA, Weitzman MD. Serotype-specific reorganization of Mre11 complex by adenoviral E4orf3 proteins. *J. Virol.* 2005; 79: 6664-73.
110. Stuiver MH, Bergsma WG, Arnberg AC, van Grondelle R, van der Vliet. Structural alterations of double-stranded DNA in complex with the adenovirus DNA-binding protein: Implications for its function in DNA replication. *J.Mol. Biol.* 1992; 225: 999-1011.
111. Teodoro JG, Branton PE. Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J. Virol.* 1997; 71:3620–3627.
112. Teodoro JG, Halliday T, Whalen SG, Takayesu D, Graham FL, Branton PE. Phosphorylation at the carboxy terminus of the 55-kilodalton adenovirus type 5 E1B protein regulates transforming activity. *J. Virol.* 1994; 68:776–786.
113. Trentin JJ, Yabe Y, Taylor G. The quest for human cancer viruses. *Science.* 1962; 137: 835-841.

114. Turnell AS, Grand RJ, Gallimore PH. The replicative capacities of large E1B-null group A and group C adenoviruses are independent of host cell p53 status. *J Virol.* 1999; 73(3): 2074-2083.
115. Ullman AJ, Reich NC, Hearing P. Adenovirus E4 ORF3 protein inhibits the interferon-mediated antiviral response. *J. Virol.* 2007; 81: 4744–4752.
116. Wang HG, Rikitake Y, Carter MC, Yaciuk P, Abraham SE, Zerler B et al. Identification of specific adenovirus E1A N-terminal residues critical to the binding of cellular proteins and to the control of cell growth. *J. Virol.* 1993; 67: 476–488.
117. Wang K, Huang S, Kapoor-Munshi A, Nemerow G. Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J Virol.* 1998; 72: 3455-8.
118. Weinberg DH, Ketner G. Adenoviral early region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression. *J. Virol.* 1986; 57: 833-838.
119. White E. Regulation of the cell cycle and apoptosis by the oncogenes of adenovirus. *Oncogene.* 2001; 20: 7836–7846.
120. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell.* 1993; 73: 309-319.
121. Wiethoff CM, Wodrich H, Gerace L, Nemerow GR. 2005. Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J. Virol.* 79:1992–2000.
122. Wimmer P, Blanchette P, Schreiner S, Ching W, Groitl P, Berscheminski J, et al. Cross-talk between phosphorylation and SUMOylation regulates transforming activities of an adenoviral oncoprotein. *Oncogene.* 2013; 32: 1626-1637.
123. Wright J, Leppard KN. The human adenovirus 5 L4 promoter is activated by cellular stress response protein p53. *J Virol.* 2013; 87(21):11617-25.
124. Xi Q, Cuesta R, Schneider RJ. Regulation of Translation by Ribosome Shunting through Phosphotyrosine-Dependent Coupling of Adenovirus Protein 100k to Viral mRNAs. *J Virol.* 2005; 79 (9) 5676-5683.
125. Xi Q, Cuesta R, Schneider RJ. Tethering of eIF4G to adenoviral mRNAs by viral 100k protein drives ribosome shunting. *Genes Dev.* 2004; 18(16): 1997-2009.

126. Yondola MA, Hearing P. The adenovirus E4 ORF3 protein binds and reorganizes the TRIM family member transcriptional intermediary factor 1 alpha. *J Virol.* 2007; 81(8): 4264–71.
127. Yu Wang, Fang Hu. Clinical Trials with Oncolytic Adenovirus in China. *Clinical Trials with Oncolytic Adenovirus in China. Current Cancer Drug Targets.* 2007; 7(2): 141-148.
128. Yueh A, Schneider RJ. Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes Dev.* 2000; 14(4): 414-21.
129. Zhang X, Turnell AS, Gorbea C, Mymryk JS, Gallimore PH, Grand RJ. The targeting of the proteasomal regulatory subunit S2 by adenovirus E1A causes inhibition of proteasomal activity and increased p53 expression. *J Biol Chem.* 2004; 279 (24): 25122-33.
130. Zhao H, Piszczek G, Schuck P. SEDPHAT-A platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions. *Methods.* 2015; 76: 137-148.
131. Ziff E, Fraser N. Adenovirus type 2 late mRNA's: structural evidence for 3'-coterminal species. *J Virol.* 1978; 25(3): 897–906.

11. Anexos

11.1 Anexo 1. Artículo de investigación aceptado por la revista *PLOS ONE*, 2019

The human adenovirus type 5 E1B 55kDa protein interacts with RNA promoting timely DNA replication and viral late mRNA metabolism

Berto Tejera^{1¶}, Raúl E. López^{1,2¶}, Paloma Hidalgo¹, Reinier Cárdenas^{1,3}, Grisel Ballesteros¹, Lina Rivillas¹, Leidys French^{1,3}, Carlos Amero³, Nina Pastor¹, Ángel Santiago¹, Peter Groitl⁴, Thomas Dobner⁵, and Ramón A. Gonzalez^{1*}

¹Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México

²Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México

³Laboratorio de Bioquímica y Resonancia Magnética Nuclear, Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México

⁴Institute of Virology, Technische Universität München/Helmholtz Zentrum München, Munich, Germany

⁵Heinrich Pette Institute, Leibniz Institute for Experimental Virology, Hamburg, Germany

*Corresponding author

E-mail: rgonzalez@uaem.mx

¶ These authors contributed equally to this work.

Abstract

The E1B 55kDa produced by human adenovirus type 5 is a multifunctional protein that participates in the regulation of several steps during the viral replication cycle. Previous studies suggest this protein plays an important role in postranscriptional regulation of viral and cellular gene expression, as it is required for the selective accumulation of maximal levels of viral late mRNA in the cytoplasm of the infected cell; however the molecular mechanisms that are altered or regulated by this protein have not been elucidated. A ribonucleoprotein motif that could implicate the direct interaction of the protein with RNA was initially predicted and tested *in vitro*, but the interaction with RNA could not be detected in infected cells, suggesting the interaction may be weak or transient. Here it was determined that the E1B 55kDa interacts with RNA in the context of the viral infection in non-transformed human cells, and its contribution to the adenovirus replication cycle was evaluated. Using recombinant adenoviruses with amino acid substitutions or a deletion in the ribonucleoprotein motif the interaction of E1B 55kDa with RNA was found to correlate with timely and efficient viral DNA replication and viral late mRNA accumulation and splicing.

Introduction

The early 1B protein, E1B 55kDa (E1B 55K), from species C human adenoviruses participates in key steps of the virus replication cycle, as it is implicated in the regulation of cellular processes that produce a favorable environment that results in efficient virus gene expression and progeny production [1-3]. E1B 55K has been reported to interact

with over 30 proteins, including the viral E4 Orf3, E4 Orf6, DBP, L4 100K, pVI, pVII and a variety of cellular proteins [4]. The role played by the interaction of E1B 55K with each viral or cellular protein in viral replication has not been fully characterized; however, most can be grouped into a few major biological processes that range from regulation of gene expression to polyubiquitin-dependent proteasomal degradation of target proteins. The late phase of infection is characterized by the establishment of a selective expression program in which E1B 55K is required for viral late mRNA intranuclear trafficking, cytoplasmic accumulation [5] and translation [6]. However, E1B 55K is also implicated in the regulation of the anti-viral response of the infected cell. In the absence of this protein, the expression of interferon-sensitive genes like GBP1-5, IFIH1 (MDA5), IFIT2, MX2 and TAP1 increases [7], and its role as inhibitor of the interferon-pathway has been described [8]. A repression domain for interferon target genes has been mapped to the E1B 55K C-terminus [9], while its N-terminus can interact with the tumor suppressor p53, tethering a repressor domain that inhibits p53-dependent transcription [10,11]. The interaction with the viral early E4 Orf6 protein and the cellular proteins Cullin 5, Elongins B and C, and Rbx1 is required for assembly of an E3 Ubiquitin ligase complex [12] that promotes polyubiquitylation and degradation of a growing number of cellular substrates that include components of the DNA Damage Response (DDR), such as Mre11, Rad 50 [13,14], the Bloom helicase [15] and DNA ligase IV [16,17], as well as, ATRX [18], p53 [12,19], Tip 60 [20], SPOC 1 [21], Tab182 [22], and α 3 integrin [23]. Interestingly, E1B 55K is also responsible for degradation of the PML nuclear bodies component Daxx without the assembly of the E4 Orf6-dependent Cullin5 E3 Ubiquitin ligase complex [24].

Several experiments designed to explore the contribution of specific motifs or domains to the protein's activities have identified features such as a nuclear export signal

(NES) between residues 83 to 93 [25] and a nuclear localization signal (NLS) in the C-terminus [26] that allow shuttling of the protein between the nucleus and the cytoplasm. The protein is modified posttranslationally by phosphorylation at Ser490, Ser491, and Thr495 [27,28], and by sumoylation at Lys104 [29]. Phenotypic analyses of mutant viruses with amino acid substitutions in these sites indicate they impact E1B 55K functions. Phosphorylation is necessary for the proper localization of the protein in the cell nucleus and for its ability to associate with, inhibit and induce proteasomal degradation of p53 [12,28,30], while E1B sumoylation regulates intranuclear targeting and nuclear export of the protein [31], and it has been proposed that it functions as E3 SUMO1 ligase for p53 [32]. E1B 55K is required for efficient accumulation of viral late mRNA and the concomitant inhibition of accumulation of cellular mRNA in the cytoplasm [33]. Since it was reported that the protein associates with the cellular hnRNP E1B-AP5 [34], which interacts with the cellular mRNA export receptor Nxf1 [35], it was suggested that the protein could directly alter cellular mRNA export mechanisms; however, no evidence has been found for the participation of hnRNP E1B-AP5 in the selective export of viral late mRNA, or in the reduction of the cytoplasmic accumulation of viral late mRNAs caused by an E1B 55K insertion mutant [36], whose interaction with hnRNP E1B-AP5 is not disturbed [34]. Export of the E1B 55K and E4 Orf6 proteins from the nucleus of infected cells, which depends on the export receptor, Crm1 (Xpo1), does not affect export of viral late mRNA [37], which are exported through Nxf1 [38].

In the absence of E1B 55K, viral late mRNAs do not accumulate efficiently in a soluble nuclear compartment after their dissociation from the nuclear matrix, and previous to their association with the nuclear membrane [5]. These observations suggest

that E1B 55K promotes the intranuclear processing of viral mRNA, while simultaneously interfering with that of cellular mRNA [39].

Very few studies have produced information on the structure of E1B 55K. The protein synthesized from a baculovirus expression system analyzed by gel filtration, velocity sedimentation centrifugation, and glutaraldehyde cross-linking assays was reported to form dimers with a nonglobular, elongated conformation [10]. NMR and circular dichroism experiments demonstrated the protein's N-terminus is intrinsically disordered [40]. Analysis of the E1B 55K amino acid sequence suggests that a central region, from amino acid 215 to 345 may form a hydrophobic core [41] that contains a predicted ribonucleoprotein (RNP) motif, which was shown to interact with RNA *in vitro* in a non-sequence specific manner. In these experiments E1B 55K was over-expressed in *E. coli* as a GST fusion protein and residues between Arg284 and Trp289 were directly implicated in the interaction with the viral RNA [42]. However, no interaction was detected in the context of infection suggesting that either the interaction is weak or the *in vitro* experiments do not reflect the ability of the protein to bind RNA within the infected cell [43].

Studies on E1B 55K functions and structure are relevant to understand the contributions this protein makes to the viral replication cycle and because adenovirus mutants that do not express E1B 55K have been proposed as oncolytic agents to be used in combined anti-cancer therapies, as they display selective replication in tumor *versus* normal cells [44,45]. A number of phase II and III clinical trials using oncolytic adenoviruses have been performed [45,46], but the basis for tumor selectivity remains unclear [6,47-49] and E1B 55K-dependent export of mRNA has been proposed to play a determinant role [49]. To gain insight into the role played by the RNP motif of E1B 55K

we have evaluated the protein's interaction with RNA and explored its contributions to viral replication and virus-host interactions. Using newly constructed adenovirus mutants with substitutions in the putative RNP motif and a combination of methodological strategies that integrate NMR, ITC and molecular modelling, we have determined that E1B 55K interacts with viral RNA in the context of the viral infection, and that amino acid substitutions in different positions of the RNP either increase or decrease this interaction. The activity of the E1B 55K-E4Orf6 Cullin 5 E3 Ubiquitin ligase was not abrogated by substitutions in the RNP motif, nor was the production of viral early or late proteins; however, timely viral progeny production and accumulation of viral DNA was altered, as were the levels and postranscriptional processing of viral late mRNA, providing new insight into the mechanistic basis for the role of the interaction of E1B 55K with viral RNA in regulation of viral gene expression.

Materials and methods

Cells and viruses

Monolayers of human foreskin fibroblasts (HFF) and 293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (GIBCO-BRL) and 10% Bovine serum (Biowest), respectively, 100 U of penicillin, and 100 µg of streptomycin per ml under a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. The Ad5 2250, which served as wild-type (Ad5 WT), and all E1B 55kDa (E1B 55K) mutant viruses were constructed using a method described previously [50]. Briefly, the H5pg4100 served as the Ad5 parent virus for all constructs. The complete E3 transcription unit from Ad5 was inserted into the H5pg4100 backbone generating the Ad5 2250, which served as the Ad5

WT for all experiments, and for construction of the E1B 55K substitution or deletion mutants. The C288A, C288S, W289F and Δ 284-289 carry nucleotide substitutions (or a deletion in the case of Δ 284-289) that were introduced by site-directed mutagenesis into the Ad5 2250 backbone. All recombinant bacmids were partially sequenced to confirm the substitutions or deletion. The Ad5 mutant *Hpm4149* (E1B⁻), which is null for expression of the E1B 55K protein carries four stop codons and was described previously [31]. All viruses were propagated and titrated by fluorescent foci on 293 cells as described previously [51], and a multiplicity of infection (MOI) of 30 Focus Forming Units (FFU) per cell was used in all experiments. Subconfluent HFF cells (at 90% confluence) were used in all experiments.

Antibodies

The primary antibodies (Ab) used were the mouse monoclonal (MAb) anti-DBP, B6 [52]; the rabbit polyclonal anti-DBP (a kind gift of T. Dobner); the mouse MAb anti-E1B 55kDa, 2A6 [53]; the mouse MAb anti-p53 (DO-1, Santa Cruz Biotechnology); the mouse polyclonal anti-Mre11 (Novus Biologicals); the mouse MAb anti- β actin (Santa Cruz Biotechnology); and the mouse MAb anti-fiber (Abcam). The secondary antibodies used were anti-mouse and anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies (both from Jackson ImmunoResearch), anti-mouse Alexa Fluor 568, and anti-rabbit Alexa Fluor 488 (both from Invitrogen).

Primers design

Primers were designed using the CLC sequence viewer software and primer-

BLAST (NCBI). The primers used to detect the L5 pre-mRNA (L5NP) recognize a region within the L5 primary transcript upstream of the coding sequence, and an amplification product was obtained from nucleotides (nts) 31,007 to 31,123. Primers used to detect the spliced L5 mRNA (L5P) spanned the splice junction between the third exon of the tripartite leader (TPL) and the L5 exon. The forward primer was complementary to the spliced junction (9,720-9,733; 31,042-31,049) and the reverse primer was complementary to the L5 exon sequence (nts 31,189-31,212) (S1A Fig). To measure viral DNA, primers were designed to amplify the second intron in the TPL sequence (nts 7,273-7,353). The latter were also used to perform RT qPCR in the experiments for RNA immunoprecipitation and were previously described [54]. β actin mRNA was used as loading control in the experiments that detected L5NP and L5P. To perform *in vitro* transcription assays primers were complementary to the intron-exon junction between the second intron and the third exon of the TPL (nts 9,601-9,796). The forward primer has a T7 promoter sequence upstream of the complementary sequence. The PCR product served as the DNA template to obtain the corresponding RNA (RNA TPL 196nts). A shorter RNA probe (20nts), whose sequence is included in the RNA TPL 196nts and corresponds to the junction between the second intron and the third exon of the TPL was obtained. The forward primer (used to obtain the RNA TPL 196nts) also served to obtain the 20 nts RNA probe (RNA TPL 20nts) and corresponds to nts 9,632-9,651. Primer sequences are shown in S1B Fig.

RNA immunoprecipitation assays

HFF cells were infected with Ad5 WT or the E1B 55K mutants and harvested at 36 hpi. Cell pellets were resuspended in lysis buffer (HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 140 mM,

EDTA 1mM, 1% Triton X-100, 0.1% Sodium deoxycholate). Samples were sonicated using a SONIC-Ruptor 4000 (OMNI International), at amplitude of 40% for 60 seconds to lyse the cells. This process was repeated twice. Cell debris was removed by centrifugation at 10,000 g at 4°C for 5 min. All samples were treated with DNase 10U/ μ l (Promega) for 15 minutes at 37°C. 10% of the total cell lysate from each sample was used to determine the RNA input. For immunoprecipitation, samples were incubated overnight with the anti-E1B MAb 2A6. Subsequently, protein A-Sepharose was added and incubated for 1h at 4°C. Samples were centrifuged and beads were washed using four consecutive buffers. Buffer 1: 50 mM HEPES pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Sodium deoxycholate; buffer 2: 50 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Sodium deoxycholate; buffer 3: 10 mM Tris HCl pH 8, 250 mM LiCl, 0.5% NP40, 1 mM EDTA; buffer 4: 10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl. Beads were resuspended in elution buffer (100 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS) and the RNA was isolated using Trizol Reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Equal volumes of total RNA were analyzed by RT qPCR (Applied Biosystems) using primers complementary to the second intron of the TPL sequence from nucleotides 7,273 to 7353 (RNA TPL 81nts). RT minus (RT-) controls were included to rule out DNA contamination in the pull-down assays. For the RT- reactions an average C_T of 32 was obtained in triplicates from three independent experiments, while the RT+ reactions produced average C_T values of 17.

The input for RNA TPL 81nts was quantified and normalized to β actin mRNA levels. These data were then normalized to WT values, obtaining the fold-change for the input RNA between WT and the E1B mutants. The IP data were normalized to the values obtained with the samples from the E1B null virus taken as a measure of the non-specific

background. The final values to determine the difference in protein-RNA interaction between WT and E1B mutants were calculated as the percentage of the IP over the input values.

***In vitro* transcription assays**

HFF cells were infected with Ad5 WT and harvested at 36 hpi. Cell pellets were incubated in Tween 20 (1:200)/proteinase K (1mg/ml) at 55°C for 1 hour. The proteinase K was inactivated by incubation at 95°C for 10 minutes. Total DNA was precipitated using 1:10 vol/vol 3M sodium acetate pH 5.2 and 1 vol isopropanol. DNA pellets were resuspended in Tris HCl 10mM pH 7.5 and 100 ng of total DNA were amplified by endpoint PCR (Thermo Scientific) using the forward primer that carries the T7 promoter sequence fused to the sequence that is complementary to the viral DNA described above. The DNA amplicon whose sequence corresponds to an intron-exon junction in the Major Late region between nts 9,601 and 9,796 served as template for T7 RNA polymerase *in vitro* transcription (Ribomax Large Scale RNA Production Kit, Promega). RNA was precipitated using 1:10 vol/vol 3M sodium acetate pH 5.2 and 1 vol isopropanol. RNA pellets were resuspended in nuclease free water and stored at -70°C. This transcript, RNA TPL 196nts, was used in the Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Isothermal Titration Calorimetry experiments.

Peptide synthesis and purification

The peptides that correspond to the region that spans the RNP1 between residues 281 to 289 of the Ad5 WT E1B 55K protein sequence (RGCAFYCCW) and a mutant

peptide with substitutions, C287S/C288S (RGCAFYSSW), were synthesized by solid-phase and Fmoc strategy, as previously described [56,57]. All peptides were amidated at the carboxy-terminus. Crude peptides were purified to over 95% purity by reverse-phase high-performance liquid chromatography and characterized by MALDI-TOF.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

NMR spectra of both the WT and mutant peptides were recorded at 25°C on a Bruker 500MHz DRX spectrometer equipped with a 5-mm triple resonance cryoprobe with z-gradients. Two-dimensional [¹H-¹H] total correlation spectroscopy (2D TOCSY) (80 ms spin-lock times) were collected on a 0.5 mM peptide solution in 25 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, and 10 % D₂O, in the absence and presence of 0.156 μM RNA TPL 196nts (nts 9,601-9,796) or RNA TPL 20nts (nts 9,632-9,651)). Spectra were processed and analyzed with NMRPipe and CARA. Most of the residues could be assigned based on the residue type, while the signal corresponding to Cys 283 was identified as the only Cys residue in the mutant peptide. However, it was not possible to distinguish between Cys 287/288 or Ser 287/288 using the available data. We did not observe a signal for Gly 282 HN, but the HA were assigned.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

ITC experiments were performed at 25°C on a Malvern ITC200 instrument. Each experiment consisted of 20 injections, each one with 2.0 μl, with injection spacing of 180s. A total of 1.6 M peptide (WT or mutant) was injected into the cell containing 0.156 mM RNA (RNA TPL 196nts or RNA TPL 20nts). All the samples were exchanged into

identical buffer to ensure minimal buffer mismatch. To account for the heat of dilution, the background titration, consisting of the identical titrant solution into only the buffer solution, was subtracted. The data were subsequently analyzed with the integrated public-domain software packages NITPIC, SEDPHAT and GUSSE [58-60].

Western blot assays

To analyze the steady-state concentrations of the cellular proteins, Mre11, p53, β actin and the viral proteins DBP and fiber, HFF cells infected with Ad5 WT or the E1B 55K mutants were harvested at 16, 24 and 36 hpi in 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.5% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40), and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and incubated 30 min at 4°C. Cell debris was removed by centrifugation at 10,000 g at 4°C for 5 min. The cell extracts were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting. β actin was used as the loading control. For immunoblotting, equal amounts of total protein were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes (Millipore), and processed as described previously [41]. Bands were visualized by enhanced chemiluminescence as recommended by the manufacturer (Pierce, Thermo Fisher Scientific) on X-ray films (Kodak). Autoradiograms were scanned and cropped using Adobe Photoshop CC.

Immunofluorescence

HFF cells grown on glass coverslips to approximately 90% confluence were mock-infected or infected with Ad5 WT or the E1B 55K mutant viruses. The infected cells were

processed at the indicated times postinfection, as described previously [36]. After the application of specific primary antibodies, cells were incubated with secondary antibodies coupled to fluorophores as indicated. The coverslips were mounted on glass slides in PBS–10% glycerol, and samples were examined using a Zeiss Axiovert 200M inverted microscope with a 63x/1.4-numerical-aperture oil-immersion objective lens with an Axiocam MRM and Axiovision 3.1 software (Carl Zeiss, Inc.).

DNA purification and quantitative PCR

Total DNA was isolated from mock-, Ad5 WT- and E1B 55K mutants-infected HFF cells at 16, 24 and 36 hpi. Cell pellets were incubated in Tween 20 (1:200)/proteinase K (1mg/ml) and incubated at 55°C for 1 hour. The proteinase K was inactivated by incubation at 95°C for 10 minutes. Cell debris was removed by centrifugation at 10,000 g at 4°C for 5 min. Total DNA was precipitated using 1:10 (vol/vol) 3M sodium acetate pH 5.2 and 1 vol isopropanol. DNA pellets were resuspended in Tris HCl 10mM pH 7.5 and stored at -20°C. Viral DNA was quantified from equal volumes of total DNA using the Power SYBR Green PCR Master Mix kit according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). All primers were validated to confirm an amplification efficiency >90% calculated by the linear regression obtained from standard-curve assays. The primers amplified a unique product of the expected size, as determined by melt-curve analyses. The StepOne system (Applied Biosystems) was used for thermocycling. The DNA samples were analyzed by the standard-curve method using a fragment of the Major Late DNA sequence from nucleotide position 7,007 to 7,480 to calculate the linear regression from the standard curve. The number of DNA copies were plotted as the log of the mean value with standard deviations from triplicate values of two independent experiments using Prism 7.0 software.

Splicing assays

HFF cells were infected with Ad5 WT or the E1B 55K mutant viruses and harvested at 36 hpi. Total RNA was isolated using Trizol Reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Equal volumes of total RNA were analyzed by RT qPCR using the primers for L5P and L5NP. The samples were analyzed by the $\Delta\Delta C_T$ comparative method using triplicate samples from two independent experiments. β actin mRNA was used as endogenous control.

Quantification of IFIT2 mRNA

HFF cells were treated with 1U/ml of human interferon β 1 (IFNB1) (Novus biologicals) or with 0.1% BSA for 12 h in DMEM. After this time, cells were mock-infected or infected with the Ad5 WT or Δ 284-289 viruses and harvested at 8 and 36 hpi with Trizol reagent (Invitrogen). Total RNA was isolated and equal volumes were analyzed by RT qPCR using primers specific for IFIT2 (ISG54). The samples were analyzed by the $\Delta\Delta C_T$ comparative method using triplicate samples from two independent experiments. β actin mRNA was used as endogenous control. IFIT2 was detected with the following primers (5' to 3') Fwd: TGTTCATTCTTGCCAGCC, Rev: CATACCGCAGATGGAGCAG.

Molecular modeling

The amino acid sequence of the human adenovirus type 5 E1B 55K was aligned with the LH3 protein from a snake adenovirus [61] using the Basic local alignment search tool-NCBI-NIH (Blast), resulting in a significant alignment (24% identity) from residue 164 to residue 349. This region was modeled with I-TASSER [62] using PDB structure 5G5O

(LH3 from snake adenovirus) as a template, for both the wild-type and deletion (Δ 284-289) versions of the protein; these were achieved with C-scores of 0.40 and 0.57, respectively (scores greater than -1.5 indicate useful models, as detailed in [62] and in the server web page). The resulting models were submitted to the PDB2PQR/APBS servers [63,64] to calculate their electrostatic potentials at pH 7 with CHARMM36 [65] charges and atomic radii. Both models were also submitted to HDOCK [66] to perform docking with a 19 bp segment of dsRNA (PDB structure 1QC0), using default parameters. The 100 predicted complexes with the best interaction energies were further analyzed with VMD [67].

Protein Disorder Analysis

For disorder analysis the E1B 55K amino acid sequence of human adenovirus type 5 was used [UniProt ID: P03243] with the following servers: PONDR® pool [PONDR® VLXT, PONDR® XL1_XT, PONDR® VL3-BA, PONDR® VSL2] (www.pondr.com); IUPRED (<https://iupred2a.elte.hu>) and DISOPRED (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred_new/).

Coevolution Analysis

The GREMLIN software (<http://openseq.org/submit.php>) was used to search for coevolving residues with potential structural significance. The HHblits algorithm was used to generate a multiple sequence alignment (MSA) of all available E1B 55K sequences. Sequences having >50% gaps were filtered out.

Statistical analysis

All data were analyzed in Prism 7.0 software. ANOVA and t-test were used to determine the statistical significance.

Results

E1B 55K interacts with RNA in Ad5-infected cells

It has been suggested that the interaction of E1B 55K with viral RNA through the RNP motif may be weak or transient during infection. Therefore, to detect a possible interaction between E1B 55K and viral late mRNA in the context of infection, an RNA immunoprecipitation assay (RIP) was performed, in which total protein lysates of cells infected with the Ad5 WT or E1B⁻ viruses or with the RNP mutants C288A, C288S, Δ 284-289, and W289F were immunoprecipitated with the anti-E1B 55K MAb-2A6, and the pulled-down RNA were amplified by RT qPCR (Fig 1).

Fig 1. E1B 55K interacts with RNA in Ad5 WT-infected cells and RNP substitutions affect RNA binding. HFF cells infected with the indicated viruses were harvested at 36hpi. E1B 55K was immunoprecipitated with the 2A6 MAb, RNA was isolated and RT qPCR were performed to detect a sequence corresponding to intron 2 in the TPL. (A) Western blot of immunoprecipitated samples with the anti-E1B 55K 2A6 MAb. (B) RT qPCR of immunoprecipitated viral RNA. Immunoprecipitation data was normalized as described in Materials and Methods and it is represented as the percentage of the input RNA. Standard deviations from three independent experiments performed in triplicate are shown. *** P<0.001, **** P<0.0001.

Immunoprecipitation of the E1B 55K protein was observed in similar amounts in lysates from cells infected with the Ad5 WT virus, as well as with all the mutants tested. Moreover, no protein expression was observed in lysates of cells infected with the E1B⁻ virus that does not direct the synthesis of E1B 55K (Fig. 1A). Once the protein was immunoprecipitated, the viral late RNA associated was amplified by RT qPCR (Fig 1B). The differences in the amount of RNA recovered from cells infected with the Ad5 WT and E1B⁻ was nearly 100-fold, demonstrating that under the conditions tested E1B 55K associates with the viral late RNA (Fig 1B). The RNA sequence amplified corresponds to the TPL RNA of 81nts (S1 Fig), which was selected because all five families of viral late mRNA from the adenovirus major late transcription unit contain this sequence in their 5'-noncoding region and it is necessary for their efficient export from the nucleus and translation [68, 69, 70]. Even though similar levels of the E1B 55K protein were immunoprecipitated from the lysates of cells infected with Ad5 WT virus or each of the E1B 55K-RNP1 mutant viruses (Fig 1B), the amount of RNA amplified from each sample was significantly different. The RNA pulled-down from the C288A mutant was nearly 20-fold lower than in Ad5 WT, an expected result considering the reduced binding of this E1B 55K protein to RNA previously reported [42]. Interestingly viruses that harbor the substitutions C288S and W289F displayed only minor variations in their ability to associate with RNA. In sharp contrast, over 10-fold higher amount of RNA was recovered with the Δ 284-289 mutant compared to Ad5 WT. The latter result was unexpected, as deletion of the RNP eliminates the residues that were previously suggested to participate in the direct contact of the RNP with RNA [42]. Nevertheless,

taken together these results indicate that E1B 55K can interact with RNA in infected cells, and the interaction is affected by substitutions in the RNP sequence.

An E1B 55K RNP1 peptide binds RNA *in vitro*

Previous studies of the E1B 55K-RNA interaction determined *in vitro* showed that substitutions in the E1B 55K-RNP sequence either increased or decreased binding of the protein to RNA [42]. When residues A284S and F285Ldel287 (in which C287 was deleted) were substituted the resulting E1B 55K proteins showed reduced RNA binding, while the C288A substitution displayed only minor reduction, and W289F showed increased binding [42], suggesting that these residues may either directly participate in RNA contact or contribute to the proper conformation of the RNP motif. To determine whether the RNP motif may participate in the direct interaction with RNA, we evaluated if a synthetic peptide corresponding to residues 281 to 289 of the E1B 55K polypeptide can bind RNA *in vitro*, using NMR and ITC. The TPL RNA 196nts probe that contains the TPL intron 2 – exon 3 junction of the tripartite leader (S1 Fig) was synthesized as described in Materials and Methods and used for these experiments. The sequence was selected because all five families of viral late mRNAs from the adenovirus major late transcription unit contain this sequence in their 5'-noncoding region [69,70]. Two peptides were tested in the NMR and ITC experiments: a peptide with the Ad5 WT (WT) sequence (RGCAFYCCW) and a peptide with substitutions in C287S and C288S (RGCAFYSSW), termed C287S/C288S peptide, in which the cysteine residues were substituted to avoid disulfide linkage formation, and because their substitution (C288A) or deletion (F285Ldel287) affect RNA binding [42]. The WT and C287S/C288S peptides were

titrated with the TPL RNA 196nts probe and the interaction was followed by NMR and ITC, as described in Materials and Methods (Fig 2).

Fig 2. E1B 55K-RNP peptides interact with TPL RNA 196nts *in vitro*. (A) Expanded region of an overlay of TOCSY spectra of free WT peptide (black) and WT peptide bound to the TPL RNA 196nts probe (blue). (B) Heat exchanged from each injection of WT peptide into a solution containing the TPL RNA 196nts probe. (C) Expanded region of an overlay of TOCSY spectra of free C287S/C288S peptide (black) and C287S/C288S peptide bound to the TPL RNA 196nts (blue). (D) Heat exchanged from each injection of C287S/C288S peptide into a solution containing the TPL RNA 196nts. The thermograms were best fit to a one binding site model.

The chemical shift difference between the TOCSY spectra of both peptides, with and without RNA, indicates residues whose chemical environment has been affected by the binding. The shifts obtained indicate that both peptides interact with the RNA, and significantly that the most affected residues were R281, A284 and F285 in both peptides (Figs 2A and 2C). Furthermore, the ITC titration confirmed RNA binding for both peptides (Figs 2B and 2D), with slightly higher heat exchanges for the WT peptide, which displayed an exothermic process that suggests a higher affinity interaction. The binding of WT and mutant peptides was also tested against a 20 nts RNA (TPL RNA 20nts) probe whose sequence is included in the TPL RNA 196nts and corresponds to the intron-exon junction; however, in this case the NMR spectra and the ITC results indicate that there was no binding (S2 Fig). These results are in agreement with Horridge and Leppard [42], who showed that substitution of C288A has a mild effect and that A284S or

F285LdelC287 severely reduce binding of E1B 55K to RNA. Our data agree with these observations and further suggest that A284 and F285 may participate in direct contact of the protein with RNA.

Substitutions in the E1B 55K-RNP alter timely progeny production

E1B 55K is a multifunctional protein implicated in various key processes during viral replication that ultimately affect viral progeny production. To determine the effect of the E1B 55K-RNP substitutions on virus replication, mutant viruses were analyzed for their ability to produce viral progeny compared to the wild-type virus. Infected cells were harvested at late times post-infection (36 and 48 hpi) and viral titers were determined by immunofluorescence (Fig 3).

Fig 3. Effect of substitutions in the E1B 55K RNP motif on viral progeny production. HFF cells were infected at a MOI 30 FFU/cell and harvested at 36 and 48 hpi. Viral titers were determined in 293 cells by fluorescent foci using a mouse monoclonal anti-E2 72K (DBP) antibody. The standard deviations from two independent titration experiments are shown. * P <0.05, **P<P0.01, ***P<0.001.

All mutant viruses showed defects in viral progeny production at 36hpi compared with Ad5 WT. Interestingly in the case of the Δ 284-289 mutant virus the defect was slightly more severe at this time-point compared with the other E1B 55K RNP mutants. In fact, this reduction in viral yield was similar to the defect observed in the E1B⁻ mutant.

The decreases in viral yield were statistically significant, and were similar to those reported for other RNP mutants [43]. However, while for the C288 and W289 mutants this phenotype was maintained (C288A, W289F) or was slightly more severe (C288S) at 48 hpi, the Δ 284-289 mutant produced viral progeny at levels that were comparable with Ad5 WT, indicating that mutations in the RNP motif alter the efficiency and the timely production of progeny.

Mutations in E1B 55K-RNP1 do not impair the E1B 55K/E4 Orf6 - E3 Ubiquitin ligase activity

Since mutations in the E1B 55K coding sequence that prevent the assembly of the E3 Ubiquitin ligase complex result in a decrease of viral yield [36], we decided to determine if the altered progeny production observed with the RNP mutants (Fig 4) correlate with impaired activity of the E1B 55K/E4Orf6 - E3 Ubiquitin ligase. HFF cells were infected and harvested at times post-infection that were previously established [36] to correspond to early (16 hpi), transition to late phase (24 hpi) and a late time post-infection (36 hpi), and the levels of Mre11 and p53 proteins were compared between Ad5 WT and the RNP motif mutants (Fig 4).

Fig 4. E1B 55k RNP substitutions do not impair degradation of Mre11 and p53. HFF cells were infected and harvested at 16, 24 and 36 hpi. Total protein extracts were obtained and Western blot assays were performed employing anti-Mre11 (Novus Biologicals) and anti-p53 DO1 (Santa Cruz Biotechnology) antibodies. β actin (Santa Cruz Biotechnology) was used as the loading control.

As expected, a clear decrease in the levels of Mre11 and p53 could be observed in Ad5 WT-infected cells by 36 hpi, and when E1B was not expressed (E1B⁻), failure to assemble the E3 Ub-ligase resulted in increased p53 levels and no change was observed in Mre11 levels. Cells infected with C288A, C288S or W289F mutant viruses, displayed similar levels of Mre11 and p53 at the different times post-infection compared with the levels observed in Ad5 WT-infected cells. Interestingly, in the case of the Δ 284-289 mutant, p53 and Mre11 levels decreased to undetectable levels by 24 hpi, suggesting that their degradation initiated earlier or proceeded more efficiently than in Ad5 WT-infected cells. These results indicate that although deletion of the RNP motif resulted in earlier decrease of the selected cellular protein targets, the activity of the E3 Ubiquitin ligase was not impaired by the E1B RNP mutations in agreement with previous observations [43].

Effect of E1B 55K-RNP substitutions on viral early or late protein levels

One of the primary defects of adenovirus mutants that do not express the E1B 55K is the reduced synthesis of viral late proteins, which results from decreased accumulation of viral late mRNA in the cytoplasm; therefore, we decided to evaluate if the E1B RNP mutations impact the accumulation of fiber protein. In these experiments the early DBP protein was also included. The steady state levels of both proteins were compared between Ad5 WT and the RNP motif mutants in total cell lysates harvested at 16, 24 and 36 hpi by Western blot assays (Fig 5).

Fig 5. Effect of substitutions in the E1B 55K RNP on kinetics of accumulation of viral proteins, DBP and fiber. HFF cells infected with Ad5 WT or E1B 55K mutants were harvested at 16, 24 and 36 hpi. Total protein extracts were obtained and western blot assays were performed using the anti-DBP (B6) and anti-fiber (Abcam) antibodies. β actin (Santa Cruz Biotechnology) was used as the loading control.

In Ad5 WT-infected HFF cells the DBP and fiber proteins were detected at 24 and increased by 36 hpi. In the case of fiber, the protein could only be detected at the earlier time-point in longer exposures of these blots. In contrast, shorter exposures were used for comparison with the RNP mutants, as higher protein levels were detected. Thus, in all cases, the levels of both DBP and fiber increased as the viral replication cycle progressed, but higher levels of DBP were obtained in all mutants compared with those observed from Ad5 WT. In the case of fiber, the protein was detected earlier in the mutants than in Ad5 WT infected cells, although the levels were only moderately higher. These unexpected results suggest that substitutions in the E1B 55K RNP motif do not abrogate viral early or late gene expression but affect their timely expression.

Mutations in the RNP motif do not impair E1B 55K intranuclear localization

The timely localization of E1B 55K in viral Replication Compartments (RC) - intranuclear sites where the viral genome is replicated and expressed - is known to be required for efficient viral DNA replication [8], viral late mRNA biogenesis and ultimately

viral progeny production [5,36,39,71]. To determine if the E1B 55K RNP motif mutations affect its subcellular localization, particularly in the RC, HFF cells infected with the Ad5 WT and mutant viruses were analyzed at 24 and 36 hpi by immunofluorescence microscopy (Fig 6).

Fig 6. Localization of DBP and E1B 55K to viral RC in Ad5 WT- or RNP mutants-infected HFF cells. HFF cells infected with Ad5 WT or E1B 55K mutant viruses were fixed and processed for immunofluorescence as described in materials and methods. Blue (DAPI), green (DBP), red (E1B 55K). (A) 24hpi, (B) 36hpi. Results shown are representative of at least two independent experiments.

In these experiments the viral DBP protein was used as a *bona fide* component of viral RC. In Ad5 WT-infected cells the DBP is known to be distributed forming structures with a doughnut-shaped or ringed appearance, and as the transition to the late phase of viral replication progresses (after 24 hpi), E1B 55K colocalizes more extensively with DBP (Fig 6A). The ring-shaped structures then seem to coalesce at later times of viral replication. The Ad5 WT and E1B mutant viruses showed the expected DBP pattern, with a ring-like distribution that coalesced by 36hpi (Fig 6B). E1B 55K-DBP colocalization was more evident at 36hpi and no discernible differences were observed comparing Ad5 WT and E1B mutant viruses. These data suggest that the E1B 55K RNP motif mutations do not impair the intranuclear distribution of E1B 55K.

Timely viral DNA replication is altered by substitutions in the E1B 55K RNP motif

Since mutations in the E1B 55K RNP reduced viral progeny production (Fig 3), but did not abrogate the activity of the E3 Ub ligase (Fig 4), changes in the timing and level of viral protein expression (Fig 5) could be the result of altered timing or efficiency of viral DNA replication. Therefore, qPCR were performed to determine the kinetics of viral DNA accumulation measured at various time-points of the viral replication cycle (Fig 7).

Fig 7. Kinetics of viral DNA accumulation are altered by mutations of the E1B 55K RNP motif. HFF cells infected with Ad5 WT or E1B 55K mutants were harvested at 16, 24 and 36 hpi and total DNA was isolated. Viral DNA was amplified through a quantitative PCR and a viral DNA absolute quantification was performed. Data are shown as viral DNA copy number per cell of duplicate samples from two independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, t-test.

The expected pattern of DNA accumulation was observed in Ad5 WT-infected HFF cells [36]. The input level (16 hpi) was initially detected, followed by 10- and 1000-fold increases in the viral DNA copy number at 24 and 36 hpi, respectively (Fig. 7). Also as expected, the E1B 55K null virus displayed delayed and reduced (about 100-fold lower) levels of viral DNA by 36 hpi. Interestingly, the RNP mutants showed varying degrees of altered timing and levels of viral DNA. Statistically significant differences between these viruses and Ad5 WT were observed by 24 hpi, and lower levels of viral DNA than the Ad5 WT virus were produced by 36 hpi in cells infected with the C288A, C288S and W289F mutants. These results correlate with the reduced efficiency of

progeny production in these viruses. In contrast, Δ 284-289-infected cells produced similar levels of viral DNA compared with Ad5 WT by 24 and 36 hpi.

Increased E1B 55K-RNA binding correlates with higher steady-state levels and splicing of the L5 mRNA

The altered kinetics of viral DNA replication between Ad5 WT and the RNP motif mutants suggest that the interaction of E1B 55K with RNA may also impact the expression of viral genes at different levels. To determine a possible role of the E1B RNP motif on viral late mRNA biogenesis, the steady-state levels of both viral late pre-mRNA and mature mRNA were quantified by RT qPCR, and their ratio was calculated as a measure of splicing efficiency. Total RNA was obtained from Ad5 WT- and RNP mutants-infected HFF cells and primers that differentiate the unspliced (L5NP) vs the spliced (L5P) form of the L5 mRNA transcript were quantified, as described in Materials and Methods (Fig 8).

Fig 8. Substitutions in E1B 55K RNP affect viral late mRNA biogenesis. HFF cells infected with Ad5 WT or E1B 55K mutants were harvested at 36 hpi and total RNA was isolated. Viral late pre-mRNA levels were determined for L5 RNA by RT qPCR against an (A) intron-exon (L5NP) or (B) Exon-exon (L5P) junction, for the unspliced and spliced L5 mRNA species, respectively. (C) To compare the splicing efficiency the L5P:L5NP ratios were calculated. β actin mRNA was used as endogenous control. Data from two independent experiments performed in triplicate are shown. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

The absence of E1B 55K (E1B⁻) resulted in 3-fold reductions of both the unspliced and spliced L5 mRNA, and no discernable effect could be observed on splicing efficiency, as the ratio of L5P/L5NP mRNA were similar to Ad5 WT levels. Similar, 2-fold reductions in the levels of both the L5NP and L5P mRNA were observed for the C288S mutant virus, while the mutants C288A and W289F displayed 14 and 5-fold reductions, respectively (Figs 8A and 8B). As with the E1B⁻ mutant, none of these substitutions affected splicing efficiency (Fig 8C). An unexpected finding was that L5 mRNA levels were 2 to 5-fold higher in cells infected with the RNP motif deletion mutant Δ 284-289, an effect that was opposite to what was expected, given the negative effect observed for the C288 and W289 substitutions. Moreover, in contrast to the E1B⁻ and the C288 or W289 mutants, deletion of the RNP resulted in 2.6-fold higher levels of spliced over unspliced L5 mRNA, indicating that both higher mRNA steady state levels and more efficient splicing were induced when residues 284 to 289 were deleted from E1B 55K.

Bioinformatic analysis and molecular modeling of the interaction of E1B 55K with RNA

As described in the introduction, the putative RNP motif lies within a conserved region that may represent a hydrophobic core flanked by less conserved N- and C-termini, where most of the functional regions of the protein have been mapped. The N-terminus has been shown to be intrinsically disordered [40], but no information is available on the structure of the central or C-terminal regions. Using several predictors of intrinsic disorder it was confirmed that residues from position 1 to 150 at the N-terminus display high scores of disorder. Also, most of the algorithms predicted that residues from

390 to 496 at the C-terminus display relatively high scores for disorder, while residues from approximately 150 to 380 display a relatively high degree of order, suggesting that the protein may be organized in three discernible structural domains (Fig 9).

Fig 9. Intrinsic disorder in E1B 55K. POND^R VLXT, POND^R XL1_XT, POND^R VL3-BA, POND^R VSL2, IUPred and DISOPRED predictors were used for disorder analysis. All predictors indicate a high level of intrinsic disorder in the N- and C-terminus.

In order to rationalize the effects of the mutants in the context of the full E1B 55K, we modeled its ordered region using LH3 from a snake adenovirus [61]. While sequence identity is low (24%), we consider this a valid template because of its equivalent position in the adenovirus genome of Atadenovirus and Mastadenovirus, which suggests a common ancestor. Furthermore, the quality of the models for the wild-type and Δ 284-289 proteins is adequate for their use as working models (a superposition with the parent structure is shown in Fig 10A), and the structure is stabilized by short ladders and clusters of hydrophobic residues (S3 Fig), typical of beta-helices.

Fig 10. E1B 55K-RNA interaction model. (A) Superposition of the model for the wild-type central domain that contains the putative dsRNA binding motif (solid cyan ribbons) and the parent LH3 structure (transparent gray ribbons). (B) Superposition of the models for the wild-type (cyan and red ribbons) and deletion Δ 284-289 (cyan and yellow ribbons) versions of the putative dsRNA binding motif of E1B 55K, in the same orientation as above facing the surface designated as PB3. N- and C-termini, as well as loops belonging to T2 and T3 surfaces are indicated. PB2 lies at the right of the figure and PB1

at the back, following the nomenclature of LH3. (C) Interaction of dsRNA with the putative RNA-binding motif in E1B 55K. Left: best ranked complex for the wild-type protein. Right: best ranked complex for the mutant protein. dsRNA is shown in sticks, the protein domain in a translucent ribbon (N-terminus to the right) and the RNP motif in spacefilling representation, carbon in cyan, nitrogen in blue, oxygen in red, sulfur in yellow. (D). Sample of the classes of RNA-protein conformations or poses found for the wild-type domain, showing different angles of interaction between dsRNA and the long axis of the domain. The first column shows two views, rotated 90 degrees, of the interaction with PB3 and PB1 surfaces with a parallel register of the domain and RNA main axes. The second column shows two views, rotated 90 degrees, of the interaction with PB3 and PB1 surfaces and the T3 loop with an oblique register of the domain and main axes. The third column shows the interaction with the T3 loop in a perpendicular register of the domain and the main dsRNA axis. The protein is depicted as a translucent cyan ribbon, with the RNA binding domain in a spacefilling representation and CPK colors. dsRNA is shown in sticks with CPK colors (C in cyan, N in blue, O in red, S or P in yellow).

Analysis of coevolution between amino acid residue positions of all reported E1B 55K sequences using the Gremlin server further supported the possibility that the protein core is organized as a β solenoid structure because residues between amino acids 148 and 383 showed higher scores, especially in paired residues that interact in the core structure, while very low scores were obtained for residues outside of this region (shown as bold in the S1 Table). Analysis of the positions on this model of the residues that were predicted to coevolve (Fig 11) showed that phenylalanines 264, 285 and 307, which may be involved in the stabilization of the solenoid structure (S3 Fig) display a similar ladder

to those on the LH3 protein [61] (Fig 11A). Positively charged residues, R281, K303, R323, occupy the same side of the beta solenoid, creating a highly positive region (Fig 11B), while C283, C305 and N325 also seem to interact (Fig 11C), lending support to the idea that the central domain folds into a beta solenoid structure.

Fig 11. Representation of amino acids with highest probability of coevolution on the E1B 55K model. Three-dimensional model of the E1B 55K central region with VDW representation of amino acid with highest probability of coevolution. A) F264-F285-F307. B) R281-K303-R323. C) C283-C305-N325.

The superposition of both models is shown in Fig 10B, highlighting that the RNP deletion has a local effect on the structure. This could explain why there are no drastic phenotypes in protein degradation and/or protein localization assays. A surface representation in S4 Fig shows that the RNP lies at the T2 loop and PB3 face; the deletion results in placing an additional positive charge roughly at the same position as K290, adjacent to the C-terminus of the putative RNP. The electrostatic potentials mapped on the molecular surface are shown in S5 Fig, for the three main surfaces of the domain (PB1, PB2, and PB3, as defined by Menendez et al [61]). Again it can be observed that the effect of the deletion is local, and that the electrostatic potential is similar for both versions.

To model the protein-RNA interaction, the TPL RNA 81nts detected in pull-down assays or the TPL RNA 196nts probe used in NMR and ITC were approximated as a dsRNA of 19bps. We chose this particular conformation as a secondary structure prediction of TPL showed that these structures were possible. The best binding poses

are shown in Fig 10D, displaying superficial and non-specific interactions of both dsRNA grooves. Most importantly, W289 and K290 emerge as important residues in the interaction, providing a rationale for the modest decrease in interaction for the W289F mutation. C288 is located in the core of the domain, in keeping with the modest effect of the C288S mutation; the C288A mutation could be destabilized compared to the wild-type protein, as C288 forms part of the cysteine ladder in the core of the protein (S3 Fig). dsRNA can bind at various surfaces of the protein, as shown in Fig 10C and S6-S8 Figs. This allows for simultaneous binding of two dsRNA regions, which could be important for promoting mRNA processing and/or organization of protein-RNA complexes in the infected cell. Upon analysis of the 100 best-energy poses for each protein, we found that those of the wild-type version can be classified in a few groups, as shown in Fig 10C. On the other hand, the deletion mutant displayed a much larger collection of poses, prototypes of which can be seen in S6-S8 Figs. This could be related to the intriguing finding of an increase in RNA binding of the RNP deletion mutant compared to the wild-type version, where an increase in affinity would be explained with an entropic argument, instead of a better direct interaction.

Discussion

The E1B 55K protein makes several contributions to the viral replication cycle; however, the molecular mechanisms that are altered or regulated by this protein in the infected cell are incompletely understood. Here we have shown that E1B 55K interacts with viral RNA in the infected cell (Fig 1) and that the RNP motif can participate in direct protein-RNA contacts (Fig 2). Substitution of amino acid residues at positions in the RNP motif that were previously shown to either reduce or increase RNA interaction *in vitro* [42]

displayed similar patterns of altered binding, confirming that the RNP and the positions that were substituted are relevant for the interaction in infected cells. Nevertheless, deletion of the RNP motif increased RNA binding, indicating that its exclusion results in changes that promote the interaction. Interestingly, molecular modeling of E1B 55K with dsRNA suggests the protein can associate with two such molecules and that the deletion of the RNP may increase the conformational arrangements that the E1B 55K-dsRNA complexes can adopt (Fig. 10).

The multifunctional nature of E1B 55K is likely to depend on postranslational modifications and on the variety of molecular interactions the protein engages. Such molecular interactions can be expected to determine both the protein's intracellular localization and activities, which are likely to be interdependent. Phosphorylation of the E1B 55K C-terminus promotes the protein's SUMOylation, a modification that increases its localization in the viral RC [31,72], a site where the protein is likely to exert its role on viral DNA replication and viral gene expression [71], as well as on viral mRNA processing. Other activities, such as the assembly of the E1B 55K/E4 Orf6-dependent E3 Ubiquitin ligase may depend on nucleoplasmic localization or translocation of the protein to the cytoplasm. The interactome of E1B 55K in infected cells has been reported [4], and although it is not clear how each of the reported molecules may influence the protein localization or activity, at least some of the interactions can be expected to occur at different times of the viral replication cycle and different subcellular sites. Consequently, different subpopulations of the E1B 55K may exist during the viral replication cycle, as the protein engages different interactions and activities. The results in this work indicate that one such interaction is with viral late mRNA, and that changes in E1B 55K-RNA binding alter phenotypes that are implicated in the normal progression of the viral

replication cycle.

Substitutions in the RNP altered the efficiency or timely production of viral progeny. In the case of the C288A, C288S and W289F mutants, levels of viral progeny were comparable to those produced by the E1B null virus, both at 36 and 48 hpi. In contrast, the Δ 284-289 mutant displayed reduced virus production only at 36 hpi, as by 48 hpi virus production reached levels that were similar to Ad5 WT (Fig 3). Lower efficiency or delayed virus production could originate from changes in viral gene expression, viral DNA replication, degradation of protein targets, adequate formation of viral RC, or virus assembly, and all but the latter are known to require E1B 55K. Since degradation of p53 and Mre11 was not abrogated by substitutions in the RNP motif E1B 55K-RNA binding is not implicated in assembly of the E1B 55K-E4 Orf6-dependent E3 Ubiquitin ligase (Fig 4). Rather, viral gene expression and DNA replication seem to be directly affected (Fig 7 and 8). Interestingly, the C288A, C288S and W289F mutants displayed severely reduced viral DNA replication at 24 hpi - at levels that were 3-fold lower than the E1B null virus, suggesting a dominant negative effect. In contrast, the Δ 284-289 mutant displayed no such defect at this time-point. However, while from 24 to 36 hpi the increase in viral DNA copies in the E1B null virus was minimal, all RNP mutants displayed increments that were comparable to Ad5 WT (Fig 7), suggesting that all but the deletion RNP mutant display a defect in the initial replication of viral DNA, and that the E1B 55K produced by the RNP mutants can support WT levels of viral DNA replication at later time-points of infection. Such an effect could be related to the timely role of E1B 55K on formation of viral RC, which in turn impacts efficient viral DNA replication [8], and to the recently described bi-phasic kinetics of viral genome replication [73]. Although immunofluorescence experiments showed no clear effect on E1B 55K or

DBP localization in RC (Fig 6), it is possible that mutations that affect the RNP motif may hinder E1B 55K activities even when the protein can associate with RC, where RNP mutations may affect the early low rate, but not the late high rate of DNA replication.

Nevertheless, differences in the efficiency and timing of DNA replication are not sufficient to explain the low levels of progeny produced by the C288S, C288A and W289F mutants, suggesting an additional defect in these viruses that was not displayed by the deletion mutant (Fig. 3). Although no evidence has been reported for participation of E1B 55K in viral DNA encapsidation or assembly, viral proteins implicated in viral packaging are associated with the periphery of viral RC [74]. Moreover, the intriguing finding that the E4 Orf6 protein is associated to the virus surface and may function as a portal for genome packaging [75] further suggests E1B 55K may affect viral packaging. Therefore, it will be of interest to determine whether E1B 55K-RNA binding may alter the proper organization of RC, as well as the interaction with E4 Orf6 which may affect virus assembly.

Since E1B 55K is implicated in the regulation of the anti-viral response, the RNP motif mutant's phenotypes may stem from failure to timely inhibit cellular defense mechanisms, such as the expression of interferon-stimulated genes (ISG) [7, 8]. This was indeed the case for the RNP deletion mutant, which displayed decreased repression of IFIT2, a previously reported E1B 55K-repressed ISG [7, 8] (S9 Fig), and it will be of interest to determine whether E1B 55K-RNA binding may be required for transcriptional repression of p53- or IFN-dependent genes.

Other antiviral mechanisms could be affected and should be evaluated, such as the regulation of the death-associated Daxx factor [24] or regulation of KAP1, each of which may also impact viral progeny production [76]. However, since degradation of p53

and Mre11 was not abrogated by deletion of the RNP motif but repression of IFIT2 was defective, these findings further indicate that the activities of the E1B 55K/E4 Orf6-dependent E3 Ubiquitin ligase are unrelated to E1B 55K activities in ISG repression.

All RNP mutants showed anticipated timing and enhanced accumulation of the early DBP and late Fiber proteins (Fig 5), but it is not clear whether this may alter the program of viral or cellular gene expression and result in delayed progeny production. To our knowledge, a direct effect of E1B 55K on viral early gene expression has not been demonstrated, and it will be interesting to determine whether the protein and the RNP motif may be implicated in regulation of early genes. In contrast, maximal levels of viral late mRNA require E1B 55K [3, 5]. Interestingly, increased E1B 55K-RNA binding in the deletion mutant correlated with higher than Ad5 WT levels of the L5 viral late mRNA production and splicing (Fig 8). Although we have evaluated the effect of mutations in the RNP motif on different phenotypes during productive infection, in our experiments the interaction of E1B 55K with RNA was evaluated only at 36 hpi and it will be of interest to determine the effect of the interaction at other times of viral replication on viral early and late gene expression. Nevertheless, the 10-fold increase in RNA binding observed for the RNP deletion mutant correlated with more efficient production of viral late mRNA, lending further support to the notion that the protein participates in viral late mRNA production [5, 39], and providing a rationale for the mechanistic basis in which the interaction of E1B 55K with RNA is necessary for intranuclear viral late mRNA processing.

Acknowledgments

We thank the Laboratorio Nacional de Estructuras de Macromoléculas (LANEM) for NMR instrumentation. LR, CA, AS and NP thank the Laboratorio de Dinámica de Proteínas for experimental and computational resources.

References

1. Berk AJ. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene*. 2005; 24:7673-7685.
2. Dobner T, Kzhyshkowska J. Nuclear export of adenovirus RNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2001; 259: 25-54.
3. Flint SJ, González RA. Regulation of mRNA production by the adenoviral E1B 55-kDa and E4 Orf6 proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2003; 272: 287-330.
4. Hung G, Flint SJ. Normal human cell proteins that interact with the adenovirus type 5 E1B 55 kDa protein. *Virology*. 2017; 504:12-24.
5. Leppard KN, Shenk T. The adenovirus E1B 55kD protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *EMBO Journal*. 1989; 8: 2329-2336.
6. Harada JN, Berk AJ. p53-independent and dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J. Virol*. 1999; 73: 5333-5344.
7. Miller DL, Rickards B, Mashiba M, Huang W, Flint SJ. The adenoviral E1B 55-Kilodalton protein controls expression of immune response genes but not p53-dependent transcription. *J. Virol*. 2009; 83(8): 3591-3603.

8. Chahal JS, Qi J, Flint SJ. The Human Adenovirus Type 5 E1B 55 kDa Protein Obstructs Inhibition of Viral Replication by Type I Interferon in Normal Human Cells. 2012; PLoS Pathog 8(8): e1002853. doi:10.1371/journal.ppat.1002853.
9. Chahal JS, Gallagher C, DeHart CJ, Flint SJ. The repression domain of the E1B 55-kilodalton protein participates in countering interferon-induced inhibition of adenovirus replication. J. Virol. 2013; 87(8): 4432-4444.
10. Martin ME, Berk AJ. Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. J. Virol. 1998; 72: 3146-3154.
11. Yew PR, Liu X, Berk AJ. Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. Genes Dev. 1994; 8(2): 190-202.
12. Querido E, Blanchette P, Yan Q, Kamura T, Morrison M, Boivin D et al. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. Genes Dev. 2001; 15: 3104-3117.
13. Carson CT, Schwartz RA, Stracker TH, Lilley CE, Lee DV, Weitzman MD. The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. EMBO J. 2003; 22(24): 6610-6620.
14. Stracker TH, Carson CT, Weitzman MD. Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad 50- NBS1 DNA repair complex. Nature. 2002; 418: 348-352.
15. Orazio NI, Naeger CM, Karlseder J, Weitzman MD. The adenovirus E1b55K/E4orf6 complex induces degradation of the Bloom helicase during infection. J Virol. 2011; 85(4): 1887-1892.

16. Baker A, Rohleder KJ, Hanakahi LA, Ketner G. Adenovirus E4 34k and E1b 55k oncoproteins target host DNA ligase IV for proteasomal degradation. *J. Virol.* 2007; 81: 7034-7040.
17. Berscheminski J, Wimmer P, Brun J, Ip WH, Groitl P, Horlacher T et al. Sp100 isoform-specific regulation of human adenovirus 5 gene expression. *J Virol.* 2014; 88(11): 6076-92.
18. Schreiner S, Burck C, Glass M. Control of human adenovirus type 5 gene expression by cellular Daxx/ATRAX chromatin-associated complexes. *Nucleic Acids Research.* 2013; 41(6): 3532-3550.
19. Harada JN, Shevchenko A, Shevchenko A, Pallas DC, Berk AJ. Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J. Virol.* 2002; 76 (18): 9194-9206.
20. Gupta A, Jha S, Engel DA, Ornelles DA, Dutta A. Tip60 degradation by adenovirus relieves transcriptional repression of viral transcriptional activator E1A. *Oncogene.* 2013; 32(42): 5017-5025.
21. Schreiner S, Kinkley S, Bürck C, Mund A, Wimmer P, Schubert T, et al. SPOC1-mediated antiviral host cell response is antagonized early in human adenovirus type 5 infection. *PLoS Pathog.* 2013; 9(11):e1003775. doi: 10.1371/journal.ppat.1003775.
22. Hagkarim NC, Ryan EL, Byrd PJ, Hollingworth R, Shimwell NJ, Agathangelou A, et al. Degradation of a novel DNA damage response protein, tankyrase 1 binding protein 1 (Tab182), following adenovirus infection. *J Virol.* 2018; 92(12): e02034-17. doi: 10.1128/JVI.02034-17.
23. Dallaire F, Blanchette P, Groitl P, Dobner T, Branton PE. Identification of integrin

- subunit alpha 3 as a new substrate of the adenovirus E4 orf6/E1B 55 kilodalton E3 Ubiquitin ligase complex. *J. Virol.* 2009; 83: 5329-5338.
24. Schreiner S, Wimmer P, Sirma H, Everett RD, Blanchette P, Groitl P, et al. Proteasome-dependent degradation of Daxx by the viral E1B-55K protein in human adenovirus-infected cells. *J Virol.* 2010; 84(14): 7029-38.
25. Dobbelstein M, Roth J, Kimberly WT, Levine AJ, Shenk T. Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *EMBO J.* 1997; 16: 4276-84.
26. Kratzer F, Rosorius O, Heger P, Hirschmann N, Dobner T, Hauber J, et al. The adenovirus type 5 E1B-55K oncoprotein is a highly active shuttle protein and shuttling is independent of E4orf6, p53 and Mdm2. *Oncogene.* 2000; 19: 850-857.
27. Teodoro JG, Halliday T, Whalen SG, Takayesu D, Graham FL, Branton PE. Phosphorylation at the carboxy terminus of the 55-kilodalton adenovirus type 5 E1B protein regulates transforming activity. *J. Virol.* 1994; 68:776-786.
28. Teodoro JG, Branton PE. Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J. Virol.* 1997; 71: 3620-3627.
29. Endter C, Kzhyshkowska J, Stauber R, Dobner T. SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 11312-11317.
30. Schwartz R, Lakdawala SS, Eshleman HD, Russell MR, Carson CT, Weitzman MD. Distinct requirements of adenovirus E1B55K protein for degradation of cellular substrates. *J Virol.* 2008; 82 (18): 9043-9055.

31. Kindsmüller K, Groitl P, Hartl B, Blanchette P, Hauber J, Dobner T. Intranuclear targeting and nuclear export of the adenovirus E1B-55K protein are regulated by SUMO1 conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104: 6684-6689.
32. Pennella MA, Liu Y, Woo JL, Kim CA, Berk AJ. 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. *J. Virol.* 2010; 84 (23): 12210-12225.
33. Beltz G A, Flint S J. Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection: restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus. *J Mol Biol.* 1979;131: 353-373.
34. Gabler S, Schutt H, Groitl P, Wolf H, Shenk T, Dobner T. E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J. Virol.* 1998; 72: 7960-7971.
35. Bachi A, Braun IC, Rodrigues JP, Pante N, Ribbeck K, von Kobbe C, et al. The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *RNA.* 2000; 6: 136-158.
36. Gonzalez R, Huang W, Finnen R, Bragg C, Flint SJ. Adenovirus E1B 55-kilodalton protein is required for both regulation of mRNA export and efficient entry into the late phase of infection in normal human fibroblasts. *J. Virol.* 2006; 80: 964-974.
37. Schmid M, Kindsmüller K, Wimmer P, Groitl P, Gonzalez RA, Dobner T. The E3 Ubiquitin Ligase Activity Associated with the Adenoviral E1B-55K–E4orf6 Complex Does Not Require CRM1-Dependent Export. *J Virol.* 2011; 85(14): 7081-7094.

38. Yatherajam G, Huang W, Flint SJ. Export of Adenoviral Late mRNA from the Nucleus Requires the Nxf1/Tap Export Receptor. *J Virol.* 2011; 85(4): 1429-1438.
39. Ornelles DA, Shenk T. Localization of the adenovirus early region 1B 55-kilodalton protein during lytic infection: association with nuclear viral inclusions requires the early region 4 34-kilodalton protein. *J Virol.* 1991; 65 (1): 424-429.
40. Sieber T, Scholz R, Spoerner M, Schumann F, Kalbitzer HR, Dobner T. Intrinsic disorder in the common N-terminus of human adenovirus 5 E1B-55K and its related E1BN proteins indicated by studies on E1B-93R. *Virology.* 2011; 418 (2): 133-43.
41. Gonzalez R, Flint SJ. Effects of mutations in the adenoviral E1B 55-kilodalton protein coding sequence on viral late mRNA metabolism. *J. Virol.* 2002; 76: 4507-4519.
42. Horridge JJ, Leppard KN. RNA-binding activity of the E1B 55-kilodalton protein from human adenovirus type 5. *J. Virol.* 1998; 72 (11): 9374-9379.
43. Kato SE, Huang W, Flint SJ. Role of the RNA recognition motif of the E1B 55 kDa protein in the adenovirus type 5 infectious cycle. *Virology.* 2011; 417(1): 9-17.
44. Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science.* 1996; 274: 373-376.
45. Lu W, Zheng S, Li XF, Huang JJ, Zheng X, Li Z. *World J Gastroenterol.* 2004; 10(24): 3634-3638.
46. Wang Yu, Hu Fang. Clinical Trials with Oncolytic Adenovirus in China. *Clinical Trials with Oncolytic Adenovirus in China. Current Cancer Drug Targets.* 2007; 7(2): 141-148.

47. Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, Scheffner M, zur Hausen H. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J. Virol.* 1998; 72: 9470–9478.
48. Turnell AS, Grand RJ, Gallimore PH. The replicative capacities of large E1B-null group A and group C adenoviruses are independent of host cell p53 status. *J Virol.* 1999; 73(3): 2074-2083.
49. O'Shea CC, Johnson L, Bagus B, Choi S, Nicholas C, Shen A, et al. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell.* 2004; 6 (6): 611-623.
50. Groitl P, Dobner T. Construction of adenovirus type 5 early region 1 and 4 virus mutants. *Methods in Molecular Medicine.* 2007; 130: 29-39.
51. Williams JF. Oncogenic transformation of hamster embryo cells in vitro by adenovirus type 5. *Nature.* 1973; 243: 162-163.
52. Reich NC, Sarnow P, Duprey E, Levine AJ. Monoclonal antibodies which recognise native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein. *Virology.* 1983; 128: 480-484
53. Sarnow P, Hearing P, Anderson CW, Halbert DN, Shenk T, Levine AJ. Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4 25,000-dalton protein in productively infected cells. *J. Virol.* 1984; 49: 692-700.
54. Hidalgo P, Anzures L, Hernández A, Guerrero A, Wood CD, Valdés M, et al. Morphological, biochemical, and functional study of viral replication compartments isolated from adenovirus-infected cells. *J Virol.* 2016; 90(7): 3411-3427.
55. Cancio C, Yocupicio M, Sandoval JC, Galvan I, Urena L, Vashist S et al. Nucleolin

- interacts with the feline calicivirus 3' untranslated region and the protease-polymerase NS6 and NS7 proteins, playing a role in virus replication. *J. Virol.* 2011; 85: 8056-8068.
56. Sigel H, Martin RB. Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands. *Chem. Rev.* 1982; 82: 385-426.
57. Kállay C, Dávid, A, Rimári S, Nagy EM, Sanna D, Garribba E et al. Copper(II) complexes of rat amylin fragments. *Chem Soc., Dalton Trans.* 2011; 40: 9711-9721.
58. Keller S, Vargas C, Zhao H, Piszczek G, Brautigam C, Schuck P. High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak shape analysis. *Anal. Chem.* 2012; 84: 5066-5073.
59. Zhao H, Piszczek G, Schuck P. SEDPHAT-A platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions. *Methods.* 2015; 76: 137-148.
60. Brautigam CA. Calculations and publication-quality illustrations for analytical ultracentrifugation data. *Methods Enzymol.* 2015; 562: 109-133.
61. Menéndez R, Nguyen TH, Singh AK, Condezo GN, Marschang RE, Van Raaij MJ et al. Structure of a reptilian adenovirus reveals a phage tailspike fold stabilizing a vertebrate virus capsid. *Structure.* 2017; 25(10): 1562-1573.
62. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods.* 2015; 12(1): 7-8.

63. Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(suppl 2): W665-W667
64. Jurrus E, Engel D, Star K, Monson K, Brandi J, Felberg LE, et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science.* 2018; 27(1): 112-128.
65. Best RB, Zhu X, Shim J, et al. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles. *J Chem Theory Comput.* 2012; 8(9): 3257-3273.
66. Yan Y, Zhang D, Zhou P, Li B, Huang SY. HDOCK: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(W1): W365-W373. doi:10.1093/nar/gkx407
67. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14(1): 33-38, 27-28.
68. Berget SM, Moore C, Sharp PA. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; 74: 3171-3175.
69. Berkner KL, Sharp PA. Effect of tripartite leader on synthesis of a non-viral protein in an adenovirus 5 recombinant. *Nucleic Acids Res.* 1985; 13: 841-857.
70. Logan J, Shenk T. Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984; 81(12): 3655-3659.
71. Schmid M, Speiseder T, Dobner T, Gonzalez RA. DNA Virus Replication Compartments. *J Virol.* 2014; 88 (3): 1404-1420.

72. Wimmer P, Blanchette P, Schreiner S, Ching W, Groitl P, Berscheminski J, et al. Cross-talk between phosphorylation and SUMOylation regulates transforming activities of an adenoviral oncoprotein. *Oncogene*. 2013; 32: 1626-1637.
73. Komatsu T, Quentin-Froignant C, Carlon-Andres I, Lagadec F et al. In vivo labelling of adenovirus DNA identifies chromatin anchoring and biphasic genome replication. *J Virol* 2018; 92:
74. Condezo GN, San Martin C. Localization of adenovirus morphogenesis players, together with visualization of assembly intermediates and failed products, favor a model where assembly and packaging occur concurrently at the periphery of the replication center. *PLoS Pathog*. 2017; 13(4): e1006320.
75. Ahí YS, Hassan AO, Vemula SV, Li K, Jiang W et al. Adenoviral E4 34K protein interacts with virus packaging components and may serve as the putative portal. *Scientific Reports* 2017; 7: 7582
76. Burck C, Mund A, Berscheminski J, Kieweg L, Muncieberg S, et al. KAP1 is a Host Restriction Factor That Promotes Human Adenovirus E1B-55K SUMO Modification. *J Virol*. 2016; 90: 930-946.

Figures

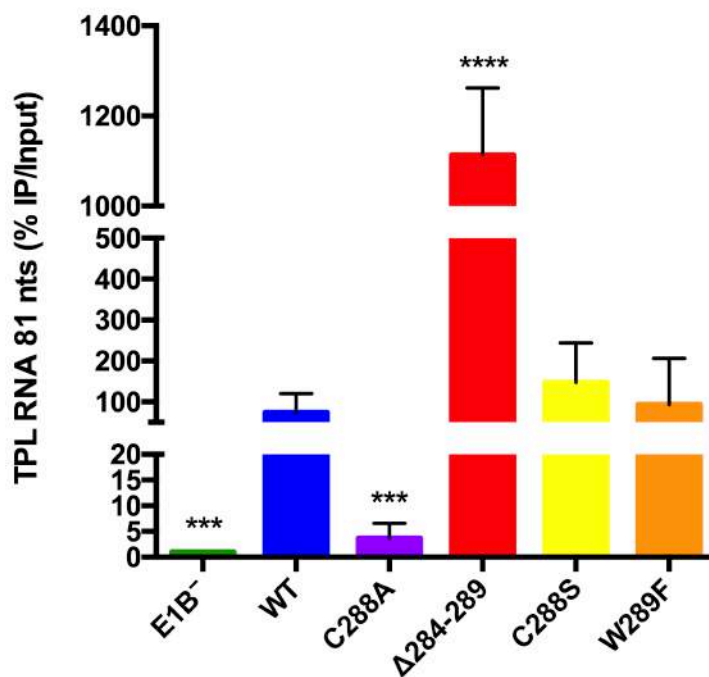


Fig 1. E1B 55K interacts with RNA in Ad5 WT-infected cells and RNP substitutions affect RNA binding. HFF cells infected with the indicated viruses were harvested at 36hpi. E1B 55K was immunoprecipitated with the 2A6 MAb, RNA was isolated and RT qPCR were performed to detect a sequence corresponding to intron 2 in the TPL. (A) Western blot of immunoprecipitated samples with the anti-E1B 55K 2A6 MAb. (B) RT qPCR of immunoprecipitated viral RNA. Immunoprecipitation data was normalized as described in Materials and Methods and it is represented as the percentage of the input RNA. Standard deviations from three independent experiments performed in triplicate are shown. *** P<0.001, **** P<0.0001.

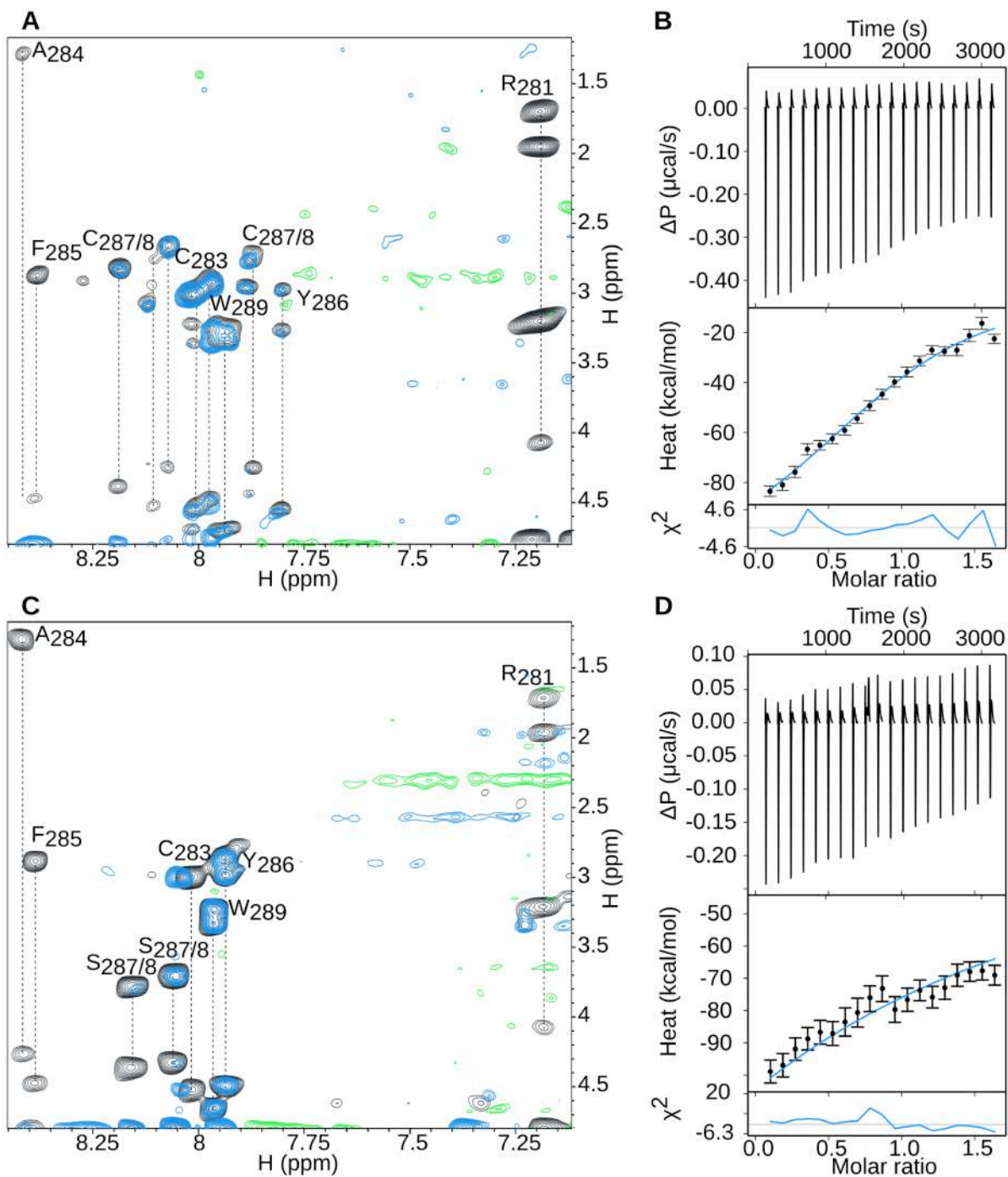


Fig 2. E1B 55K-RNP peptides interact with TPL RNA 196nts *in vitro*. (A) Expanded region of an overlay of TOCSY spectra of free WT peptide (black) and WT peptide bound to the TPL RNA 196nts probe (blue). (B) Heat exchanged from each injection of WT peptide into a solution containing the TPL RNA 196nts probe. (C) Expanded region of an

overlay of TOCSY spectra of free C287S/C288S peptide (black) and C287S/C288S peptide bound to the TPL RNA 196nts (blue). (D) Heat exchanged from each injection of C287S/C288S peptide into a solution containing the TPL RNA 196nts. The thermograms were best fit to a one binding site model.

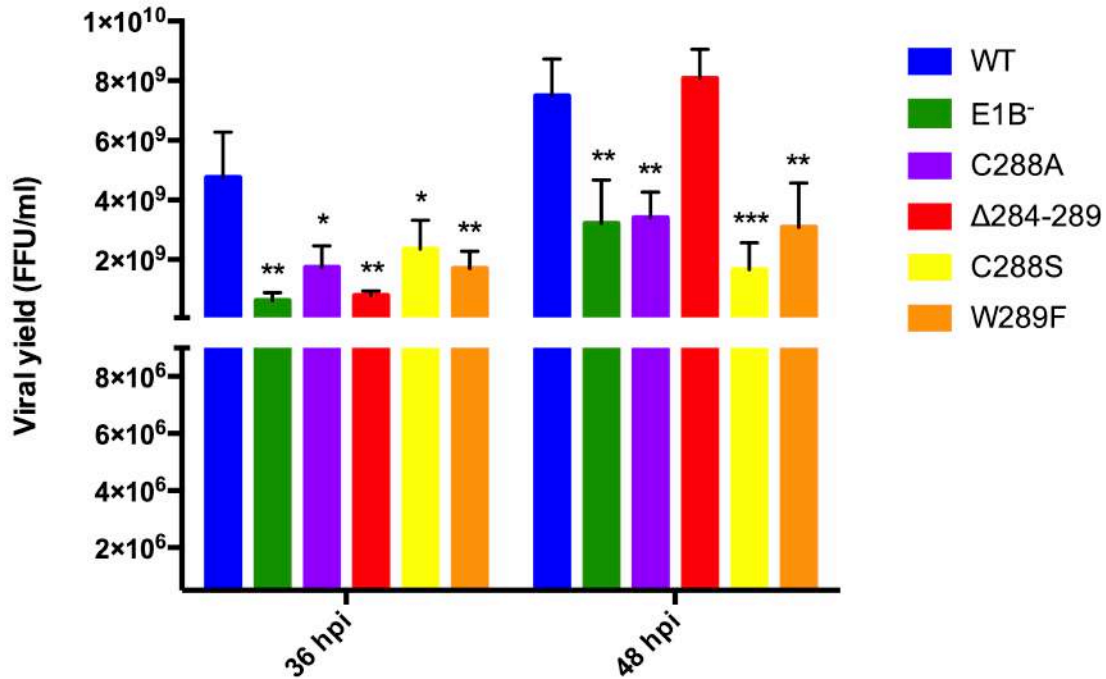


Fig 3. Effect of substitutions in the E1B 55K RNP motif on viral progeny production. HFF cells were infected at a MOI 30 FFU/cell and harvested at 36 and 48 hpi. Viral titers were determined in 293 cells by fluorescent foci using a mouse monoclonal anti-E2 72K (DBP) antibody. The standard deviations from two independent titration experiments are shown. * P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

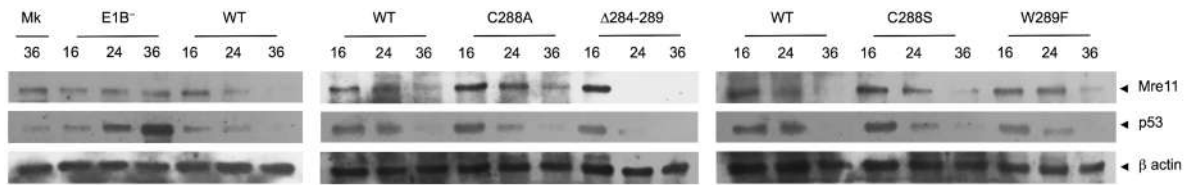


Fig 4. E1B 55k RNP substitutions do not impair degradation of Mre11 and p53. HFF cells were infected and harvested at 16, 24 and 36 hpi. Total protein extracts were obtained and Western blot assays were performed employing anti-Mre11 (Novus Biologicals) and anti-p53 DO1 (Santa Cruz Biotechnology) antibodies. β actin (Santa Cruz Biotechnology) was used as the loading control.

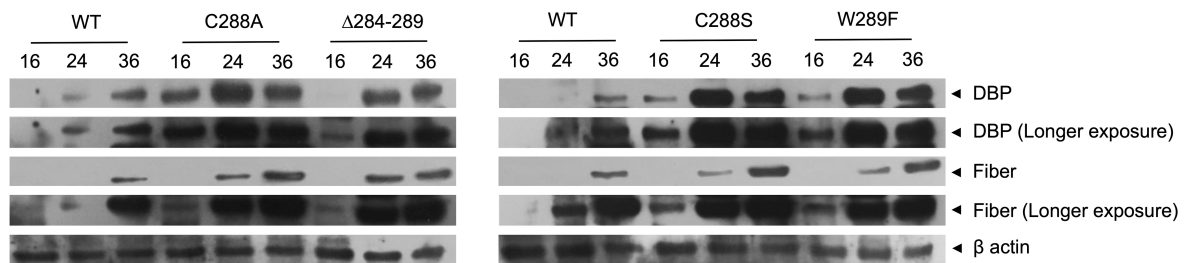


Fig 5. Effect of substitutions in the E1B 55K RNP on kinetics of accumulation of viral proteins, DBP and fiber. HFF cells infected with Ad5 WT or E1B 55K mutants were harvested at 16, 24 and 36 hpi. Total protein extracts were obtained and western blot assays were performed using the anti-DBP (B6) and anti-fiber (Abcam) antibodies. β actin (Santa Cruz Biotechnology) was used as the loading control.

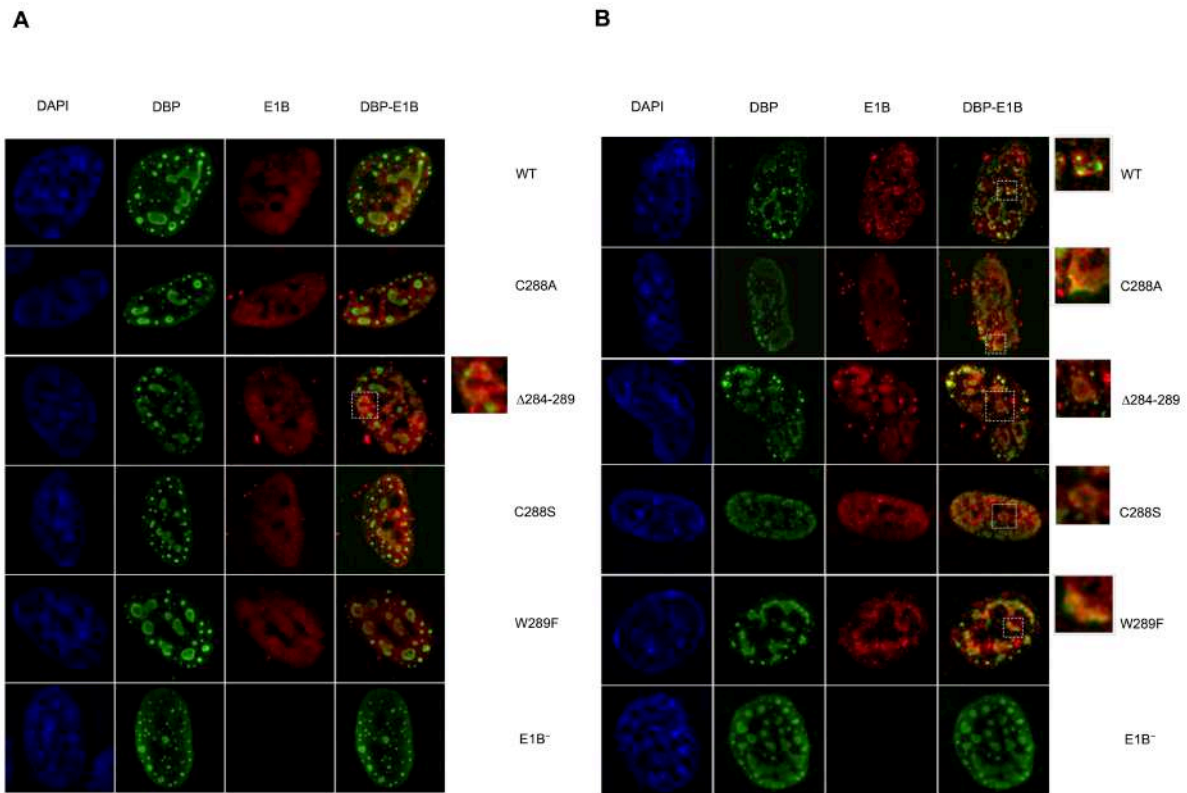


Fig 6. Localization of DBP and E1B 55K to viral RC in Ad5 WT- or RNP mutants-infected HFF cells. HFF cells infected with Ad5 WT or E1B 55K mutant viruses were fixed and processed for immunofluorescence as described in materials and methods. Blue (DAPI), green (DBP), red (E1B 55K). (A) 24hpi, (B) 36hpi. Results shown are representative of at least two independent experiments.

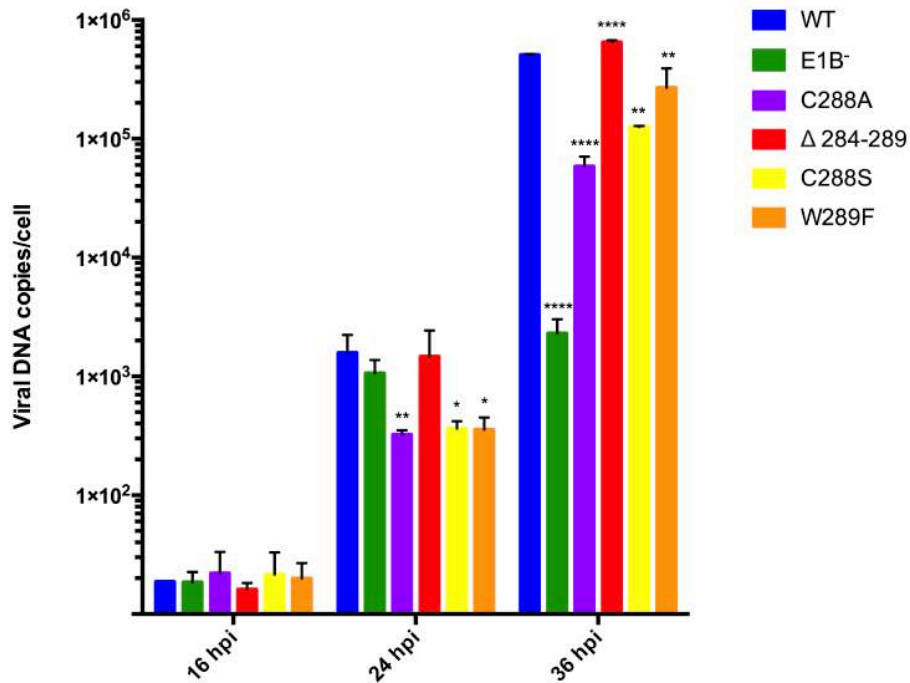


Fig 7. Kinetics of viral DNA accumulation are altered by mutations of the E1B 55K RNP motif. HFF cells infected with Ad5 WT or E1B 55K mutants were harvested at 16, 24 and 36 hpi and total DNA was isolated. Viral DNA was amplified through a quantitative PCR and a viral DNA absolute quantification was performed. Data are shown as viral DNA copy number per cell of duplicate samples from two independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, t-test.

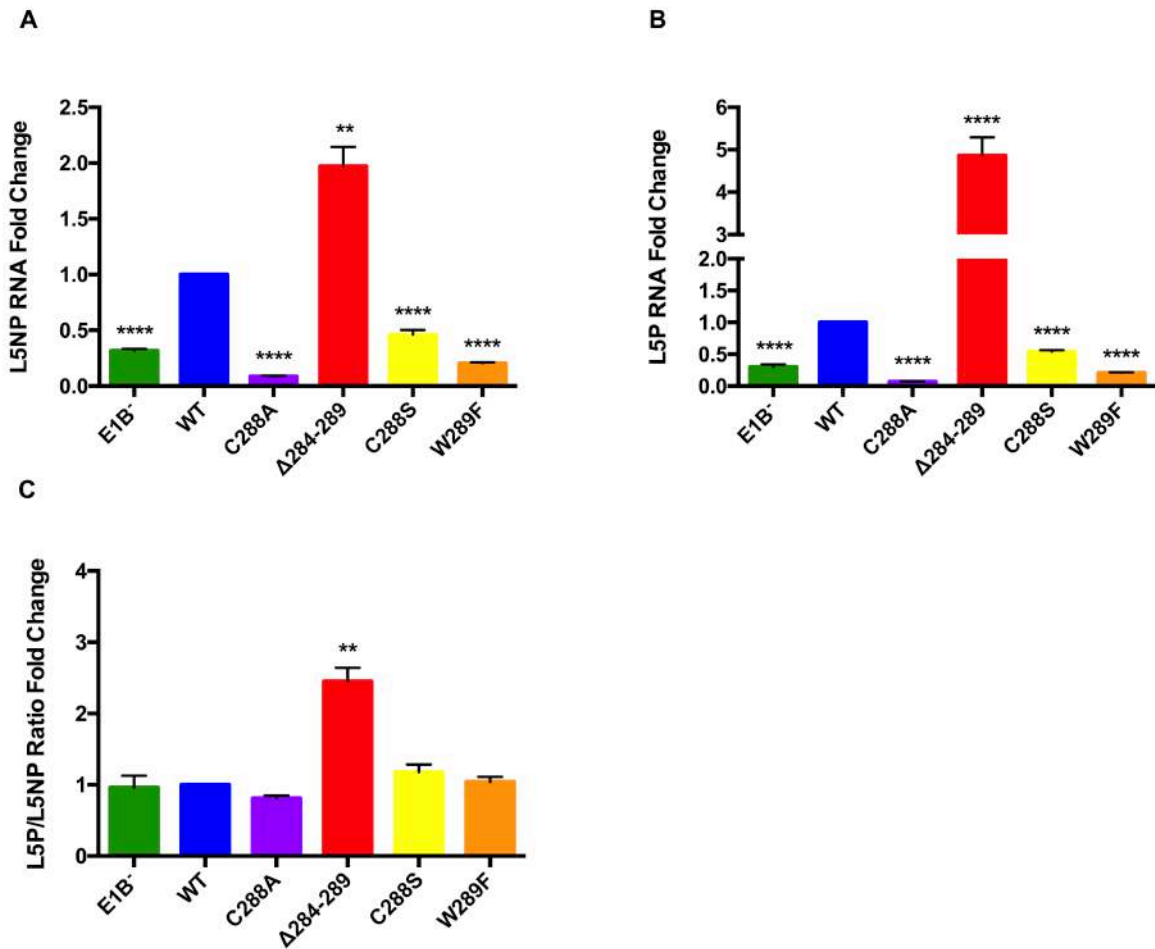


Fig 8. Substitutions in E1B 55K RNP affect viral late mRNA biogenesis. HFF cells infected with Ad5 WT or E1B 55K mutants were harvested at 36 hpi and total RNA was isolated. Viral late pre-mRNA levels were determined for L5 RNA by RT qPCR against an (A) intron-exon (L5NP) or (B) Exon-exon (L5P) junction, for the unspliced and spliced L5 mRNA species, respectively. (C) To compare the splicing efficiency the L5P:L5NP ratios were calculated. β actin mRNA was used as endogenous control. Data from two independent experiments performed in triplicate are shown. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

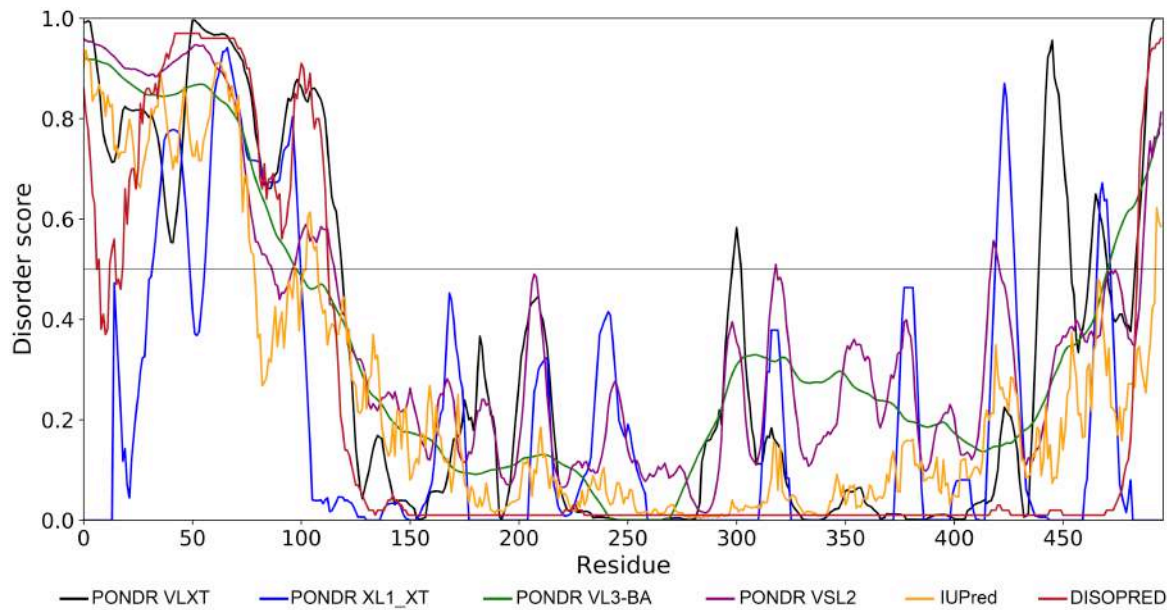


Fig 9. Intrinsic disorder in E1B 55K. PONDRL VLXT, PONDRL XL1_XT, PONDRL VL3-BA, PONDRL VSL2, IUPred and DISOPRED predictors were used for disorder analysis. All predictors indicate a high level of intrinsic disorder in the N- and C-terminus.

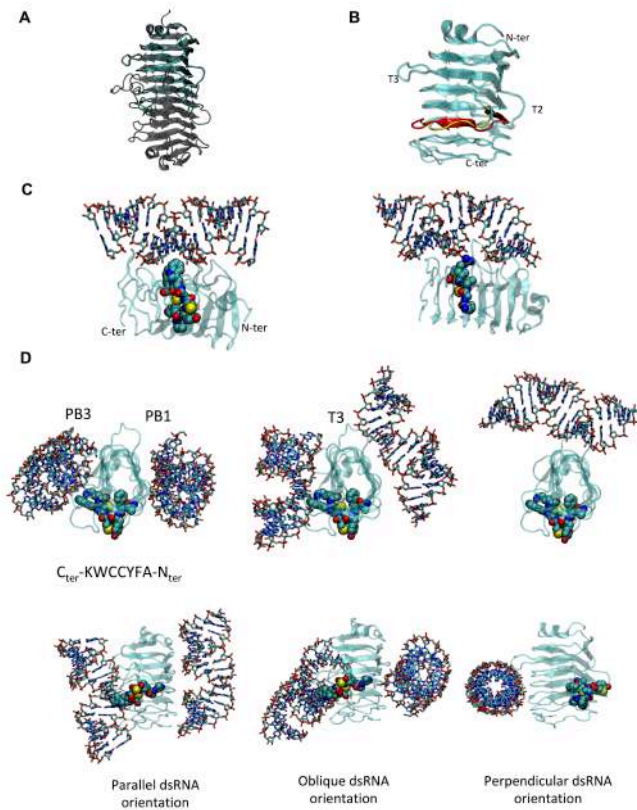


Fig 10. E1B 55K-RNA interaction model. (A) Superposition of the model for the wild-type central domain that contains the putative dsRNA binding motif (solid cyan ribbons) and the parent LH3 structure (transparent gray ribbons). (B) Superposition of the models for the wild-type (cyan and red ribbons) and deletion $\Delta 284-289$ (cyan and yellow ribbons) versions of the putative dsRNA binding motif of E1B 55K, in the same orientation as above facing the surface designated as PB3. N- and C-termini, as well as loops belonging to T2 and T3 surfaces are indicated. PB2 lies at the right of the figure and PB1 at the back, following the nomenclature of LH3. (C) Interaction of dsRNA with the putative RNA-binding motif in E1B 55K. Left: best ranked complex for the wild-type protein. Right: best ranked complex for the mutant protein. dsRNA is shown in sticks, the protein domain in a translucent ribbon (N-terminus to the right) and the RNP motif in spacefilling representation, carbon in cyan, nitrogen in blue, oxygen in red, sulfur in yellow. (D). Sample of the classes of RNA-protein conformations or poses found for the wild-type domain, showing different angles of interaction between dsRNA and the long axis of the domain. The first column shows two views, rotated 90 degrees, of the interaction with PB3 and PB1 surfaces with a parallel register of the domain and RNA main axes. The second column shows two views, rotated 90 degrees, of the interaction with PB3 and PB1 surfaces and the T3 loop with an oblique register of the domain and main axes. The third column shows the interaction with the T3 loop in a perpendicular register of the domain and the main dsRNA axis. The protein is depicted as a translucent cyan ribbon, with the RNA binding domain in a spacefilling representation and CPK colors. dsRNA is shown in sticks with CPK colors (C in cyan, N in blue, O in red, S or P in yellow).

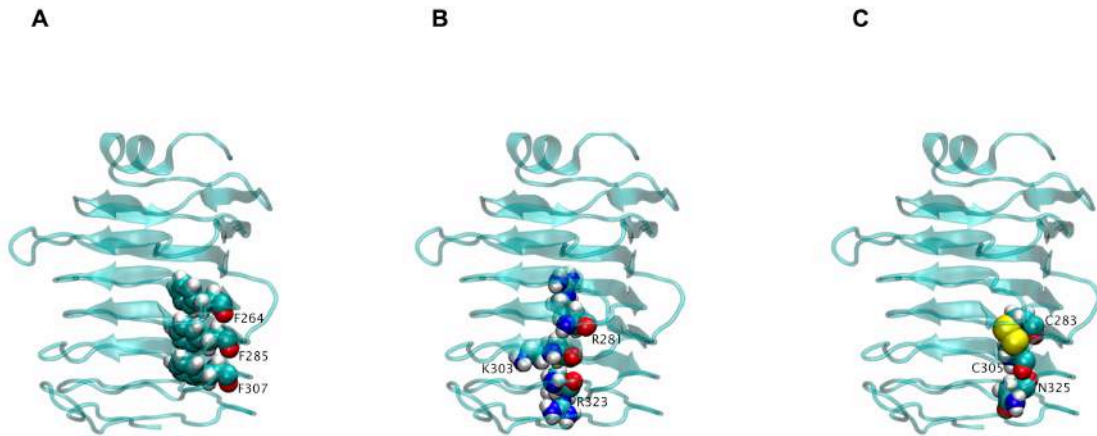


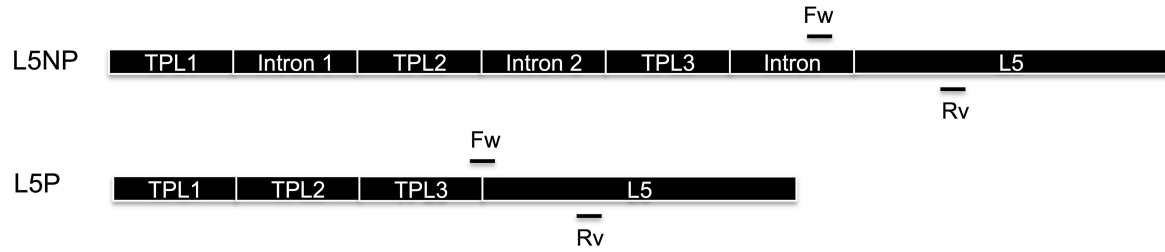
Fig 11. Representation of amino acids with highest probability of coevolution on the E1B 55K model. Three-dimensional model of the E1B 55K central region with VDW representation of amino acid with highest probability of coevolution. A) F264-F285-F307. B) R281-K303-R323. C) C283-C305-N325.

Supporting information

S1 Table. Amino acids with highest scores of coevolution.

Position 1	Position 2	Score	Prob
F285	F307	4.291	1.000
E169	R173	4.141	1.000
N325	N345	3.963	1.000
C305	N325	3.828	1.000
V262	C283	3.698	1.000
C283	C305	3.611	1.000
K303	R323	3.246	1.000
R281	K303	3.066	1.000
A327	V347	2.832	1.000
C305	N345	2.613	1.000
F264	F285	2.594	1.000
H324	H344	2.329	1.000
F241	F264	2.282	1.000
C283	N325	2.272	1.000
I302	V322	2.256	1.000
C330	N350	2.159	1.000
D277	R299	1.975	1.000
G282	K304	1.954	1.000
F307	A327	1.950	0.999
R323	K343	1.948	0.999
C310	C330	1.897	0.999
H260	R281	1.883	0.999
M237	H260	1.854	0.999
G233	N256	1.837	0.999

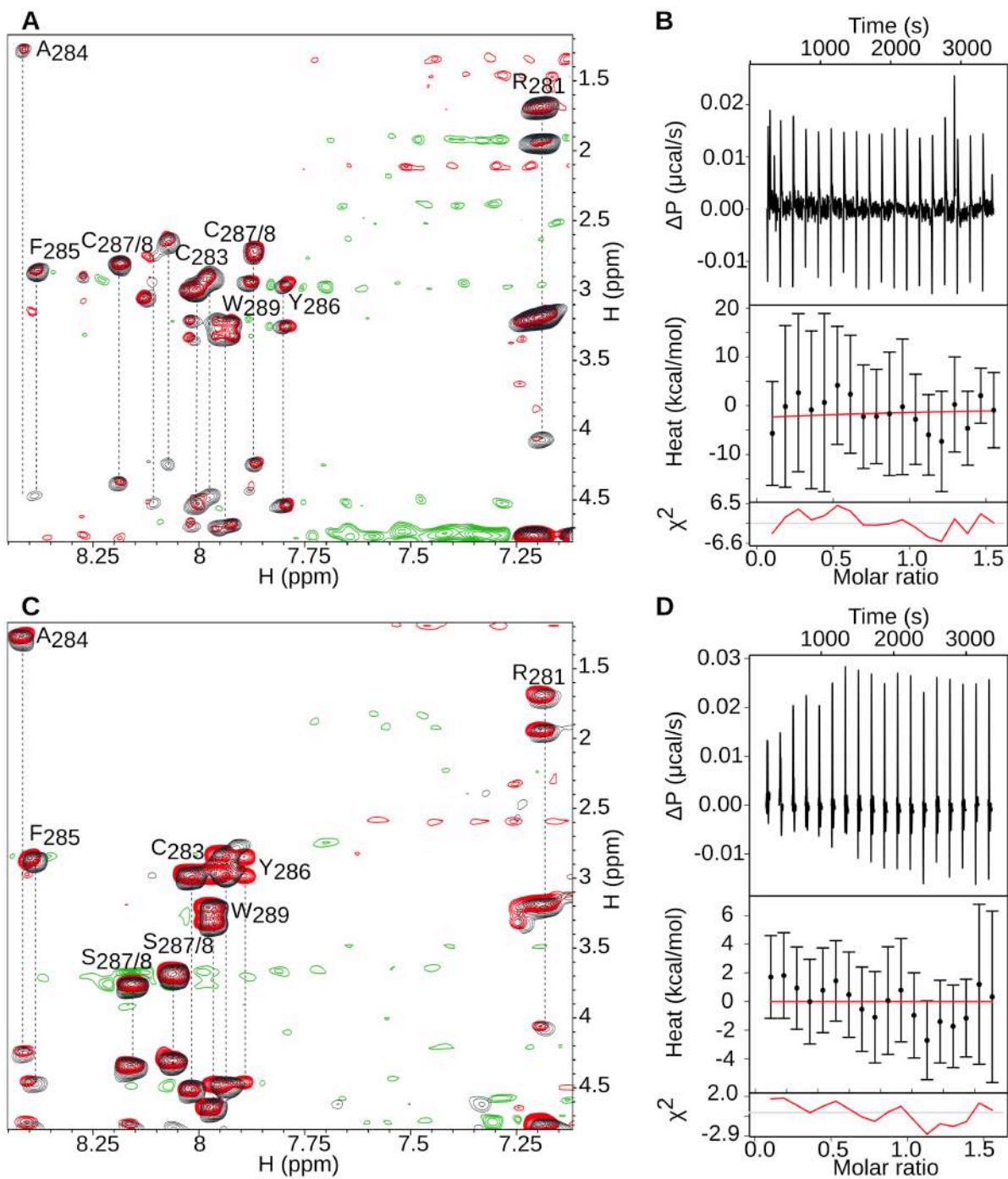
A



B

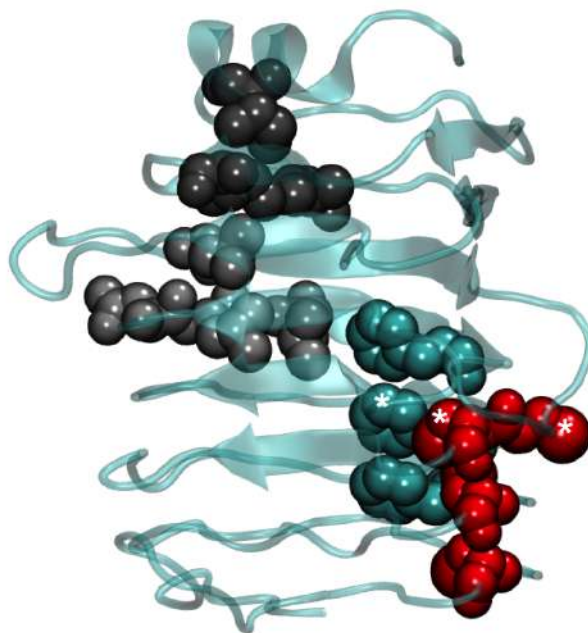
Name	Fw Primer	Rv Primer	Size (bp)	Position (nts)
TPL RNA 81nts	5' GAGCGAGGTGTGGGTGAGC 3'	5' GGATGCGACGACACTGACTTCA 3'	81	7,273-7,353
TPL RNA 196nts	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGGGAT ACGGCGCTAACGATGC 3'	5' GCACCTCCGCCAGAAACAACC 3'	196	9,601-9,796
Pre-mRNA L5 (L5NP)	5' GTCCATCCGCACCCACTATCTTC 3'	5' AAGGCACAGTTGGAGGACCG 3'	117	31,007-31,123
mRNA L5 (L5P)	5' GTCACAGTCGCAAGATGAAGCG 3'	5' GGTAAGTAGAGGTTCCGGATAGGCG 3'	185	9,720-31,212
rDNA 18S	5' CGATGCCGACCGGCGATG 3'	5' CTCCTGGTGGTGCCCTTC 3'	140	1,085-1,224
mRNA β actin	5' CTCCTTCCTGGGCATGGAGTCC 3'	5' GCAATGCCAGGGTACATGGTGG 3'	139	875-1,013
Viral DNA	5' GAGCGAGGTGTGGGTGAGC 3'	5' GGATGCGACGACACTGACTTCA 3'	81	7,273-7,353

S1 Fig. Schematic representation of primer design and sequences. (A) Diagram showing the L5NP and L5P primers recognition sequences (not to scale), (B) Sequences of all primers used in this work.

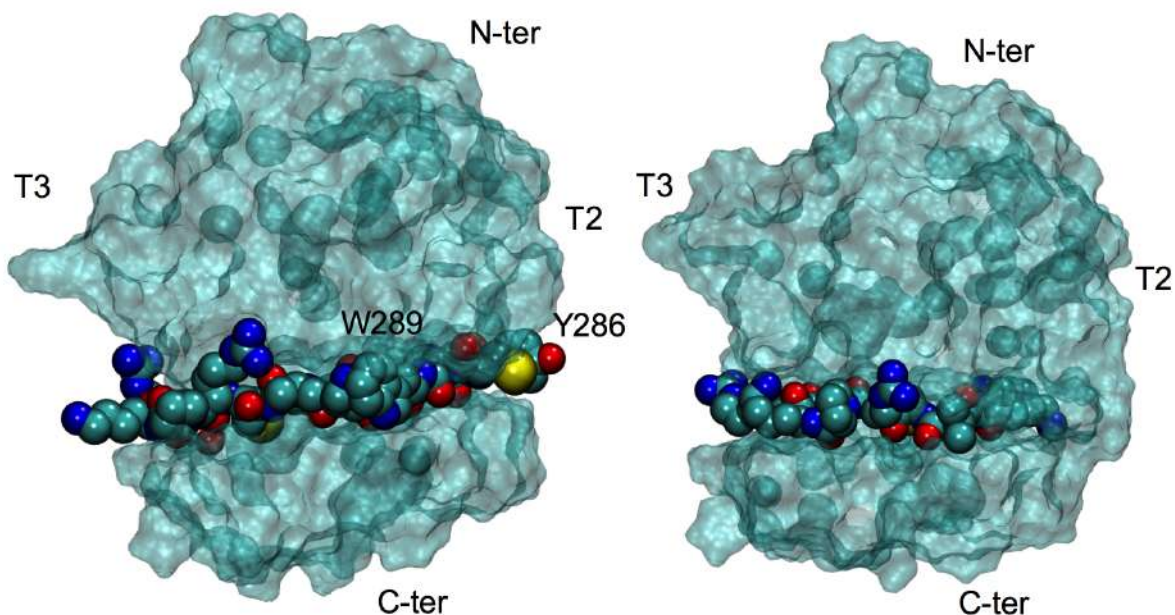


S2 Fig. E1B 55K-RNP peptides do not interact with TPL RNA 20nts *in vitro*. (A) Expanded region of an overlay of TOCSY spectra of free WT peptide (black) and WT peptide bound to the TPL RNA 20nts probe (red). (B) Heat exchanged from each injection of WT peptide into a solution containing the TPL RNA 20nts probe. (C)

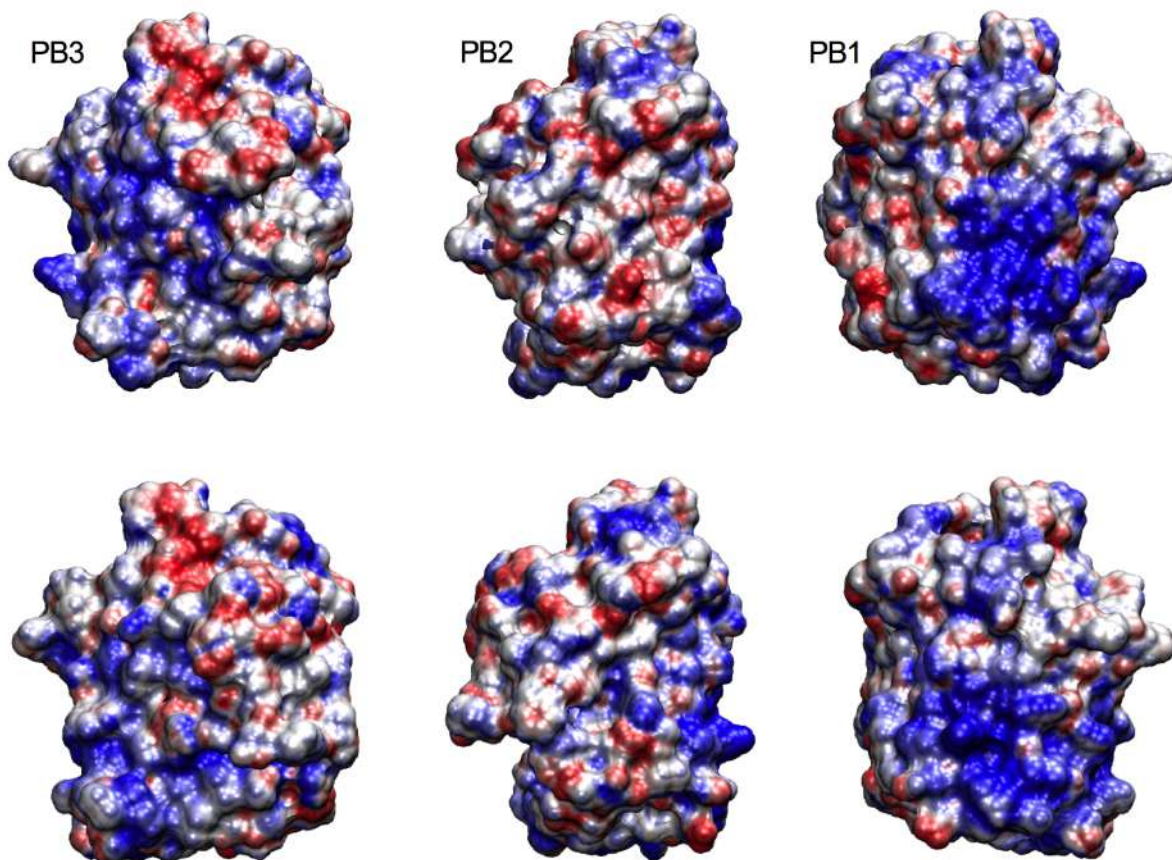
Expanded region of an overlay of TOCSY spectra of free C287S/C288S peptide (black) and C287S/C288S peptide bound to the TPL RNA 20nts (red). (D) Heat exchanged from each injection of C287S/C288S peptide into a solution containing the TPL RNA 20nts. The thermograms were best fit to one binding site model.



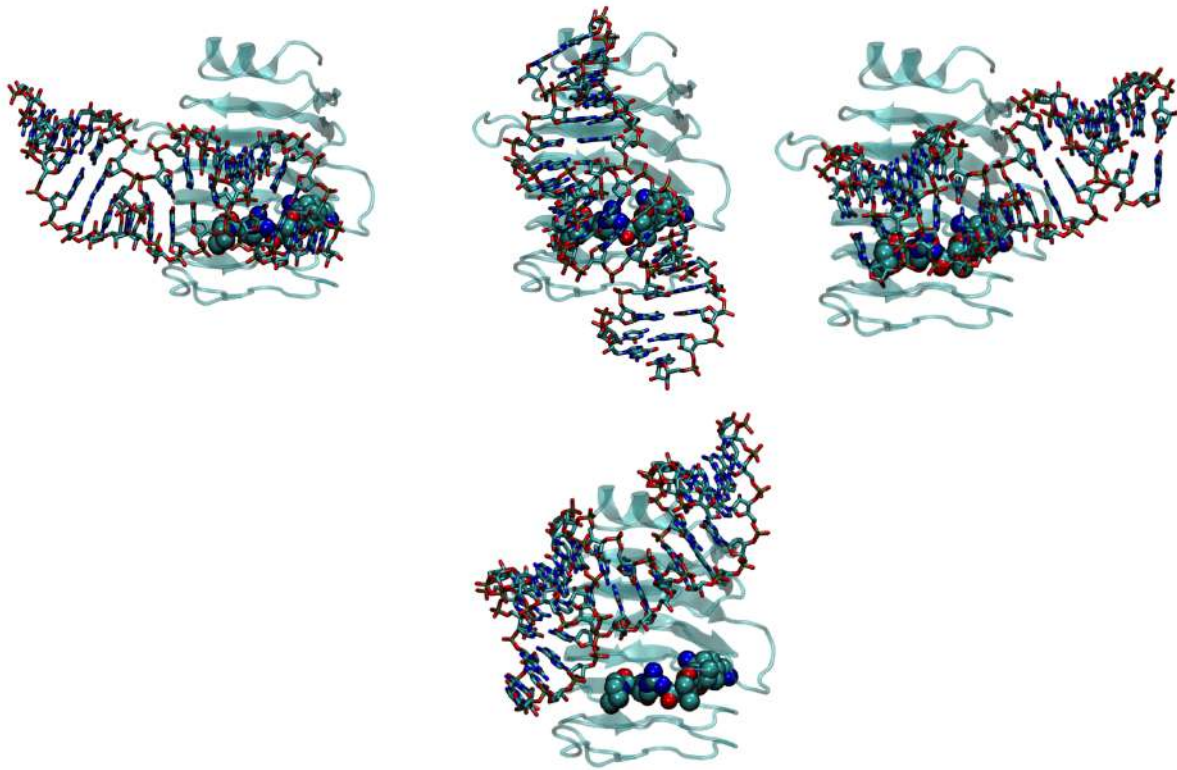
S3 Fig. Core residues stabilizing the core of the domain. Leucine in grey, isoleucine in black, phenylalanine in cyan and cysteine in red, in spacefilling representation. Residues marked with a white asterisk are part of the putative RNP motif (F285, C287, and C288).



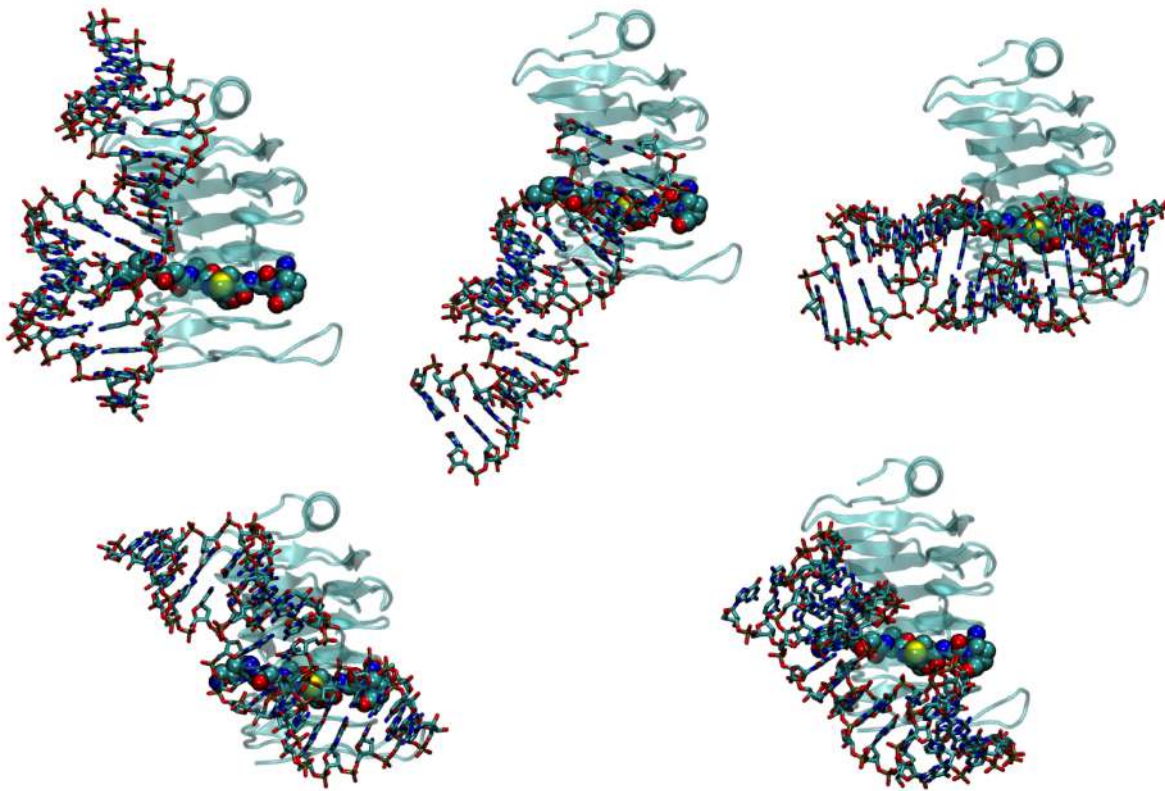
S4 Fig. Molecular surface representation for the wildtype (left) and RNP deletion mutant (right), with PB3 facing the viewer and the N-terminus of the domain on top. The beta-helix turn with the deletion is rendered as a space-fill model, in CPK colors (carbon in cyan, nitrogen in blue, oxygen in red and sulfur in yellow). The putative RNP is visible (Y286 to W289). Note the equivalent position of positive charges at the lefthand side of the domain, and the occlusion of the peptide in the deletion mutant near the T2 side of the domain.



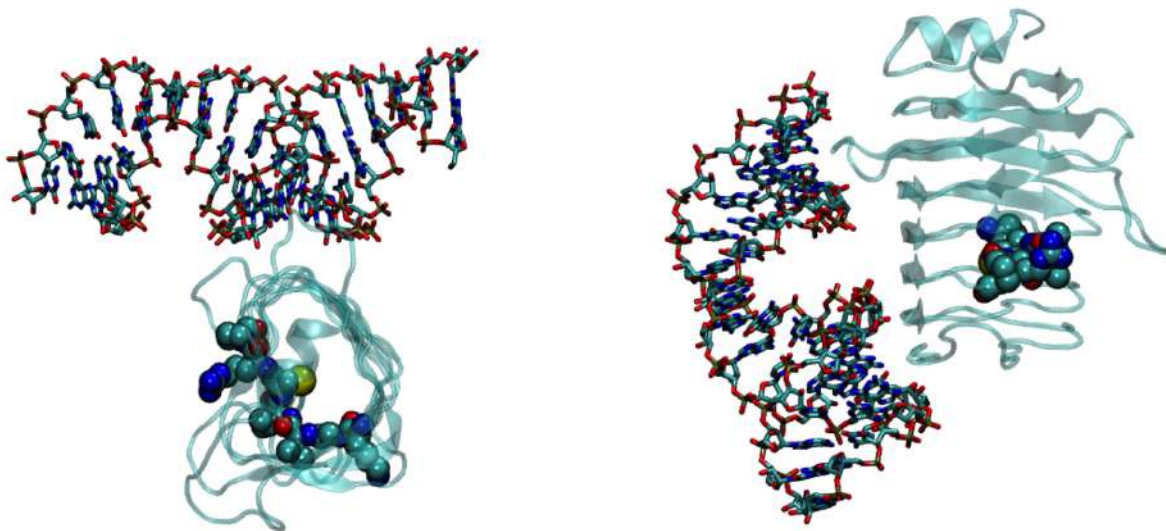
S5 Fig. Electrostatic potential mapped at the molecular surface for the wildtype (top row) and RNP deletion mutant (bottom row). The color scale spans from +5 kT/e in blue to -5 kT/e in red. The orientation of the domain is the same as in panels A and B, with the N-terminus on top and C-terminus at the bottom.



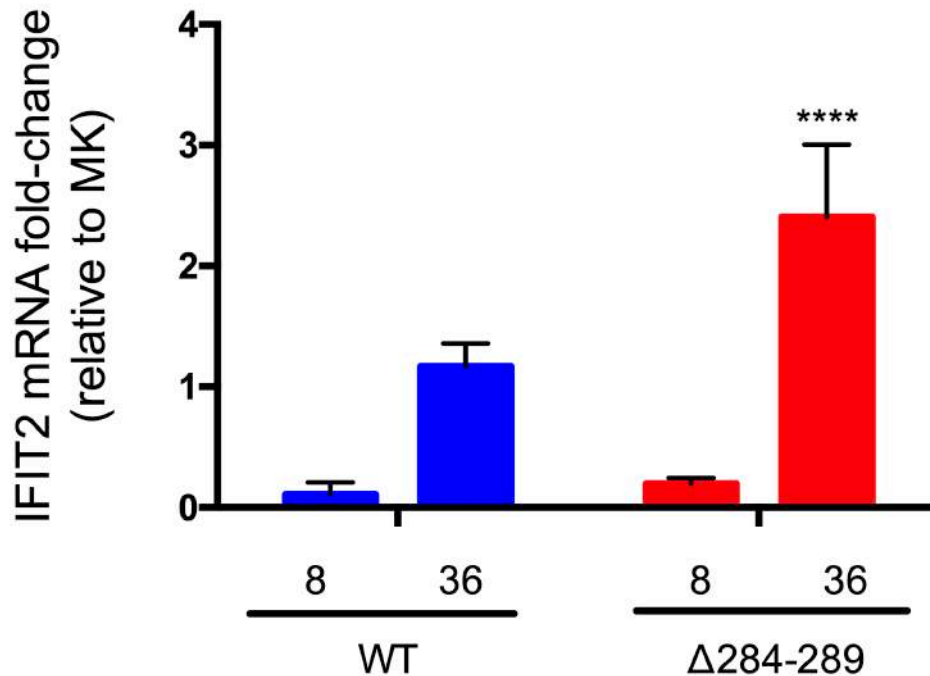
S6 Fig. Sample of the classes of RNA-protein poses found for the RNP deletion mutant on the PB3 face, showing different angles of interaction between dsRNA and the long axis of the domain. The top row shows poses that use the remaining RBD as a binding surface; the bottom row shows a representative structure of poses that use the N-terminal helix instead. The protein is depicted as a translucent cyan ribbon, with the mutant RNP in a spacefilling representation and CPK colors. dsRNA is shown in sticks with CPK colors (C in cyan, N in blue, O in red, S or P in yellow).



S7 Fig. Sample of the classes of RNA-protein poses found for the E1B RNP deletion mutant on the PB1 face, showing different angles of interaction between dsRNA and the long axis of the domain. The protein is depicted as a translucent cyan ribbon, with the mutant RNP in a spacefilling representation and CPK colors. dsRNA is shown in sticks with CPK colors (C in cyan, N in blue, O in red, S or P in yellow).



S8 Fig. Sample of the classes of RNA-protein poses found for the E1B RNP deletion mutant on the T3 loop, showing two different angles of interaction between dsRNA and the long axis of the domain. The protein is depicted as a translucent cyan ribbon, with the mutant RNP in a spacefilling representation and CPK colors. dsRNA is shown in sticks with CPK colors (C in cyan, N in blue, O in red, S or P in yellow).



S9 Fig. Deletion of the E1B 55K RNP motif reduces repression of IFIT2 expression.

HFF cells treated with 1 U/ml of IFN β 1 were infected with the indicated viruses or mock-infected and harvested at 8 or 36 hpi. Total RNA was isolated to prepare cDNA specific for IFIT2 and β actin, and quantified by qPCR. β actin was used as endogenous control and the samples were quantified relative to the mock-infected samples. Mean values and standard deviations from the relative quantification were plotted from two independent experiments performed in triplicate. **** P=0.0007.

11.2 Anexo 2. Artículo de divulgación científica publicado en la revista *Inventio* 2016, 21 (10): 23-32

Proteínas de unión con ARN, moléculas integradoras de la expresión genética

Ramón A. González, Berto Tejera Hernández, Paloma Hidalgo Ocampo

Profesor e investigador, Facultad de Ciencias, UAEM

Doctorado en Ciencias, Facultad de Ciencias, UAEM

Maestría en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Investigación en Biotecnología (IBT), UNAM

Todos los seres vivos están constituidos por los mismos tipos de biomoléculas. Entre ellas se encuentran los ácidos nucleicos y las proteínas, que son moléculas *informativas*. En el caso de las proteínas, este término se refiere a que la secuencia de aminoácidos que compone cada proteína determina el arreglo tridimensional que adopta la cadena polipeptídica y, consecuentemente, su conformación y su función. Para los ácidos nucleicos, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN) son moléculas informativas porque portan en las secuencias de nucleótidos que las componen la información genética de cada organismo. En el caso del ARN, se trata además de una molécula que puede tener actividad catalítica. En la molécula de ARN, la secuencia de nucleótidos determina no solo la información genética sino que también determina la forma y la función de la molécula; en otras palabras, la molécula de ARN puede representar tanto un genotipo como un fenotipo. La identidad de cada célula y las actividades que pueden desempeñar dependen de los genes que se expresan a partir de la información contenida en su genoma. La secuencia de nucleótidos en una molécula de ADN es utilizada como un molde para *transcribir* y sintetizar una molécula de ARN. La secuencia de nucleótidos de esta molécula de ARN es después *traducida* y resulta en la síntesis de una proteína, es decir, una cadena de aminoácidos organizada en una secuencia que corresponde directamente a la secuencia de nucleótidos en el ARN, pero traducida a un lenguaje molecular diferente.

El ARN es una biomolécula formada por azúcares (ribosa), bases nitrogenadas (adenina, uracilo, guanina o citosina) y fosfatos, los cuales constituyen nucleótidos que forman los bloques que construyen el ARN. Esta molécula puede encontrarse en forma de cadena sencilla o doble, formando estructuras (secundarias y terciarias) topológicamente complejas. La organización tridimensional de estas estructuras depende de la secuencia del ARN, de su longitud, de modificaciones químicas a las que está sujeto y de proteínas que se le asocian.

1 Thomas R. Cech, "The RNA worlds in context", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 4, 2012, pp. 1-5.

Tabla 1. Principales tipos de ARN presentes en metazoarios

Tipo de ARN	Función
ARNm	ARN que codifica para una proteína
ARNt	ARN que aporta cada aminoácido en la síntesis de proteínas
ARNr	ARN que forma parte estructural y catalítica de los ribosomas
ARNsi	ARN de 20-25 nucleótidos de longitud, que regula la traducción de un ARNm
miR	ARN de 21-22 nucleótidos de longitud, que regula la traducción de un ARNm
ARNnc	ARN que no codifica para una proteína
ARN pequeños nucleares	ARN estructural y catalítico del "spliceosoma" en el procesamiento de ARNm
ARNlnc	ARN largos no codificantes que regulan la expresión génica
ARNpi	ARN derivados de transcritos largos que regulan transposones

Existen muchos tipos de ARN, con tamaños, estructuras y funciones diversas. Los tres más conocidos, por ser los primeros en identificarse, son los ARN mensajeros (ARNm), los de transferencia (ARNt) y los ribosomales (ARNr). No obstante, en los últimos años se han encontrado muchos otros tipos de ARN. En la tabla 1 se incluyen algunos de los ARN que se encuentran en todos los metazoarios.

El ARN es una molécula central en la regulación de la expresión génica y el funcionamiento de la célula, y puede actuar como integradora de las diferentes funciones biológicas de una célula. No obstante, no se encuentra libre en una célula, ya que a lo largo de su biogénesis —desde el inicio de su síntesis hasta su degradación—, cada ARN está físicamente asociado con diferentes proteínas. A estas proteínas se les llama RBP (por sus siglas en inglés, *RNA-binding-proteins* o proteínas de unión con ARN) y, dado que toda molécula de ARN está siempre asociada con una o más RBP, entonces funcional y estructuralmente, los ARN pueden ser considerados ribonucleoproteínas o RNP. Las proteínas de unión con ARN (RBP) son determinantes en la estabilidad de la molécula de ARN, su localización celular, su forma y su función. Las RBP funcionan como integradoras de las actividades celulares, desde la organización estructural del ADN en el núcleo de una célula, hasta cada paso en la regulación de la expresión de los genes.

En la última década, los hallazgos que han permitido aprender sobre la estructura y función de los ARN y las proteínas que se les asocian, han

Tabla 2. Ejemplos de enfermedades causadas por fallas en ARN y RBP

Enfermedad	Función alterada
Síndrome de Prader Willi	biogénesis de ribosoma
Eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond	biogénesis de ribosoma
Síndrome de Shwachman-Diamond	biogénesis de ribosoma
Síndrome de Treacher-Collins	biogénesis de ribosoma
Cáncer de próstata	biogénesis de ribosoma
Esclerosis lateral amiotrófica	<i>splicing</i> , transcripción
Atrofia muscular espinal	<i>splicing</i>
Retinosis pigmentaria	<i>splicing</i>
Síndrome X Frágil	traducción
Síndrome de Charcot–Marie–Tooth	traducción
Discapacidad cognitiva ligada a X	traducción/NMRDA
Autismo	RNA no codificante

Cáncer	<i>splicing</i> /traducción/exportación
--------	---

mostrado que las RBP son esenciales en el funcionamiento normal de la célula. Este tipo de proteínas son moléculas clave en el flujo y la expresión de la información genética. En los últimos años se ha encontrado que mutaciones que afectan el funcionamiento del ARN y las RBP están ligadas con una gran variedad de enfermedades (en la tabla 2 se incluyen algunos ejemplos). En este artículo hacemos una descripción breve de algunas de las principales actividades celulares que dependen de las RBP y cómo estas pueden convertirse en enfermedades.

2 John S. Mattick e Igor V. Makunin, “Non-coding RNA”, *Human Molecular Genetics*, vol. 15, núm. 1, 2006, pp. R17-R29.

RBP, proteínas de unión con ARN

Aspectos estructurales y funcionales

Las RBP se unen con ARN a través de una o más regiones de la cadena polipeptídica, conocidas como *dominios*. Los dominios son regiones de una proteína que pueden adoptar una conformación estructural y funcional de forma autónoma. Se han encontrado múltiples tipos de dominios en las proteínas, que son responsables de su interacción con ARN. En la tabla 3 se enlistan los principales dominios que se conocen en la actualidad.

3 Kiven E. Lukong, Kai-wei Chang, Edouard W. Khandjian y Stephane Richard, “RNA-binding proteins in human genetic disease”, *Trends Genetics*, vol. 24, núm. 8, 2008, pp. 416-425.

Tabla 3. Tipos de dominios proteicos de unión con ARN

Dominios de unión a ARN	Topología	Tipo de ARN que une	Ejemplo
Dominio KH	tipo I: $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ tipo II: $\alpha\beta\beta\alpha\beta$	ARNcs	hnRNP K
PAZ	Barril β	ARNcd	Ago
Dominio rico en argininas	-----	ARNcd, ARNcs	SC35, ASF/SF2

Dominio dedo de zinc	B β α	ARNcd	BRCA-1, Complejo Polycomb
RRM	B α β β α β	ARNcs	U1, U2, Aly, Tap
CSD	Barril β	ARNcs	eIF2 α
dsRBD	A β β β α	ARNcd	PKR
PIWI	5 hojas β rodeadas por una α hélice	ARNcd	Ago

ARNcs: ARN de cadena sencilla; ARNcd: ARN de cadena doble; KH: dominio con homología a proteína K; RRM: motivo de reconocimiento de ARN; CSD: dominio *cold shock*; dsRBD: dominio de unión a ARN de cadena doble; PAZ: dominio PIWI-Argonata-Zille; PIWI: dominio P-element induced *wimpy testis*.

Las RBP pueden reconocer secuencias de nucleótidos o estructuras específicas en el ARN, y la presencia de varios dominios de unión con ARN en una misma proteína incrementa la afinidad y especificidad por su ARN blanco.

Las funciones de las RBP en el nivel molecular varían tanto como las actividades en las que están involucradas, pero para describirlas las dividimos aquí en cinco grandes grupos:

- ARN polimerasas. Son las RBP encargadas de la síntesis de ARN. Estas RBP son enzimas polimerasas (polimerasas de ARN celulares; replicasas y transcriptasas de ARN virales) que reconocen una secuencia de ADN como molde (o ARN en los genomas virales compuestos por esta molécula) y dirigen la formación de enlaces fosfodiéster entre

grupos 3' OH de un nucleótido y el extremo 5' fosforilado del nucleótido entrante.

- ARNasas o ribonucleasas. Son enzimas que cortan enlaces entre los nucleótidos del ARN. Se han identificado al menos veinte tipos diferentes que reconocen distintas formas de ARN. Algunas reconocen secuencias específicas de nucleótidos y otras reconocen arreglos estructurales en la molécula del ARN. Pueden reconocer moléculas de ARN de cadena sencilla o doble, o híbridos de ARN/ ADN; algunas cortan enlaces en los extremos (exorribonucleasas) y otras, enlaces internos (endorribonucleasas) de un ARN.

- Helicasas de ARN. Son RBP encargadas de inducir cambios conformacionales del ARN; en estos casos, una enzima helicasa reconoce una secuencia o estructura en el ARN y cambia su torsión y arreglo estructural, por la remoción de puentes de hidrógeno.
- Enzimas modificadoras de ARN. Entre estas RBP se puede incluir un número muy grande de enzimas que comprenden todas aquellas que pueden hacer cambios químicos en los nucleótidos que forman un ARN, sin alterar su secuencia.
- Ribonucleoproteínas (RNP). Este es el grupo más extenso de las RBP; estas participan en el contacto de una molécula de ARN con otras proteínas, formando complejos de ribonucleoproteínas. En un complejo de RNP pueden estar incluidas proteínas de cualquiera de los cuatro grupos anteriores.

Las RNP pueden estar formadas por un ARN y una RBP, o pueden llevar a la formación de complejos macromoleculares en los que las RBP se asocian con moléculas de ARN y permiten la interacción de otras proteínas, formando así estructuras multiméricas complejas.

Entre ellas están dos de los complejos macromoleculares de mayor tamaño y complejidad de la célula: el “spliceosoma” y el ribosoma. Ambos son ensamblajes de ARN y RBP que cumplen funciones estructurales y enzimáticas, e incluso acompañan la actividad catalítica del ARN.

Las RBP en la regulación de la expresión de los genes

- Estabilidad y organización de la cromatina.

Dentro de un núcleo celular, el ADN se organiza en arreglos que tienen diferentes grados de compactación. Estos grados de compactación dependen de las histonas (un conjunto de proteínas que se encargan de organizar y compactar las moléculas de ADN) y de modificaciones químicas a las que están sujetas tanto las histonas (metilación y acetilación) como el ADN (metilación). La forma más compactada del ADN se conoce como heterocromatina, mientras que a la menos compactada se le llama eucromatina. En las regiones del genoma menos compactadas —en la eucromatina— generalmente se encuentran genes activos; es decir, estas son regiones de ADN temporalmente accesibles a la *maquinaria* celular encargada de expresar los genes. Pueden ser activamente transcritas y son reconocidas por las enzimas celulares encargadas de sintetizar las moléculas de ARN codificadas en cada gen.

4. Y. Chen y G. Variani, "Protein families and RNA recognition", *FEBS J*, vol. 272, 2005, pp. 2088-2097.
5. Emily Bernstein y C. David Allis, "RNA meets chromatin", *Genes & Development*, vol. 19, núm. 14, 2005, pp. 1635-1655.

Por otra parte, se asocia con el dominio carboxilo terminal del ARN polimerasa II (descrito más adelante) y con complejos de desacetilación de histonas, y participa en el control de la transcripción, a través de la modulación de la cromatina.

Las RBP tienen un papel crucial en la estabilidad de los cromosomas. Tal es el caso del supresor tumoral BRCA-1. Esta RBP es un componente de la "maquinaria de reparación de daño" del ADN (DDR, de *DNA damage repair*); funciona como factor transcripcional e interactúa con complejos remodeladores de la cromatina, entre muchas funciones más. BRCA-1 ayuda a reparar ADN dañado por cortes de doble cadena e induce la muerte de las células en las que el genoma dañado no puede repararse.

Durante la remodelación de la cromatina, el papel de las RBP también es fundamental. Esta actividad de las RBP es novedosa, ya que no se conocían algunas de ellas que pudieran participar en la remodelación de la cromatina. Dos grupos de RBP ejemplifican este caso: la familia de proteínas Argonauta y la proteína heterogénea nuclear (hn) hnRNP K. Las proteínas Argonauta se encuentran en organismos de los tres dominios de la vida (Eukarya, Bacteria y Archaea) y sus secuencias están muy conservadas a lo largo de la evolución.

Las Argonauta unen ARN a través de un dominio PAZ (PIWI/Argonauta/Zwille) y participan principalmente en la regulación de la traducción de ARNm mediante el silenciamiento, que depende de ARN cortos, conocidos como ARNs (RNA pequeños interferentes o silenciadores). Recientemente se ha observado que al asociarse con algunos ARN, las Argonauta se pueden unir al ADN y favorecer su compactación en heterocromatina.

En el caso de la hnRNP K, la conexión entre diferentes actividades es aún más notable. Esta RBP funciona como un conector entre la remodelación de la cromatina y varios pasos en la regulación de la expresión de genes. La hnRNP K se une con proteínas del grupo Policomb (PcG) para permitir la compactación de la cromatina, inhibiendo así la expresión de genes. Además, participa en la activación de la transcripción de genes,

como el gen c-myc (un factor que regula el crecimiento celular) y eIF4E (un factor esencial en la traducción de ARNm). Adicionalmente, esta RBP participa en el procesamiento postranscripcional, al regular a SRp20, otro conector de actividades celulares, ya que es un protooncogen que participa en el *splicing*, exportación y traducción de ARNm. La hnRNP K se encuentra sobreexpresada o tiene una localización intracelular aberrante en cáncer colorectal, de próstata, hepático, de mama y en leucemias.

Las RBP en la regulación de la expresión de los genes

- Transcripción. El primer paso en la expresión de un gen es el proceso llamado *transcripción*, que se describió anteriormente. Durante la transcripción de un gen, se reclutan varios factores a la molécula de ADN que se ensamblan sobre secuencias específicas de nucleótidos, los cuales permiten unir la ARN polimerasa II (RPII). Esta última es una RBP formada por doce subunidades, que utiliza ADN como templado para sintetizar ARN.

La RPII tiene una secuencia en el carboxilo terminal conocida como CTD; este es modificado por fosforilación para regular su actividad, así como su asociación con otras proteínas, entre ellas, RBP que participan en la biogénesis del ARNm (por ejemplo, TAF15, un componente del factor de inicio de la transcripción, TFIID). Por lo tanto, el CTD de la RPII funciona como un sitio de andamiaje para el reclutamiento de RBP durante el proceso transcripcional y postranscripcional, permitiendo el acoplamiento de ambos eventos.

- Procesamiento de ARN. Durante su síntesis, la molécula de ARN sufre diferentes modificaciones, las cuales incluyen la adición de un nucleótido en el extremo de la molécula en el que inicia su síntesis (extremo 5'), conocido como "estructura de caperuza" o "cap"; la adición de una secuencia de poliadeninas en el extremo opuesto de la molécula (extremo 3'), y la remoción de secuencias de la molécula de ARN por un mecanismo muy complejo, conocido como corte y empalme o *splicing*, en el que se unen secuencias de ARN, conocidas como exones, y se eliminan las secuencias conocidas como intrones. El resultado es el ARNm maduro que puede ser exportado a citoplasma y traducido a proteína.

Gran parte de las RBP son proteínas multifuncionales, es decir, que participan en diferentes actividades biológicas, lo que les permite funcionar como acopladores entre

diferentes procesos celulares. Además de los citados en la sección anterior, otro ejemplo de RBP multifuncional es el de los factores de *splicing* conocidos como SC-35 y ASF/SF2. Estas son proteínas SR (factores de *splicing* llamados así por tener secuencias ricas en los aminoácidos serina (S) y arginina (R)), que modifican el ARNm al unírsele mediante dominios RRM. Estas proteínas participan en la transcripción, procesamiento postranscripcional, exportación, estabilidad y traducción del ARNm. En otras palabras, en cada uno de los eventos moleculares en la expresión de un gen.

SC-35 y ASF/SF2 reconocen secuencias específicas del ARN, conocidas como mejoradores o *en-*

hancers. Ambas funcionan como promotoras del procesamiento de ARNm por *splicing*. Además, SC-35 promueve la transcripción de algunos genes al favorecer la fosforilación del CTD de la RPII. Por lo tanto, SC-35 permite el acoplamiento de la transcripción con el procesamiento postranscripcional. Además, se ha sugerido que SC-35 participa en el transporte de ARNm, favoreciendo su exportación a citoplasma. Por otro lado, estas dos proteínas también están asociadas con la degradación de ARNm por un mecanismo conocido como NMD (degradación de ARN mediado por sinsentido, *nonsense-mediated RNA decay*), proceso que se describirá más adelante.

Para el procesamiento de ARNm por *splicing*, es esencial la formación del mayor complejo de ribonucleoproteínas en la célula mencionado antes y llamado "spliceosoma". Este complejo está conformado por ARN pequeños nucleares (U1, U2, U4, U5, U6, U4atac, U6atac, U11 o U12) y subconjuntos de alrededor de cien proteínas RBP con actividades de helicasas, nucleasas y RBP accesorias, como las proteínas Sm (o Lsm, en el caso del ARN U6), que dirigen el reconocimiento de secuencias entre los ARN pequeños nucleares y el ARNm. Las proteínas Sm forman un anillo que envuelve al ARN y son esenciales para la biogénesis, el transporte y la actividad de las RNP pequeñas nucleares. Los ARN pequeños nucleares se unen con el ARNm recién sintetizado en un orden específico (U1 y U2, seguidas por U4, U5 y U6) para marcar las regiones del ARNm que serán cortadas por la actividad catalítica del complejo formado por U4 y U6, para unir los exones, escindir los intrones y formar ARNm maduros listos para ser exportados a citoplasma.

Las alteraciones en la localización y función de estas RBP se han asociado con el desarrollo de cáncer, específicamente de leucemias, y de una variedad de otras

enfermedades. Se piensa que esto podría deberse a que el mal funcionamiento de estas proteínas puede afectar la fidelidad de la expresión génica y producir cambios en la organización o ensamblaje de la *maquinaria* involucrada en la transcripción de genes y el procesamiento postranscripcional de los ARNm. Además, la producción de formas aberrantes de ARNm por alteraciones en el procesamiento por *splicing* podría favorecer la transformación oncogénica de la célula debido a la síntesis de variantes de ARNm con potencial oncogénico, como en el caso del síndrome mielodisplásico y de la leucemia mieloide aguda.

- Exportación nucleocitoplásmica de ARNm. Los pasos posteriores del procesamiento pos-transcripcional de ARNm ocurren hacia la periferia del interior del núcleo y una vez que los ARNm salieron al citoplasma. Las células eucariontes poseen una compartimentalización que les permite separar y regular diferentes funciones biológicas en microambientes definidos. A pesar de esta separación física, los procesos que ocurren en el núcleo y citoplasma no están desconectados, ya que moléculas como las RBP y los ARN a los que se asocian permiten integrar las actividades celulares. Además, existen estructuras que funcionan como comunicadores entre estos microambientes.

En el caso del núcleo, este se comunica con el citoplasma a través de un canal de comunicación conocido como Complejo del Poro Nuclear (NPC). Las proteínas que lo componen hacen contacto con RBP que participan en la organización de la cromatina en el núcleo, en la regulación de la transcripción, el procesamiento postranscripcional de ARN, y que seleccionan de forma activa ARNm procesados correctamente, permitiendo su exportación al citoplasma, donde pueden ser traducidos a proteínas por los ribosomas. El NPC es, entonces, no solo un canal que permite el paso regulado de moléculas, sino que participa activamente en la regulación de la expresión de los genes.⁶

La exportación de los ARNm está mediada por la *maquinaria* compuesta por las RBP ALY/REF y Tap. Estas se unen con otras RBP y con el NPC, para asociarse con el ARNm y traslocarlo en el citoplasma.

La síntesis, el procesamiento, el empaquetamiento y la exportación del ARNm asociado con las RBP requieren de mecanismos muy finos de control de calidad, ya que cualquier falla puede originar ARNm aberrantes que, si son exportados al citoplasma y traducidos

a proteínas, pueden tener efectos deletéreos sobre la célula y favorecer el desarrollo de enfermedades.

Uno de estos mecanismos es la vigilancia dependiente de SUMO y exosoma, establecido desde el NPC. Asociados con la cara nuclear del NPC se encuentran factores de vigilancia que participan en el control de calidad de los ARNm. Los transcritos que no son correctamente procesados son rápidamente degradados por el exosoma, un complejo de exonucleasas y ARN helicasas. El complejo TRAMP, formado por un ensamblaje de varias RBP, se asocia con el NPC y participa en este proceso. TRAMP poliadenila los ARNm aberrantes, marcándolos para ser procesados correctamente o degradados por el exosoma.

Un mecanismo de control de calidad de los ARNm es el conocido como “degradación de ARN mediado por sinsentido”, NMD (*nonsense mediated RNA decay*), en el cual los ARNm con codones de paro prematuros son reconocidos y degradados para impedir la síntesis de una proteína incompleta que pueda tener efectos deletéreos sobre el funcionamiento celular.

6 Caterina Strambio-de-Castillia, Mario Niepel y Michael P. Rout, “The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation”, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 11, núm. 7, pp. 490-501.

Este mecanismo de control de calidad es principalmente citoplásmico, pero se ha observado que proteínas SR, como SC-35 y ASF/SF2 pueden promover esta respuesta en el núcleo. Estos datos indican que existe una función adicional para estos factores de *splicing*, que actúan no solo sobre el procesamiento de ARNm (como se describió antes), sino también en la regulación de su estabilidad. Se ha observado que, en tumores, el mecanismo de NMD se encuentra inhibido, lo que permite una desregulación génica favorable para la tumorigénesis.

- Traducción. La traducción es un proceso en el que, a partir de una molécula de ARNm (en un lenguaje de nucleótidos), se sintetiza una cadena polipeptídica (traducido a un lenguaje de aminoácidos). La maquinaria celular encargada de la traducción de un ARNm es el segundo RNP de mayor tamaño y complejidad en la célula, el ribosoma.⁸

NARRACIONES DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA

7 Kristian E. Baker y Roy Parker, "Nonsense-mediated mRNA decay: Terminating erroneous gene expression", *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 16, núm. 3, 2004, pp. 293-299.

8 John W. B. Hershey y William C. Merrick, "Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis", en John W. B. Hershey, Michael B. Mathews y Nahum Sonenberg (eds.), *Translational regulation of gene expression*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2000, pp. 33-88.

En este sentido, se sabe que las proteínas de la superficie del ribosoma S2, S16, L1, L2 y L3 son responsables de las principales interacciones entre el ARNm y el ribosoma. Estas interacciones son imprescindibles para el reconocimiento correcto del ARNm por parte del ribosoma, ya que permiten que se ensamble el complejo de inicio de la traducción, formado a su vez por varias otras RBP.

Los ribosomas constan de dos subunidades que están compuestas por cuatro moléculas de ARNr y alrededor de ochenta proteínas ribosomales. Las proteínas S forman la subunidad pequeña, y las L, la subunidad grande. La mayoría de estas proteínas tiene topología tipo barril β o sandwich α/β . La integridad y estabilidad del ribosoma depende de interacciones proteína-ARN y proteína-proteína. Estas interacciones electrostáticas dependen del acoplamiento conformacional entre ARN y proteínas, lo que asegura la especificidad de la interacción. Las proteínas que forman parte de la superficie del ribosoma están más directamente involucradas en la interacción con ARN.

Para el inicio de la traducción, es necesario el reconocimiento de la estructura de "cap" y secuencias específicas en el ARNm, por una serie de RBP que se conocen como factores de inicio de la traducción eucariotes eIF (*eukaryotic initiation factor*), como eIF4F, que está constituido por eIF4E, eIF4A y eIF4G, los cuales hacen contacto con al menos otras seis RBP.

Estos factores de inicio de la traducción favorecen la interacción correcta entre el ARNm y las subunidades del ribosoma para su traducción. La alteración de cualquiera de los pasos, desde el ensamblaje del ribosoma hasta la traducción de un ARNm, está asociada con diversas enfermedades, particularmente cáncer y enfermedades neurodegenerativas.

Importancia de la molécula de ARN

En las últimas dos décadas, las evidencias experimentales acumuladas han dejado claro que la molécula de ARN es central en el funcionamiento de todos los procesos biológicos; consecuentemente, las proteínas que se asocian a ARN juegan un papel igualmente esencial en la biología.

Hemos hecho aquí una breve descripción de algunas de las actividades celulares que, por depender de algún tipo de ARN, dependen de las proteínas que se asocian con ARN y definen su forma, procesamiento, estabilidad y función.

Estas proteínas y los mecanismos celulares en los que participan están alterados en enfermedades. La participación de RBP en cada aspecto del funcionamiento celular, desde la organización estructural y funcional del núcleo hasta la regulación de la expresión de genes, permite suponer que en los próximos años se seguirán encontrando nuevas RBP, y que aprender sobre las funciones de RBP permitirá, por una parte, entender mejor el funcionamiento de la célula y, por otra, desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para interferir o utilizar ARN y RBP en el tratamiento de un número creciente de enfermedades.