



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**REGULACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE LA PROTEÍNA ADENOVIRAL E1B-
55K POR FOSFORILACIÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M.C. Raúl Eduardo López Antonio

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ramón A. González García Conde
CIDC, IICBA, UAEM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Susana Castro Obregón
IFC, UNAM

Dr. Christopher David Wood
LNMA IBT/UNAM

Ciudad de México. Junio, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. El trabajo fue supervisado por el Dr. Ramón A. González García-Conde. RELA (CVU 662169) contó con el apoyo de la beca SEP-CONACyT. El trabajo contó con el apoyo de CONACyT, proyectos 168497 y A1-S-8696, y el Programa de Vinculación de Grupos de Investigación de la Fundación Alexander von Humboldt.

RESUMEN

Los adenovirus (AdV) pertenecen a la familia *Adenoviridae*; estos virus se han asociado con enfermedades de vías respiratorias, el sistema gastrointestinal e infecciones de la conjuntiva. Son virus no envueltos con cápside icosaédrica y su genoma es DNA lineal de doble cadena organizado en unidades transcripcionales tempranas y una unidad tardía. La E1B-55K es una fosfoproteína de 496 aminoácidos que puede ser modificada postraduccionalmente por fosforilación en los residuos serina 490, 491 y treonina 495, y por SUMOilación en la lisina 104. Se ha reportado que la fosforilación de estos residuos impacta las actividades de la proteína durante el ciclo de replicación del virus. La E1B-55K es necesaria para la replicación eficiente y producción de progenie viral; sin embargo, no se conoce cuál es el efecto de estas modificaciones sobre las funciones y actividades de los compartimentos de replicación viral.

En este trabajo usamos virus mutantes con sustituciones sencillas, dobles o triples de los sitios de fosforilación de E1B-55K y determinamos el efecto de estas modificaciones en la localización intracelular de la proteína; la replicación del DNA viral; la producción de progenie viral; y el estado de fosforilación de la E1B-55K asociada a los Compartimentos de Replicación (CR) viral; así como las cinasas que participan en la fosforilación de los tres sitios. Nuestros resultados muestran que la fosforilación de la E1B-55K favorece su localización asociada a compartimentos de replicación y en estos sitios promueve la formación y organización de compartimentos de replicación, adicionalmente determinamos por primera vez que la fosforilación de la treonina 495 favorece las actividades de replicación, transcripción y splicing en los compartimentos de replicación. Adicionalmente determinamos que la E1B-55K es fosforilada por CK1, CK2 y GSK3 y proponemos por primera vez que la acción concertada de las cinasas modulan las actividades de la E1B-55K y orquestan sus actividades en el ciclo de replicación viral.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	4
ABREVIATURAS	8
1.- INTRODUCCIÓN	10
1.1. GENERALIDADES DE LOS ADENOVIRUS.	10
1.2 CLASIFICACIÓN	11
1.3 ESTRUCTURA	11
1.4 CICLO DE REPLICACIÓN	13
1.4.1 Adhesión y entrada	13
1.4.2 Organización del genoma	14
1.4.3 Expresión de los genes virales tempranos	16
1.4.4 Replicación del genoma	16
1.4.5 Expresión de genes virales tardíos.....	17
1.4.6 Ensamblaje y liberación de las partículas virales	18
1.5 COMPARTIMENTOS DE REPLICACIÓN	18
2.- LA PROTEÍNA E1B-55K	21
2.1 ESTRUCTURA-FUNCIÓN	21
2.2 LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA E1B-55K	22
2.3 E1B-55K EN LA TRANSFORMACIÓN CELULAR	22
2.4 DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES	24
2.5 REPRESIÓN DE GENES ESTIMULADOS POR INTERFERON (ISG)	25
2.6 PAPEL DE LA E1B-55K EN LOS COMPARTIMENTOS DE REPLICACIÓN	25
2.7 INTERACTOMA DE E1B-55K	26
2.8 EXPRESIÓN DE mRNA VIRALES	26
3.- ANTECEDENTES	28
3.1 PAPEL DE LA FOSFORILACIÓN DE E1B-55K EN EL CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL	28
4.- HIPÓTESIS	34
5.- OBJETIVOS	34
5.1 OBJETIVO GENERAL:	34
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1 Células.	35
6.2 Anticuerpos.	35

6.3 Inhibidores	35
6.4 Construcción de virus.....	36
6.5 Microscopía de inmunofluorescencia.....	38
6.6 Ajuste de elipses para la detección automática de CRs.....	38
6.7 Predicción de Desorden	39
6.8 Microscopía de contraste de fase, microscopía de inmunofluorescencia y análisis de superresolución.....	39
6.9 Titulación por conteo de focos fluorescentes.	40
6.10 Análisis de la eficiencia de replicación viral.	40
6.11 Análisis de la síntesis de DNA viral por PCR cuantitativo.	41
6.12 Inmunoprecipitación.....	41
6.13 Western blot.....	42
6.14 Análisis de densitometría.....	43
6.15 Microscopía de super resolución.....	43
6.16 Plásmidos y transfecciones transitorias.....	44
6.17 ensayos de luciferasa.	44
6.18 Preparación de fracciones subcelulares y subnucleares de células HFF infectadas.	45
6.19 Ensayos de replicación de ADN en CRs aislados.....	46
6.20 Ensayos de transcripción en CRs aislados.	47
6.21 Ensayos de splicing en CRs.	47
6.22 Densitometría y análisis estadístico.	48
7. RESULTADOS.....	49
7.1 Efecto de las modificaciones en el motivo de ribonucleoproteína (RNP) de la E1B-55K sobre sus actividades durante el ciclo de replicación.	49
7.2 Construcción y amplificación de virus recombinantes con sustituciones en los sitios de fosforilación de la E1B-55K.	52
7.3 La fosforilación en E1B-55K favorece la formación de CRs.	54
7.4 la fosforilación diferencial en E1B-55K regula su localización durante el ciclo de replicación viral.....	61
7.5 La fosforilación de la treonina 495 en la E1B-55K es necesaria para su reclutamiento a los CR.....	77
7.6 La fosforilación de la T495 en E1B-55K favorece la síntesis de DNA viral.....	81
7.7 La fosforilación de la treonina en E1B-55K favorece la fosforilación de las serinas 490 y 491.	85
7.8 La E1B-55K es fosforilada por CK1, CK2 y GSK3.....	88

7.9 Las sustitución en los sitios de fosforilación por alanina en la E1B-55K reducen la producción de progenie viral.	92
7.10 La fosforilación de la treonina 495 en E1B-55K es necesaria para sus actividades asociadas con los CR.	94
7.11 La fosforilación de la treonina 495 en E1B-55K es necesaria para la regulación del promotor E1A.	96
8. DISCUSIÓN.....	97
9.CONCLUSIONES	104
10.-PERSPECTIVAS	105
11. REFERENCIAS.....	105
12.-ANEXOS	114

ABREVIATURAS

Ad Pol	Polimerasa de adenovirus
Aa	Aminoácidos
Ab	Anticuerpo
ActD	Actinomicina
AdV	Adenovirus
APS	Persulfato de amonio
ATM	Ataxia telangiectasia
ATP	Adenina trifosfato
BLM	Helicasa bloom
bp	Pares de bases
BRCA1	Breast cancer 1
CAR	Receptor de Coxsackie-Adenovirus
CB	Cuerpos de cajal
CC	Coefficiente de correlación
cDNA	DNA complementario
CP	Fosfocreatina
CRs	Compartimentos de replicación de adenovirus
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DBP	Proteína de unión a DNA de cadena sencilla
DMEM	Medio Dulbecco's Modified Eagle's
DNA	Ácido desoxiribunucleico
dNTP	Deoxy-nucleotide triphosphate
dsDNA	DNA de cadena sencilla
DTT	Ditiotreitol
E1A	Genes tempranos de la región 1A de adenovirus
E1B	E1B-55K
ERA	Enfermedad respiratoria aguda
Ery	Eritromicina
FBS	Suero fetal bovino
FFU	Unidades formadoras de focos
HAdV	Adenovirus humano
HFF	Fibroblastos de prepucio humano
Hpi	Horas post-infección
IFN	Interferón
IG	Gránulos intercromatina
ITR	Secuencias repetidas invertidas
K/kDa	Kilo dalton
L	Genes adenovirales tardíos
mAb	Anticuerpo monoclonal
MK	Mock
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MLP	Promotor principal Tardío
MLTU	Unidad de Transcripción Mayor Tardía
MOI	Multiplicidad de infección
MRN	Complejo Mre11, Rad50 y NBS1

ND10	Dominios nucleares 10
NES	Señal de exportación nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
NTC	Control sin templado
NTP	Nucleotido trifosfato
Orf	Marco abierto de lectura
pAb	Anticuerpo policlonal
PBS	Buffer de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PKR	Proteína kinasa R
PML	Proteína leucemia promielocítica
Pol	Polimerasa Viral
pRB	Proteína retinoblastoma
PT	Proteína Terminal
PTM	Modificaciones postraduccionales
CRs	Compartimentos de replicación virales
RNA	Ácido Ribonucleico
RNApol	Polimerasa de ácido Ribonucleico
RNP	Dominio de ribonucleoproteína
SDS	Dodecyl sulfato de sodio
ssDNA	DNA de cadena sencilla
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SR	Super resolución
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TIRF	Reflección interna total de fluorescencia
TP	Proteína terminal
TPL	Secuencia del líder tripartita
UT	Unidad de Transcripción
VA RNA	RNAs virus asociados
v/v	Volumen por volumen
w/v	Peso por volumen
ZPR	Zona Periférica de Replicación

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES DE LOS ADENOVIRUS.

En el invierno de 1953, Wallace Rowe, un becario postdoctoral de Robert Huebner, en el Instituto Nacional de Salud, en E.U. aisló un agente citopatogénico filtrable que era responsable de la degeneración espontánea de explantes de tejidos adenoides que se encontraban en estudio para el cultivo de células [1]. Al mismo tiempo, ocurría una epidemia de enfermedad respiratoria aguda (ERA) en Fort Leonard Wood, que se pensaba era causada por un virus de influenza [2]. Sin embargo, no pudieron aislar el virus de influenza de vías respiratorias de estos pacientes y en su lugar lograron aislar a partir de lavados de garganta un agente infeccioso desconocido. Harold Ginsberg demostró que los agentes aislados por Rowe y Hilleman eran neutralizados por muestras de suero de pacientes con ERA de poblaciones militares de la segunda guerra mundial, pero no con suero de pacientes con otras condiciones respiratorias, como el resfriado común o neumonía primaria, estableciendo a este virus como el agente etiológico de ERA en poblaciones de reclutas militares [3]. Para este tiempo, Huebner y Rowe demostraron la relación antigénica entre doce agentes clasificados como virus "adenoide-faríngeo-conjuntival", que incluían los aislados por Hilleman, organizándolos en 6 serotipos sobre la base de reactividad cruzada por anti-suero de pacientes en los ensayos de neutralización [4]. Como se aislaron más cepas de agentes infecciosos que compartían características con estos virus y la evidencia acumulada indicaba que estos agentes representaban una familia relacionada de virus, fueron llamados "adenovirus", proveniente del tejido originario del que se aislaron por Rowe. Posteriormente, fue aprobado como una nueva familia de virus por recomendación de John Enders [5].

Actualmente por estudios epidemiológicos se sabe que los adenovirus (AdV) son responsables del 5 al 35% de las infecciones respiratorias agudas [6] y recientemente, se reportó que causan alrededor del 60% de los casos de queratoconjuntivitis en Japón [7]. Los brotes son comunes en reclutas militares, usuarios de piscinas, instituciones residenciales, hospitales, guarderías, etc.

Además, frecuentemente infectan niños menores de 5 años, donde inducen principalmente diarrea, faringitis, y fiebre faringo-conjuntiva [8]. En pacientes inmunosuprimidos, como aquellos que presentan síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), AdV puede causar infecciones fatales que resultan en hepatitis, neumonía y encefalitis [9-13].

1.2 CLASIFICACIÓN

Los virus de la familia *Adenoviridae* son clasificados en 5 géneros con base en el análisis de la secuencia del genoma; los Mastadenovirus infectan mamíferos incluyendo a los humanos; los Aviadenovirus infectan solo aves; los Atadenovirus que son llamados así por su alto contenido de A + T en su genoma, infectan reptiles, aves, marsupiales y mamíferos; los Siadenovirus que codifican para una sialidasa infectan réptiles y aves [14]; y los Ichtadenovirus con un único miembro confirmado que infecta peces [15].

Los AdV humanos (HAdV) se dividen en subgrupos (especies) de la A a la G basado en su capacidad de hemaglutinación, potencial oncogénico, la movilidad electroforética de proteínas del virión y homología de secuencias del genoma [16]. Además, estos se dividen en serotipos y genotipos, basados en las propiedades inmunorreactivas de los epítopes variables expuestos en las proteínas de superficie, hexón y fibra, y en las secuencias de sus genomas.

Hasta la fecha, 55 serotipos humanos y 113 genotipos han sido identificados y asociados con varios síndromes, incluyendo enfermedades respiratorias agudas, gastroenteritis y queratoconjuntivitis epidémica.

1.3 ESTRUCTURA

Los AdV son virus no envueltos. Su cápside icosaédrica de aproximadamente 90 nm de diámetro (figura 1) está conformada por tres estructuras mayoritarias llamadas hexón, pentón y fibra (compuestas por las proteínas II, III y IV, respectivamente) y cinco proteínas minoritarias (IIIa, IVa2, VI, VIII y IX). Además,

otros seis componentes estructurales se sitúan en el “core” del virión, cinco de estos se asocian con el genoma viral [V, VII, μ , IVa2 y la proteína terminal (TP)] y el componente restante es la proteasa del virión, 23K, que desempeña un papel fundamental en el ensamblaje y maduración del virión.

Con los avances en la cristalografía de rayos X y reconstrucción de imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica se ha llegado a una resolución de 3.5 Å de la partícula viral, donde es evidente la disposición de un número de componentes estructurales. En la figura 1 se muestra un diagrama de la cápside icosaédrica de AdV [17]. La cápside está formada por 252 capsómeros: 240 hexones (formados por trímeros de la proteína II) que forman la mayoría de la superficie de la cápside y 12 pentones (formados por la base del pentón que consta de pentámeros de la proteína III), uno en cada vértice del icosaedro, desde donde se proyecta una fibra (formada por un trímero de la proteína IV), que es el primer componente del virus que interacciona con la célula [18].

Los componentes minoritarios de la cápside VIII y IX estabilizan las interacciones entre hexones; la proteína IIIa interacciona con la base del pentón y los hexámeros de cada cara y estabiliza la interacción entre ellas. La proteína VI participa en la desestabilización de la membrana endosomal para la liberación de la partícula viral durante la infección [19].

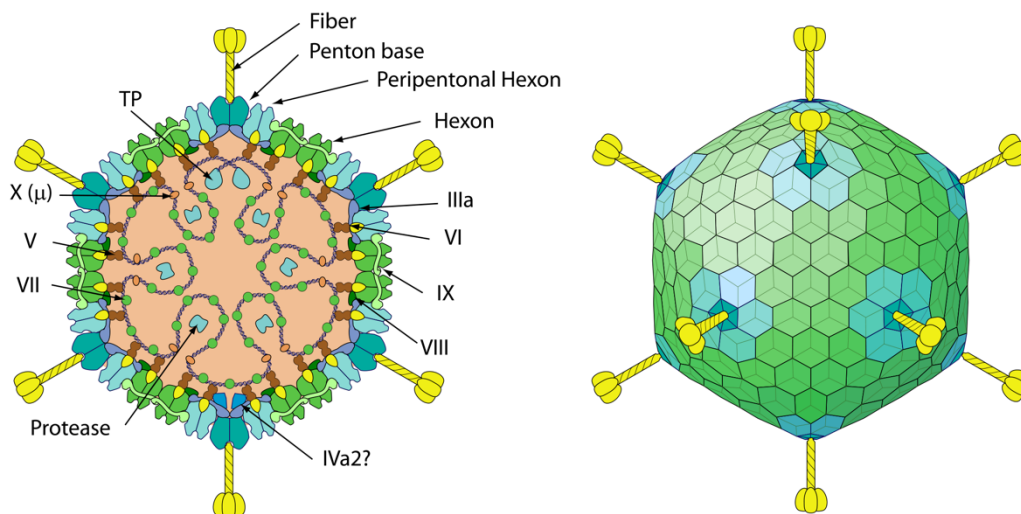


Figura 1. Organización de la cápside de AdV. Esquema de la composición y organización de la cápside viral, resume el modelo actual de la disposición de los polipéptidos estructurales (modificado de *viral zone*).

El resto de las moléculas estructurales están asociadas con el “core” del virión. Las proteínas VII, V y Mu (μ) son altamente básicas, lo que permite que interactúen con el DNA viral; la proteína VII es la principal proteína del “core”. El tratamiento de “cores” aislados con nucleasas sugiere que el polipéptido VII forma dímeros que condensan el DNA viral en un complejo nucleoproteína DNA-VII, que contiene de 90 a 150 pb de DNA. Finalmente, una capa de la proteína V envuelve al complejo DNA-VII.

La proteína V se puede unir a la base del pentón y a la proteína VI, sugiriendo que puede enlazar al “core” con la cápside [18, 19]. Mu es sintetizada como una proteína precursora de 79 aminoácidos, llamada pre-Mu, que posteriormente, es cortada por la proteasa codificada por AdV para llegar a su forma madura, altamente básica de 19 aminoácidos; pre-Mu ayuda a mantener el DNA viral condensado dentro de la cápside [18]. El “core” también contiene cerca de 10 moléculas de la proteasa viral 23 K que corta precursores de varias proteínas del virión durante el ensamblaje y maduración de la partícula viral, así como durante el desensamblaje del virus y escape del endosoma, al inicio de la infección [19].

1.4 CICLO DE REPLICACIÓN

1.4.1 Adhesión y entrada

El ciclo de replicación de los AdV se divide en dos fases, separadas por el inicio de la replicación del DNA viral. Los eventos tempranos comienzan cuando el virus interactúa con la célula hospedera. La entrada a la célula depende de la interacción entre la proteína fibra que se proyecta de cada vértice y el receptor de cosxsackie y AdV (CAR) localizado en la superficie de la membrana celular. Después de esta interacción, las estructuras pentón de la cápside se unen a integrinas localizadas en la membrana de la célula hospedera y esto conduce a la entrada de la cápside mediante endocitosis dependiente de clatrina [20]. Posterior al desensamblaje parcial de la cápside y el escape del endosoma, el cual ocurre por un mecanismo dependiente de la proteína viral VI que no está bien entendido [21,

22], la partícula viral es transportada a la periferia del núcleo por motores de dineína sobre los microtúbulos, en donde se desensambla completamente [23]. El genoma viral unido a la proteína viral VII entra al núcleo a través del complejo del poro nuclear, seguido del inicio del programa transcripcional viral a través de una interacción entre la proteína VII y factores de activación (TAF) [24] (figura 3).

1.4.2 Organización del genoma

El genoma de AdV es una molécula de DNA lineal de doble cadena, de alrededor de 36 kpb que se organiza en unidades de transcripción tempranas, tempranas retrasadas y una unidad tardía. El extremo 5' de cada hebra del DNA viral tiene una proteína terminal covalentemente unida, la cual actúa como cebador para la replicación del genoma viral, seguido por una región de secuencias invertidas repetidas que contienen el origen de replicación y los sitios de unión para factores de transcripción celulares [25].

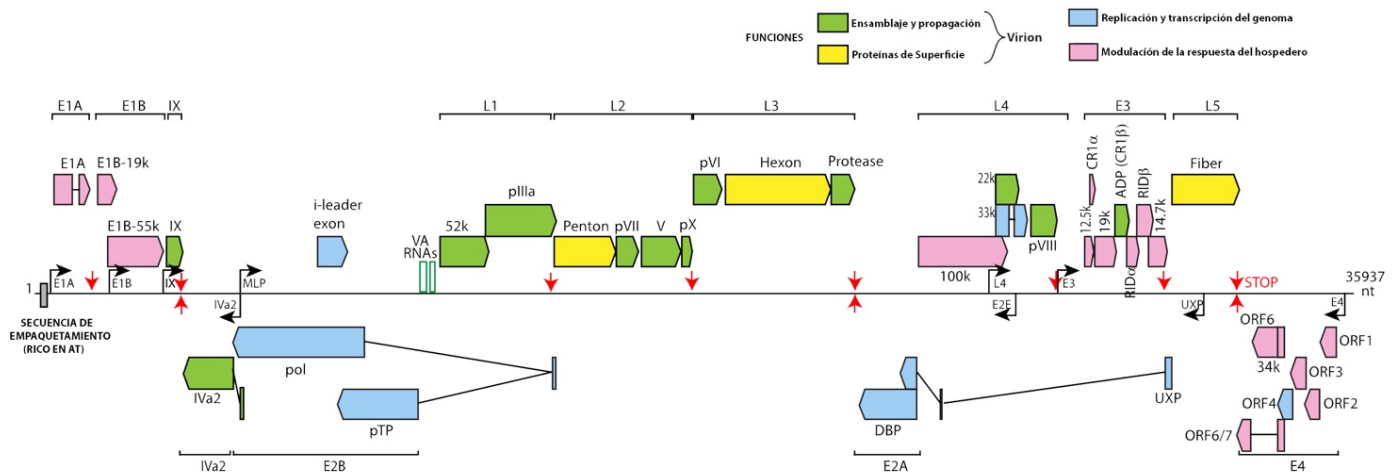


Figura 3. Organización del genoma de AdV. El DNA viral se representa en la línea continua negra y los cuadros representan los genes virales (rosa genes tempranos de modulación del hospedero, verde proteínas de ensamblaje y propagación, amarillo proteínas de superficie y azul proteínas de replicación y transcripción). Por convención el genoma viral se esquematiza con la unidad transcripcional E1A del lado izquierdo y la cadena que se lee de izquierda a derecha codifica para las unidades E1A, E1B, IX, ML, VA y E3; la cadena complementaria codifica para las unidades E4, E2 y IVa2 (*modificado de Viral zone*).

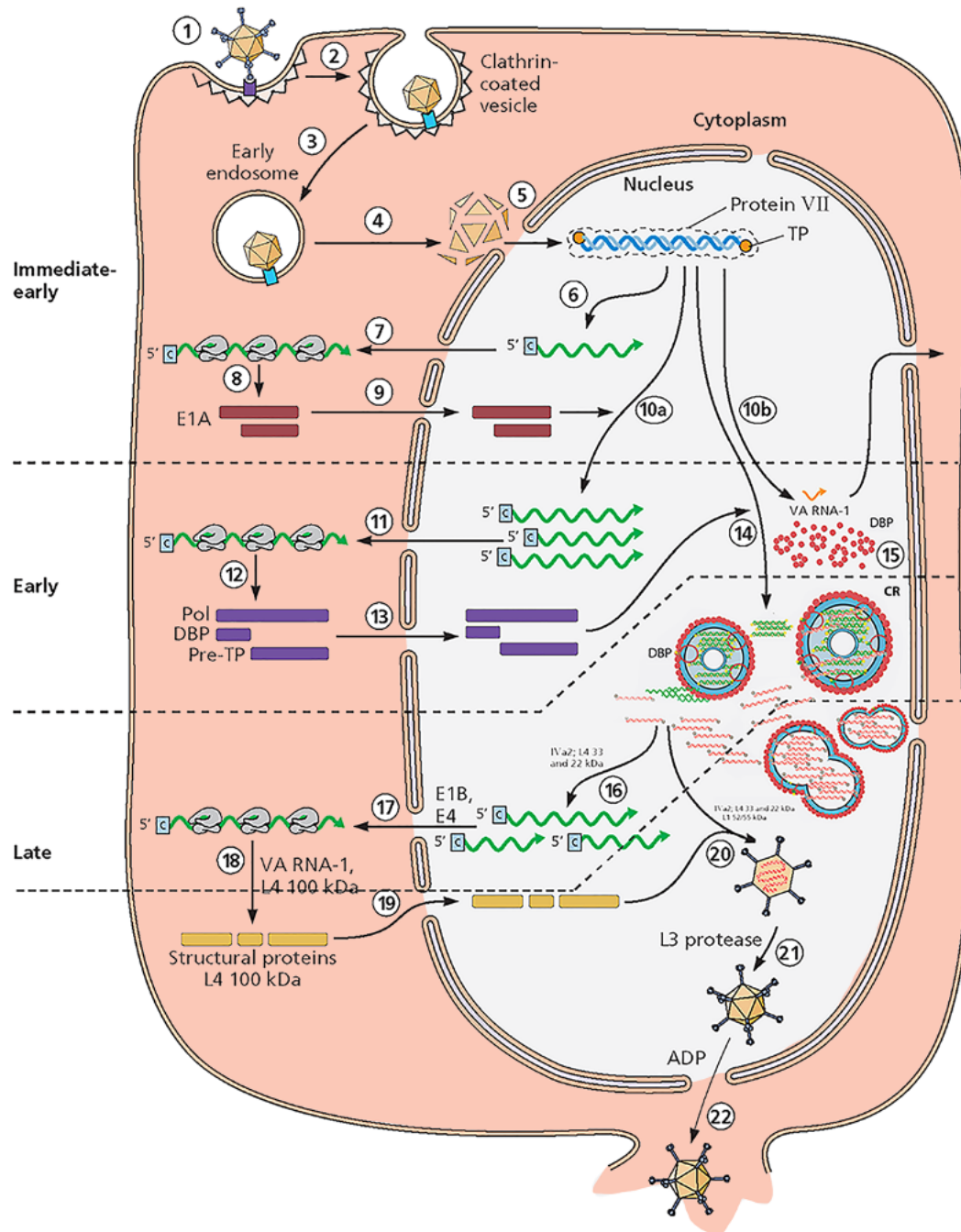


Figura 2. Ciclo de replicación de AdV. El esquema resume los eventos que suceden tras la infección con AdV, la adhesión y entrada (1 a 4), la expresión de genes tempranos (5 a 9a y b), la transición a la fase tardía (13), la formación de compartimentos de replicación (14), la expresión de genes tardíos (15 a 19), ensamblaje y liberación de viriones (19 a 21) (modificado de *Principles of Virology* S. J. Flint 2009).

El genoma viral contiene 5 unidades de transcripción temprana: E1A, E1B, E2, E3 y E4; tres unidades tempranas retrasadas: IX, IVa2 y VA; y una unidad de transcripción tardía, llamada principal tardía o ML (*major late*), que por selección de sitios de poliadenilación da origen a 5 familias de mRNA tardíos. Todas las unidades transcripcionales del genoma viral, con excepción de IX y IVa2, codifican para múltiples mRNAs que son producidos por splicing alternativo [26].

1.4.3 Expresión de los genes virales tempranos

Durante la fase temprana del ciclo de replicación de AdV, la región transcripcional E1A es expresada inmediatamente después de la entrada del genoma al núcleo [27]. Los productos de esta región son dos proteínas producidas por mRNA que son procesados por splicing alternativo y que conducen a la expresión de los genes virales tempranos E1B, E2, E3 y E4, mediante la unión a factores transcripcionales celulares [28, 29].

Los productos de los genes tempranos establecen el ambiente celular favorable para la replicación del genoma viral, mediante la activación de la fase S del ciclo celular (E1A, E4) y constituyen la maquinaria necesaria para la replicación del DNA viral (E2) [19]. Algunos de los productos tempranos inhiben apoptosis y regulan las defensas antivirales de la célula (E1B, E3, E4) [30, 31].

1.4.4 Replicación del genoma

La replicación del genoma de AdV ocurre de una manera semiconservativa, la cual está mediada por el precursor de la proteína terminal (PT), la proteína de unión a DNA (DBP) y la DNA polimerasa (Ad Pol), los cuales son productos de la región temprana E2 [32]. La polimerasa y p-TP forman un complejo que se une a secuencias específicas dentro de las regiones invertidas repetidas en el genoma viral [32]. p-PT provee el grupo hidroxilo libre, requerido para la iniciación de la síntesis de DNA. El reclutamiento de la proteína DBP y los factores transcripcionales

celulares NF-1 y Oct-1 resulta en el ensamble del complejo de pre-iniciación, lo cual permite a la polimerasa iniciar la síntesis de DNA [19], y que la elongación del genoma inicie mediante desplazamiento de cadena; la cadena parental que está siendo desplazada es estabilizada por monómeros de DBP, la cual permite la apertura no dependiente de ATP del DNA. La interacción entre monómeros de DBP es de tan alta afinidad que es suficiente para abrir las hebras de DNA conforme avanza la DNA polimerasa. La cadena de DNA desplazada hibrida sobre sí misma generando sitios idénticos al genoma inicial, lo que permite el ensamble del complejo de pre-iniciación y la síntesis de la cadena desplazada [33].

1.4.5 Expresión de genes virales tardíos

Con el inicio de la replicación del DNA, la fase tardía del ciclo comienza y se activa la expresión de los genes virales tardíos, conducido por la expresión de la unidad ML. La unidad ML codifica para veinte mRNAs con un promotor común. Los mRNA virales tardíos son procesados por adición diferencial de poliadenilación y todos son procesados por splicing alternativo [19].

El promotor ML es expresado en bajos niveles durante la fase temprana y su máxima activación requiere la unión del producto de la unidad IVa2 [34, 35] y factores transcripcionales celulares [36] [37]. Dos productos del gen tardío L4, L4 22 kDa y L4 33 kDa son expresados por un promotor menor tras la unión de las proteínas virales E1A, E4orf3 y IVa2 [38] que son requeridas para el correcto splicing de todo el repertorio de mRNAs de ML, aunque el mecanismo por el cual se regula este proceso no ha sido dilucidado [39, 40].

Estos mRNAs han sido agrupados en 5 familias, de L1 a L5, y codifican principalmente para proteínas estructurales y otras proteínas que están involucradas en el ensamblaje del virión [41].

1.4.6 Ensamblaje y liberación de las partículas virales

El mecanismo por el cual las cápsides son ensambladas y el genoma es empacado en el núcleo aún no está resuelto, aunque se sabe que se requiere la proteasa viral para la maduración de la cápside, ya que las proteínas IIIa, VI, VII, VIII, μ , y TP deben ser procesadas por la proteasa viral p23. En ausencia de este procesamiento la partícula viral no es capaz de salir del endosoma al infectar a una nueva célula [42]. Se ha demostrado que la liberación de la progenie viral también depende de la proteasa viral p23, de la inducción de la muerte de la célula por la proteína temprana E3 11.6 kDa y de la separación de uniones celulares por trímeros de la proteína viral fibra [43] [44, 45]. Sin embargo, el mecanismo por el cual estos eventos llevan a la salida de progenie no se conoce.

1.5 COMPARTIMENTOS DE REPLICACIÓN

Durante el ciclo de replicación viral se induce la reorganización y reclutamiento de componentes nucleares de la célula infectada necesarios para la expresión de los genes virales a sitios nucleares definidos que se conocen como compartimentos de replicación viral (CR), en los cuales se localiza el DNA viral, y proteínas celulares y virales que median la replicación, transcripción y el procesamiento postranscripcional de los mensajeros virales [46, 47] (figura 4). Estas estructuras virales tienen apariencia de inclusiones electrodensas con forma de anillos. El análisis por microscopía electrónica ha ayudado a entender la organización tan compleja de estos sitios virales. En la fase tardía, el DNA viral de doble cadena (dsDNA) que no está siendo replicado ni transcrito se localiza en el centro de estos anillos [48]. En la periferia de estas estructuras se encuentra la Zona Periférica de Replicación (ZPR), una red fibro-granular en la que está presente el DNA viral de cadena sencilla (ssDNA) [48], en la que ocurre la transcripción y replicación del genoma del virus. Se sabe que la proteína viral DBP se asocia a regiones de la ZPR, lo que sugiere que en estos sitios se sintetizan nuevas moléculas de DNA viral. En la ZPR también se localizan las proteínas virales tempranas E1B-55K y E4orf6 [49]. Se sabe que, a estos sitios especializados en la replicación y expresión del DNA

viral, además de proteínas esenciales para la replicación, transcripción y procesamiento de los genes virales, también se recluta una amplia variedad de proteínas, que incluye: proteínas de la maquinaria de respuesta a daño en el DNA, factores transcripcionales, supresores tumorales, y proteínas de la respuesta inmune innata, entre otras. Estas evidencias sugieren que los CR además de funcionar como sitios especializados en la replicación viral, funcionan como ambientes que modulan y suprimen los procesos celulares que se encargan de la respuesta antiviral figura 4.

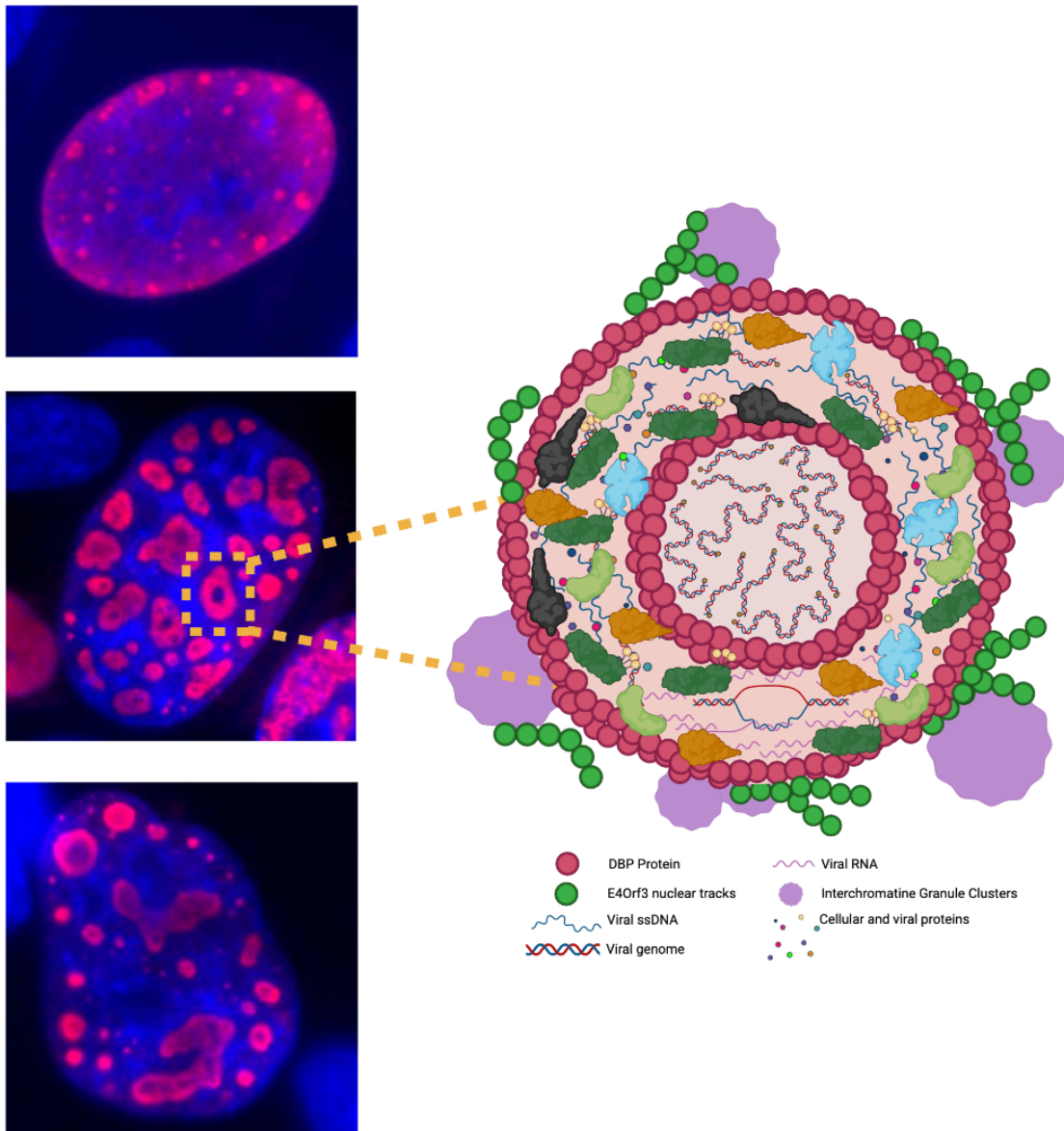


Figura 4. Compartimentos de replicación de AdV (CRs). La compartimentalización del núcleo se altera durante la replicación viral debido a la acumulación de macromoléculas que regulan la replicación del genoma viral y la expresión génica, lo que da como resultado el ensamblaje de microdominios nucleares especializados denominados compartimentos o compartimentos de replicación viral (CRs). A) Núcleo de células HFF infectadas en rojo se marcó a la proteína viral DBP y en azul DAPI a las 12, 24 y 36 hpi. B) Representación de un compartimento de replicación viral las proteínas celulares y/o virales se representan con diferentes formas en color amarillo, verde, azul y negro.

2.- LA PROTEÍNA E1B-55K

2.1 ESTRUCTURA-FUNCIÓN

La región temprana E1B-55K de AdV humano tipo 5 codifica para una fosfoproteína multifuncional [50-53]. Está compuesta por 496 aminoácidos que, aunque no se ha resuelto su estructura, la información experimental sugiere que tiene dominios intrínsecamente desordenados en los extremos N y C terminal, así como una secuencia de localización nuclear (NES), una secuencia de exportación nuclear, un dominio de unión a RNA (RNP), así como sitios que son modificados postraduccionalmente (PTM), por SUMOilación en las lisinas K101 y K104 (SCM Ψ -K-x-E/D) [30, 54-57], y fosforilación en la región C-terminal (CPR) en la serinas 490 y 491, y en la treonina 495 [30, 51] (figura 5). La E1B-55K interviene en varios pasos críticos durante las fases temprana y tardía de la replicación viral [58].

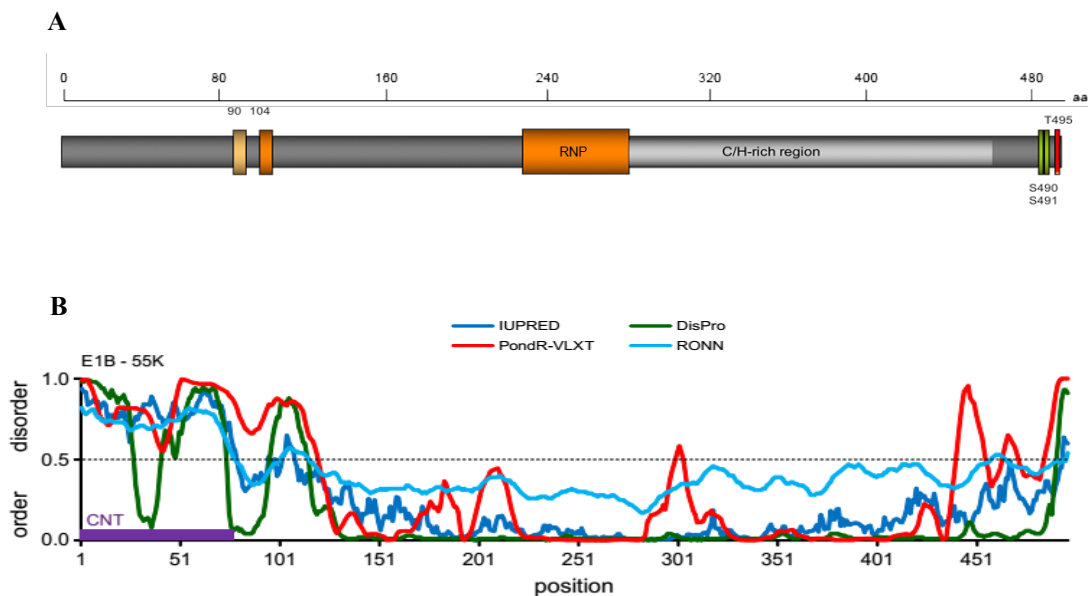


Figura 5. Representación lineal de la proteína E1B-55K. A) Las cajas indican los diferentes motivos que se conocen hasta el momento de la E1B-55K. RNP (caja central naranja), región de unión a RNA; C₂H₂, dominio propuesto como dedo de zinc atípico (Caja gris C/H). Las cajas pequeñas indican los sitios en los que la proteína está sujeta a modificaciones postraduccionales, verdes y roja por fosforilación y en naranja por SUMOilación. **B)** Predicción del desorden de la proteína E1B-55K mediante diferentes algoritmos. IUPRED, DisPro, PondR-VLXT y RONN.

2.2 LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA E1B-55K

La proteína E1B-55K muestra un patrón complejo de localización en células humanas infectadas, pero se localiza principalmente en el núcleo. En la fase temprana de la infección la E1B-55K se asocia a la proteína E4orf3 en los cuerpos nucleares de PML. En la medida que avanza el ciclo de replicación la E1B-55K se asocia a la proteína viral E4orf6, lo que resulta en el reclutamiento de la proteína E1B-55K a los CR, [49] mientras que la proteína E4orf3 permanece asociada a los cuerpos nucleares de PML en estructuras filamentosas en forma de tracks, que permanecen adyacentes a los CR.

Se ha reportado que el reclutamiento de E1B-55K a los CR es necesario para la replicación eficiente del genoma viral y la exportación de los mensajeros virales tardíos [59]. Además, se ha observado que la localización de E1B-55K y E4orf6 en los CR correlaciona con el reclutamiento de proteínas celulares, como p53 y Mre11 a estos sitios [60, 61].

En células transformadas infectadas con el virus wt, en tiempos tardíos la proteína E1B-55K se localiza en una estructura citoplasmática adyacente al núcleo que tiene las características de un agresoma, y mediante análisis por inmunofluorescencia se ha determinado que γ -tubulina y pericentrina (proteínas de agresoma) co-localizan con E1B-55K en estas estructuras por esto, se ha sugerido que la proteína E1B-55K utiliza la vía del agresoma para facilitar la degradación de proteínas celulares [62].

2.3 E1B-55K EN LA TRANSFORMACIÓN CELULAR.

Se ha estimado que el 12% de los cánceres humanos en el mundo tienen un origen viral; sin embargo, aunque los AdV son capaces de inducir transformación celular no se ha logrado asociar la infección con cáncer en humanos. La tumorigénesis inducida por una infección viral es lenta e ineficaz, y por lo general se desarrollan tumores solo en una minoría de individuos infectados años o décadas después de la infección primaria, es por ello la mayoría de los virus no causan cáncer en su

huésped nativo, pero muchos pueden hacerlo en huéspedes donde persisten o tienen una replicación defectuosa. Por lo tanto, después del primer reporte de Trentin [63] y colaboradores donde mostraron que el AdV humano tipo 12 (HAdV-A12) puede inducir tumores malignos después de la inoculación en hámsters recién nacidos, los AdV se convirtieron en uno de los principales modelos de la virología tumoral. Los AdV brindan un excelente modelo experimental para investigar los eventos moleculares involucrados en la transformación celular. Durante los últimos 40 años múltiples estudios sobre la transformación oncogénica mediada por AdV humanos han aportado gran parte de nuestra comprensión actual sobre los mecanismos moleculares que están involucrados en el proceso. Hasta la fecha, estos estudios han demostrado que la transformación celular es un proceso de varios pasos, regulado por la cooperación de varios productos génicos adenovirales codificados en los genes tempranos (E1 y E4). El gen temprano E1A inmortaliza las células primarias de roedores, mientras que la coexpresión de la proteína E1B induce la transformación celular completa. Además de las proteínas E1, también algunas proteínas E4 tienen actividades transformadoras mediante la regulación de varias vías celulares.

La proteína E1A estimula la síntesis de DNA y la proliferación celular, lo que provoca la activación de programas de muerte celular por apoptosis dependiente e independiente de p53, que son inhibidos por los productos de los genes E1B y E4. La proteína E1B-55K bloquea la transcripción dependiente de p53 *in vitro* [64], y esta represión se correlaciona con la capacidad de E1B-55K de transformar células de roedores junto con los productos de E1A [52, 54, 55]. Se ha propuesto que el N-terminal de E1B-55K puede interactuar con p53, uniéndose a un dominio represor que inhibe la transcripción dependiente de p53 [8, 11], y los mutantes defectuosos en la unión de p53 no pueden coadyuvar con E1A en la transformación celular. Además, se ha demostrado que las modificaciones por fosforilación y SUMOilación están asociadas con la capacidad de transformación de E1B-55K [52, 53, 65].

2.4 DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES

La E1B-55K, junto con la proteína viral E4orf6 y los factores celulares cullin-5, Rbx1, elongin B y C, forman un complejo E3 ligasa de ubiquitina [31, 66] que media la degradación de proteínas celulares. Se ha propuesto que la proteína E1B-55K es la subunidad de la E3 ligasa de ubiquitina que reconoce los sustratos, ya que interacciona con diversas proteínas [65]. E1B-55K previene la respuesta al daño del DNA de doble cadena celular (DSBR) y, como consecuencia, la concatamerización de genomas virales durante la infección [67]. Entre las proteínas que son degradadas mediante la ligasa de ubiquitina están componentes de la DSBR, como el complejo MRN (Mre11, Rad50 y Nbs1) [66], la helicasa Bloom [68], la DNA ligasa IV [69], ATRX [70], p53 [31]. Además, la E3 ligasa de ubiquitina induce la degradación de otras proteínas celulares, como la proteína 60 interactiva Tat (Tip60) [71], SPOC1 [72], Tab 182 [73], integrina $\alpha 3$ [74], factores asociados-BRG1 [75]. E1B-55K también es responsable de la disminución de los niveles del represor transcripcional Daxx, independientemente de E4orf6 en células infectadas con HAdV5 [76].

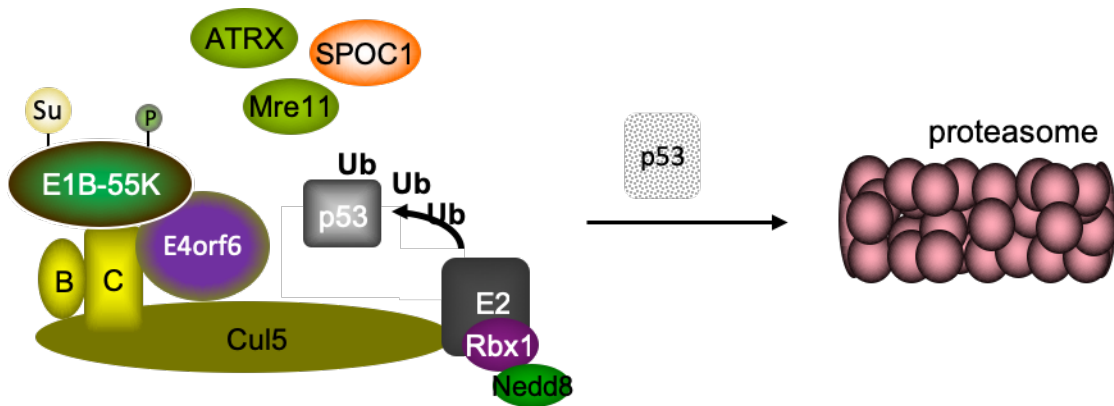


Figura 6. Representación esquemática de la E3 ligasa de ubiquitina. Las proteínas adenovirales E1B-55K-55 kDa y E4orf6 forman un complejo E3 ligasa de ubiquitina que poliubiquitina diferentes sustratos, como p53, para su posterior degradación en el proteosoma.

2.5 REPRESIÓN DE GENES ESTIMULADOS POR INTERFERON (ISG)

La E1B-55K contribuye a la regulación de las defensas antivirales del huésped. Durante la infección viral, la respuesta antiviral es inhibida por diferentes mecanismos. E1B-55K es una de las proteínas involucradas en los mecanismos de defensa celular antiviral, ya que inhibe los genes sensibles al interferón (ISG) como GBP1-5, IFIH1 (MDA5), IFIT2, MX2 y TAP1 [77], independientemente de la formación de la ligasa E3 de ubiquitina. Se ha descrito su función como inhibidor de la vía de interferón [78] y se ha propuesto un dominio de represión de los genes de interferón en el extremo C-terminal de E1B-55K (aa 443–448) [79]. Esta inhibición se correlaciona con una formación eficiente de los compartimentos de replicación (CR) virales y la promoción de la replicación del DNA viral [78].

2.6 PAPEL DE LA E1B-55K EN LOS COMPARTIMENTOS DE REPLICACIÓN

Como se describió antes, en la fase temprana de la infección la proteína E1B-55K se asocia con la proteína E4orf3 en "tracks" nucleares, estructuras con apariencia de filamentos, promoviendo la reorganización inicial de los cuerpos nucleares de PML (PML-NB)[80] y la formación de los CR. Los PML-NB son organelos sin membrana a los que se asocian proteínas en sitios discretos en el nucleoplasma [81, 82] y que están implicados en una amplia gama de procesos biológicos, como la apoptosis, la senescencia, y la defensa antiviral, entre otras, ya que concentran proteínas para favorecer modificaciones postraduccionales, como la SUMOilación y la fosforilación, regulando la actividad de proteínas en el núcleo. La proteína PML es el principal organizador de los PML-NB y forma una estructura que rodea un núcleo interno de múltiples proteínas [83]. La proteína E4orf3 induce la reorganización de componentes de PML-NB, como PML, 100 kDa speckled (Sp100), nuclear dot protein 55 (NDP55), death domain-associated protein 6 (Daxx), y small ubiquitin-like modifier (SUMO), de estructuras con apariencia de focos (puntos) a estructuras similares a filamentos a los que se asocian proteínas virales, así como las proteínas virales E1A, E1B-55K y E4orf6 [61, 84, 85]. En la fase tardía, los componentes de PML-NB y las proteínas E1B-55K y E4orf6 [49, 85] se relocalizan a los CR que están adyacentes a los filamentos nucleares de PML-

E4orf3. Como se describió antes los CR de AdV son ensamblajes complejos macromoleculares que contienen el genoma viral, proteínas virales y celulares que dirigen la replicación del DNA viral, la transcripción y el procesamiento postranscripcional de los RNAs virales. Estos sitios son compartimentos moleculares para las interacciones virus-célula huésped, donde las macromoléculas virales están protegidas de las actividades antivirales y las actividades celulares son inhibidas. La fosforilación de E1B-55K es necesaria para su localización y retención nuclear y para su asociación con E4orf6 [86-88].

2.7 INTERACTOMA DE E1B-55K

Las funciones de la proteína E1B-55K que se conocen hasta ahora se han englobado en tres grupos: como E3 SUMO1 ligasa de p53 [89]; como componente de reconocimiento de sustrato del complejo E3 ligasa de ubiquitina basado en Culina 5 [31]; y como represor transcripcional [77, 78, 90, 91]. Sin embargo, está claro que estas tres funciones no describen la multifuncionalidad conocida de la proteína. Se sabe que E1B-55K interacciona con más de 90 proteínas celulares y virales [92] asociadas con la respuesta antiviral, con el sistema ubiquitina-proteosoma, con el metabolismo del RNA y con el ciclo celular, entre otras actividades celulares. Además, como parte del trabajo de doctorado recientemente hemos determinado que la proteína interacciona con RNA virales [93], lo que promueve su papel en la transcripción y el splicing de los mRNA virales tardíos. El papel de cada una de estas interacciones en la regulación de las actividades de E1B-55K no ha sido caracterizada, pero es claro que podrían depender del estado de las modificaciones postraduccionales a las que está sujeta la proteína, como se describe más adelante.

2.8 EXPRESIÓN DE mRNA VIRALES

Durante la fase tardía de la infección la E1B-55K establece un programa de expresión génica selectiva, anteriormente se había reportado que E1B-55K era necesaria para la exportación selectiva de los mensajeros virales y la inhibición de

la exportación de mRNAs celulares al citoplasma [59], así como la inhibición de la síntesis de proteínas celulares [94], mientras que los mRNA tardíos se acumulan eficientemente en el citoplasma y son traducidos [95-101]. Se ha propuesto que el complejo de ubiquitina ligasa E1B/E4Orf6-E3 se encarga de la degradación de las proteínas celulares necesarias para la exportación de mRNA celulares sin afectar a los mRNAs virales tardíos [102, 103]. Sin embargo, evidencias recientes muestran que E1B no participa en el tránsito nucleocitoplasmático de los mRNA virales tardíos [104, 105], sino que facilita el procesamiento intranuclear de los mRNAs virales antes de su asociación con membranas nucleares y exportación al citoplasma [106]. Además, hallazgos recientes han demostrado que la mayoría de los blancos de la E3 ligasa de ubiquitina no son degradados, y que la ubiquitinación sin degradación proporciona mecanismos más rápidos para alterar las vías celulares y las respuestas del huésped [107]. Por lo tanto, la evidencia sugiere que el efecto de E1B en la biogénesis de mRNA virales podría estar en eventos intranucleares durante la transcripción, procesamiento postranscripcional o liberación de los mRNAs de los CR. Además, la posible asociación de la E1B-55K a mRNAs virales podría regular el programa de expresión de los mensajeros virales. Recientemente se confirmó mediante análisis transcriptómico el programa de expresión de mRNA virales, en estos estudios se observó el cambio en su acumulación durante la transición de la fase temprana a la tardía de la replicación viral. Sin embargo, la progresión a la fase tardía de la infección no dio como resultado la inhibición de la exportación de los mRNAs celulares; los mRNAs virales tardíos superaron en número a los mRNAs tempranos y a la mayoría de los celulares en varios órdenes de magnitud durante la fase tardía, lo que mostró que los mRNA virales tardíos no se exportan selectivamente, sino que superan la biogénesis de los mRNA celulares [108]. Recientemente encontramos que la fosforilación de E1B-55K modula las tasas tanto de síntesis, como de splicing de mRNA virales tardíos en los CR. E1B-55K promueve la liberación de mRNAs virales tardíos desde su sitio de síntesis en los CR al nucleoplasma circundante [109]; adicionalmente demostramos que la E1B-55K puede interactuar con RNA y se ha propuesto que esta interacción favorece la expresión de mRNA virales [110]. Por otra parte, recientemente se

encontró que favorecer el splicing de los mRNA virales podría ser una estrategia para evitar la respuesta celular innata a través de la proteína cinasa dependiente de dsRNA (PKR) [111]. Es importante señalar que al igual que las actividades descritas arriba, estas actividades también dependen de las modificaciones postraduccionales de E1B-55K y las interacciones que establece durante el ciclo de replicación viral. En conjunto, las evidencias muestran que la E1B-55K puede ser regulada de forma espacio-temporal, que sus actividades dependen de las interacciones que establece con diferentes proteínas y con ARN, y de su localización intracelular en diferentes tiempos del ciclo de replicación viral, lo que sugiere que las PTM a las que está sujeta la proteína son determinantes para definir diferentes estados y funciones de la proteína.

3.- ANTECEDENTES

3.1 PAPEL DE LA FOSFORILACIÓN DE E1B-55K EN EL CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL

Como se describió en la sección anterior la E1B-55K es una proteína multifuncional que está involucrada en varios pasos críticos durante las fases temprana y tardía de la infección [112, 113]. En virus mutantes que carecen de esta proteína el ciclo de replicación viral es deficiente, y se produce alrededor de 100 veces menos progenie que en células infectadas con el virus wt. Pese a lo anterior, los mecanismos moleculares en los que E1B-55K participa para favorecer la replicación del virus no se conocen con detalle. Como se mencionó antes, la evidencia hasta ahora reportada muestra que las actividades de la proteína están reguladas por sus modificaciones postraduccionales. Se sabe que la fosforilación de la E1B-55K promueve la SUMOilación de la proteína y esto favorece su localización en CR, así como sus actividades durante la infección.

Para obtener información sobre las modificaciones postraduccionales de la E1B-55K y su repercusión en el ciclo de replicación viral, se han usado distintas técnicas y estrategias experimentales. Los primeros reportes usaron marcaje radiactivo con ³²P para demostrar la fosforilación de la proteína en las serinas 490, 491 y la

treonina 495 [50, 51]. Más adelante se generaron mutantes con sustituciones en las serinas por alaninas que mostraron que la replicación viral, así como la habilidad de la proteína para transformar células primarias de rata son defectuosas. En virus mutantes con sustituciones en las serinas 490 y 491 por alaninas, la proteína es capaz de unirse a p53, pero solo se inhibe parcialmente su actividad de transactivación de p53 [51]. Posteriormente se reportó que un virus con sustituciones en la treonina 495 por alanina además de las serinas (mutante denominado ΔP) se abate completamente la capacidad represora de la E1B-55K sobre p53. Estos experimentos mostraron que la transformación por E1B-55K depende de la regulación de la fosforilación de los tres sitios de su C-terminal [52]. Experimentos posteriores con el virus mutante ΔP mostraron que la proteína no interacciona con p53, el complejo MRN o la DNA Ligasa IV, por lo que no se induce la degradación de estos blancos celulares por la E3 Ub ligasa, independientemente de que la proteína pueda seguir asociándose con E4orf6 [30, 52, 65, 114], lo que reduce drásticamente la transformación celular y disminuye la eficiencia de replicación viral [52]. Por otra parte, los virus mutantes deficientes en la fosforilación de ambas serinas (mutante AAT) no muestran defectos sobre la degradación de sustratos o la asociación de la proteína con otras proteínas virales, aunque curiosamente, la replicación viral está disminuida [30, 51, 65]. En ensayos de transfección y con virus mutantes en los que la E1B-55K no puede ser fosforilada se muestra una reducción drástica en su SUMOilación y en la localización nuclear de la proteína asociada a los CRs [55, 87, 88]. Es claro que existe una interrelación entre las modificaciones por fosforilación y SUMOilación de la proteína, sin embargo, no se conoce en qué estados de fosforilación la proteína realiza cualquiera de sus actividades, ni qué efecto tiene la fosforilación de cada uno de los tres residuos sobre la proteína. La fosforilación diferencial de los tres sitios podría funcionar como un interruptor molecular que regula el estado de modificación y las funciones de la proteína durante el ciclo de replicación viral.

Aunque el mecanismo por el cual se regula la fosforilación de E1B-55K no se conoce, se ha determinado que CK2 α fosforila las serinas 490 y 491 [86] y por análisis de secuencia se ha sugerido que CK1 y GSK3 podrían fosforilar la treonina

495. Los miembros de la familia CK1 generalmente tienen carga positiva, por lo que típicamente se asocian con residuos ácidos, siendo las secuencias blanco consenso: D-X-X-S/T y pS/pT-X-X-S/T, y muy comúnmente éstas se encuentran en los últimos aminoácidos del C-terminal (-1 a -5) del sitio fosfoaceptor [115, 116]. La proteína E1B-55K tiene un dominio ácido en el extremo C-terminal que es idéntico a la secuencia consenso de reconocimiento para CK1 (SSDEDTD). Adicionalmente estos aminoácidos también se ajustan moderadamente bien a la secuencia blanco de GSK3. La glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) es una cinasa con características no convencionales para la fosforilación y generalmente tiene como blanco la secuencia consenso pS/pTXXXS/T y S/TXXXpS/pT. Sus sustratos generalmente necesitan ser fosforilados previamente por otra cinasa en el residuo de serina/treonina del extremo C-terminal [117]. Datos de nuestro grupo (Sollano Mendieta, 2014 y Raúl López 2015) sugieren que la fosforilación de la E1B-55K es necesaria para su localización intracelular asociada a CR y para la producción de progenie viral. Para esto, se usaron mutantes de AdV con sustituciones en los sitios sujetos a fosforilación en la proteína E1B-55K (serina 490, 491; treonina 495). La sustitución de cada residuo por alanina resulta en que la fosforilación en cada sitio no puede ocurrir y por el contrario la sustitución de cada residuo por ácido aspártico resulta en que fisicoquímicamente se mimetiza un estado fosforilado por la carga negativa del ácido aspártico. Para estos experimentos se construyeron los siguientes virus: El virus llamado AAT, en el que las serinas 490 y 491 fueron sustituidas por alaninas (S490A/S491A); el virus Δ P en donde las serinas 490, 491 y la treonina 495 fueron sustituidas por alaninas (S490A/S491A/T495A); el virus PM donde los tres sitios fueron sustituidos por ácido aspártico (S490/S491/T495); el virus DDT donde las serinas fueron sustituidas por ácido aspártico (S490D/S491D). El uso de estos mutantes permitió determinar que cuando la proteína no puede ser fosforilada en las serinas y treonina, la E1B-55K no se localiza eficientemente en CR y la degradación de p53 no se induce. Algunas observaciones muy interesantes de estos experimentos han sido que en el mutante S490A/S491A/T495A, la síntesis de DNA viral y la producción de progenie son deficientes, mientras que cuando sólo las serinas 490 y 491 no pueden ser fosforiladas (S490A/S491A), la localización de

la proteína es similar a la proteína wt y la síntesis de DNA es eficiente, pero la producción de progenie es deficiente. En contraste, cuando se mimetiza el estado fosforilado de las serinas y treonina, al sustituirlas por aspartato en el virus PM, la E1B-55K se localiza más eficientemente en CR que la proteína wt, la p53 es degradada eficientemente y la producción de progenie viral es más eficiente que en el virus wt. Adicionalmente, mediante ensayos de complementación que consisten en infectar células con un virus mutante que no expresa la E1B-55K (E1B -) y posteriormente complementar mediante la transfección de un plásmido que dirige la expresión de E1B-55K con sustituciones en los sitios de fosforilación, se observó que tras la complementación con la E1B-55K en la que la treonina 495 fue sustituida por aspartato se rescata el fenotipo wt (Sollano Mendieta, 2014). En conjunto estas observaciones sugieren que la fosforilación en la treonina 495 es determinante para las funciones de la E1B-55K.

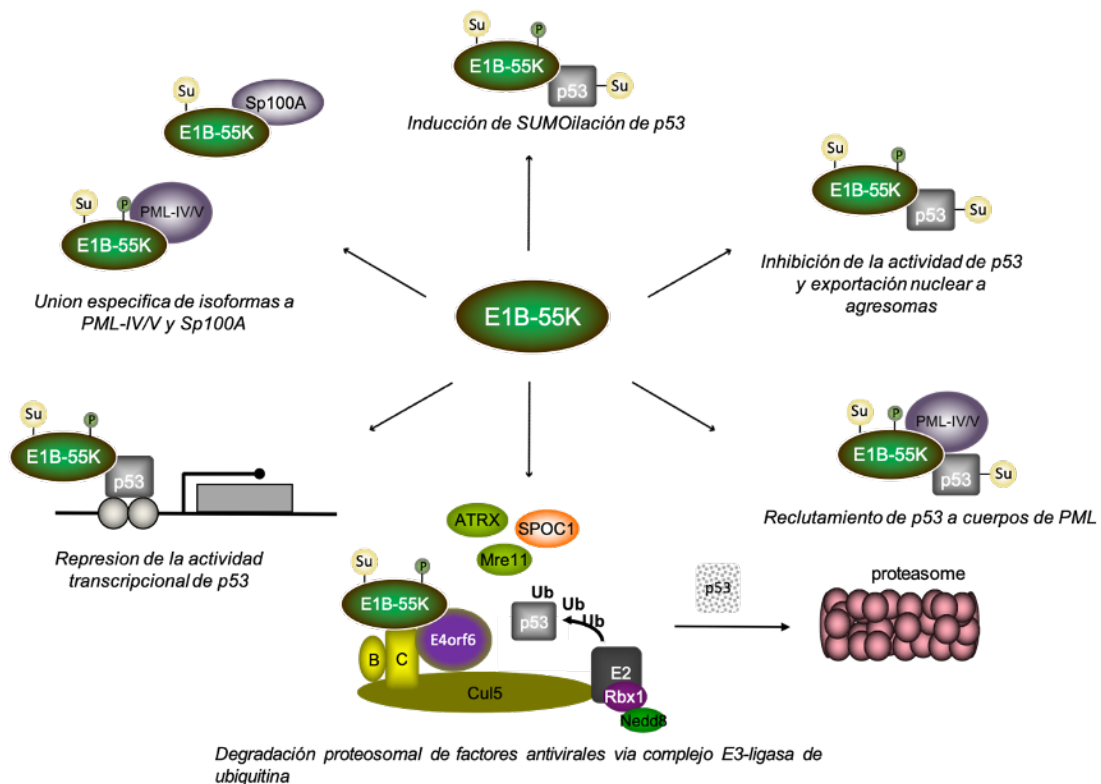


Figura 6. Resumen de actividades de E1B-55K. La proteína E1B-55K tiene múltiples roles y se ha propuesto que sus actividades son reguladas por modificaciones postraduccionales, la figura ejemplifica algunas de ellas.

Como se mencionó antes una actividad de la proteína E1B-55K es la de represor transcripcional y recientemente datos obtenidos por análisis transcriptómico de células infectadas con AdV sugieren que la E1B-55K inhibe la expresión de un número importante de genes celulares, la mayoría de ellos están involucrados en la respuesta antiviral de la célula, particularmente la respuesta mediada por interferón tipo 1. Se ha sugerido que la E1B-55K es necesaria para bloquear la inhibición de la progresión del ciclo de replicación mediada por interferón, ya que en ausencia de la E1B-55K la replicación del genoma viral se ve disminuida [78]. El tratamiento con esta citocina no interfiere con la síntesis de proteínas virales necesarias para la replicación, sino que bloquea la formación adecuada de CR, que como se ha descrito arriba son estructuras especializadas en la replicación y expresión del genoma viral. El mecanismo por el cual la E1B-55K reprime la transcripción de genes específicos se desconoce y aunque, como se describió arriba, se sabe que la fosforilación de la E1B-55K es determinante para sus actividades, hasta el momento el efecto de estas modificaciones sobre la regulación de la expresión de los genes de respuesta a interferón o sobre la expresión o replicación del genoma viral, no se han reportado.

Datos de nuestro grupo de investigación muestran que la inhibición de estos sitios de fosforilación resulta en la disminución de diferentes actividades de la proteína E1B-55K en el ciclo de replicación viral como la producción eficiente de progenie y la localización intracelular de la proteína. Esto sugiere que la fosforilación en las serinas 490/491 y/o en la treonina 495 tiene efectos distinguibles sobre sus actividades, por lo que diseñar combinaciones de mutantes en estos sitios llevaría a obtener información del efecto de la fosforilación sobre sus actividades.

Como se mencionó anteriormente la E1B-55K es fosforilada en las serinas por CK2 mientras que la treonina está en un sitio consenso para CK1. Sin embargo, no se sabe si la fosforilación de cada uno de estos residuos está regulada o si existe un orden cronológico secuencial en la fosforilación de cada uno de los residuos y si existe algún efecto (positivo o negativo) de uno de los sitios sobre los otros y sobre las actividades de la proteína durante el ciclo de infección.

Por lo anterior resulta indispensable diseñar experimentos que permitan identificar el efecto de la fosforilación en serinas y/o treonina sobre las actividades de la proteína, además de identificar la(s) cinasa(s) responsables de su fosforilación. Dada la evidencia que se ha reportado la fosforilación de la E1B-55K favorece su SUMOilación y en este estado la E1B-55K puede permanecer mayoritariamente en núcleo donde puede funcionar como una SUMO ligasa para algunos blancos celulares [89] y esto favorece el reclutamiento de proteínas celulares y virales a estos sitios, sugerimos que la fosforilación de E1B-55K favorece la organización y formación de los CR virales. Por esto, es necesario realizar experimentos que permitan obtener información acerca de la organización nanoscópica de los CR viral durante la infección.

Con el fin de identificar el efecto de la fosforilación de E1B-55K sobre sus actividades durante el ciclo de replicación viral, así como el efecto de las modificaciones individuales en las serinas y treonina sobre la modulación de la fosforilación de los otros residuos, en el presente trabajo analizamos el efecto de la fosforilación de la serina 490, 491 y la treonina 495 de E1B-55K sobre las actividades de la proteína adenoviral en diferentes tiempos del ciclo de replicación viral.

4.- HIPÓTESIS

La fosforilación diferencial de serinas 490, 491 y treonina 495 en la E1B-55K tiene efectos distinguibles en sus actividades durante el ciclo de replicación viral.

5.- OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL:

- Determinar el efecto de la fosforilación de las serinas 490/491 y treonina 495 de E1B-55K sobre sus actividades durante el ciclo de replicación viral.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar el efecto de la interacción de la E1B-55K con RNA durante el ciclo de replicación de HAdV-5.
- Determinar el efecto de la sustitución de las S490, S491 y T495 de E1B-55K sobre:
 - La producción de progenie viral.
 - La fosforilación de los otros sitios en E1B-55K
 - El orden de fosforilación.
 - La organización y formación de CR.
 - La localización intracelular de la proteína E1B-55K durante el ciclo de
 - La eficiencia de síntesis de DNA viral.
 - La transcripción y splicing en CR.
 - La regulación de promotores virales.
- Determinar si las cinasas CK1, CK2 y GSK3 son responsables de la fosforilación de la E1B-55K.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Células.

Células HFFs (Fibroblastos derivados de prepucio humano) se cultivaron en medio Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco-Invitrogen™) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco-Invitrogen™) en pases no mayores a 13. Las células HEK-293 (derivadas de células embrionarias humanas de riñón, transformadas con la región E1 de Ad) se cultivaron en DMEM suplementado con 5 % de suero bovino (SB, Biowest™). Las células 2E2 (derivadas de células embrionarias humanas de riñón, transformadas con la región E1, E2 y E4 de HAdV5 HEK-293) se cultivaron en DMEM suplementado con 5 % SB (SB, Biowest™). Las células HeLa (derivadas de células de cáncer cérvico uterino) se cultivaron en DMEM suplementado con 5 % SB (SB, Biowest™); todas las células se mantuvieron a 37°C con 5 % de CO₂.

6.2 Anticuerpos.

Los anticuerpos primarios utilizados para Western blot e inmunofluorescencia fueron los siguientes: el anticuerpo (Ab) específico para Ad5 DBP monoclonal de ratón (mAb) B6-8 [118], el anticuerpo monoclonal de ratón anti-E1B 2a6 [119], el anticuerpo policlonal de conejo anti-CTCF (Millipore), el anticuerpo monoclonal de rata E4orf3 6A11, el anticuerpo monoclonal de conejo anti-SUMO2/3 (18H8, Cell Signaling Technology), el anticuerpo monoclonal de conejo anti-YB1 (EP2706Y, Millipore), el anticuerpo monoclonal de conejo anti-Tap (EPR8009, Abcam), el anticuerpo monoclonal de ratón anti-BRCA1 (Novus Biological), el anticuerpo anti-ratón fosfoserina (PS-45 Abcam), el anticuerpo anti-conejo fosfotreonina (Rabbit 9381 Cell signaling). El anticuerpo secundario utilizado para Western blot fue un anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano anti-ratón (HRP) y anti-conejo (Jackson ImmunoResearch) y para análisis de inmunofluorescencia, los anticuerpos Alexa Fluor 405, 488 y 568 (todos de ThermoScientific).

6.3 Inhibidores

Para el tratamiento con inhibidores de cinasas, se agregó DMAT (2-dimetilamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-bencimidazol; SML2044 Sigma), CK1-7 (C0742 Sigma) y/o

BIO (ab120891 Abcam) al cultivo celular 4 h.p.i. a una concentración final de 5 μ M, 5 μ M y 10 μ M, respectivamente.

6.4 Construcción de virus

Los AdV mutantes se derivaron de la cepa de AdV H5pg4100 [88]. El genoma de HAdV5 se modificó y propagó en *Escherichia coli* dentro del plásmido p15A de bajo número de copias. Los genomas virales con sustituciones en los sitios de fosforilación fueron purificados y se generaron mutaciones mediante recombinación homóloga en un sistema de selección ccdB [120]. Los genomas fueron purificados y utilizados para transfección en células Hela con Lipofectamina 3000 (Thermo). Se monitoreó el efecto citopático por un lapso de 6 días post transfección; al término de este tiempo las células fueron lisadas y los lisados fueron titulados por conteo de focos fluorescentes. Las rondas de amplificación se repitieron hasta obtener lisados con títulos virales altos, posterior a esto se enviaron a secuenciar para confirmar la mutación. Para la confirmación mediante secuenciación se infectaron células HeLa y se extrajo el DNA como se describe en materiales y métodos. Con este DNA se realizó un PCR para amplificar una región de 212 nucleótidos dentro de la cual se encuentran las mutaciones originadas.

En todos los experimentos se utilizaron AdV tipo 5 wt (Ad5-H5pg4100 y Ad5-H5pm2250), el virus Ad5-H5pg4100 es idéntico en secuencia y fenotipo al virus Ad5 wt (GenBank no. AY339865), excepto que carece de una porción de la región E3 (nt 28593 – 30471) y contiene un sitio único de restricción para BstBI (nt 30955); el virus wt (Ad5-H5pm2250), posee la región E3 en el fondo del H5pg4100. Estos virus wt son fenotípicamente indistinguibles en células en cultivo. Además, en los experimentos se usaron los siguientes virus recombinantes: Para entender la asociación de la E1B-55K con RNA, se diseñaron los siguientes virus recombinantes mutantes en esta región: C288S, C288A, W289F y Δ 284-289. Para el estudio del impacto de las modificaciones por fosforilación sobre sus actividades se utilizaron los siguientes virus: virus AAT, en el cual las Ser 490 y 491 fueron sustituidas por alaninas (S490A/S491A), por lo cual estos sitios no pueden ser fosforilados; el virus

DDT, en el cual las Ser 490 y 491 fueron sustituidas por ácido aspártico (S490D/S491D), mimetizando el estado fosforilado de los 2 sitios; los virus SSA y SSD que presentan sustituciones en la treonina 495 por alanina y ácido aspártico, respectivamente; mutantes sencillos en serinas por alanina o por ácido aspártico, AST, SAT, DST y SDT. Estos virus fueron construidos en el fondo genético de wt 2250. El virus ΔP (S490/491/T495A) en el que los tres sitios de fosforilación fueron sustituidos por alaninas; y el virus PM (S490/491/T495D) en el cual los tres sitios de fosforilación fueron sustituidos por ácido aspártico habían sido construidos en el fondo genético del virus wt 4100 (Tabla 1). Todos los virus fueron amplificados en células HEK293, utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 unidades formadoras de focos (UFF)/célula. A las 48 h.p.i las células se cosecharon con gendarme y se centrifugaron a 4,300 rpm durante 5 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 100 µl de solución IV USB (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 0.1% w/v dextrosa). Después se lisaron las células para liberar las partículas virales mediante cambios bruscos de temperatura, 5 min en nitrógeno líquido y 10 min a 37°C (3 veces); posteriormente se centrifugó a 13,500 rpm durante 5 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo; los virus se titularon por microscopía de focos fluorescentes.

A)

Virus	Mutación
wt	S490/S491/T495
DDD-PM	S490D/S491D/T495D
AAA-ΔP	S490A/S491A/T495A
DDT	S490D/S491D/T495
AAT	S490A/S491A/T495
SSD	S490/S491/ T495D
SSA	S490/S491/ T495A
DST	S490D/S491/T495
AST	S490A/S491/T495
SDT	S490/ S491D/T495
SAT	S490/ S491A/T495
AAD	S490/S491/ T495D

B)

```

480           491
|             |
VLACTRAEFGS SDEDTD
.....D D...D.
.....A A...A.
.....D D.....
.....A A.....
.....      ....D.
.....      ....A.
.....A .....
.....D .....
.....A.....
.....D.....
.....A A...D.

```

Tabla 1. AdV mutantes. A) La tabla muestra el nombre de cada virus y las modificaciones en el C terminal, las negritas indican el aminoácido sustituido por alanina o aspártico. El panel B) muestra la secuencia y el contexto de aminoácidos en los que se encuentran estas sustituciones.

6.5 Microscopía de inmunofluorescencia.

Se utilizaron ensayos de microscopía de inmunofluorescencia para titular los stocks de virus Ad5 wt y mutantes, por conteo de focos fluorescentes (en células HEK-293), así como para determinar la localización intracelular de las proteínas p53, E1B-55K y E4orf3 en células HFF infectadas. Se sembraron células HFF en cajas de 12 pozos sobre cubreobjetos previamente lavados con etanol absoluto y esterilizados por autoclave. Las células fueron fijadas a las 16 y 36 h.p.i con 1 ml por pozo de formaldehído al 3.7% en PBS durante 20 min a TA, se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS por pozo (cada lavado de 10 min en agitación), se permeabilizaron con 1 ml por pozo de Tritón X-100 0.5%/PBS durante 5 min a TA sin mover y posteriormente se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS por pozo; se adicionó 300 µl por pozo del anticuerpo primario a la dilución indicada con PBS para cada anticuerpo y se incubó toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-E1B-55K (2a6), 1:500; anti-p53 (ab32049 BioLegend), 1:1000, anti-DBP (B6-8), 1:500 y anti-E4orf3 (6A11), 1:500. Después de incubar con el anticuerpo primario se hicieron 3 lavados con 1 ml de PBS por pozo, y se adicionó 300 µl por pozo del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 488, Alexa 568 o Alexa 680 en una dilución 1:1,500 (Jackson Inmuno Research), se incubó por 2 hrs a TA en agitación; posteriormente se hicieron 3 lavados con 1 ml de PBS por pozo y se agregó 1 ml por pozo de DAPI 0.1 µg/mL; se hizo un lavado con PBS por 5 min en agitación y después se montaron los cubreobjetos sobre glicerol 10%/PBS en portaobjetos y se sellaron con barniz. Las laminillas se mantuvieron a -20°C y se analizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia (Axiovert 200M, Carl Zeiss Inc.).

6.6 Ajuste de elipses para la detección automática de CRs.

Se utilizó un algoritmo automático, determinista y no iterativo que desarrollamos recientemente para detectar simultáneamente múltiples centros de replicación viral mediante el ajuste de elipses, con el fin de comparar el área de los centros de replicación en células infectadas con Ad WT, E1B o E1B PM. Los detalles sobre el

algoritmo, así como los procedimientos de validación, se describen en [121].

6.7 Predicción de Desorden

Se utilizó la secuencia de la proteína viral E1B-55K que se encuentra registrado en NCBI bajo el número de referencia QBM91913.1, junto con varios predictores de desorden, incluyendo PONDR® pool (PONDR® VLXT, PONDR® VL1_XT, PONDR® VL3-BA, PONDR® VSL2), IUPRED (<https://iupred2a.elte.hu/>) y DISOPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), con el fin de predecir la presencia de desorden en las proteínas. Se calculó el promedio de las predicciones obtenidas de estos seis predictores para identificar las áreas que mostraran un desorden intrínseco. Se consideraron como regiones desordenadas de interés en nuestro análisis aquellas en las cuales al menos 30 aminoácidos tuvieran valores de predicción de desorden promedio superiores a 0.5.

6.8 Microscopía de contraste de fase, microscopía de inmunofluorescencia y análisis de superresolución.

Se utilizó la microscopía de contraste de fase con un objetivo de 40x o 60x, según se indica, para monitorear las preparaciones de fracciones subnucleares. Para la inmunofluorescencia, las células HFF cultivadas en portaobjetos hasta alcanzar aproximadamente un 90% de confluencia fueron infectadas con Ad5. Las células se procesaron para la inmunofluorescencia como se describe arriba. Después de la aplicación de anticuerpos primarios específicos, las células se incubaron con anticuerpos secundarios. Los portaobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio en PBS/10% de glicerol y las muestras se examinaron utilizando un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200M, con un objetivo de inmersión en aceite de 63x/1.4 de apertura numérica, para la adquisición de imágenes se utilizó una cámara AxioCam MRM y software Axiovision 3.1 (Carl Zeiss, Inc.). Las células se examinaron utilizando un microscopio invertido Olympus IX-81, con un objetivo de inmersión en aceite de 100x/1.49 de apertura numérica, con una lente de magnificación

intermedia adicional de 1.6x, con una cámara de dispositivo de carga acoplada de multiplicación de electrones (EMCCD) (iXon 897, Modelo No: DU- 897E-CS0-#BV; Andor)

6.9 Titulación por conteo de focos fluorescentes.

Los virus fueron titulados en células HFF, las cuales fueron infectadas al 90% de confluencia con diluciones seriadas de los stocks de virus utilizando diluciones desde 1×10^{-1} , hasta 1×10^{-6} . Posteriormente las células se fijaron a las 24 hpi y se prepararon para su análisis por inmunofluorescencia como se describió antes; como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo monoclonal B6-8 dirigido contra la proteína de AdV DBP, a una dilución 1:500 en PBS, y como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 488 (Jackson Inmuno Research) a una dilución 1:1,500 en PBS. El análisis de las muestras se realizó por microscopía de fluorescencia usando el objetivo 20X. Se tomaron fotos de 6 campos aleatorios en cada dilución, a partir de los cuales se determinó el porcentaje de células infectadas. El título de cada stock viral se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{Título en } \frac{\text{UFF}}{\text{ml}} = (\text{Número de células infectadas}) \times (\text{Dilución}^{-1}) \times (1\text{mL}/\text{Volumen inicial de lisado})$$

$$\text{Donde } \frac{\text{UFF}}{\text{ml}} = \text{Unidades formadoras de focos por mililitro}$$

6.10 Análisis de la eficiencia de replicación viral.

Se infectaron células HFF con el virus wt o con cada uno de los virus recombinantes utilizando una MOI de 30 UFF/célula, y se cosecharon a las 36 h.p.i como se describe arriba. Los lisados fueron titulados por focos fluorescentes para determinar la eficiencia de producción de progenie. Se sembraron células HFF en cajas de 12 pozos sobre cubreobjetos y se infectaron con diluciones de 1×10^{-1} a 1×10^{-6} de cada virus; las células se fijaron con formaldehído al 3.7%/PBS a las 36 hpi y se prepararon para inmunofluorescencia como se describió antes para posteriormente

titularlos por conteo de focos fluorescentes.

6.11 Análisis de la síntesis de DNA viral por PCR cuantitativo.

Se infectaron células HFF con el virus wt o mutantes y se cosecharon a las 4, 12, 16, 24 y 36 h.p.i. Las células se trataron con proteinasa K (1 mg/ml) y Tween 20 (1:200) en agua MQ estéril. Se incubó a 55°C por 1 h y 10 min a 95°C. El DNA se precipitó con 1/10 de acetato de sodio 3M pH 5.2 y un volumen de isopropanol, incubando a 4°C toda la noche. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4°C y lapastilla se resuspendió en 20 µl de Tris pH 7.4 10 mM. El DNA se cuantificó por espectrometría utilizando un NanoDrop™ (Ver anexo tabla 2).

Para el análisis cuantitativo de la síntesis de DNA, se utilizó el sistema de detección SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para la amplificación de las copias de DNA viral, se utilizaron 50 ng del molde (DNA), 1X del Master Mix del kit (SYBR® Green I Dye, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase UP, dNTPs, referencia pasiva (ROX) y componentes optimizados de buffer). Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo StepOne (Applied Biosystems). Para cada par de primers se hicieron controles sin muestra molde (NTC) para verificar que no existía amplificación por formación de estructuras secundarias entre los primers. Además, se hicieron curvas con diluciones 1:5 partiendo de 50 ng totales de DNA de la muestra de wt para verificar que la eficiencia de amplificación de todos los pares de primers utilizados fuera similar. El análisis se realizó utilizando dos experimentos independientes para cada virus, y cada muestra se cuantificó por triplicado. Los resultados, así como el análisis estadístico se realizó mediante el software Graph Prism 8.

6.12 Inmunoprecipitación.

Las muestras de proteína fueron preparadas como se describe en la sección de western blot. Los lisados totales de células infectadas se preaclaaron como sigue: Para aproximadamente 1 ml de lisado de células se usó 0.25 µg de Proteína A Sepharosa® de (Thermofisher) y se incubó por 1 hora a 4°C en movimiento.

Posterior a la incubación las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm (1,000 g) durante 1 minuto a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf a 4°C, se agregó el anticuerpo primario 2A6 de ratón en una dilución 1:50 y se incubó durante toda la noche en movimiento a 4°C. Posteriormente se agregó Proteína A Sepharosa® y se incubó durante 1 hr a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm (1,000 g) durante 1 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. La sepharosa fue lavada 3 veces con 1 ml de RIPA (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM, desoxicolato de sodio al 0,5 % (p/v), Nonidet P-40 0.5% (NP-40) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM) y después del lavado final se desechó el sobrenadante; se resuspendió en buffer de carga (bromophenol blue, 0.004%, DTT, 400 mM, glycerol, 20%, SDS, 4% y TRIS, 0.125 M con 10 % beta-mercaptoetanol) y se incubaron a 95°C durante 5 min. Finalmente, las muestras fueron analizadas inmediatamente por westernblot, cada uno de los resultados mostrados fueron al menos 3 experimentos independientes.

6.13 Western blot.

Para los ensayos de inhibición y estado de fosforilación de la E1B-55K, se cosecharon células HFF infectadas con MK o Ad a las 24 horas después de la infección (hpi). Para la inmunotransferencia, los geles se transfirieron a membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF) (Millipore) y se incubaron según se describe en estudios previos [122]. Las membranas se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con BSA al 3% y se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios (2a6 1:50, PS-45 1:500, 9381 1:250). Después de lavados sucesivos con TBS/0.1% Tween20, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a HRP durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia mejorada según las recomendaciones del fabricante (Pierce, Thermo Fisher Scientific) y las bandas se visualizaron en películas de rayos X (Kodak).

6.14 Análisis de densitometría.

Las imágenes de electroforesis en gel de DNA y RNA, así como las películas de Western blot (WB), se analizaron mediante densitometría utilizando ImageJ [123] . Graph Prism se utilizó para graficar los datos y para el análisis estadístico mediante la prueba t de student.

6.15 Microscopía de super resolución.

Para los ensayos de microscopía de súper resolución, las células se montaron en cubreobjetos y se trataron como se describió anteriormente. Todas las mediciones de imágenes de súper resolución se realizaron en un microscopio invertido Olympus IX-81 configurado para la excitación de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF) (Olympus, cell TIRFTM Illuminator) del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA-UNAM). El ángulo crítico se configuró de tal manera que el campo de evanescencia tenía una profundidad de penetración de ~ 200 nm (software Xcellence v1.2, solución de imágenes blandas de Olympus GMBH). Las muestras se iluminaron continuamente utilizando fuentes de excitación en función del fluoróforo utilizado. Los fluoróforos azul (Alexa Fluor 488) y amarillo (Alexa Fluor 568) se excitaron con un láser de estado sólido bombeado por diodos de 488 nm o de 561 nm. La selección del haz y la modulación de las intensidades del láser se controlaron a través del software Xcellence v.1.2. Se utilizó un conjunto completo de cubos láser multibanda para discriminar las fuentes de luz seleccionadas (LF 405/488/561/635 A-OMF, línea brillante; Semrock). La fluorescencia se recolectó utilizando una lente objetivo de inmersión en aceite de apertura numérica Olympus UApo N 100x / 1.49 con una lente de ampliación intermedia adicional de 1.6x. Todas las secuencias de imágenes se adquirieron en una región de 65×65 píxeles de una cámara EMCCD (iXon 897, número de modelo: DU-897E-CS0- # BV; Andor) a 100 nm por píxel. Las imágenes de sub-difracción se derivaron del análisis bayesiano de los colorantes centelleantes y blanqueadores estocásticos de Alexa Fluor. Para cada reconstrucción de súper resolución, se adquirieron 300 imágenes a 37 Hz con un tiempo de exposición de 23 ms, a plena potencia del láser. La potencia máxima del láser que sale de la fibra óptica, medida en el plano focal posterior de la lente

objetivo, para las líneas láser de 488 nm y 561 nm fue de 23.1 mW y 19.1 mW, respectivamente. Para las figuras 13 a la 18 Las secuencias de imágenes se introdujeron en el complemento de análisis de microscopía 3B de Image J y para la figura 19 se utilizó el complemento SRRF de Fiji, considerando un tamaño de píxel de 100 nm y un ancho máximo de la mitad de la función de dispersión de puntos de 270 nm (para Alexa Fluor 488) y 290 nm (para Alexa Flour 568), ambos medidos experimentalmente con perlas fluorescentes de 0.17 μm (kit de fuente de punto de microscopio PS-SpeckTM, Molecular Probes, Inc.). Todos los demás parámetros se configuraron como valores predeterminados. El análisis se realizó en 200 y 100 iteraciones, según lo recomendado, y las reconstrucciones finales de resolución superior se crearon a un tamaño de píxel de 10 nm. La resolución espacial observada en la imagen configurada por el análisis fue de aproximadamente 50 nm.

6.16 Plásmidos y transfecciones transitorias.

Las proteínas Ad E1B se expresaron a partir de sus respectivos DNA complementarios bajo el control del promotor inmediato temprano del citomegalovirus derivado del vector pcDNA3 (Invitrogen) para producir Ad WT E1B 55K [124] o E1B 3XPD (S490/491D, T495D) (pE1BPM). Las construcciones de los promotores se basaron en el vector pGL3-basic (Promega). Para las transfecciones transitorias, las células subconfluentes se trataron con una mezcla de transfección de DNA y polietilenimina lineal de 25 kDa, como se describe [125].

6.17 ensayos de luciferasa.

Células subconfluentes H1299 se cotransfectaron con un plásmido pGL3 que porta el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor HAdV5 E1A; un plásmido pRenilla que expresa la luciferasa de Renilla; y un plásmido pcDNA que dirige la expresión de E1B-55K WT, o las proteínas mutantes SSA o SSD. Paralelamente, las células transfectadas se infectaron con el virus H5pm4149 (E1B-). La actividad del promotor se analizó con lisados celulares totales en el Dual-

Luciferase® Reporter 1000 Assay System, usando un luminómetro automatizado (Pharmingen Monoluz 3010). Las muestras se normalizaron para la eficiencia de la transfección midiendo la actividad Renilla-luciferasa del plásmido pRenilla cotransfectado. Todos los experimentos mostrados se realizaron en triplicado y los datos se presentan como valores medios con la desviación estándar correspondiente utilizando GraphPad Prism.

6.18 Preparación de fracciones subcelulares y subnucleares de células HFF infectadas.

Para aislar las fracciones citoplasmáticas y nucleares, las células HFF infectadas con Ad5 se fraccionaron esencialmente según un procedimiento diseñado para aislar nucleolos descrito previamente [126] y adaptado recientemente [127], con las siguientes modificaciones [127]: Todos los procedimientos se llevaron a cabo en hielo, excepto cuando se indica. Las células HFF se cultivaron en cultivos de monocapa hasta un 90% de confluencia. Las células infectadas con Ad5 o no infectadas se cosecharon en los tiempos indicados después de la infección y se lavaron con PBS frío (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ y 1.8 mM de KH₂PO₄). Para romper la membrana celular, 1×10^7 células se resuspendieron en un tampón hipotónico frío (10 mM de HEPES pH 7.9, 10 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 mM de DTT, 20 µg/ml de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de pepstatina A y 10 µg/ml de leupeptina). Después de una hinchazón extensa, las membranas celulares se lisaron mediante 80 golpes con un homogeneizador de Dounce, monitoreado constantemente por microscopía de contraste de fase para garantizar la lisis completa de la membrana celular evitando dañar los núcleos. El homogeneizado celular se centrifugó a $300 \times g$, 4°C durante 5 minutos y el sobrenadante que contenía la fracción citoplasmática (CYT) se almacenó a -20°C. Para eliminar los restos celulares de los núcleos, el pellet se resuspendió en solución 1 (S1) (0.25 M de sacarosa, 10 mM de MgCl₂, 20 µg/ml de PMSF, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de pepstatina A y 10 µg/ml de leupeptina) y se colocó sobre un volumen igual de solución 2 (S2) (0.35 M de sacarosa, 0.5 mM de MgCl₂, 20 µg/ml de PMSF, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml

de pepstatina A y 10 µg/ml de leupeptina), y se centrifugó a $1,400 \times g$, 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante contenía restos celulares y el pellet que contenía los núcleos aislados (NUC) se resuspendió en S2 y se almacenó a -20°C. Para aislar fracciones subnucleares enriquecidas con el CR del adenovirus (fracciones CR), los núcleos se sonicaron con un baño ultrasónico Branson 1510, utilizando dos pulsos de 5 minutos, hasta que se observó que todos los núcleos se lisaban según se observó por microscopía de contraste de fase. Luego, los núcleos sonicados se colocaron sobre un volumen igual de solución 3 (S3) (0.88 M de sacarosa y 0.5 mM de MgCl₂) y se centrifugó a $3,000 \times g$, 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante que contenía la fracción nucleoplásmica (Npl) y el pellet que contenía las fracciones CR o fracción nucleolar (Nlo, en células no infectadas simuladas) se almacenaron a -70°C. Se muestran datos de tres experimentos independientes en todos los procedimientos cada uno con triplicados internos.

6.19 Ensayos de replicación de ADN en CRs aislados.

Se evaluó la actividad de la polimerasa de ADN asociada a las fracciones de los complejos de replicación en dos experimentos independientes, utilizando muestras en triplicado. Las fracciones de los complejos de replicación se incubaron durante 30 minutos a 30 °C en una solución compuesta por 200 mM de sulfato de amonio, 40 mM de Tris-HCl con pH 7.9, 5 mM de MgCl₂, 3 mM de ditioneitol (DTT), 50 µM de cada desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) y 1 mM de ATP (modificación basada en [128]). Posteriormente, la síntesis de ADN se determinó mediante la amplificación de una región del genoma adenoviral dentro de la secuencia TPL mediante PCR. En el caso del ADN celular, se emplearon cebadores específicos para el ARN ribosómico 18S y el ARN pequeño nuclear U1 snRNA. Los productos amplificados mediante PCR se separaron en geles de agarosa y se cuantificaron mediante densitometría. Se utilizó una concentración de 100 ng/ml de Actinomicina D (ActD) para inhibir la replicación del ADN. Los ensayos de replicación se llevaron a cabo con muestras duplicadas obtenidas de dos experimentos independientes, y los datos se sometieron a análisis mediante la prueba t de Student.

6.20 Ensayos de transcripción en CRs aislados.

Se analizó la actividad de transcripción en las fracciones de complejos de replicación en dos experimentos independientes, utilizando muestras duplicadas. Las fracciones de los complejos de replicación se incubaron durante 10 minutos a 37 °C en una solución que contenía 200 mM de sulfato de amonio, 80 mM de Tris-HCl con pH 7.9, 2 mM de MnCl₂, 0.05 mM de DTT y 1 mM de cada trifosfato de ribonucleósido (NTP) (modificado según [129]). Posteriormente, se aisló el ARN utilizando el reactivo Trizol, siguiendo los procedimientos previamente descritos, y se verificó la ausencia de contaminación de ADN. La síntesis de ARN se determinó mediante RT-PCR utilizando cebadores virales específicos dentro de la secuencia TPL, así como cebadores celulares para el ARN mensajero de actina y el ARN ribosómico 18S. Los productos de PCR amplificados se sometieron a 20 ciclos de amplificación para evitar la saturación de la señal. Se empleó una concentración de 25 µg/ml de Actinomicina D (ActD) para inhibir la transcripción. Los ensayos de transcripción se realizaron utilizando muestras duplicadas obtenidas de dos experimentos independientes, y los datos se analizaron mediante la prueba t de Student.

6.21 Ensayos de splicing en CRs.

Se evaluó la actividad de empalme asociada a las fracciones de complejos de replicación en dos experimentos independientes, utilizando muestras duplicadas. Las fracciones se incubaron durante 90 minutos a 30 °C en una solución que contenía 1 mM de ATP, 20 mM de fosfato de creatina (CP), 3.2 mM de MgCl₂, 0.25 U/µl de RiboLock (ThermoScientific), 1 mM de DTT, 72.5 mM de KCl y 12 mM de HEPES-KOH a pH 7.9 (modificación basada en [130]). Posteriormente, se aisló el ARN y se verificó la ausencia de contaminación de ADN. La actividad de empalme de pre-ARN se determinó mediante RT-PCR utilizando cebadores que se unen a las uniones de empalme dentro de la secuencia TPL (para el ARN viral) y dentro del ARN mensajero de actina (para el ARN celular). Los productos de PCR amplificados

se sometieron a 25 ciclos de amplificación para evitar la saturación de la señal. Se utilizó una concentración de 500 μM de eritromicina (Ery) para inhibir el empalme, como se ha informado previamente [131]. Los ensayos de empalme se llevaron a cabo utilizando muestras duplicadas obtenidas de dos experimentos independientes, y los datos se analizaron mediante la prueba t de Student.

6.22 Densitometría y análisis estadístico.

Las imágenes de electroforesis en gel de DNA y RNA, así como las películas de WB, se analizaron mediante densitometría utilizando ImageJ [123]. Graph Prism 8.2.1 se usó para graficar los datos y para el análisis estadístico mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA), prueba t de Student y R para Kruskal-Wallis del mismo paquete.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de las modificaciones en el motivo de ribonucleoproteína (RNP) de la E1B-55K sobre sus actividades durante el ciclo de replicación.

Como se describió en la introducción, la E1B-55K participa en varios procesos durante la replicación viral y, en última instancia, afecta la producción de progenie viral. La evidencia acumulada sugiere que a E1B-55K está implicada en la regulación de la producción nuclear de los mRNA virales tardíos. Datos no publicados de nuestro laboratorio sugieren un posible papel en el procesamiento postranscripcional y estabilidad de los mRNAs virales, pero el mecanismo mediante el cual E1B-55K ejerce este efecto no se conoce. Inicialmente se propuso que la interacción E1B-55K - RNA podría ser clave en la regulación de estos procesos; sin embargo, dicha interacción no había sido detectada en el contexto de la infección [132]. Para determinar el papel del dominio RNP en la E1B-55K en la producción y/o procesamiento de mRNAs virales, se construyeron mutantes de HAdV-C5 con sustituciones en el dominio putativo RNP y se analizó su efecto sobre la producción de progenie viral; la replicación del DNA viral; y la producción de pre-mRNA y mRNA virales tardíos. Las células HFF infectadas se recolectaron en tiempos tardíos del ciclo de replicación de AdV (16, 24 y 36 hpi) y se cuantificó la progenie viral por inmunofluorescencia (Figura 7A). Todos los virus mutantes mostraron disminución en la producción de progenie para las 36 hpi. En el caso del mutante $\Delta 284-289$, en el que se eliminó el RNP, el defecto fue ligeramente más severo e incluso mostró un fenotipo similar al virus que no expresa la proteína (E1B-) a las 36 hpi, pero para las 48 hpi la producción de progenie fue similar al virus wt. La reducción en la progenie viral fue estadísticamente significativa y similar a la reportada para otros mutantes E1B-RNP [132]. Adicionalmente analizamos la acumulación del DNA viral en estos mutantes (Figura 7B). Los mutantes de RNP mostraron un comportamiento variable con respecto al nivel y el tiempo de acumulación de DNA viral. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos virus y wt a las 24 hpi, y las células infectadas con los mutantes C288A, C288S y W289F produjeron niveles de DNA viral más bajos que el virus wt a las 36 hpi, lo que correlacionó con una eficiencia reducida en la producción de progenie viral. Por el contrario, las

células infectadas con $\Delta 284-289$ produjeron niveles similares de DNA viral en comparación con el virus wt a las 24 y 36 hpi. Los defectos en la acumulación de DNA viral sugieren que las mutaciones en E1B-55K RNP pueden afectar la acumulación del DNA viral. Para determinar el papel potencial del E1B-55K RNP en la biogénesis de los mRNAs virales tardíos, se determinaron los niveles de pre-mRNA y mRNA del gen L5 (pIV-fibra) y la relación entre los dos como una medida de su procesamiento por splicing. El RNA total se extrajo a las 36 hpi de células infectadas con virus wt o mutantes y se analizó mediante RTqPCR usando cebadores que permitían discriminar entre RNA no procesado de L5 (L5NP) y procesado (L5P) (Figura 7C). El mutante E1B- resultó en una disminución de 3 veces en la acumulación de L5NP y L5P, pero la relación L5P:L5NP mostró niveles similares a wt. El mutante C288S mostró un fenotipo similar, con una reducción cercana al 50% de L5NP y L5P. Los mutantes C288A y W289F, mostraron una reducción de 14 y 5 veces, respectivamente, para ambos tipos de RNA L5 (Figura 7C y D). Similar al virus E1B, ninguna de estas mutaciones afectó la eficiencia de splicing. El mutante $\Delta 284-289$, mostró un aumento de 2 y 5 veces en los niveles de acumulación de RNA de L5NP y L5P, respectivamente. En contraste con los otros mutantes, la relación L5P:L5NP fue 2.5 veces mayor en el mutante $\Delta 284-289$ en comparación al virus wt. Estos resultados, aunque no esperados, son consistentes con datos previos de nuestro grupo que mostraron que la E1B-55K del virus $\Delta 284-289$ interacciona más eficientemente con RNA que en el virus wt, por lo que en conjunto sugieren que la interacción de E1B-55K con el RNA viral correlaciona con un aumento en la acumulación de RNA viral y en su procesamiento por splicing [110].

Una vez que se estableció el efecto de la interacción con RNA sobre la producción de mRNAs virales, analizamos el efecto de la fosforilación de la E1B-55K sobre sus actividades en los CR durante el ciclo de replicación viral.

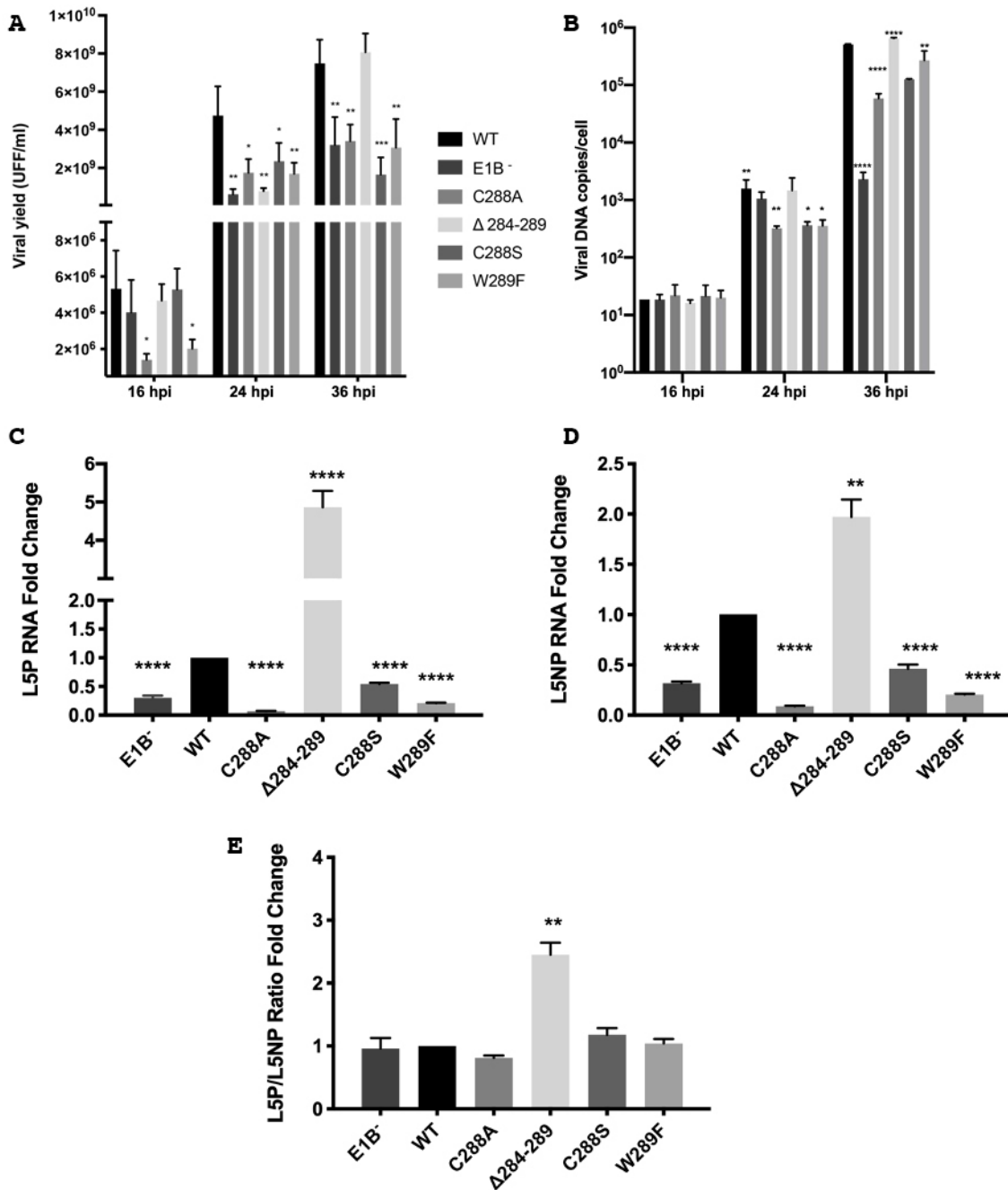


Figura 7. Las sustituciones en E1B RNP afectan la biogénesis de los mRNAs virales tardíos. Células HFF se infectaron a las 16, 24 y 36 hpi y se determinó la producción de progenie viral A) y la acumulación de DNA viral B). Se infectaron células HFF con el virus wt o mutantes de E1B-55K y se cosecharon a 36 hpi. El RNA total fue extraído y los niveles del mRNA de L5 se determinaron mediante RT qPCR empleando primers que reconocen una unión exón-intrón (L5NP) para el pre-mRNA C) o unión exón-exón (L5P) para el mRNA maduro D). Para comparar la eficiencia del splicing, se calcularon los cocientes L5P:L5NP E). El mRNA de β actina se usó como control endógeno. Se muestran los datos de dos experimentos independientes cada uno por triplicado. * P < 0.01, **** P < 0.0001.

7.2 Construcción y amplificación de virus recombinantes con sustituciones en los sitios de fosforilación de la E1B-55K.

Como se ha descrito anteriormente la fosforilación tiene efectos sobre las actividades de E1B-55K relacionadas a la E3 Ub ligasa, la transformación celular, la SUMOilación y por lo tanto la localización de la proteína; además el análisis de diferentes secuencias de E1B-55K de diferentes AdV muestra que las serinas 490, 491 se encuentran completamente conservadas mientras que la treonina 495 no lo está. En los HAdV-E4 en lugar de la treonina se encuentra una serina que puede ser modificada por fosforilación y en HAdV-A12 este sitio lo ocupa un ácido aspártico (Figura 8A). Adicionalmente un análisis bioinformático de diferentes secuencias de E1B-55K de diferentes AdV muestra que estos residuos de la proteína podrían ser fosforilados por diferentes cinasas. Como se describió en la introducción, anteriormente se han construido mutantes en estos sitios (S490, S491 y T495) en los que mediante mutagénesis sitio dirigida se han sustituido estos aminoácidos por alaninas o ácidos aspárticos. La sustitución de estos residuos por alaninas resulta en que el residuo no puede ser fosforilado y, por el contrario, la modificación por ácido aspártico resulta en que fisicoquímicamente se mimetiza el estado fosforilado de estos sitios por la adición de la carga del ácido aspártico. En nuestro laboratorio se han diseñado y construido los virus mutantes que expresan la E1B-55K como PM, Δ P, AAT, DDT, SSA y SSD mediante un protocolo previamente descrito [133] (Figura 8). Sin embargo, dada la información que se ha obtenido con estos virus mutantes (ver sección de materiales y métodos) decidimos diseñar y construir virus recombinantes con mutaciones sencillas en las serinas 490 y 491. Con el objetivo de obtener información del papel de la fosforilación individual de las serinas implementamos el sistema de mutación dirigida mediante recombinación RED (descrito en materiales y métodos) para este fin. A diferencia del sistema convencional, donde la limitante es el uso de enzimas de restricción, el sistema lambda Red es un método que puede usarse para la clonación del genoma de Ad5 con mayor facilidad.

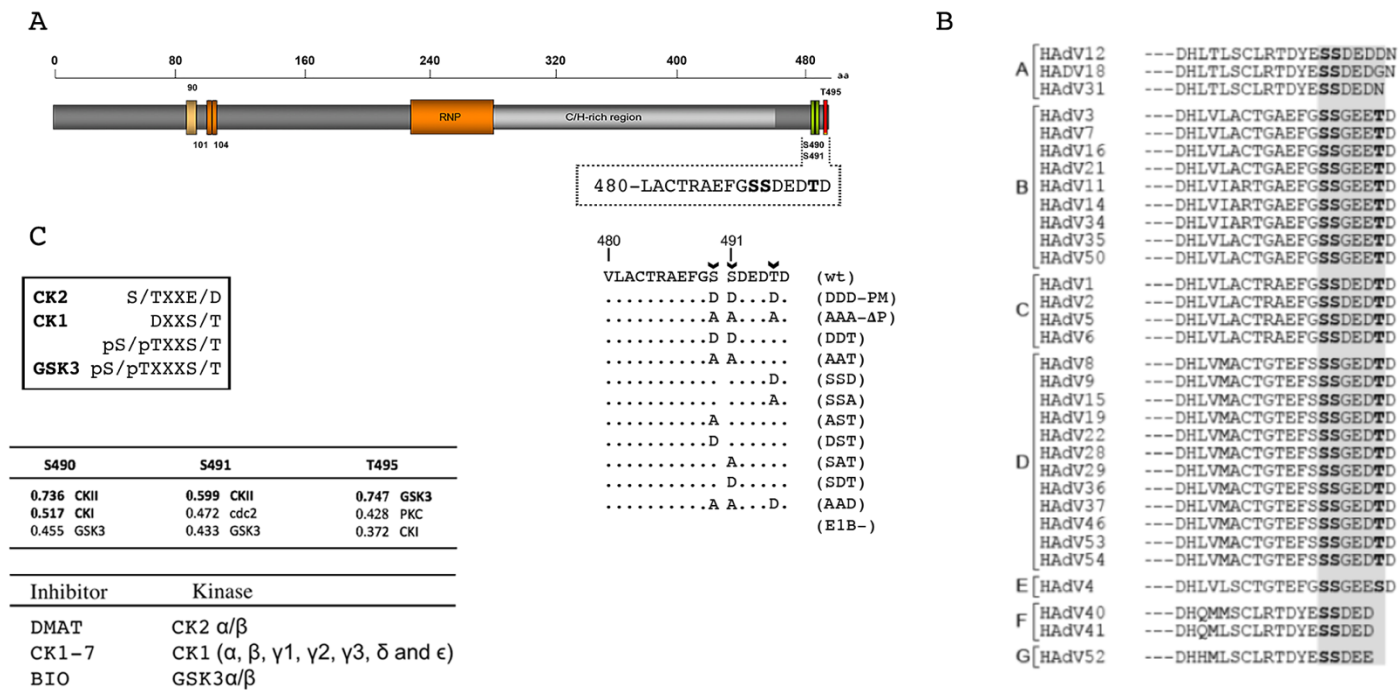


Figura 8. Representación de la proteína E1B-55K 55 kDa. A) Mutaciones en el C-terminal de E1B-55K, las sustituciones de aminoácidos se indican con flechas. **B)** Alineamiento comparativo de secuencias de E1B-55K de las 7 especies representativas de cada grupo de adenovirus. **C)** predicción de los sitios de fosforilación y cinasas responsables mediante análisis de secuencia de la E1B-55K con el software Netphos 2.0.

Este sistema se basa en la recombinación homóloga y permite la modificación directa del DNA en diferentes cepas de *E. coli* y es independiente de los sitios de restricción. Su uso como herramienta de ingeniería genética se llama con frecuencia sistema de recombinación RED. Mediante este método y el uso de las cepas bacterianas GBred-gyrA462 y GB05-Red (para la primer y segunda recombinación respectivamente) se obtuvieron los genomas con las mutaciones de interés. Posteriormente estas secuencias fueron validadas mediante el uso de enzimas de restricción y confirmadas mediante secuenciación, la nomenclatura que se usará para las siguientes secciones puede ser consultada en materiales y métodos (figura 9).

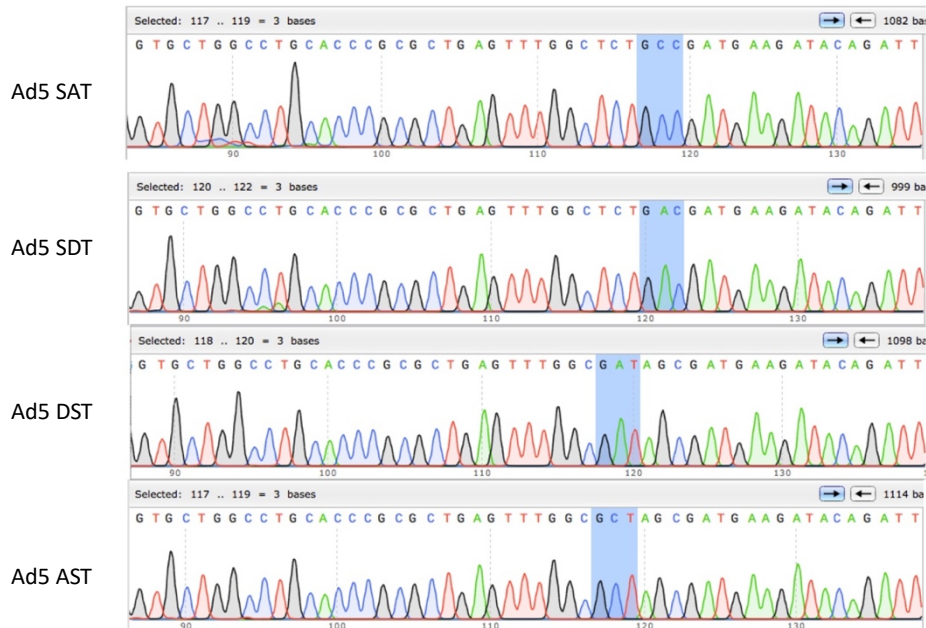


Figura 9. Confirmación de virus mutantes mediante secuenciación. A) El DNA viral de células infectadas fue extraído y usado como molde para la amplificación de un fragmento de PCR que incluye los nucleótidos en donde se realizó la mutación (Región marcada en azul). Las muestras fueron secuenciadas mediante el método de sanger en el Campus Research at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf y en la unidad de secuenciación del IBT UNAM. Se muestra los cromatogramas para los virus mutantes SAT, SDT, DST y AST.

7.3 La fosforilación en E1B-55K favorece la formación de CRs.

El núcleo celular se organiza en compartimentos discretos llamados cuerpos nucleares o dominios nucleares. Algunos de estos compartimentos, como los nucleolos, los cuerpos de Cajal y los compartimentos de reparación marcados con la proteína 53BP1, se forman mediante la separación de fases líquido-líquido (LLPS) y desempeñan un papel crucial en la regulación de diversas actividades nucleares, como la replicación del ADN, la transcripción génica, el procesamiento de ARN postranscripcional, el ensamblaje de ribosomas, el ensamblaje de empalmesomas, la remodelación de la cromatina y la reparación del ADN. Estas funciones son esenciales para el control de la expresión génica y el mantenimiento de la homeostasis celular y del genoma.

Durante la replicación viral, la compartimentación del núcleo se altera debido a la acumulación de macromoléculas restringidas al sitio que regulan la replicación del genoma viral y la expresión génica. Esto conduce a la formación de microdominios celulares especializados llamados centros o compartimentos de replicación viral (CR). Estos CR son esenciales para la replicación y regulación de los virus en el núcleo celular.

Inicialmente, los centros de replicación viral de adenovirus se detectaron mediante microscopía electrónica de transmisión y se describieron como agregados virales electro densos. Los CRs están compuestos por proteínas y ácidos nucleicos y se han definido como compartimentos inducidos por el virus que albergan proteínas implicadas en la replicación del genoma viral, así como factores de transcripción y splicing que regulan la expresión de los genes virales. Además, los CR desempeñan un papel en la modulación de las respuestas antivirales celulares al reclutar y concentrar factores celulares que normalmente bloquean la replicación viral. Los CRs son clave para las interacciones entre el virus y la célula huésped, la formación y regulación del reclutamiento

Durante las etapas tempranas de la infección, la proteína viral E1B se encuentra de manera difusa en el núcleo y en puntos perinucleares específicos en células transformadas con el adenovirus humano tipo 5 (HAdV5). Esta distribución nuclear de E1B-55K está asociada con la proteína viral temprana E4Orf3, que se colocaliza con alteraciones en la distribución de los cuerpos nucleares de PML (PML-NB) o con la matriz nuclear en células infectadas, independientemente de su asociación con E4Orf3. A medida que progresa el ciclo de replicación viral, E1B-55K interactúa con E4Orf6, lo que conduce a la relocalización de la proteína en la periferia de los centros de replicación viral (CR). En la periferia la E1B-55K desempeña un papel importante en la formación adecuada de los CR y regula diversas actividades relacionadas con los CR en las células infectadas. Dado que se sabe que E1A, E1B-55K y E4orf3 regulan el sistema de modificación de SUMO [134], la interacción entre los CR, los tracks nucleares de PML-E4orf3 y el sistema de SUMOilación pueden dirigir el tránsito de proteínas dentro y fuera de CR y por lo anterior podrían resultar en la formación eficiente de los compartimentos de replicación.

Adicionalmente se ha reportado que en un virus mutante nulo en la fosforilación los compartimentos de replicación se forman deficientemente por lo anterior la formación de estos sitios y la fosforilación de la E1B-55K podrían estar estrechamente relacionadas.

Como se describió anteriormente DBP es una proteína viral que se asocia al DNA viral de cadena sencilla durante la replicación del genoma. La proteína tiene actividad de helicasa no dependiente de ATP y de esta manera participa en el mecanismo de replicación del genoma viral separando las hebras de DNA. Esta proteína se organiza en la periferia de los CR y es la más abundante en estos sitios, por lo que se puede utilizar como un marcador para analizar la organización de los CR. Por lo anterior, el análisis de la cinética de distribución de DBP permite determinar la eficiencia con la que los CR se forman durante la infección. Para evaluar esto, se infectaron células HFF con los virus wt o mutantes de E1B-55K (wt 4100, Δ P, PM, E1B-, AAT, DDT, SSD, AST, SAT, DST y SDT); las células se fijaron a las 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 h.p.i. y se analizó la distribución de la proteína viral DBP mediante microscopía de inmunofluorescencia. La figura 10 muestra los resultados de estos experimentos.

En células infectadas con el virus wt a las 12 h.p.i. la proteína DBP se localizó difusa en núcleo y en algunos puntos con mayor intensidad; a las 16 h.p.i. estos puntos se hicieron más evidentes sobre una distribución difusa y a partir de las 24 h.p.i. estos puntos nucleares formaron zonas bien definidas en el núcleo en forma de anillos. En tiempos posteriores a las 28 h.p.i. estos anillos coalescieron formando estructuras intranucleares diversas que invaden casi la totalidad del núcleo de acuerdo con lo previamente reportado [49, 135-137].

Para las células infectadas con los virus AAT, E1B- o Δ P a tiempos tempranos se observó a DBP difusa en núcleo (12 a 20 h.p.i), y solo para los virus E1B- y Δ P a las 24 h.p.i se observó a DBP en puntos o engrosamientos bien definidos. Sin embargo, estos no formaron anillos en tiempos comparables con el virus wt. Para tiempos tardíos de la infección se observó a DBP localizada en anillos bien definidos, pero no se observó coalescencia entre CR. Para los virus DDT y SSD la

localización fue similar al virus silvestre, pero en tiempos tardíos se observó a los anillos coalescer más temprano. Interesantemente en el virus PM desde las 12 h.p.i se observó a DBP en puntos bien definidos sobre una distribución difusa comparable con las 20 h.p.i del virus wt. Para las 20 h.p.i se observó a DBP en anillos bien definidos e inclusive en tiempos tardíos (28 h.p.i) se observó un número mayor de anillos con respecto al virus wt. Para los virus mutantes sencillos AST, DST, SAT y SDT, en los que en todos los casos se mantiene la treonina 495 y por lo tanto puede ser fosforilada y fosfatada, no se observaron diferencias marcadas en la localización de DBP y su localización fue similar al virus silvestre.

Dado que hasta el momento la información obtenida mediante microscopía de inmunofluorescencia sobre la distribución de DBP en los CR había sido cualitativa, desarrollamos un algoritmo para el análisis de imágenes obtenidas mediante microscopía que permite obtener información cuantitativa de forma automatizada de los CR como: Área, perímetro, excentricidad, diámetro, intensidad media de fluorescencia y número de estructuras por célula. La figura 10 muestra los resultados del análisis del tamaño de los CR analizados por la distribución de DBP [121], expresado en área con el uso del algoritmo DLSF. Hay que destacar que, para el análisis de la cinética de formación de CR, el uso de este algoritmo (ajustes de elipses) carece de sentido en tiempos muy tardíos porque los CR coalescen e invaden todo el núcleo y no hay posibilidad de ajustar elipses.

Para el virus wt se observó un incremento progresivo en la media del área de los CR desde las 16 horas hasta alcanzar un máximo a las 24 h.p.i, posterior a este tiempo se detectó una disminución de la media en el resto de los tiempos (Figura 10). Interesantemente en el virus PM se observó que el incremento en el intervalo de 12 a 16 h.p.i fue mayor y se alcanzó un pico máximo a las 20 h.p.i. Es decir, la población de células analizada mostró CR de mayor tamaño en tiempos más tempranos con respecto al virus wt (Figura 10). En contraste, en los virus donde se afectó la fosforilación de la E1B-55K o en el mutante que no la expresa no se observó un incremento comparable al del virus wt en el intervalo de 12 a 16 h.p.i. Además, se observó que, aunque sí hubo un aumento conforme progresó el ciclo de replicación, este fue discreto (Figura 10).

A

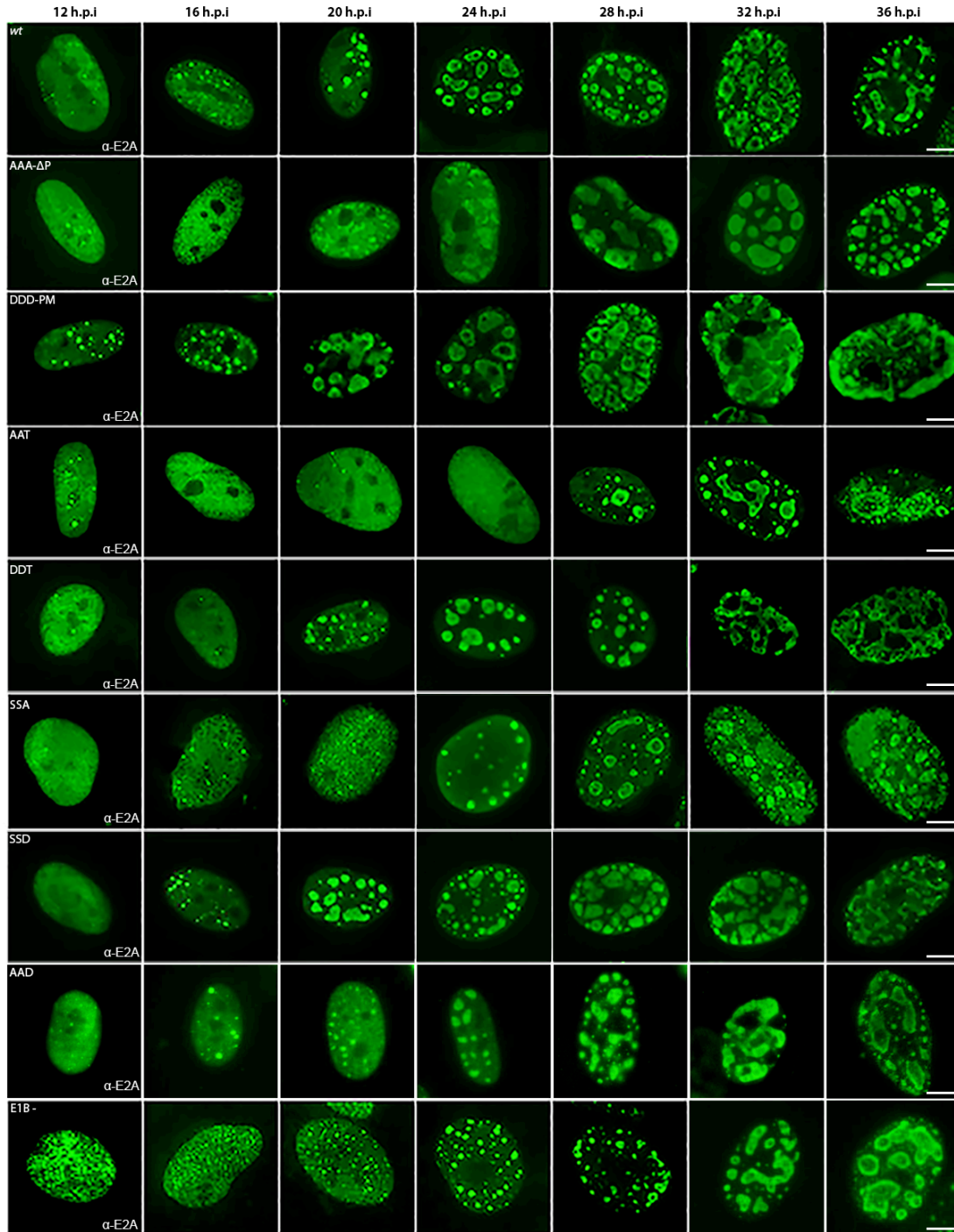


Figura 10. Análisis de la cinética de formación de compartimentos de replicación (CR). Células HFF fueron infectadas con virus silvestre o mutantes y fijadas a diferentes tiempos, posterior a esto se prepararon para inmunofluorescencia, para la detección de la proteína DBP se utilizó el anticuerpo monoclonal de conejo anti-DBP (B6) y la señal se detectó utilizando el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa 488, secuencias de 1000 células fueron obtenidas mediante un microscopio de epifluorescencia (Axiovert 200M, Carl Zeiss Inc, ver materiales y metodos.) a 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 h.p.i. barra de escala 10 μ m

Para los virus mutantes DDT, SSD, DST y SDT la cinética de formación de los CR fue similar al virus silvestre y solo se detectó una diferencia menor en los mutantes AST y SAT, ambos mutantes que mantienen la treonina 495. Adicionalmente, se comparó el número de anillos que se forman durante la replicación viral (Figura 11). Estos datos muestran que para los virus mutantes PM, DDT, SSD, DST, SDT, AST y SAT el número de CR por célula fue similar al virus wt. Interesantemente, en los virus mutantes E1B -, SSA, AAT, ΔP el número de CR fue significativamente menor comparado con el virus wt. Un parámetro adicional que tomamos en cuenta para la caracterización de los CR fue la excentricidad. Dado que el algoritmo emplea el ajuste de elipses para la selección de los CR la excentricidad es un parámetro mediante el cual podemos obtener información de su forma. Estos resultados muestran mínimas diferencias entre el virus silvestre y los virus mutantes. Este análisis mostró que cuando se afectan los sitios de fosforilación en la E1B-55K (serinas o treoninas) la progresión en la formación de CR es menos eficiente (medido por área y número de CR). Mientras que, cuando se mimetizó el estado fosforilado de serinas o treonina, no se afectó la eficiencia con la que se forman estos sitios. Sin embargo, es de notar que cuando se mimetizó el estado fosforilado de los 3 sitios, la progresión en el ciclo de replicación fue más eficiente que en el virus wt. En conjunto estos datos sugieren que la fosforilación en las serinas y treonina de E1B-55K tiene un efecto diferencial en la formación de compartimentos de replicación viral y que impactan la cinética de formación de los CR.

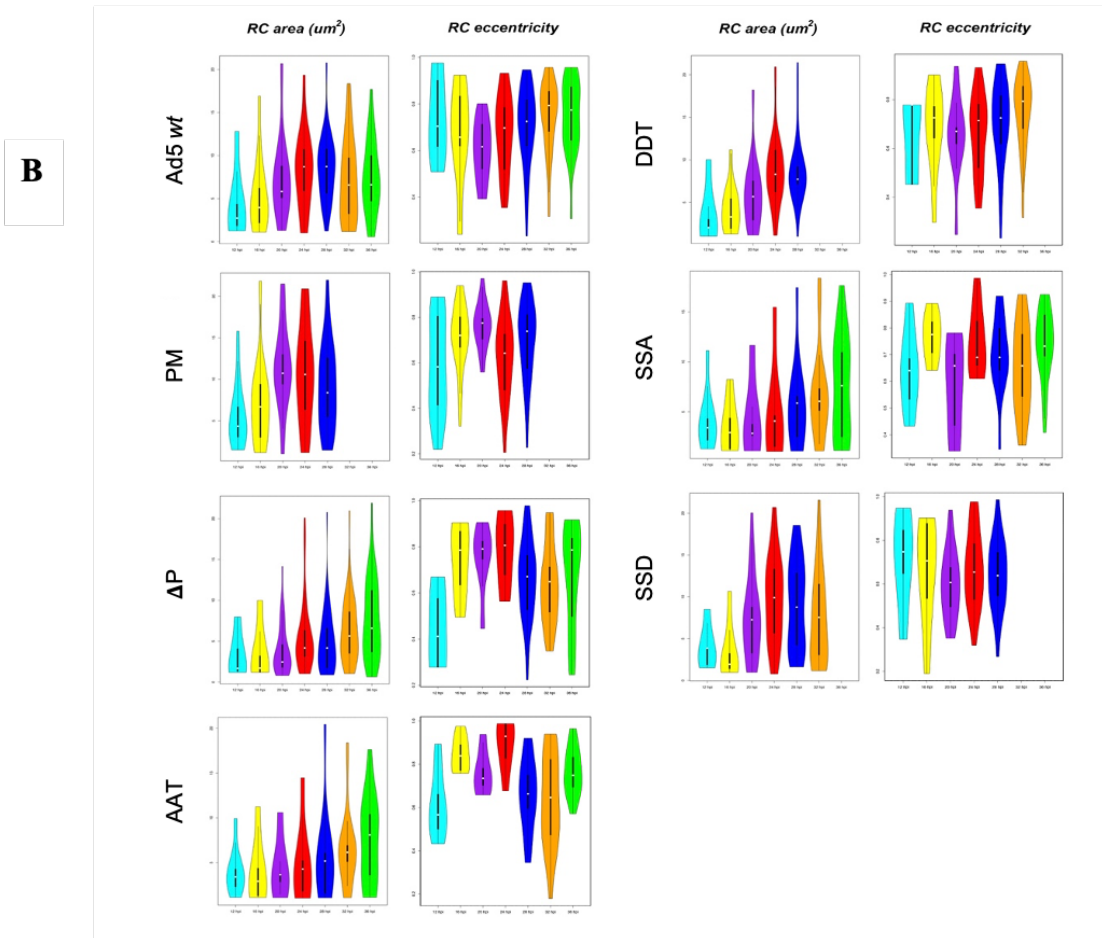
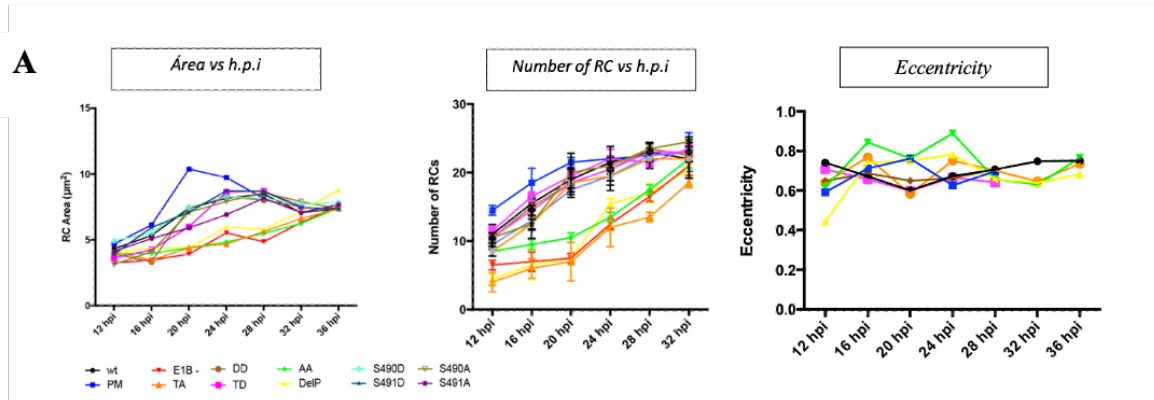


Figura 11. Análisis de la cinética de formación CR mediante el uso de DSLF. Células HFF fueron infectadas con virus silvestre o mutantes y fijadas a diferentes tiempos, posterior a esto se prepararon para inmunofluorescencia, para la detección de la proteína DBP se utilizó el anticuerpo monoclonal de conejo anti-DBP (B6) y la señal se detectó utilizando el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa 488. El análisis de cada set de imágenes se muestra en los gráficos desde 12 hasta 36 h.p.i. **A)** Área de los CR obtenidos, número de anillos por célula y excentricidad. **B)** distribución de población de los CR por área y excentricidad. Los datos se obtuvieron en micrografías de células infectadas n=1000 células mediante el uso del algoritmo de ajuste de elipses descrito en la sección de materiales y métodos.

7.4 la fosforilación diferencial en E1B-55K regula su localización durante el ciclo de replicación viral.

Como se describió previamente, durante la fase temprana del ciclo de replicación de Ad, la E1B-55K colocaliza con la proteína E4orf3 en los cuerpos nucleares de PML, en estructuras que eventualmente son reorganizadas a estructuras filamentosas conocidas como “tracks” [85]. En la transición a la fase tardía la E1B-55K interacciona con la proteína E4orf6 y esto resulta en su relocalización a los CR, mientras que E4orf3 permanece en tracks adyacentes a los CR. Resultados del análisis de la composición de los CR por espectrometría de masas y proteómica en el laboratorio muestran que E1B-55K afecta la relocalización de varias proteínas celulares a los CR (que incluyen maquinaria de síntesis de DNA, splicing, que participan en la respuesta a daño en el DNA, supresores tumorales, etc.) y se ha propuesto que la formación de los CR podría ser una estrategia para evitar la respuesta antiviral y reclutar proteínas celulares necesarias para la replicación del genoma viral y de esta manera favorecer la progresión del ciclo de replicación viral. Un ejemplo es el reclutamiento de p53 a los CR pues su relocalización a estos sitios correlaciona con la relocalización de E1B-55K y E4orf6 y esto a su vez correlaciona con la síntesis eficiente del DNA viral. Por lo anterior se ha sugerido que la E1B-55K podría asistir de manera directa o indirecta el reclutamiento de proteínas celulares y de esta manera el ensamblaje de los CR virales. Con base en lo anterior y en experimentos que han mostrado que la fosforilación de la E1B-55K es necesaria para su localización en CR, la fosforilación de la proteína podría también favorecer sus actividades asociadas a estos sitios. Sin embargo, no se sabe cuál o cuáles de los residuos (S490, S491 y/o T495) deben ser fosforilados para favorecer su reclutamiento o sus diferentes actividades en los CR.

Con el objeto de analizar el efecto de la fosforilación de la proteína E1B-55K sobre su localización intracelular, se infectaron células con el virus wt o mutantes con sustituciones en los sitios de fosforilación de E1B-55K. Las células infectadas se analizaron en tiempos tempranos (4, 12, 16 y 20 h.p.i) y tardíos de la infección (24, 28, 32, 36 h.p.i). Las células fueron fijadas y preparadas para microscopía de

inmunofluorescencia (ver materiales y métodos) y se analizó la distribución de las proteínas E1B-55K, DBP y E4orf3. Los resultados que permiten ilustrar el efecto de la fosforilación de la E1B-55K sobre su localización en la etapa temprana y tardía de la infección se muestran en la figura 12 y los datos completos se muestran en la figura 1 del Anexo 1. Se utilizaron las proteínas virales DBP y E4orf3 como marcadores de CR pues como se describió antes se sabe que DBP es la proteína viral más abundante de los CR, la cual se asocia al DNA viral de cadena sencilla que se está replicando en estos sitios y la E4orf3 se localiza en los cuerpos nucleares de PML en la fase temprana y más tarde se encuentra adyacente a los CR.

Durante la fase temprana de la infección con el virus wt (Figura 12A; 12 h.p.i), la proteína E1B-55K se localizó en una distribución difusa y en puntos bien definidos en el núcleo (columna 2), en los que colocalizó con E4orf3, de acuerdo con lo previamente reportado [85, 138]. En células infectadas con los virus mutantes la localización de E4orf3 y E1B-55K fue similar al virus wt; sin embargo, la localización de la proteína viral DBP en el virus PM mostró que la formación de compartimentos de replicación inicia antes que en el virus wt.

Con el avance del ciclo de replicación viral la E1B-55K del virus wt se acumuló en puntos de mayor intensidad en el núcleo, excluida del nucleolo, con una distribución que coincide con la proteína DBP, mientras que la proteína E4orf3 se localizó en fibras nucleares adyacentes a los CR, como se ha descrito anteriormente (Figura 12B).

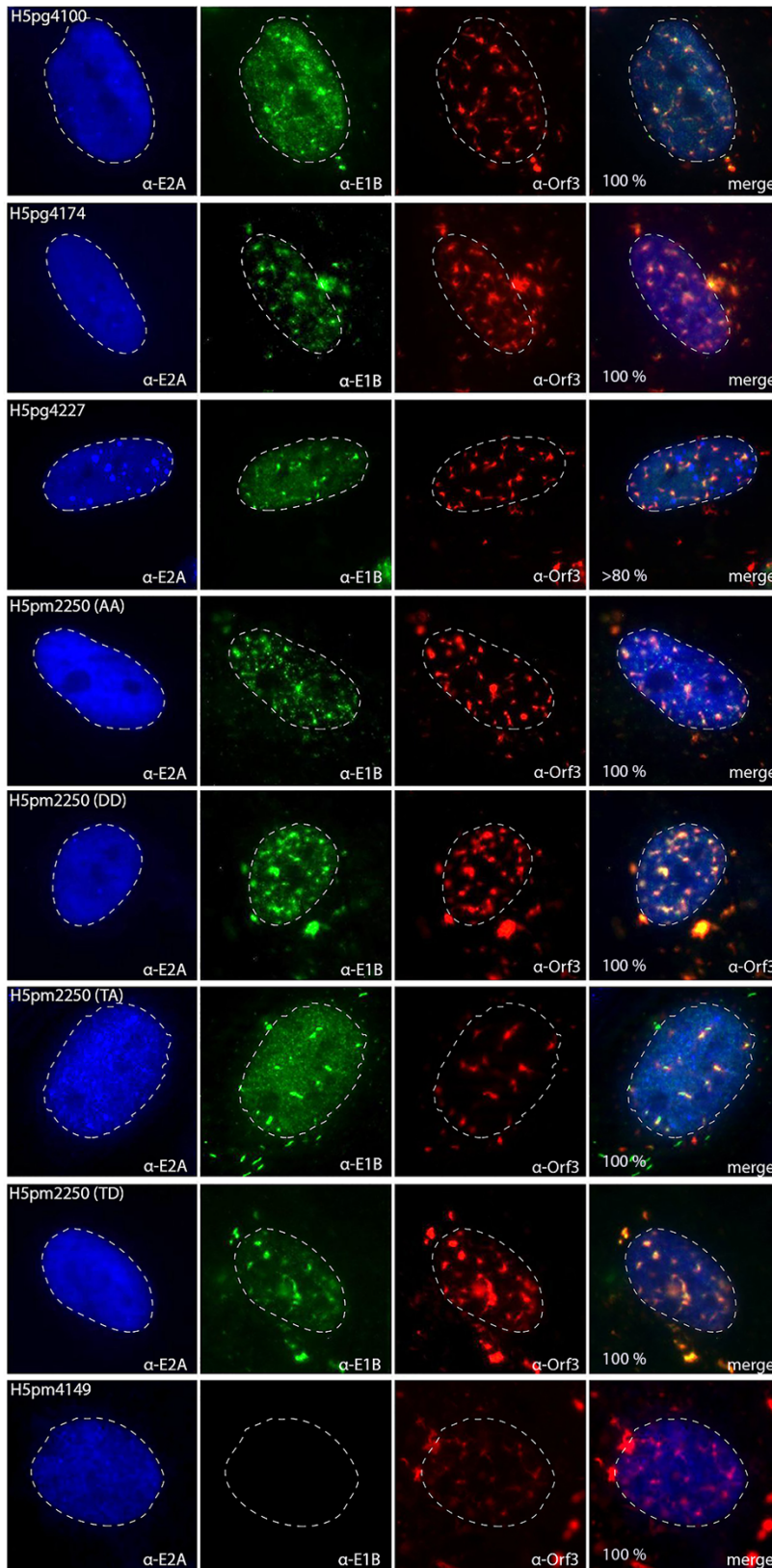
Para el virus PM la E1B-55K se observó asociada a CR (28 h.p.i) y permaneció asociada a estos sitios hasta muy tarde en el ciclo de replicación (36 h.p.i) (Figura 1B suplementaria). En contraste, en la infección con el virus ΔP (Figura 12B) la E1B-55K se localizó difusa en núcleo y citoplasma y no se observó colocalización con la proteína viral DBP (CR). Estos datos muestran que la fosforilación de la E1B-55K es necesaria para su localización a CR.

Tras la infección con el virus AAT (Figura 12B) la E1B-55K se localizó con la proteína viral DBP similar al virus wt, lo que indica que las serinas 490/491 no son necesarias para su reclutamiento a CR (columna 2 fila 4). Algo muy interesante es que tras la

infección con el virus SSD la E1B-55K se observó asociada a CR y en algunas fibras nucleares y citoplásmicas. En contraste con esto, en células infectadas con el virus SSA la E1B-55K se localizó difusa en el núcleo y en fibras de mayor intensidad tanto en núcleo como en el citoplasma. Estos resultados mostraron que la fosforilación de la treonina 495 es necesaria para la localización de la E1B-55K a CR.

Para los virus mutantes sencillos en serinas AST y SAT la E1B-55K se localizó en puntos sobre una distribución difusa en los que se localizó con la proteína E4orf3 en tiempos tempranos de la infección, similar al virus wt. En la etapa tardía la proteína se mantuvo localizada difusa en el núcleo excluida de nucleolo y no se observó en ninguno de los dos mutantes que se relocalizara a CR. Interesantemente en los mutantes sencillos DST y SDT la localización de la E1B-55K fue similar que en el virus silvestre en la etapa temprana de la infección. Sin embargo, para la etapa tardía la proteína no se relocalizó por completo a CR, es decir se localizó en todo el núcleo, pero se detectaron cúmulos de la proteína en regiones definidas como CR (Figura 1 suplementaria). En conjunto estos datos muestran que la fosforilación tanto de serinas como de treonina afectan la localización de la E1B-55K en los CR, pero que la fosforilación de la treonina 495 es un requisito indispensable para ello.

A)



	Núcleo	Citoplasma	E1B-55K	E4orf3
E1B-55K	++	+/-	NA	++
E4ORF3	++	+/-	++	NA

	Núcleo	Citoplasma	E1B-55K	E4orf3
E1B-55K	++	+/-	NA	++
E4ORF3	++	+	++	NA

	Núcleo	Citoplasma	E1B-55K	E4orf3
E1B-55K	++	+/-	NA	++
E4ORF3	++	+/-	++	NA

	Núcleo	Citoplasma	E1B-55K	E4orf3
E1B-55K	++	+/-	NA	++
E4ORF3	++	+/-	++	NA

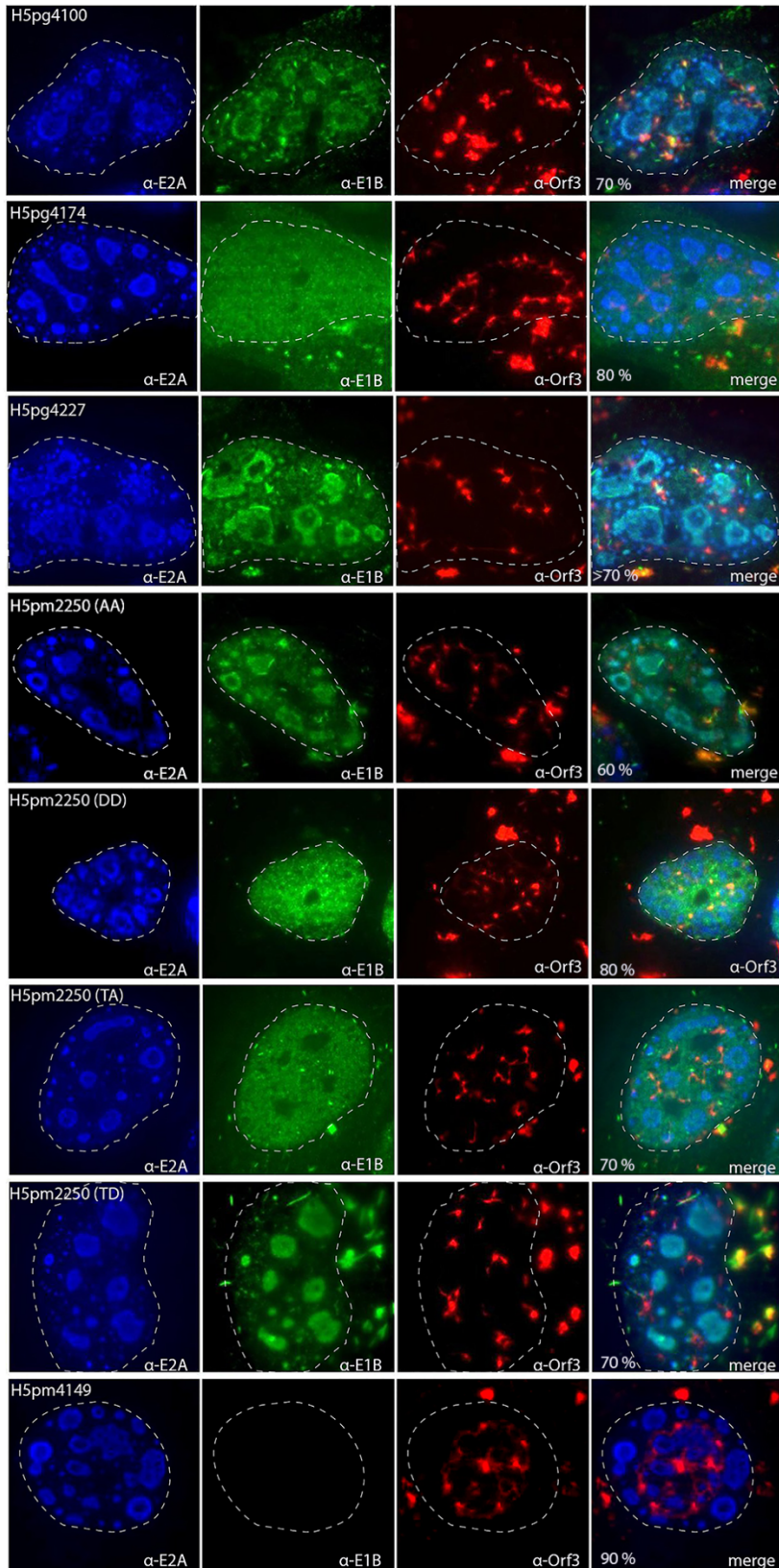
	Núcleo	Citoplasma	E1B-55K	E4orf3
E1B-55K	++	+	NA	++
E4ORF3	++	+	++	NA

	Núcleo	Citoplasma	E1B-55K	E4orf3
E1B-55K	++	+	NA	++
E4ORF3	++	+/-	++	NA

	Núcleo	Citoplasma	E1B-55K	E4orf3
E1B-55K	++	+/-	NA	++
E4ORF3	++	+	++	NA

	Núcleo	Citoplasma	E1B-55K	E4orf3
E1B-55K	NA	NA	NA	NA
E4ORF3	++	+	NA	NA

B)



	Núcleo	Citoplasma	E1B-55K	E4orf3
E1B-55K	++	+/-	NA	-
E4ORF3	++	+/-	-	NA
DBP	++	-	++	-
E1B-55K	++	++	NA	+
E4ORF3	++	+	+	NA
DBP	++	-	-	-
E1B-55K	++	-	NA	-
E4ORF3	++	+	-	NA
DBP	++	-	+++	-
E1B-55K	++	+/-	NA	-
E4ORF3	++	+	-	NA
DBP	++	-	++	-
E1B-55K	++	-	NA	-
E4ORF3	++	+	-	NA
DBP	++	-	-	-
E1B-55K	++	++	NA	+
E4ORF3	++	+	-	NA
DBP	++	-	-	-
E1B-55K	++	++	NA	+
E4ORF3	++	+	+	NA
DBP	++	-	++	-
E1B-55K	NA	NA	NA	NA
E4ORF3	++	+	NA	NA
DBP	++	-	NA	-

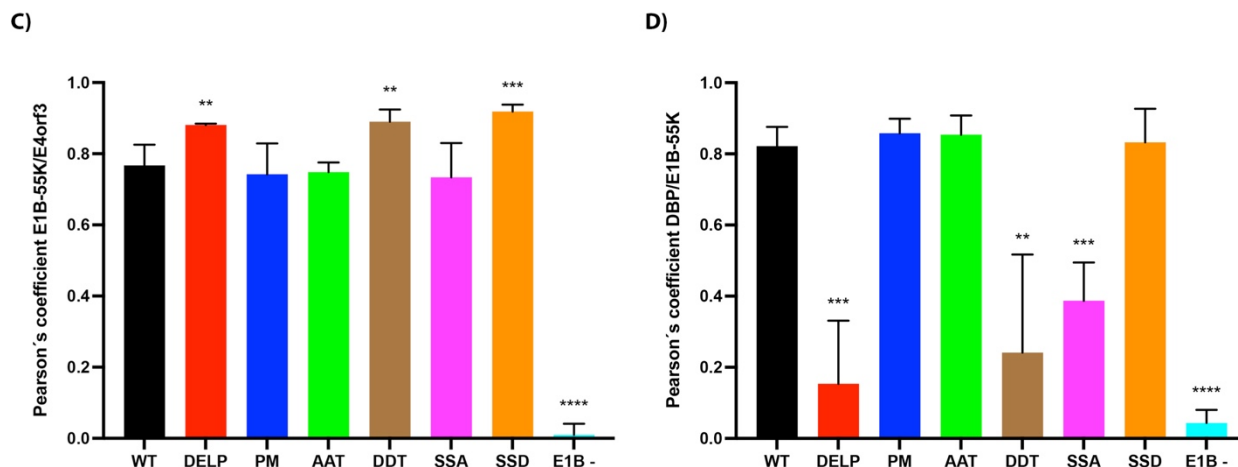


Figura 12. Localización intracelular de las proteínas E1B-55K, DBP y E4orf3 en células HFF infectadas. Las células HFF fueron infectadas con el virus silvestre o los virus recombinantes con sustituciones en los sitios de fosforilación de E1B-55K. Posteriormente las células fueron fijadas en tiempos tempranos **12A** y tardíos **12B** y tratadas para su análisis por inmunofluorescencia. Para la detección de la proteína DBP (E2A) se utilizó el anticuerpo monoclonal de conejo anti-DBP (B6) y la señal se detectó utilizando el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa 350 (azul columna 1); la proteína E1B-55K se detectó con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-E1B-55K (2a6) y la señal se detectó utilizando un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa 488 (verde columna 2). Como marcador de infección y de los compartimentos de replicación se utilizó la proteína E4orf3 que fue detectada con un anticuerpo monoclonal de rata anti-orf3 (6a11) y la señal fue detectada por un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 680 (rojo lejano columna 3). **12 C,D** Los coeficientes de colocalización de Pearson fueron calculados para todos los compartimentos de replicación (n=100 células) mediante el uso del complemento BIOP-JACOP.

En células infectadas con el virus silvestre la proteína E4orf3 (columna 3) se localizó en estructuras en forma de tracks en los que se localizó con la E1B-55K; para la etapa tardía se observó principalmente en una distribución adyacente a los CR. Sorprendentemente durante la infección con el virus ΔP , la proteína E4orf3 se localizó en puntos en el citoplasma y núcleo, sin embargo para la etapa tardía los puntos citoplasmáticos fueron más evidentes.. En el caso del virus PM, la E4orf3 mostró un patrón combinado, ya que se acumuló en tracks adyacentes a los CR, pero también se observó en numerosos puntos y fibras citoplasmáticas. Una observación interesante es que en los mutantes AST y SAT la E4orf3 se localizó en la periferia del núcleo en puntos y formas fibrosas, mientras que en los mutantes sencillos DST y SDT se mantuvo sin cambios. Estas diferencias en la distribución de la E4orf3 fueron muy variadas y complejas, por lo tanto, es difícil interpretar el

efecto de la fosforilación de la E1B-55K sobre la distribución intracelular de E4orf3. Dado que como se mencionó en la etapa temprana de la infección la E1B-55K colocaliza en puntos definidos en el núcleo, la figura 12C muestra los coeficientes de colocalización de la proteína E1B-55K/E4orf3, estos resultados mostraron que no hay cambios en la colocalización de estas proteínas con respecto al virus silvestre. En la etapa tardía de la infección ocurre la relocalización de la E1B-55K a CR, la figura 12D muestra los resultados del análisis de colocalización, estos resultados mostraron que la fosforilación de la treonina 495 de la E1B-55K son necesarias para su completa relocalización a CR.

Las posibles implicaciones del efecto de la fosforilación en E1B-55K sobre la distribución de E4orf3 se discutirán más adelante.

En conjunto estos resultados muestran que la fosforilación en la treonina 495 es necesaria para la localización eficiente de la E1B-55K en los CR.

7.5 La fosforilación de la E1B-55K afecta la localización de proteínas celulares a los CRs.

Como se describió en la sección anterior, los CR son microambientes virales en los que se reclutan proteínas celulares y virales responsables de la replicación de AdV. Nuestros resultados muestran que la E1B-55K favorece la formación de estas estructuras durante el ciclo de replicación, por tal motivo y para determinar la organización de los CR y el efecto de la E1B-55K sobre estos, realizamos análisis usando microscopía de súper resolución (SR) con células HFF infectadas con los virus wt, E1B- o PM a 20 y 24 hpi. Hasta el momento la descripción de los CRs y de las proteínas relocalizadas a estos sitios ha sido mediante microscopía de epifluorescencia convencional, o microscopía confocal. Estos experimentos han aportado evidencias de colocalización de proteínas celulares en estos sitios; sin embargo, la implementación de SR nos permite hacer una descripción en escala nanoscópica de las proteínas celulares y virales que son reclutadas a los CR que se forman en la infección con los fosfomutantes. En estos experimentos analizamos la distribución de proteínas celulares que se sabe que se localizan en los CR en relación con dos proteínas virales bien caracterizadas: la proteína DBP y la proteína

viral E4orf3 que se han descrito anteriormente. Inicialmente se analizó la distribución de la proteína viral E1B-55K mediante esta técnica; los resultados mostraron que en el virus wt, así como en el virus PM la proteína E1B-55K se localizó en CR, adyacente, en esta escala, a la proteína viral DBP. Adicionalmente la proteína se localizó en algunos sitios con la proteína E4orf3 en “tracks” nucleares (Figura 13). Estos resultados sugieren que la fosforilación de la proteína E1B-55K puede inducir su relocalización a los CR y a tracks nucleares. Lo anterior se sustenta también en los reportes donde la fosforilación de la E1B-55K aumenta su SUMOilación y esto resulta en la localización de la proteína en los CR [87].

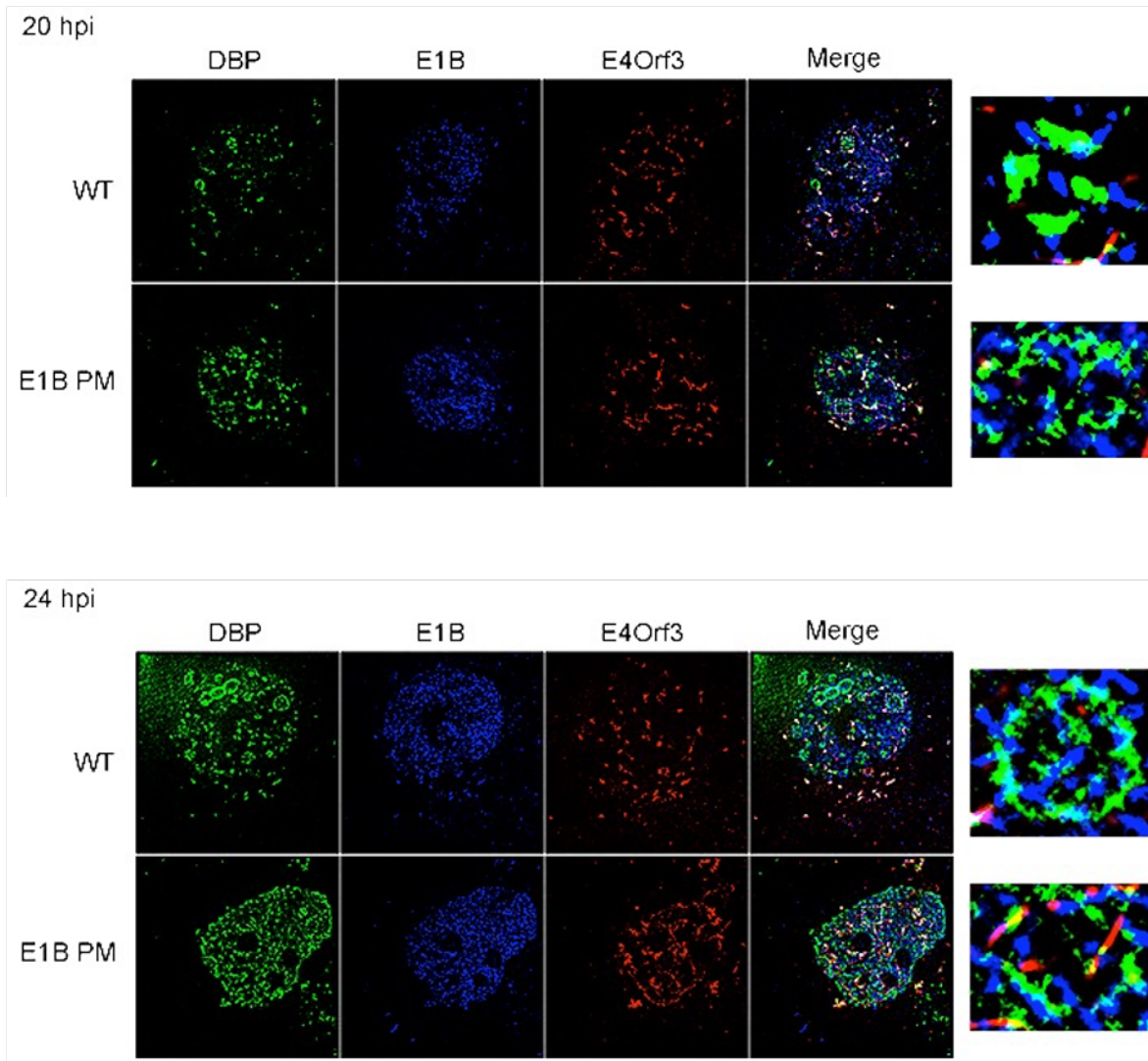


Figura 13. La fosforilación de E1B-55K induce su localización a CR y tracks nucleares. Imágenes de microscopía de súper resolución de células HFF infectadas con virus wt, PM o E1B- 20 y 24 hpi. DBP (verde, Alexa Fluor 488), E1B-55K (azul, Alexa Fluor 405), E4orf3 (rojo, Alexa Fluor 568). Se muestra la amplificación de los anillos de DBP seleccionados para mostrar la distribución de E1B-55K.

7.5.1 SUMO 2/3 y CTCF

Se ha demostrado que la modificación de proteínas por la adición de SUMO regula la formación de dominios nucleares, en particular los cuerpos nucleares de PML [83]. Durante la infección por AdV, el sistema de SUMOilación es modulado y reorganizado.

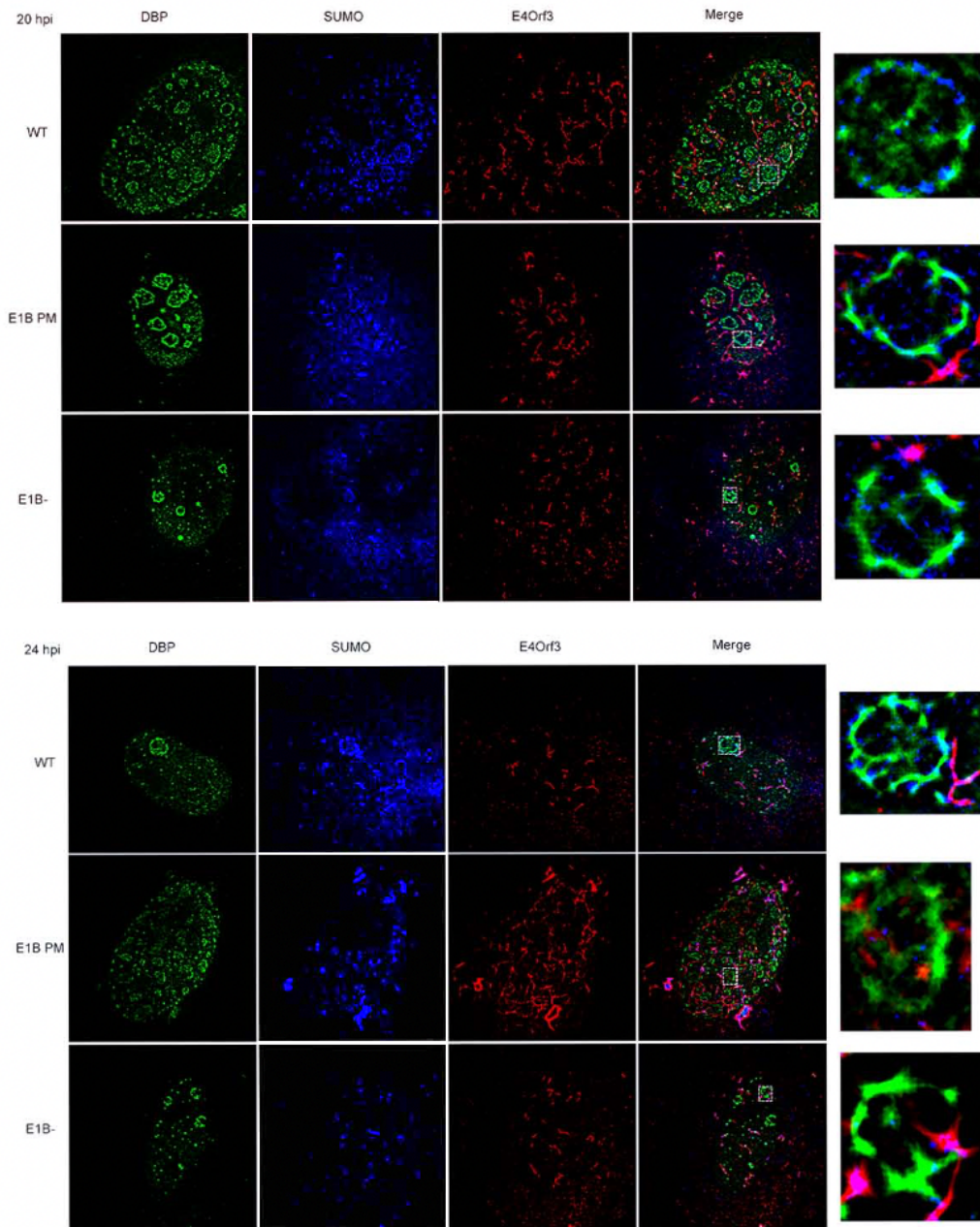


Figura 14. SUMO2/3 se recluta a los CR de manera dependiente de E1B-55K. Imágenes de microscopía de superresolución de células HFF infectadas con virus Ad wt, PM o E1B- y analizadas a las 20 y 24 hpi. DBP (verde, Alexa Fluor 488), SUMO 2/3 (azul, Alexa Fluor 405), E4orf3 (rojo, Alexa Fluor 568). Los recuadros de la derecha muestran la amplificación de anillos de DBP seleccionados para mostrar la distribución intercalada de SUMO 2/3 Ad wt y PM, la ausencia de SUMO 2/3 en los CRs en el virus E1B- y la cercanía a los tracks nucleares de E4orf3.

La proteína viral E1A se asocia con la ligasa E2 de SUMO, Ubc9, y regula la SUMOilación de proteínas diana. E1B-55K funciona como una E3 ligasa de SUMO para p53 y también puede interactuar con Ubc9. E4orf3 induce la SUMOilación de los componentes de la respuesta al daño en DNA y recientemente, usando microscopía de inmunofluorescencia, encontramos que casi la totalidad de la señal de SUMO se relocaliza en los CR en células infectadas con AdV, y que esta redistribución depende de las proteínas E1B-55K, E4orf6 y E4orf3 [61]. Sin embargo, estas observaciones sugieren que los oncogenes adenovirales, incluido E1B-55K, inducen la formación de los CR mediante el reclutamiento de proteínas celulares a sitios en los que se localiza el genoma viral.

CTCF es una proteína celular multifuncional implicada en el mantenimiento de la arquitectura nuclear. En las células infectadas con AdV, CTCF se relocaliza a los CR, donde se une al DNA viral y promueve la transcripción viral tardía eficiente [139]. La figura 15, muestra que SUMO 2/3 y CTCF se localizan en una distribución que coincide con la proteína DBP en CR, y en menor medida con E4orf3, en células infectadas con el virus wt y el mutante PM. Curiosamente, la localización de SUMO 2/3 (Figura 14) y CTCF (Figura 15) en los CR no se observó en ausencia de E1B-55K, ya que en las células infectadas con el virus mutante E1B- estas proteínas celulares solo se observaron en tracks nucleares. Estos resultados sugieren que la localización de SUMO y CTCF a los CR es dependiente de E1B-55K y es promovida por la fosforilación de la proteína. CTCF y SUMO 2/3 podrían funcionar como un andamio para la formación de CR, reclutando proteínas a estos sitios, un papel que se ha descrito anteriormente para estas proteínas en algunos procesos celulares, incluido el funcionamiento de los PML-NB, entre otros.

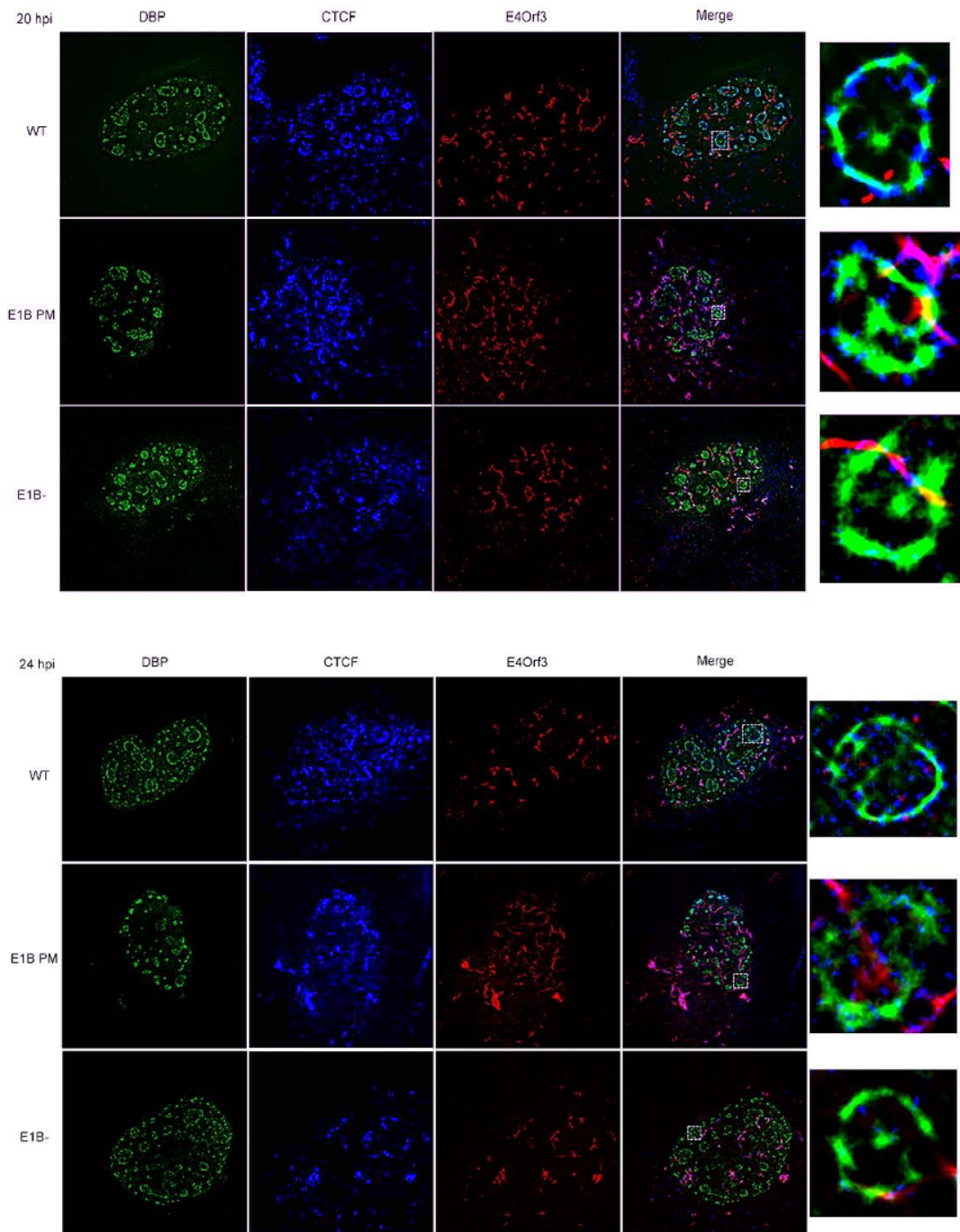


Figura 15. CTCF es reclutada a los CR dependiente de E1B-55K. Imágenes de microscopía de súper resolución de células HFF infectadas con virus wt, PM o E1B-55KE1B -, y analizadas a 20 y 24 hpi. DBP (verde, Alexa Fluor 488), CTCF (azul, Alexa Fluor 405), E4orf3 (rojo, Alexa Fluor 568).

7.5.2 BRCA1

BRCA1 es un supresor tumoral con actividad antiviral que participa en la respuesta a daño en el DNA (DDR). Se ha reportado que en células Hep-2 infectadas con adenovirus, en tiempos tempranos la proteína se localiza en los “tracks” de E4orf3 y posteriormente se relocaliza a los CR (Maul G.G et al 1998). En células infectadas con el virus wt, así como PM y E1B-, la proteína BRCA1 se relocalizó a los CR en tiempos tardíos y en menor medida en tracks de E4orf3. Esto sugiere que la relocalización de BRCA1 no es modulada por la E1B-55K (Figura16).

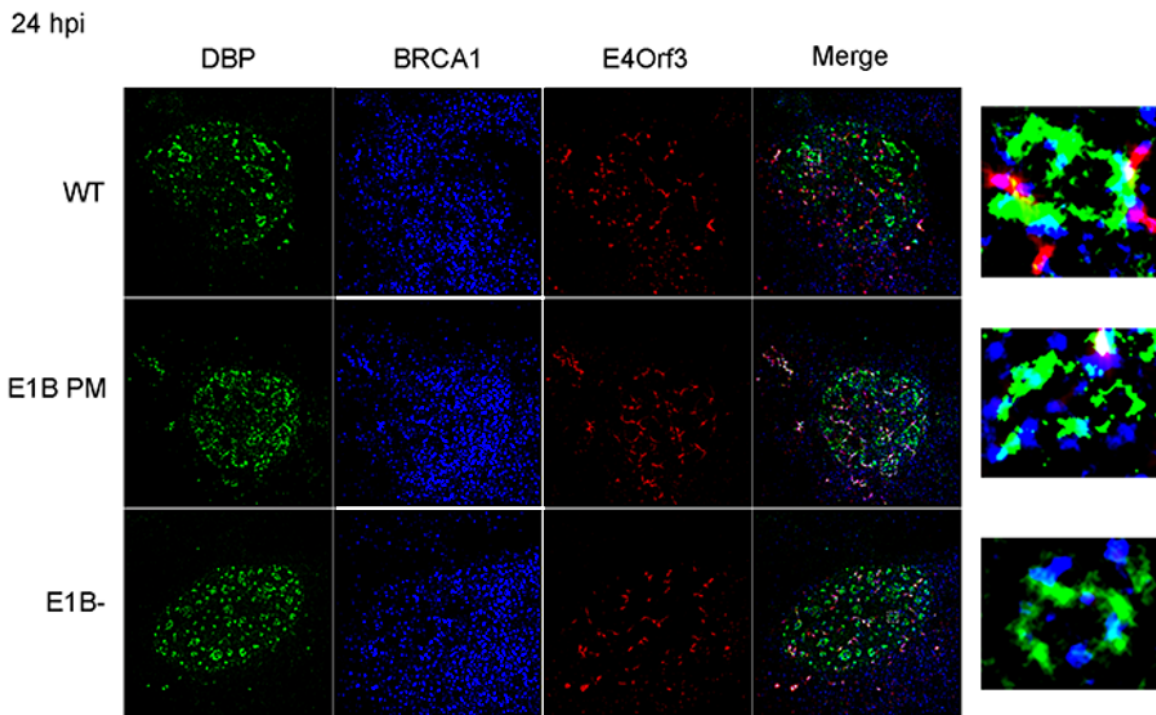
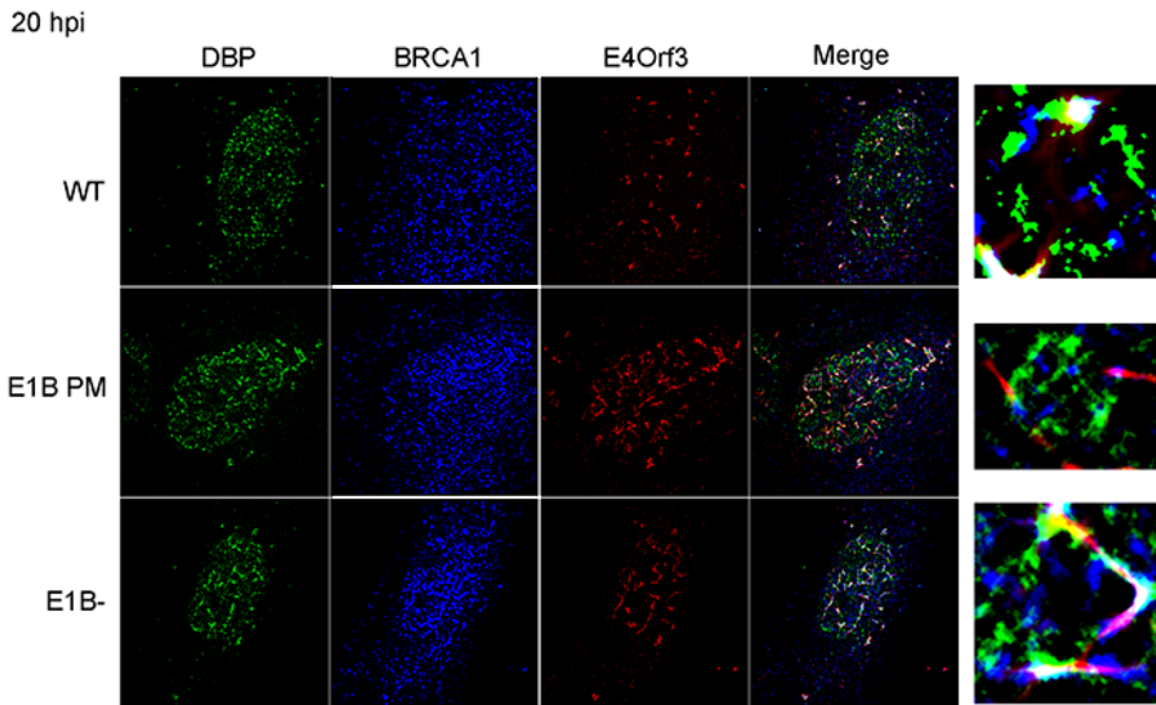
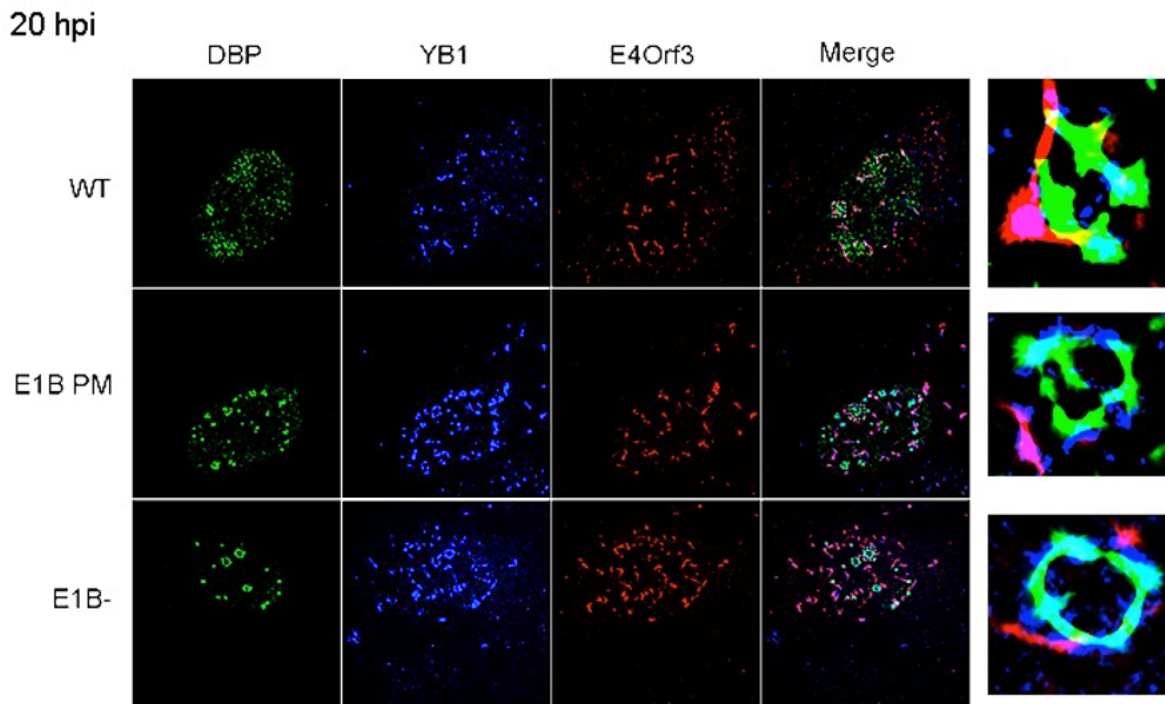


Figura 16. BRCA1 se recluta a CR y tracks nucleares independientemente de E1B-55K. Imágenes de microscopía de súper resolución de células HFF infectadas con virus wt, PM o E1B- analizadas a 20 y 24 hpi. DBP (verde, Alexa Fluor 405), BRCA1 (azul, Alexa Fluor 488), E4orf3 (rojo, Alexa Fluor 568).

7.5.3 YB1

YB1 es un factor celular multifuncional que se localiza comunmente en el citoplasma celular. Cuando la célula es sometida a estrés, YB1 se relocaliza al núcleo. Durante la infección con AdV en células HeLa, se ha demostrado que YB1 es relocalizado a los CR. Dicha relocalización depende de E1B-55K, y YB1 se une y activa el promotor viral tardío E2 [140].

La figura 17 muestra los resultados de células HFF infectadas con el virus WT, YB1 se relocalizó solo parcialmente a los CR a partir de las 20 hpi. Sin embargo, no se observaron cambios en la localización de YB1 en ausencia de E1B-55K, en contraste con lo que se había reportado [57]. En nuestros experimentos la asociación de YB1 a los CR aumentó en ausencia de la E1B-55K. Estos resultados indican que en contraste con lo que sucede en las células HeLa, una línea celular tumoral, en las células no transformadas (HFF) la relocalización de YB1 a los CR es independiente de E1B-55K (Figura 16).



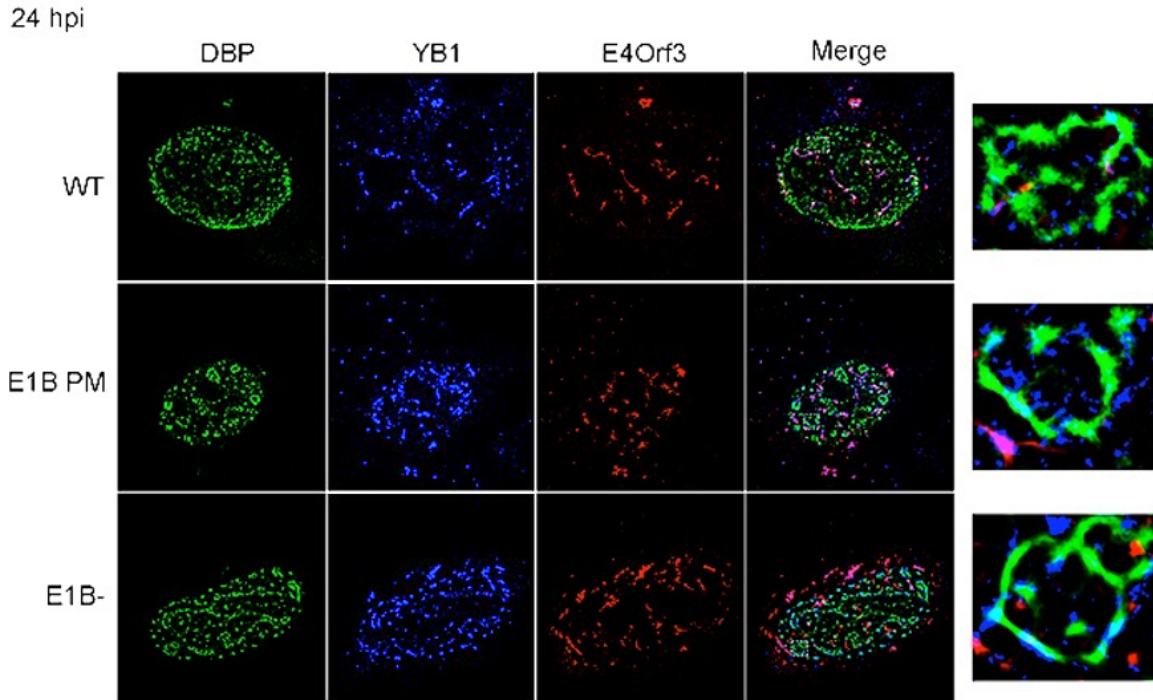


Figura 17 . Localización de YB1 es independiente de E1B-55K. Imágenes de microscopía de súper resolución de células HFF infectadas con virus wt, PM o E1B-55KE1B -, y analizadas a 20 y 24 hpi. DBP (verde, Alexa Fluor 405), BRCA1 (azul, Alexa Fluor 488), E4orf3 (rojo, Alexa Fluor 568).

7.5.4 Tap (NXF1)

La proteína celular Tap (NXF1) es el principal receptor celular encargado de la exportación de los mRNA al citoplasma y es responsable de la exportación de los mRNA virales tardíos durante la infección con Ad [105]. La figura 18 muestra que, para esta proteína, como para YB1, no observamos cambio de localización inducida por E1B-55K. En todas las condiciones y en todos los virus analizados.

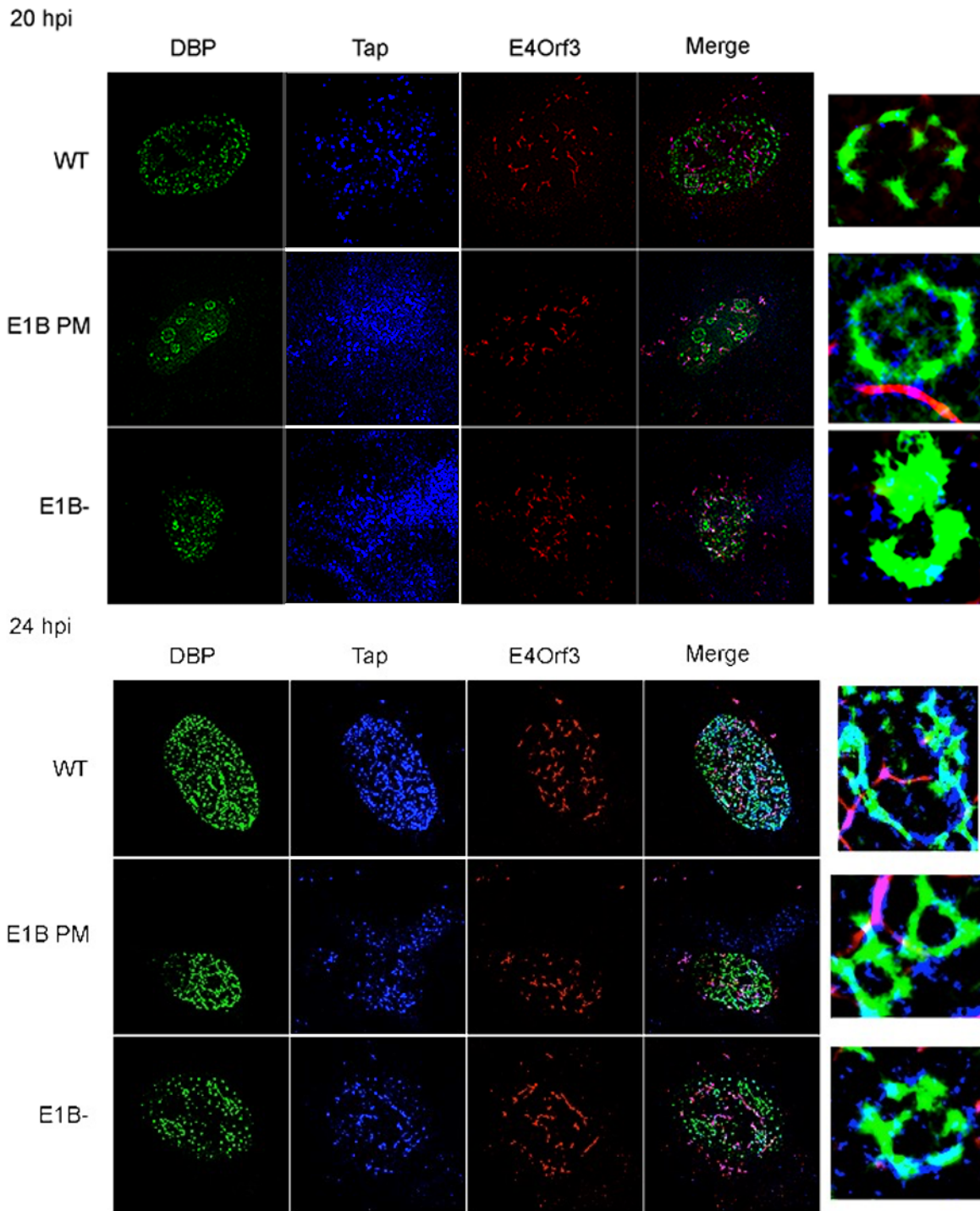


Figura 18 . La localización de Tap en la periferia de CR es independiente de E1B-55K. Imágenes de microscopía de súper resolución de células HFF infectadas con virus wt, PM o E1B- analizadas a 20 y 24 hpi. DBP (verde, Alexa Fluor 488), Tap (azul, Alexa Fluor 405), E4orf3 (rojo, Alexa Fluor 568)

En conjunto, estos resultados sugieren que la E1B-55K modula el reclutamiento de algunas proteínas a los CR que, por un lado, pueden funcionar como andamios o factores que promueven la replicación eficiente del genoma y la expresión de genes virales, y por otro, son proteínas con actividad antiviral que podrían ser inhibidas o cooptadas en los CR.

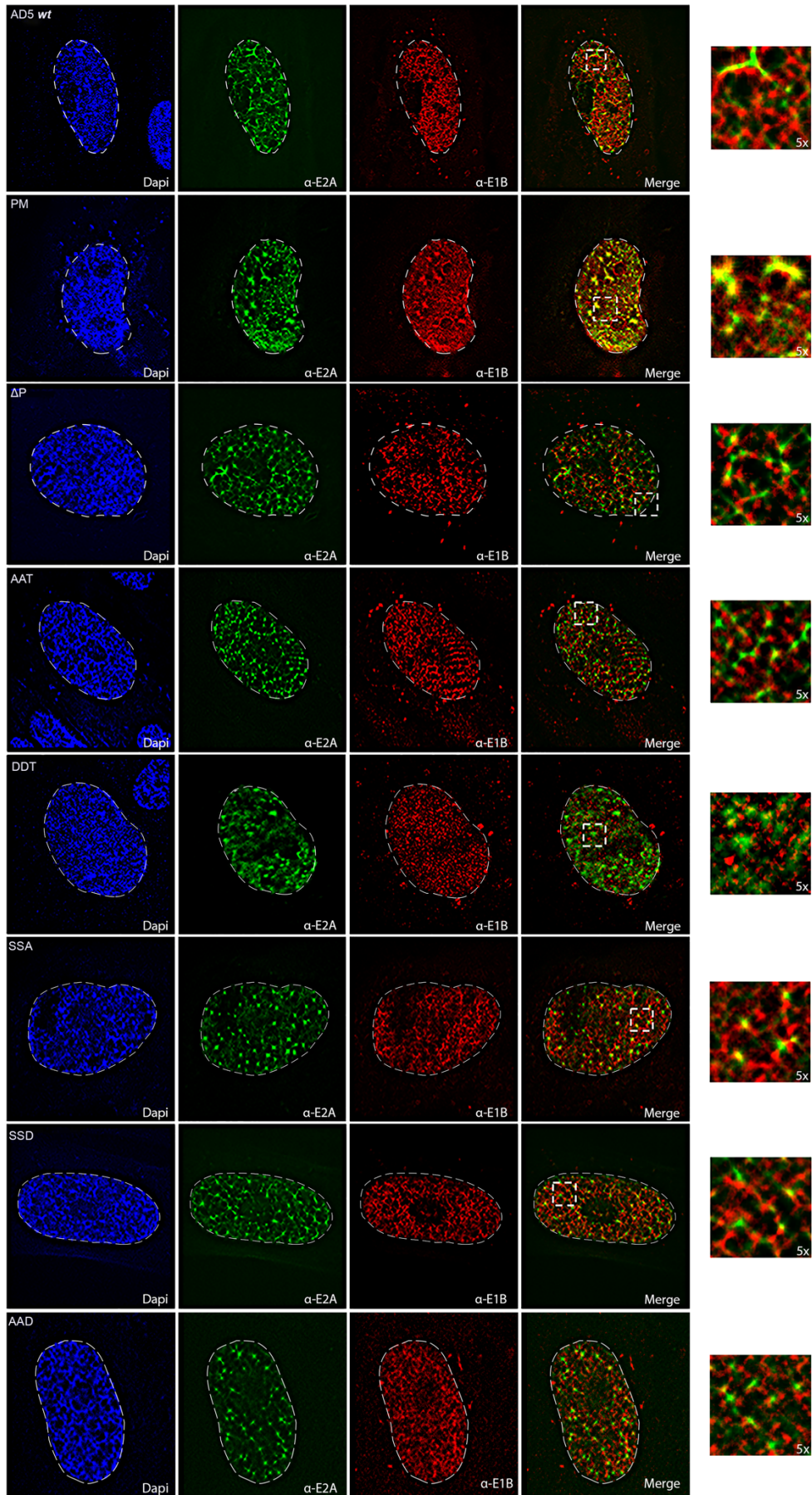
7.5 La fosforilación de la treonina 495 en la E1B-55K es necesaria para su reclutamiento a los CR.

Como se ha descrito en secciones anteriores, la formación de los CR es necesaria para la replicación eficiente de AdV y nuestros datos muestran que en ausencia de E1B-55K la formación de estas estructuras se ve alterada. Adicionalmente, hemos observado que la fosforilación de la E1B-55K es necesaria para su relocalización a estas estructuras; por tanto, con el objetivo de determinar el efecto de la modificación por fosforilación sobre su localización asociada a los CR, analizamos su distribución en los CR mediante SR, en células HFF infectadas con virus wt y mutantes de fosforilación a 16 y 24 hpi. En estos experimentos analizamos la distribución nanoscópica de la proteína E1B-55K en los CR como se describe en materiales y métodos. Por lo anterior decidimos analizar la distribución de la proteína en la etapa temprana de la infección (16 hpi) y en la etapa tardía (24 h.p.i). En la etapa temprana de la infección con el virus wt, la proteína E1B-55K se localizó en regiones en el núcleo sobre una distribución difusa; estos sitios correspondieron con los sitios en los que se localizó la proteína DBP. La magnificación de la imagen muestra la relación entre la localización de estas dos proteínas (Figura 19A). Adicionalmente y en relación con los experimentos previos con microscopía de epifluorescencia, la localización fue similar para todos los mutantes en relación al virus silvestre en tiempos tempranos de la infección para ninguno de los virus mutantes comparados con el virus wt. En la etapa tardía de la infección para el virus wt, la proteína E1B-55K colocalizó con la proteína DBP en los CR (Figura 19B); interesantemente la magnificación permitió distinguir en esta escala que estas estructuras nucleares están presentes en un halo en el que se excluyen a la E1B-55K y DBP (Figura 19B columna 5). Para el virus PM encontramos una organización

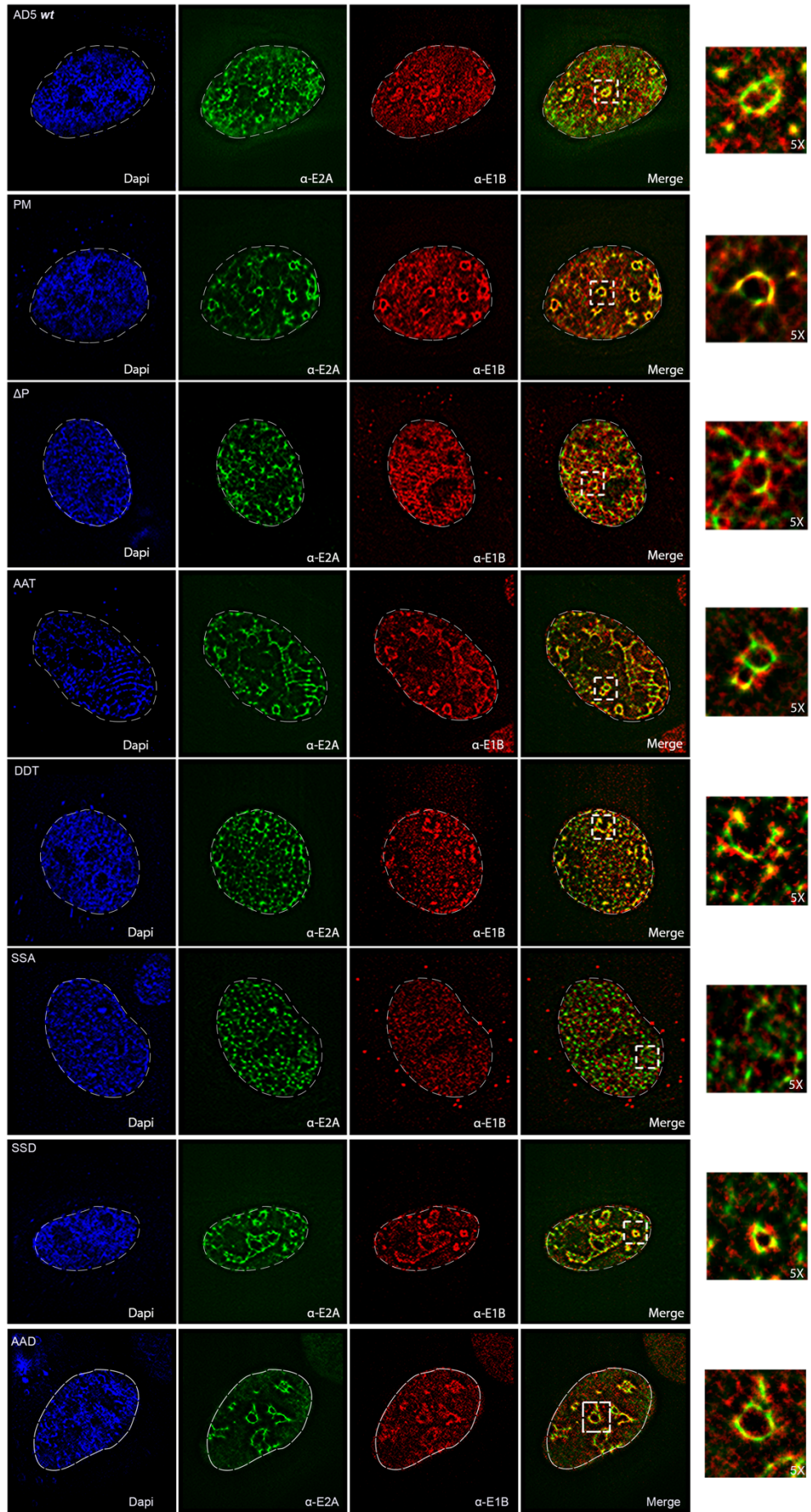
nanoscópica similar al virus wt y en contraste, en el virus ΔP la E1B-55K se localizó difusa en el núcleo y en puntos citoplasmáticos, no colocalizó completamente con la proteína DBP en los CR. Se observó un efecto similar en el virus SSA en donde la proteína se localizó en el citoplasma y núcleo pero no asociada a los CR.

Por la evidencia obtenida en los experimentos de epifluorescencia decidimos analizar la distribución de la proteína en los virus mutantes de treonina. Para el virus SSD y SST encontramos a la E1B-55K colocalizando con DBP en los CR. Sorprendentemente, para el virus AAD encontramos que la proteína colocalizó completamente con DBP en los CR. En conjunto estos datos permiten concluir que la fosforilación de la treonina 495 es indispensable para la colocalización, de la E1B-55K con la DBP en los CR virales.

A)



B)



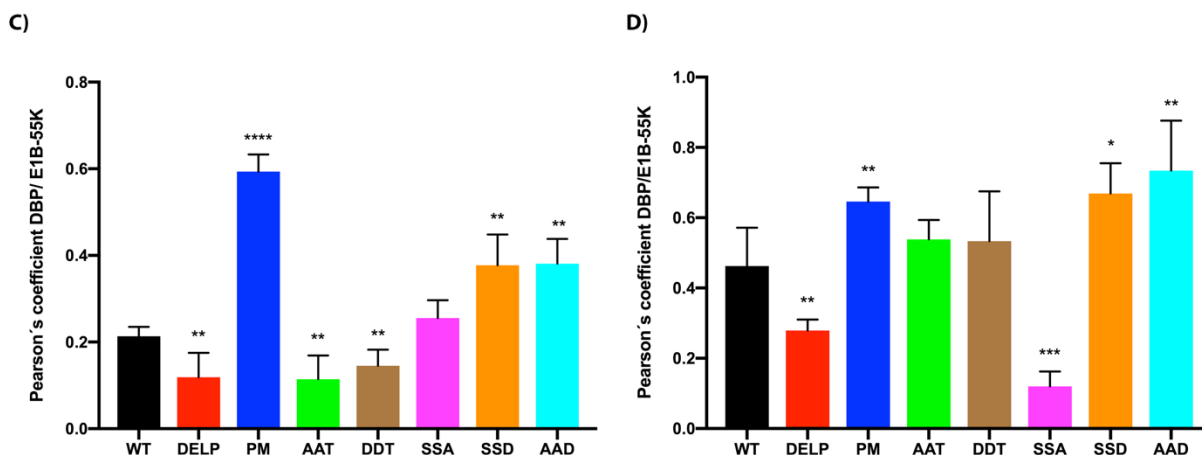


Figura 19. Papel de la fosforilación de E1B-55K sobre su distribución en CR. Imágenes de microscopía de súper resolución de células HFF infectadas con virus wt o mutantes analizadas. **A)** 16 y **B)** 24 hpi. DBP (verde, Alexa Fluor 405), DAPI (azul), E1B-55K (rojo, Alexa Fluor 568). Las reconstrucciones de superresolución se hicieron mediante el complemento SRRF como se describe en materiales y métodos. **19 C,D** Los coeficientes de colocalización de Pearson fueron calculados para todos los compartimentos de replicación (n=100 células) mediante el uso del complemento BIOP-JACOP.

7.6 La fosforilación de la T495 en E1B-55K favorece la síntesis de DNA viral.

En células infectadas con el virus mutante que no expresa E1B-55K (E1B-), se ha observado que los niveles de DNA viral y la producción de progenie son deficientes; además, la formación de los CR y el reclutamiento de moléculas a estos sitios se ve afectada. Recientemente reportamos que cuando la E1B-55K no puede ser fosforilada la eficiencia con la que se sintetiza el genoma viral disminuye y por el contrario cuando se mimetiza el estado fosforilado de la E1B-55K (PM) la eficiencia de síntesis aumenta respecto al virus wt e inclusive este proceso inicia antes[109]. Sin embargo, estos resultados no permiten distinguir si el efecto en la fosforilación de la E1B-55K sobre la síntesis de DNA viral es debido a un efecto directo sobre el mecanismo mismo de replicación de DNA o mediante un efecto indirecto o cuales residuos de la E1B-55K participan en este mecanismo. Dado que cuando no se sintetiza la E1B-55K o cuando se inhibe su fosforilación se afecta la producción de DNA viral, sugerimos que la proteína E1B-55K es necesaria para este proceso, ya

sea mediante el reclutamiento de moléculas a los CR que favorecen la síntesis de DNA viral, o mediante la regulación de promotores virales que controlan la expresión eficiente de las proteínas de la región E2 que son indispensables para el proceso de replicación del DNA viral.

Con el propósito de analizar el efecto de la fosforilación de E1B-55K sobre la síntesis de DNA viral, se infectaron células HFF con virus mutantes en los sitios de fosforilación de E1B-55K, se cosecharon a diferentes tiempos post infección (4, 12, 16, 20, 24 y 36) y se extrajo el DNA total (como se describe en materiales y métodos). Con el DNA de estas muestras se realizaron ensayos de PCR cuantitativo (q-PCR), utilizando primers que amplifican una región dentro de la unidad ML. En estos experimentos se determinó la eficiencia de replicación del genoma viral mediante el método de la curva estándar que nos permite cuantificar el número de copias de genoma viral, como se describe en materiales y métodos. La figura 20 muestra los resultados de dos experimentos independientes cada uno por triplicado. Los datos fueron normalizados tomando como 1 la cantidad de copias de genoma viral del virus silvestre a las 4 h.p.i. En células HFF la replicación del DNA viral inicia entre las 16 y 20 h.p.i, por lo que se incluyeron tiempos tempranos (4 y 12 h.p.i) en los que la replicación del DNA viral aún no ha iniciado. En estos tiempos p.i. no se observaron diferencias. Los resultados mostraron que el aumento en el número de copias de DNA viral inició entre las 16 y las 20 h.p.i., excepto para el virus PM, ya que con este virus se observó un aumento de 2.9 veces respecto al virus wt desde las 16 h p.i. A partir de las 20 h.p.i la acumulación de DNA viral aumentó significativamente para todos los virus: para el virus wt aumentó 7.5 veces de las 4 (input) a las 20 h.p.i mientras que para el virus ΔP aumentó solo 2.6 veces. Para las 24 h p.i. el incremento de DNA en las células infectadas con el virus wt fue de 29 veces y para el virus PM de 56.4 veces. Sorprendentemente para el virus ΔP el DNA viral aumentó solo 2.9 veces, es decir una producción 10 veces menor comparado con el virus wt. Para este tiempo, en el virus E1B- se observó un aumento de solo 1.29 veces. Para las 36 h.p.i las diferencias se hicieron más evidentes, el DNA del virus wt aumentó 148.56 veces con respecto al input, mientras que para el virus ΔP este incremento fue de solo 19.43 veces, es decir 7.6 veces menos que en el virus

wt, mientras que en el virus E1B- el aumento de 4 a 36 h.p.i fue de 41.25 veces, esto es 3.6 veces menos que en el virus wt. Interesantemente, el virus PM mostró un aumento de 432.90 veces a las 36 h.p.i que es 2.91 veces más que el virus wt.

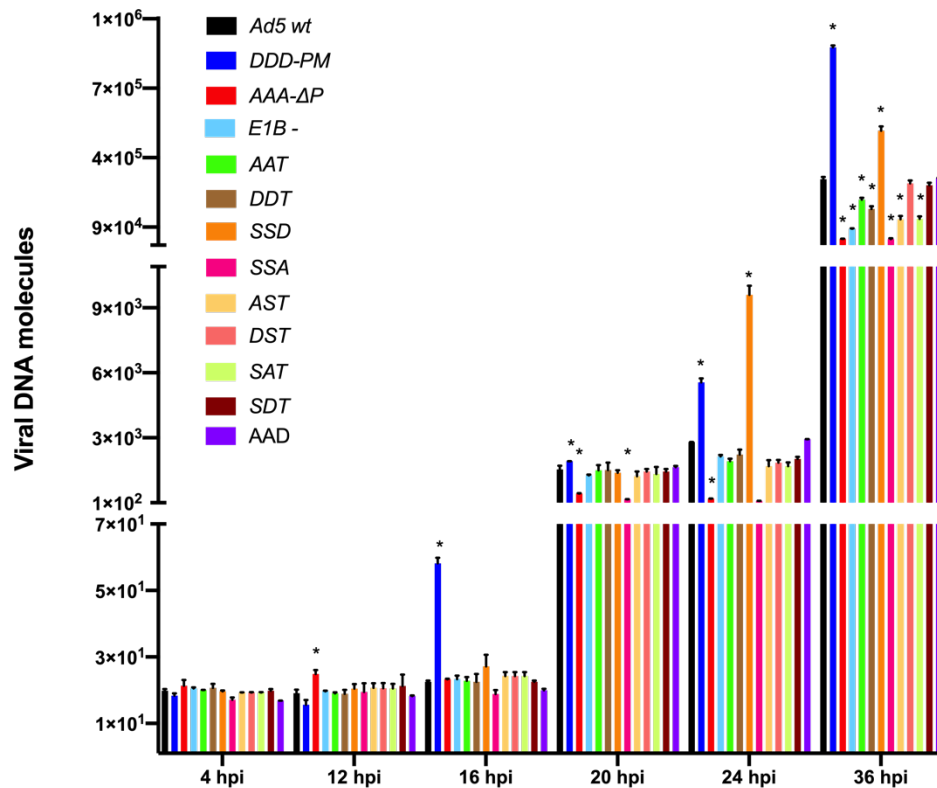


Figura 20. Efecto de la fosforilación de E1B-55K sobre la síntesis de DNA viral. Células HFF fueron infectadas y se cosecharon a 4, 12, 16, 20, 24 y 36 h.p.i el DNA fue extraído y se realizó PCR cuantitativo. Se muestra el fold-change de DNA para los mutantes de 3 experimentos independientes cada uno por triplicado, la cantidad de copias de genomas virales en células infectadas con el virus silvestre cosechadas a 4 h.p.i se tomó como input. ($P < 0.05$).

Estos resultados muestran que cuando la proteína E1B-55K no se sintetiza o cuando se inhibe su fosforilación la eficiencia con la que se acumula el DNA viral disminuye y, por el contrario, cuando se mimetiza el estado fosforilado de los tres sitios en E1B-55K la acumulación de DNA aumenta y se detecta un incremento, inclusive antes que en el virus wt. Para determinar el efecto de la fosforilación en

las serinas y treonina sobre la replicación del DNA viral se utilizaron los mutantes AAT, DDT, SSD, SSA, AST, DST, SAT y SDT. La figura 20 muestra los resultados obtenidos para estos virus mutantes. Desde las 12 y hasta las 16 h.p.i se observaron diferencias nominales en los virus mutantes. Sin embargo, similar a lo observado con el virus PM, en el virus SSD se observó una diferencia notable en el número de copias sintetizadas para este tiempo. Para los virus AAT y DDT se observaron diferencias de 19.22 y 25.26 veces, respectivamente. Es decir, para las 24 h.p.i se observó una pequeña disminución en la síntesis de genomas del virus AAT y un ligero aumento en el virus DDT respecto al virus wt. Algo interesante es que para el virus SSD se observó un incremento en la acumulación de DNA de 99.47 veces respecto al input, que representa 4.6 veces más que en el virus wt a las 24 h.p.i. En este mismo sentido el virus SSA mostró un incremento de 1.68 veces, que es 12.67 veces menor que el wt. Sorprendentemente para los virus mutantes AST y SAT se observó un incremento de solo 15.4 veces y 16.4 veces mientras que para los mutantes DST y SDT el incremento fue de 18.1 y 20 veces, respectivamente, que comparado con el virus wt los cambios en la acumulación fueron nominales. Para las 36 h.p.i el virus AAT mostró una ligera diferencia en la acumulación del DNA viral (1.23 veces menor que el virus wt). Algo inesperado fue que el virus DDT mostró una disminución con respecto al virus wt (2.13) mientras que para el virus SSD se observó un incremento de 2.48 veces con respecto al wt. En contraste, el mutante SSA mostró un incremento de 4 h.p.i a 36 h.p.i. 5.96 veces menor que el virus wt. Para los mutantes sencillos de serina AST y SAT el incremento fue de solo 56.8 y 57.8 veces mientras que para los virus mutantes DST y SDT se detectó un incremento similar al virus silvestre (134.39 y 130.3 veces).

En conjunto estos datos sugieren que la fosforilación de las serinas 490 y 491 en E1B-55K no es necesaria para la replicación de DNA viral; Sin embargo. la fosforilación de la treonina 495 es indispensable para la replicación eficiente del DNA viral.

7.7 La fosforilación de la treonina en E1B-55K favorece la fosforilación de las serinas 490 y 491.

Como se describió antes, se sabe que las serinas 490 y 491, y la treonina 495 pueden ser fosforiladas por CK2. Sin embargo, la treonina 495 se encuentra en un sitio consenso para CK1 y no se ha demostrado si cada uno de los tres sitios puede ser modificado por estas dos o alguna otra cinasa celular. Por otra parte, no se sabe si la fosforilación de cualquiera de los sitios repercute en la fosforilación de los otros dos sitios. Además, no se ha investigado si existe una secuencia temporal en la modificación de cada uno de los tres sitios en el ciclo de replicación del virus. Dado que los experimentos con los virus mutantes fosfomiméticos muestran que la regulación de las actividades de la E1B-55K depende del estado fosforilado de la treonina 495, pero que los experimentos con los mutantes con sustituciones, por alanina o aspartato, no permiten determinar si los sitios no sustituidos son fosforilados, es necesario determinar el estado fosforilado de la proteína durante el ciclo de replicación viral. Con este propósito diseñamos experimentos de inmunoprecipitación y Western blot que permitieran detectar el estado fosforilado de las serinas y la treonina en la E1B-55K durante la infección. Para estos experimentos se infectaron células HFF con el virus silvestre y mutantes dobles o sencillos en los sitios de fosforilación; posteriormente se obtuvieron lisados de células infectadas a las 24 h.p.i. (ver materiales y métodos). Con estas muestras se inmunoprecipitó la E1B-55K con el anticuerpo 2A6 y se procesaron para Western blot como se describe en materiales y métodos. Las membranas se incubaron con los anticuerpos anti-E1B-55K 2A6, anti-fosfoserina (PSR-45 Abcam) o anti-fosfotreonina (9381 Cell Signaling) y posteriorme fueron reveladas.

Como muestra la figura 21A en todos los carriles se detectó una banda que corresponde al peso molecular de la proteína E1B-55K a excepción de los carriles que corresponden a las células mock y a las células infectadas con el virus mutante que no expresa la E1B-55K (E1B-). Adicionalmente se detectó una banda por debajo de la banda de interés correspondiente a la cadena pesada del anticuerpo MAb 2A6, (que funciona en este experimento como control interno de carga). Esto muestra que las sustituciones en el carboxilo terminal no impiden el reconocimiento

de la proteína por el anticuerpo 2A6 pues en todos los casos se inmunoprecipitaron cantidades similares de la proteína. Adicionalmente tanto en el virus mutante que no expresa la E1B-55K como en células mock se detectó solo la cadena pesada del anticuerpo confirmando que la banda a la altura de 55 kDa corresponde a la proteína E1B-55K (Figura 21).

Como se muestra en la figura 21 cuando se inmunoprecipitó con el anticuerpo 2A6 y se detectó con el anticuerpo antifosfoserina, detectamos una banda por encima de la cadena pesada del anticuerpo a la altura de 55 kDa en los carriles para el virus silvestre, y mutantes sencillos de treonina por alanina (SSA) o ácido aspártico (SSD) que no fue detectada en el virus E1B- ni en los mutantes dobles de serinas (AAT, DDT), lo que sugiere que la banda corresponde a la fosforilación de las serinas 490 y/o 491.

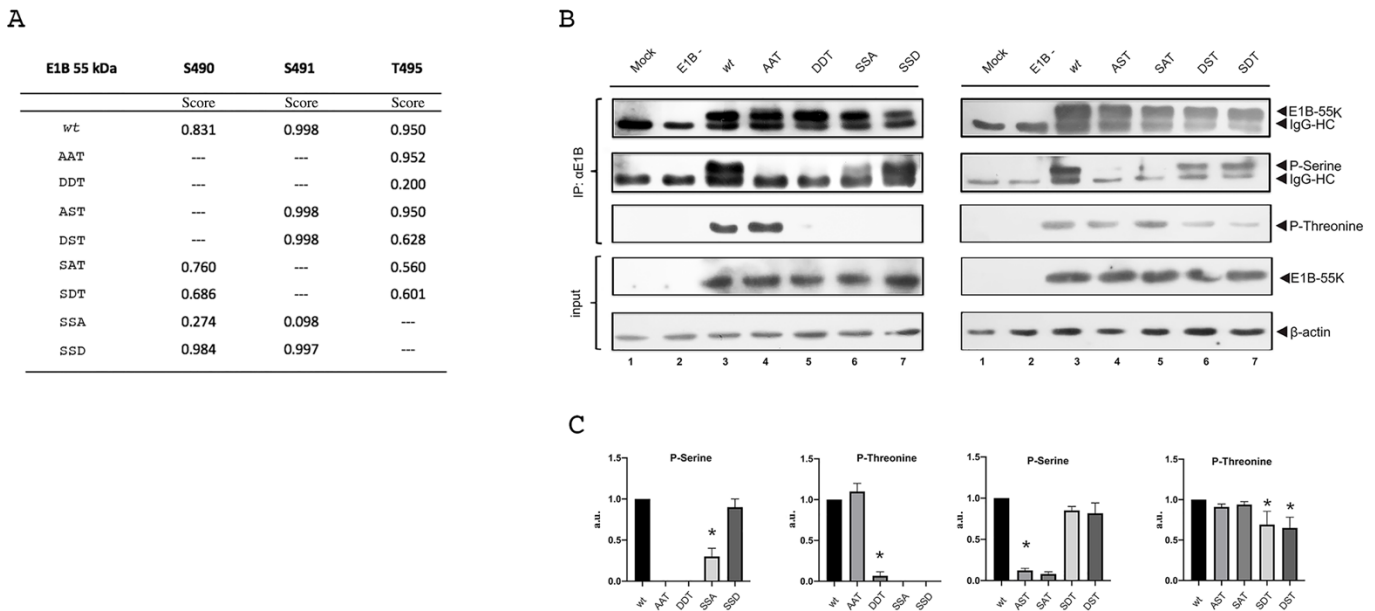


Figura 21. Regulación de la fosforilación de E1B-55K. A) Se muestra el análisis de probabilidad de los sitios de fosforilación mediante el software Netphos 2.0, **B)** Células HFF fueron infectadas con el virus silvestre o mutantes, fueron cosechadas a las 24 hpi y el lisado de células fue inmunoprecipitado con el anticuerpo 2A6 y detectado mediante el anticuerpo 2A6, anti-fosfoserina (PS-45) de Abcam, o anti-fosfotreonina (Rabbit 9381) de Cell signaling y como control B-actina. La cuantificación se realizó mediante densitometría usando el complemento de Fiji como se describe en materiales y métodos, los resultados mostrados fueron de 3 experimentos independientes.

El panel 22B muestra la cuantificación por densitometría de los niveles de las proteínas indicadas. Los datos fueron normalizados a IgG H y al total de proteína E1B-55K inmunoprecipitada. Estos resultados muestran que en el virus mutante SSA la fosforilación de las serinas está reducida, mientras que por el contrario en el mutante SSD hay un aumento en las bandas que corresponden a la fosforilación de serinas en E1B-55K. Además, que la fosforilación de cualquiera de las dos serinas 490 o 491 aumenta cuando se mimetiza el estado fosforilado de la treonina 495 (se discute más adelante) (Figura 21C).

Como se esperaba, en los virus mutantes dobles de serinas (AAT y DDT) no se detectó ninguna banda incluso en exposiciones largas, dado que en estos mutantes no puede ocurrir la fosforilación de estos residuos. Esto confirma que la señal detectada corresponde exclusivamente a la fosforilación de las serinas 490 o 491. Estos datos sugieren que la fosforilación de la treonina favorece la fosforilación de ambas serinas 490/491. Sin embargo, estos datos no permiten diferenciar cuál de las serinas es fosforilada, o si la fosforilación de una afecta, positiva o negativamente, la fosforilación de la otra.

Adicionalmente decidimos realizar experimentos para determinar el estado de fosforilación de la treonina 495 cuando se sustituyen las serinas por alanina o ácido aspártico. Como en los experimentos anteriores se inmunoprecipitó la proteína E1B-55K pero esta vez se detectó con el anticuerpo anti-fosfotreonina, para el virus silvestre una banda a la altura de 55 kDa correspondiente a la fosforilación en treonina 495 (Figura 21A) que incrementó ligeramente en el virus mutante AAT y para el virus mutante DDT se observó una banda de intensidad apenas detectable. Así mismo no se detectó ninguna banda para los virus mutantes SSA y SSD, lo cual indica que la señal detectada corresponde únicamente a la fosforilación en la treonina 495 de E1B-55K. Estos resultados muestran que la fosforilación de las serinas 490 y/o 491 impide la fosforilación de la treonina 495 (Figura 21).

Con la intención de determinar el cambio en la fosforilación de la E1B-55K en los mutantes sencillos (AST, DST, SAT, SDT) implementamos los mismos experimentos de inmunoprecipitación seguida de la detección mediante anticuerpos, contra fosfotreonina y fosfoserina (Figura 21C). La fosforilación de las

serinas está disminuida en los mutantes sencillos AST y SAT mientras que los niveles permanecen similares en los mutantes DST y SDT con respecto al virus silvestre (Figura 21C). Estos datos muestran que la fosforilación de una de las dos serinas favorece la fosforilación de la otra y cuando una de las dos serinas no puede ser fosforilada disminuye la fosforilación de la otra.

En los virus mutantes sencillos de serina por alanina o ácido aspártico se detectó una banda que corresponde a la E1B-55K fosforilada en treonina, pero la intensidad de esta banda en los mutantes DST y SDT fue significativamente menor. Esto último indica que existe un mecanismo mediante el cual se establece el orden de fosforilación de la E1B-55K (se discute más adelante) y sugiere que la fosforilación de la treonina precede a la fosforilación de las serinas y que la fosforilación de cualquiera de las serinas favorece la fosforilación de la otra.

7.8 La E1B-55K es fosforilada por CK1, CK2 y GSK3.

Como se ha descrito las serinas 490/491 pueden ser fosforiladas por la cinasa CK2 [86]; sin embargo, no hay información sobre qué cinasas podrían fosforilar a la treonina 495. Algunos reportes muestran que durante la infección con AdV algunas cinasas, como CK2, PKR, entre otras, se relocalizan a inclusiones nucleares [141]. Adicionalmente, se ha reportado que E1B-55K podría ser fosforilada por CK1 o GSK3 [86]. Análisis de secuencia ha mostrado que la treonina 495 está en un sitio consenso para CK1 (pS-X-X-S / T) y GSK-3 (S / T-X-X-X-pS / pT), pero se ha sugerido que CK2 puede ser responsable de la fosforilación de la treonina 495 y no se ha demostrado que CK1 o GSK3 puedan fosforilar a E1B-55K durante la infección por AdV. Por este motivo, realizamos experimentos en los que se inhibió cada una de estas cinasas con los fármacos N-(2-Aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulphonamide dihydrochloride (CK1-7), 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole (DMAT), y/o 6-bromoindirubin-3-oxime (BIO), que inhiben las cinasas CK2, CK1 y GSK3, respectivamente. Posteriormente la proteína E1B-55K se inmunoprecipitó y se determinó por Western blot el estado fosforilado de la proteína en presencia o ausencia de los inhibidores.

Nuestros resultados confirmaron el papel de CK2, ya que su inhibición resultó en la ausencia de la fosforilación de las serinas 490 y 491 (Figura 22A). Por otra parte, la inhibición de CK1 dio como resultado la disminución casi completa de la fosforilación en la treonina 495 y no hubo efecto sobre las serinas 490 y 491 (Figura 22B). Curiosamente, la inhibición de GSK3 dio como resultado una ligera disminución de la fosforilación de las serinas 490 y 491 (Figura 22C). Para confirmar estos resultados y analizar el posible efecto redundante de las cinasas, realizamos inhibiciones dobles de CK1 y CK2 como se muestra en la figura 22D. No se detectó ninguna señal correspondiente a fosfoserina o fosfotreonina cuando se inhibieron CK1 y CK2, lo que indica además que en ausencia de CK1 y CK2 no hay fosforilación por GSK3 en estas condiciones. Además, para determinar el papel de GSK3 en la fosforilación de treonina 495 o serinas 490/491, realizamos inhibiciones de CK1 y GSK3, y solo se detectó fosforilación de las serinas en ausencia de CK1 (Figura 22E).

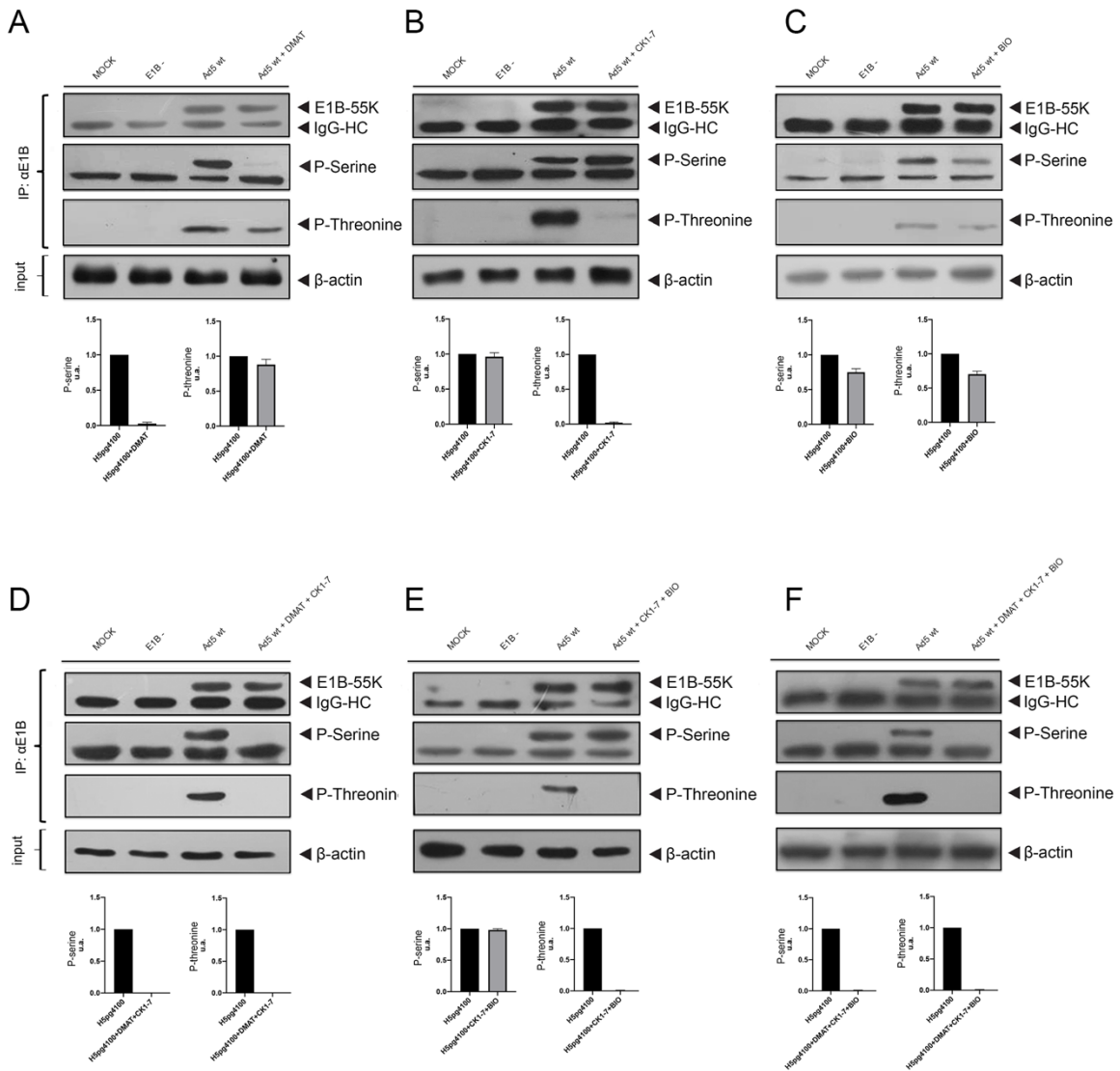


Figura 22. CK1, CK2 y GSK3 regulan la fosforilación de la E1B-55K. Células HFF fueron infectadas con el virus silvestre o mutantes, fueron tratadas con inhibidores de cinasas y posteriormente cosechadas a las 24 hpi, las proteínas del lisado de células fue inmunoprecipitado con el anticuerpo 2A6, detectado con el anticuerpo 2A6, anti-fosfoserina (PS-45) de Abcam o anti-fosfotreonina (Rabbit 9381) de Cell signaling. **A)** DMAT (inhibidor de CK2), **B)** CK1-7 (inhibidor de CK1), **C)** BIO (Inhibidor de GSK3), **D)** CK1-7 y DMAT, **E)** CK1-7 y BIO **F)** DMAT, CK1-7 y GSK3. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes.

Finalmente, para determinar si alguna otra cinasa puede fosforilar estos sitios, realizamos una triple inhibición y no detectamos ninguna banda, lo que confirmó que CK1 y CK2 son responsables de la fosforilación de la proteína y que GSK3

podría tener un efecto en conjunto con CK1 o CK2(Figura 23F). Tomados en conjunto, nuestros resultados confirmaron que CK2 es responsable de la fosforilación de las serinas 490 y 491 y demostraron que la treonina 495 es fosforilada por CK1. Por otro lado, los resultados sugieren que la fosforilación de la proteína por GSK3 podría depender de CK1 como se ha descrito para otras proteínas celulares.

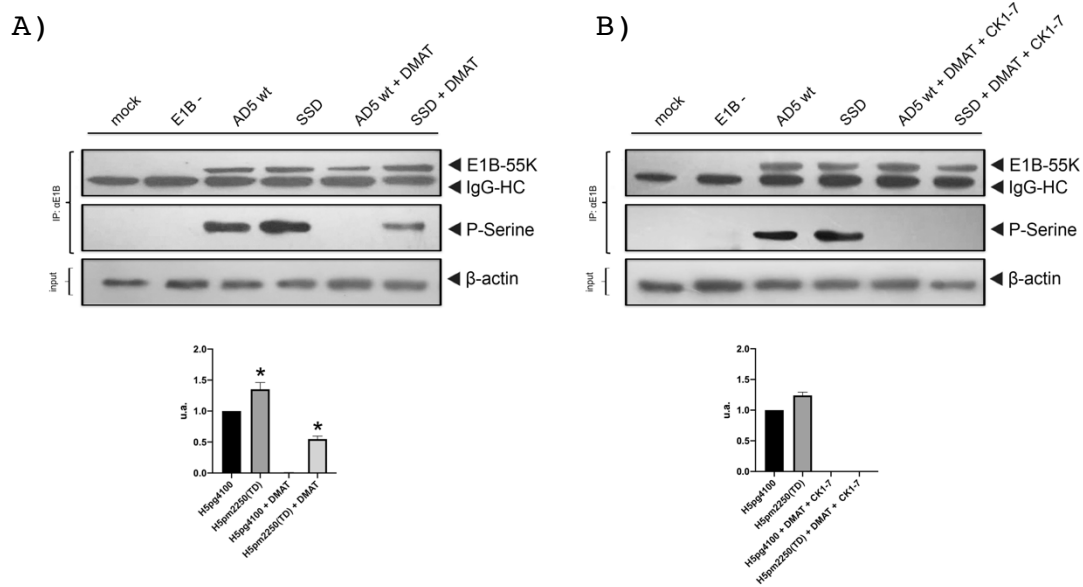


Figura 23. La actividad de GSK3 depende de la prefosforilación de la treonina 495 por CK1. Células HFF fueron infectadas con el virus silvestre o mutante SSD, fueron tratadas con inhibidores de cinasas y cosechadas a las 24 hpi, las proteínas del lisado de células fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo 2A6 y detectado mediante el anticuerpo 2A6 o anti-fosfoserina (PSR-45 Abcam). **A)** DMAT **B)** DMAT y CK1-7. Los resultados fueron obtenidos a partir de 3 experimentos independientes

La actividad de la cinasa GSK3 depende de la fosforilación previa por otras cinasas de alguno de los sitios susceptibles a ser fosforilados. Se sabe que CK1 es una de estas cinasas; en algunas proteínas se requiere la fosforilación inicial por CK1 para la fosforilación subsecuente por GSK3 [142, 143]. Dado que la secuencia de reconocimiento S / T-X-X-pS / pT de GSK3 está presente en el extremo C-terminal de E1B-55K, esta cinasa podría fosforilar las serinas 490 y 491 siempre que la

treonina 495 esté fosforilada. Para probar esto, realizamos experimentos donde CK2 fue inhibida en el mutante SSD. Como se muestra en la figura 23A, en la infección por el virus SSD y la consecuente inhibición de CK2 por tratamiento con el inhibidor DMAT, se observó una banda correspondiente a la fosforilación de serinas 490 o 491, de forma similar al virus wt. Además, cuando se inhibieron CK1 y CK2, no se detectó ninguna señal correspondiente a la fosforilación de las serinas 490 o 491. Tomados en conjunto, estos resultados muestran, por un lado, que la actividad de CK1 es necesaria para la fosforilación por GSK3, y por otro lado que la fosforilación de la treonina 495 es indispensable para la consecuente fosforilación de las serinas por GSK3 (Figura 23B).

7.9 Las sustitución en los sitios de fosforilación por alanina en la E1B-55K reducen la producción de progenie viral.

Debido a la observación de que las fosforilaciones en la proteína E1B-55K están involucradas en procesos clave en el ciclo de replicación, como la replicación del DNA viral, analizamos el efecto de su modificación sobre la eficiencia de la replicación del virus. Para esto se infectaron células HFF con el virus wt o los virus mutantes; posteriormente las células fueron cosechadas y se lisaron como se describe en materiales y métodos. Los lisados se usaron para titular la producción de progenie por focos fluorescentes. La figura 24 muestra los resultados de tres experimentos independientes, cada uno por triplicado. Como se puede observar, para el virus ΔP la producción de progenie viral fue 90 veces menor comparado con el virus wt, mientras que por el contrario para el virus PM se observó un aumento de 4 veces en la producción de progenie. Estos datos muestran que la fosforilación de los tres sitios favorece la eficiencia con la que se produce progenie viral y que por el contrario cuando ninguno de los tres sitios puede ser fosforilado el proceso de producción de progenie se ve afectado negativamente, indicando que la fosforilación de la E1B-55K es necesaria para la eficiente producción de progenie viral. En los virus mutantes de serinas Ser 490 y 491 sustituidas por ácido aspártico (DDT) la eficiencia con la que se producen progenie disminuyó ligeramente (0.5 veces) mientras que cuando estos mismos sitios son sustituidos por alaninas (AAT)

la producción disminuye en 24 veces. Estos datos muestran que la fosforilación de las serinas490/491 o treonina 495 tienen efectos diferenciales sobre la producción de progenie.

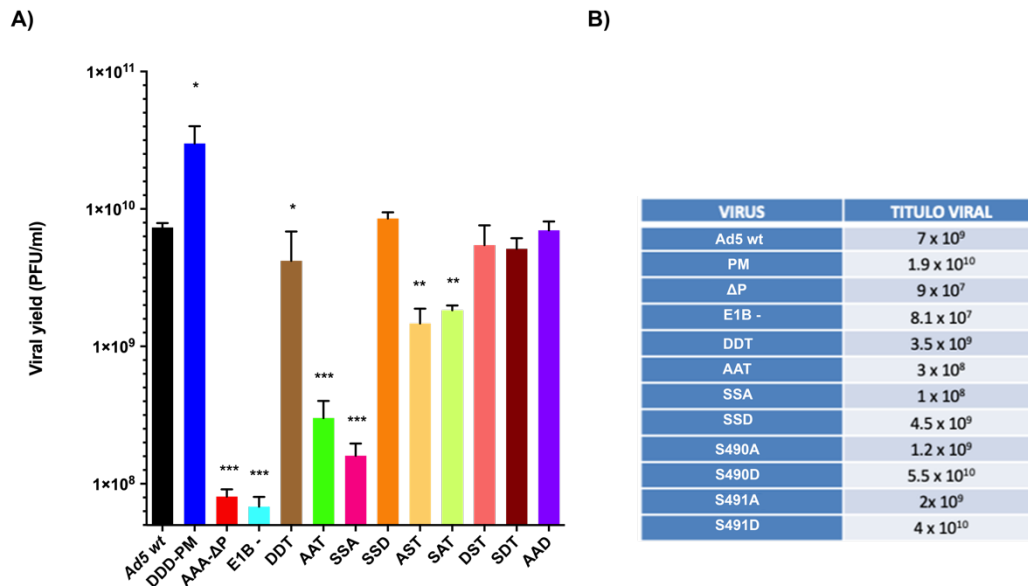


Figura 24. Efecto de la fosforilación de la E1B-55K sobre la producción de progenie viral. Células HFF fueron infectadas con el virus silvestre o recombinantes, fueron cosechadas a las 36 hpi y fueron lisadas para la obtención de progenie viral cada experimento por triplicado, los lisados virales fueron titulados por conteo de focos fluorescentes como se describe en materiales y métodos.

Para obtener información sobre estas diferencias se determinó la producción de progenie en virus mutantes sencillos. En estos mutantes AST y SAT se observó una ligera disminución en la cantidad de progenie viral, mientras que los mutantes donde se mimetizó la fosforilación individual (DST y SDT) no se observaron diferencias con respecto al virus wt. Interesantemente cuando la treonina se sustituyó por alanina la producción de progenie viral disminuyó casi 2 logaritmos, niveles comparables al mutante en el que la proteína E1B-55K no se expresa. Por el contrario, cuando se sustituyó la treonina 495 por ácido aspártico se recuperó el fenotipo cercano al nivel del virus wt.

Estos datos sugieren que la fosforilación de las Ser 490/491 y de la treonina 495 son necesarias para la producción eficiente de progenie viral, pero que la fosforilación de las serinas y treonina tiene un efecto diferencial en el que la fosforilación de la treonina es determinante para la producción eficiente de progenie viral.

7.10 La fosforilación de la treonina 495 en E1B-55K es necesaria para sus actividades asociadas con los CR.

En este estudio hemos determinado que la fosforilación de la treonina 495 en la proteína es responsable de su ubicación en los CR. Un efecto que es similar al reportado para el virus fosfomimético en los tres sitios (PM). Esta localización se correlaciona con una producción eficiente de DNA y progenie viral. Además, se sabe que la fosforilación de E1B-55K regula su actividad como represor de la transcripción. Con esto en mente y sabiendo que la transcripción y el empalme tardío de genes virales están coordinados en los CR, decidimos determinar si la fosforilación de la treonina 495 impacta las actividades de E1B-55K en los CR. Para determinar si la fosforilación de la treonina 495 de E1B-55K puede regular la transcripción y / o splicing de los mRNA virales tardíos, aprovechamos una estrategia metodológica montada en el laboratorio con la que se pueden aislar los CR de células infectadas con Ad [144]. Los CR aislados son funcionales in vitro y han demostrado ser un sistema útil para estudiar la regulación de la replicación, transcripción y splicing del genoma viral. Usamos este sistema para evaluar el efecto de la fosforilación de la treonina 495 de E1B-55K sobre la transcripción de los genes virales tardíos en CR como se describe en materiales y métodos. Como se muestra en la figura 25A para el virus SSA, el input de RNA obtenido fue 2.3 veces menor en comparación con el virus wt, lo que sugiere que la mutación resulta en niveles menores de mRNA virales. Además, la síntesis de RNA viral *de novo* fue 4.1 veces menor que en el virus wt. Una observación interesante fue que para el virus SSD no se detectaron diferencias en la cantidad del input de mRNA con respecto al wt, y los niveles de mRNA sintetizados *de novo* fueron 1.3 veces mayor a los observados con el wt.

Cuando se analizaron los CR de células infectadas con el virus SSA, los mRNA procesados *de novo* fueron 2.7 veces menores que en el virus wt (figura 25B). En contraste, en el virus SSD el procesamiento por splicing de los mRNA virales fue 1.2 veces más eficiente que en el wt (Figura 25B). Se sabe que los niveles de expresión de los genes virales tardíos dependen de la eficiencia de replicación del genoma viral. Por lo tanto, para determinar si los fenotipos observados en la transcripción y splicing podrían ser consecuencia de alteraciones en la replicación del DNA viral se evaluó el efecto de los mutantes sobre la síntesis *de novo* de DNA viral.

Los resultados mostraron que la fosforilación de la treonina 495 impacta la eficiencia de síntesis de DNA, ya que con el virus SSA se produjo 1.7 veces menos DNA que con el virus wt, mientras que con el SSD se produjo 2 veces más (Figura 25C), interesantemente en el virus PM la síntesis de DNA fue de 3.6 veces más que en el virus wt. Estos resultados indican que la fosforilación de la treonina 495 en E1B-55K es necesaria para potenciar la síntesis de mRNA virales tardíos y su procesamiento por splicing, además de potenciar la síntesis del DNA viral.

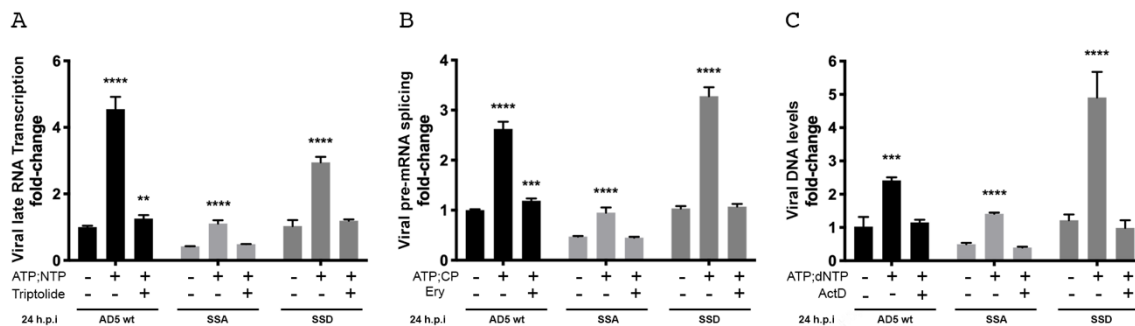


Figura 25. La fosforilación de la treonina 495 de E1B-55K promueve las actividades de replicación, transcripción y splicing en los CR.

Se aislaron partículas de CR de células infectadas con el virus wt y se compararon con CR de células infectadas con los virus SSA o SSD a las 24 hpi. A) Las muestras de CR se incubaron con ATP y NTP para cuantificar la síntesis de mRNA; B) con ATP y CP para cuantificar el procesamiento por splicing de los pre-mRNA; C) con ATP y dNTP para cuantificar la síntesis de DNA. Se aisló el DNA, RNA y el pre-mRNA sintetizados o procesados *de novo* por PCR como se describe en materiales y métodos. ActD (25 µg / ml); Ery: eritromicina (500 µM); ActD: actinomicina (100 ng / ml). Se graficaron las proporciones de los valores in vitro (i. V.) sobre los valores de ininput (sin tratamiento) para cada condición. Se muestran los promedios de los triplicados de tres experimentos independientes, en relación con Ad5 wt 24 h.p.i.

7.11 La fosforilación de la treonina 495 en E1B-55K es necesaria para la regulación del promotor E1A.

Tomados en conjunto, los datos de las secciones anteriores muestran que la fosforilación de la proteína E1B-55K en la treonina 495 es necesaria para las actividades de la proteína asociadas con los CR, pero no permiten determinar si la proteína participa directamente en cada uno de los mecanismos de síntesis de DNA, splicing o transcripción. Recientemente encontramos que la E1B-55K regula a cada uno de los promotores de AdV [109], confirmando la actividad que se había propuesto para la proteína sobre algunos promotores celulares, pero ampliando esta observación a la regulación de los genes virales. En el caso particular del promotor del gen E1A, encontramos que la E1B-55K aumenta su expresión en células transfectadas (fuera del contexto de la infección) y la reduce en células infectadas durante la fase temprana del ciclo de replicación. Para determinar si la fosforilación de la E1B-55K tiene un efecto directo sobre la transcripción, se realizaron ensayos en los que se midió la expresión del gen de luciferasa dirigida por el promotor E1A (Figura 26). El efecto de E1B-55K sobre el promotor se midió tanto en ausencia de otras moléculas virales (en células transfectadas), como en el contexto de la infección (en células transfectadas con los plásmidos e infectadas con el virus mutante E1B-, como se describe en materiales y métodos). La actividad de luciferasa se midió en ausencia de la infección a 28 hpt (figura 26, barras negras) y durante la infección, a 8 hpi (fase temprana) y a 24 hpi (fase tardía), en células H1299, por ser fácilmente transfectables (figura 26, barras de color gris claro y oscuro, respectivamente). En el contexto de la célula infectada, la E1B-55K wt y con la sustitución SSD dieron como resultado niveles más bajos de expresión dirigida por el promotor de E1A en la fase temprana de la infección. En contraste, la sustitución SSA no mostró un efecto de represión. Una observación no esperada fue que en células transfectadas tanto SSD como SSA mostraron un aumento, aunque no estadísticamente significativo, para SSA en la expresión del promotor E1A. Tomados en conjunto, los resultados de los ensayos de luciferasa sugieren que la fosforilación de la E1B-55K tiene un efecto directo sobre la regulación de la

transcripción y que la fosforilación de la treonina 495 es necesaria para la represión por E1B-55K del promotor de E1A durante la fase temprana de la infección.

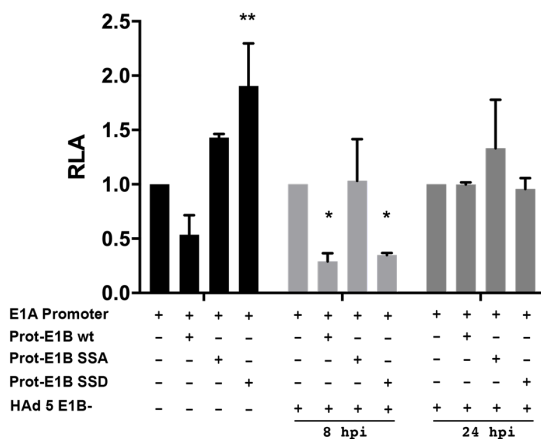


Figura 26. La fosforilación de la treonina 495 de E1B-55K es determinante para la actividad de la proteína en la regulación de la transcripción. Las células se transfectaron con un plásmido en el que la expresión del gen reportero de la Luciferasa está bajo el control del promotor de E1A y con un plásmido que expresa a la E1B-55K wt o mutantes SSA o SSD. La actividad de Luciferasa se midió a 28 hpt (barras negras). En paralelo, células transfectadas con estos plásmidos fueron infectadas con el virus E1B- y la actividad de Luciferasa se midió a las 8 y 24 hpi (barras grises). La señal de Luciferasa de luciérnaga se normalizó con la señal de Luciferasa de Renilla para obtener la actividad relativa de luciferasa (RLA) en unidades arbitrarias, los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes por triplicado.

8. DISCUSIÓN

Durante muchos años, los AdV han sido una herramienta importante que ha ayudado a entender procesos celulares; en las últimas dos décadas se ha demostrado su potencial como vector oncolítico y la proteína E1B-55K es uno de los principales blancos para el diseño de vectores pues los virus con alteraciones en esta proteína viral han mostrado funcionar como vectores oncolíticos en terapias combinadas contra el cáncer debido a su replicación selectiva en células tumorales sobre células normales [145, 146]. Esto ha llevado a ensayos clínicos de fase II y III con adenovirus oncolíticos, así como el uso clínico de uno de estos mutantes [146,

147]; sin embargo, la base de la selectividad tumoral sigue sin estar clara [148, 149]. Por lo anterior, la proteína E1B 55K ha sido extensamente estudiada; sin embargo, los mecanismos en los que está involucrada durante la infección no están aún claros. Los estudios de la función y estructura de E1B 55K han contribuido al entendimiento de esta proteína en el ciclo de replicación viral.

A casi 30 años de la primera descripción de la fosforilación en el C-terminal de la E1B-55K se ha demostrado que el papel de las modificaciones postraduccionales es fundamental para su localización y actividades durante el ciclo de replicación viral, pues por la naturaleza multifuncional de E1B-55K puede depender de la colección diferente de modificaciones postraduccionales e interacciones moleculares asociadas a lo largo del ciclo de infección. Se esperaría que estas interacciones moleculares determinen la localización intracelular de la proteína y sus actividades en los CRs. Congruente con lo que se ha reportado, la fosforilación del extremo C terminal de E1B-55K promueve la SUMOilación de la proteína, y el consecuente aumento de su localización en los CRs virales [87, 88]. Adicionalmente a lo largo de varios reportes se ha mostrado que la fosforilación de la E1B-55K es necesaria para su localización y actividades durante el ciclo de infección, además se ha reportado que CK2 puede fosforilar las serinas 490 y 491. Sin embargo, no se conoce en qué estado de fosforilación la E1B-55K realiza cada una de sus funciones ni cómo afectan su localización. Por lo anterior resultó interesante evaluar con mutantes de alanina y aspártico en los sitios de fosforilación las actividades que se ven afectadas por estos cambios. Nuestros resultados confirmaron las observaciones iniciales sobre la fosforilación en los tres sitios e interesantemente con la generación de adenovirus mutantes sencillos en los sitios de fosforilación pudimos observar que la fosforilación de la treonina 495 es un requisito para que ocurra la relocalización de la E1B-55K a los CR y sorprendentemente la fosforilación de las serinas 490 y 491 pareciera ser irrelevante en este proceso (Figura 12). Será interesante determinar si en el mutante SSD la SUMOilación de la proteína está aumentada y que como consecuencia de esto se favorezca la localización nuclear de la proteína en los CRs.

En nuestros experimentos la formación de los CR podría estar favorecida en los mutantes en los que se mimetiza el estado fosforilado de la treonina 495 pues cuando usamos un algoritmo computacional desarrollado específicamente para medir cuantitativamente los CR, encontramos que los mutantes SSD, PM y AAT presentan una cinética de formación de CR igual o más eficiente que el virus wt (Fig. 10). Estas observaciones indican que la fosforilación de la E1B-55K podría afectar la interacción y reclutamiento de proteínas celulares y/o virales y de esta manera favorecer la organización y composición de los CR, por lo que en los mutantes en los que no ocurre la fosforilación de la treonina 495 esta asociación podría perderse o estar disminuida. Será por lo tanto interesante determinar el efecto del estado fosforilado de la E1B-55K sobre las interacciones que la proteína establece. Recientemente se publicó el interactoma de E1B-55K en células infectadas [92], y aunque no está claro cómo cada una de las moléculas reportadas afectan la localización o la actividad de la E1B-55K, aun no se ha demostrado qué efecto tiene la mayoría de estas interacciones ni su repercusión en la composición de los CRs.

La interacción de la E1B-55K con otras proteínas celulares y virales podría estar regulada de forma temporal (en diferentes tiempos del ciclo de replicación viral) y por tal motivo se esperaría que existan subpoblaciones de E1B-55K con distintas modificaciones y que éstas definan las interacciones con otras proteínas a lo largo del ciclo de replicación viral. Durante el ensamblaje de los compartimentos de replicación nuclear se induce la reorganización de los componentes nucleares que son los principales constituyentes de los dominios nucleares, como PML NB, gránulos de intercromatina (IG), paraspecles, cuerpos de Cajal (CB) y nucléolos (revisado en [150-156]) adicional a estas observaciones una evidencia interesante es que cuando analizamos la localización de la E1B-55K en los CR con SR encontramos una estructura nanoscópica similar a un halo en la periferia de los CR que podría pertenecer al espacio en donde las proteínas celulares y/o virales son reclutadas o a componentes previamente descritos que no marcamos en nuestros experimentos. Podríamos esperar que en estos sitios se establezca un comunicación cruzada entre las proteínas y las subpoblaciones de E1B-55, esta actividad podría verse afectada por los componentes que son reclutados en

diferentes tiempos del ciclo de infección, así como de la implicación de la fosforilación de la E1B-55K en el reclutamiento de proteínas a CR. (Figura 19).

Por lo anterior realizamos análisis de proteínas celulares previamente reportadas que se relocalizan a los CRs, y a partir de las observaciones de las micrografías de superresolución, fue evidente un cambio en la dinámica de localización de las proteínas analizadas entre los tracks nucleares de E4orf3 y las estructuras de DBP (Figuras 13-18). Como se mencionó anteriormente, E1B-55K colocaliza con E4orf3 en tracks nucleares y posteriormente con E4orf6 en los CR. La interacción de E1B-55K con E4orf3 y posteriormente con E4orf6 resulta en el reclutamiento eficiente de E1B-55K a los CRs [49, 122, 138]. E4orf3 también es necesario para la formación eficiente de los CR y el reclutamiento de factores antivirales celulares, como PML y el complejo MRN [85, 157]. PML y E4orf3 podrían contribuir al andamiaje de los CRs así como regular las interacciones proteína-proteína y proteína-ácido nucleico. Se ha reportado que PML IV puede ensamblarse en estructuras similares a jaulas [158, 159]. En el caso de E4orf3, puede oligomerizar en cadenas lineales y ramificadas y formar una red polimérica que se ha descrito para segmentar el núcleo. Por lo tanto, es necesario determinar si estas proteínas están involucradas en la nucleación y organización de los CR. E1B-55K recluta proteínas celulares que se reprimen durante la infección [60, 106, 160]. YB1 se relocaliza del citoplasma al núcleo en células HeLa infectadas con adenovirus wt. YB1 promueve la replicación del DNA uniéndose al promotor E2 tardío (E2L) y activando la expresión del gen E2. YB1 colocaliza en los CR con la proteína DBP y con E1B-55K. Sin embargo, cuando las células se infectaron con el mutante E1B-, DBP mostró un patrón nuclear difuso, mientras que YB1 permaneció en el citoplasma. Estos resultados sugieren que la relocalización de YB1 a los CR que depende de la presencia de E1B-55K promueve la replicación del DNA viral en una etapa de la infección cuando el promotor E2L está activo [140]. Se han reportado otros factores transcripcionales que son secuestrados y aprovechados para la replicación viral eficiente, por ejemplo, la relocalización de p53 a CR es dependiente de E1B-55K y en células HFF infectadas con un virus nulo de E1B-55K (Hr6) o un virus mutante que expresa una E1B-55K que no puede unirse a p53 [60], la

replicación de DNA viral es deficiente. Estas observaciones sugieren que la reorganización nuclear que resulta en la formación de los CR y posteriormente promueve la replicación y expresión eficientes del genoma viral podría ser un mecanismo por el cual la E1B-55K promueve la replicación viral.

Como se describió en la introducción la E1B-55K está implicada en una amplia variedad de eventos durante el ciclo de replicación y la evidencia reportada sugiere que algunas de sus funciones podrían estar reguladas por sus modificaciones postraduccionales como la fosforilación y la SUMOilación. Como parte de la caracterización del ciclo de replicación de los virus mutantes de fosforilación, analizamos la síntesis de DNA y la producción de progenie viral. Nuestros resultados mostraron que la fosforilación de la treonina 495 favorece la acumulación eficiente de DNA y producción de progenie viral. En los virus mutantes SSD y PM estos dos mecanismos están aumentados mientras que en los mutantes ΔP y SSA los niveles fueron comparables a los producidos por el virus que no expresa E1B-55K (E1B -) (Fig. 26). La producción de progenie menos eficiente o retrasada podría originarse a partir de cambios en la formación adecuada de los CRs, así como cambios en la expresión de genes virales o la acumulación del DNA viral, todos estos mecanismos que son dependientes de la E1B-55K y de su fosforilación.

Durante tres décadas varios grupos usaron mutantes triples de los sitios de fosforilación y los esfuerzos se centraron en obtener información sobre las actividades que eran reguladas por esta modificación. Sorprendentemente nuestros resultados con mutantes en los que se exploraron todas las posibles combinaciones de sustituciones en los tres sitios mostraron que existen diferencias distinguibles en las distintas combinaciones de los sitios de fosforilación. Adicionalmente estos mutantes nos permitieron mostrar cómo la fosforilación de un sitio afecta la fosforilación de otro sitio. Los resultados nos permiten proponer que inicialmente la fosforilación de la treonina 495 promueve la fosforilación de las serinas 490 y 491, pero si la fosforilación de las serinas ocurre antes esto resulta en que la fosforilación de la treonina 495 se ve disminuida drásticamente (Figura 21). Esta evidencia sugiere la existencia de un mecanismo coordinado en el que dependiendo de los

requerimientos para las distintas actividades es resulta en que sitios del C-terminal son fosforilados, por esto se generan poblaciones de E1B-55K en diferentes estados de fosforilación que resultan en la regulación de sus actividades en el ciclo de replicación. Desde luego la participación de las cinasas y fosfatasas en el mecanismo de fosforilación son indispensables para la regulación de sus funciones.

Nuestros datos muestran que la E1B-55K es fosforilada por CK1, CK2 y GSK3. Inicialmente se reportó que CK2 puede fosforilar a las serinas 490 y 491 [86]. El análisis de la secuencia del C-terminal mostró que la secuencia en E1B-55K ⁴⁹⁰SSDEDTD⁴⁹⁶ se ajusta a los criterios para ser sustrato de la glucógeno sintasa cinasa-3 S-X-X-X-pS [161, 162] y CK1 pS-X-X-S / T[161]. Adicionalmente nuestros resultados mostraron que CK1 fosforila a la treonina 495 y congruente con nuestros resultados, esto último podría correlacionarse con que favorezca la fosforilación de las serinas 490 y 491 por CK2. Un resultado no esperado fue que la GSK3 también puede fosforilar a las serinas 490 y 491 y que esto se favorece cuando está fosforilada la treonina 495 y está activa la cinasa CK1. Existen diversos ejemplos en infecciones virales en las que son secuestradas distintas cinasas para explotar sus actividades en sitios específicos de la infección. Por ejemplo la proteína ZEBRA del EBV [163], la proteína ORF57 del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) [164] o la proteína del virus del herpes ICP27 [165]. En el caso de EBV ZEBRA requiere la fosforilación por parte de CK2 para convertir a la proteína viral en un represor o activador transcripcional y esta modificación postraduccional contribuye a la función de ZEBRA en el control de la expresión génica del ciclo lítico viral [163]. La fosforilación por CK2 de ORF57 de KSHV también es necesaria para controlar la expresión génica durante el ciclo infeccioso lítico [164] y en el caso de ICP27 requiere la fosforilación por CK2 para su localización subcelular correcta y su unión a varias proteínas celulares [165, 166]. Adicionalmente la inhibición de las cinasas CK1 y GSK3 durante el ciclo de infección de algunos virus, es una estrategia común pues de no ser así CK1 puede fosforilar el dominio de transactivación de p53 lo que resultaría en efectos antivirales de la célula. Esto sugiere fuertemente estrategias en los que durante la infección con adenovirus las cinasas CK1, CK2 y

GSK3 son reclutadas a CRs y sus funciones podrían ser explotadas en estos sitios, como resultado la regulación de las actividades de los CR durante la infección.

La evidencia acumulada hasta el momento sugiere que la E1B-55K puede promover la progresión del ciclo de replicación viral al impactar la formación de CR, sin embargo, también existe la posibilidad de que E1B-55K afecte la regulación de la replicación del DNA viral o diferentes pasos del programa de expresión del genoma viral, desde la transcripción, los procesos postranscripcionales o la liberación de mRNA virales de CR para ser exportados al citoplasma. Para explorar la participación de E1B-55K en cada uno de estos procesos moleculares, empleamos el aislamiento de CR de células infectadas con los virus SSD, SSA y PM. Hemos demostrado que estos CR libres de células poseen los componentes necesarios para la transcripción, splicing y replicación de DNA viral *de novo* [109, 167].

Con estos experimentos encontramos que la regulación de E1B-55K por fosforilación es necesaria para la morfogénesis eficiente y adecuada, organización y composición de los CR virales y que esta proteína viral temprana también es importante para la replicación eficiente del DNA viral, la síntesis de mRNA y el splicing que ocurren en estos sitios (Fig. 25). Nuestros resultados indican que la fosforilación de la treonina 495 de E1B-55K afecta directamente estas actividades de la proteína. Dado que se observaron niveles más altos de mRNA virales en células infectadas con los mutantes SSD y PM, esto último podría ser una consecuencia directa del efecto de la fosforilación de E1B-55K sobre los mecanismos de transcripción o procesamiento por splicing así como la vida media de los mensajeros virales. Esta influencia de E1B-55K en las actividades de los CR podría ser una consecuencia de una interacción directa de E1B-55K con ácidos nucleicos virales o interacciones con proteínas virales o celulares que se sabe que se localizan en CR y promueven la replicación eficiente del DNA viral o la biogénesis de los mRNA. Estas interacciones podrían estar directamente relacionadas con el efecto de E1B-55K sobre la represión del promotor de E1A. Recientemente encontramos que la E1B-55K puede regular la actividad de cada uno de los promotores del virus y que el estado de fosforilación de la proteína es determinante

en este proceso [109], por lo que será interesante evaluar si la fosforilación diferencial de las serinas y treonina tienen efectos distinguibles en la regulación de la transcripción de los genes virales. En nuestro trabajo analizamos el efecto de las mutaciones por alanina o aspártico en el c-terminal de E1B-55K y aunque son útiles y nos aportan información sobre el impacto de la fosforilación sobre sus actividades, no permiten tener certeza de que tengan el mismo efecto que la fosforilación, por lo que determinar el estado de fosforilación de la proteína en diferentes tiempos del ciclo de replicación viral y en diferentes sitios intracelulares será indispensable para entender la regulación por fosforilación de la E1B-55K.

9.CONCLUSIONES

- La fosforilación de la E1B-55K favorece su localización en CR
- La fosforilación de la E1B-55K favorece la formación de los CR
- La E1B-55K modula la localización de factores celulares en CR
- La localización de la E1B-55K asociada a CR correlaciona con la síntesis eficiente del DNA viral.
- La fosforilación de la treonina 495 favorece la síntesis de DNA viral.
- La fosforilación de las serinas 490, 491 favorece la fosforilación de la otra.
- La fosforilación de la treonina 495 favorece la fosforilación de las serinas 490, 491.
- La fosforilación de las serinas 490 y 491 inhibe la fosforilación de la treonina 495
- La fosforilación de la treonina 495 tiene un papel regulatorio sobre la fosforilación de las serinas, y consecuentemente la regulación de las actividades de E1B-55K.
- La cinasa CK1 fosforila a la treonina 495
- GSK3 puede fosforilar a las serinas 490 y 491 solo en presencia de CK1 activa

10.-PERSPECTIVAS

- Analizar el efecto de la fosforilación de la E1B-55K sobre su SUMOilación a lo largo del ciclo de replicación de adenovirus.
- Analizar la formación de los CR y la localización de proteínas celulares, así como DNA y RNA.
- Evaluar la fosforilación de la proteína E1B-55K en CR mediante el uso de compartimentos aislados a distintos tiempos de la infección.
- Identificar las fosfatasas responsables de desfosforilar a la E1B-55K
- Identificar distintas poblaciones fosforiladas de la E1B-55K durante el ciclo de replicación viral
- Analizar el estado de fosforilación en sus distintas actividades en el ciclo de replicación.
- Evaluar el efecto de las proteínas reclutadas a los CR sobre el ciclo de replicación viral.

11. REFERENCIAS

1. Rowe, W.P., et al., *Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1953. **84**(3): p. 570-573.
2. Hilleman, M.R. and J.H. Werner, *Recovery of New Agent from Patients with Acute Respiratory Illness*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1954. **85**(1): p. 183-188.
3. Ginsberg, H.S., *The life and times of adenoviruses*. Adv Virus Res, 1999. **54**: p. 1-13.
4. Huebner, R.J., et al., *Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents: a newly recognized group of common viruses of the respiratory system*. N Engl J Med, 1954. **251**(27): p. 1077-86.
5. Enders, J.F., et al., *Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses*. Science, 1956. **124**(3212): p. 119-20.
6. Mandelboim, M., et al., *Adenovirus Infections in Hospitalized Patients in Israel: Epidemiology and Molecular Characterization*. Journal of Clinical Microbiology, 2011. **49**(2): p. 597-601.

7. González-López, J.J., R. Morcillo-Laiz, and F.J. Muñoz-Negrete, *Queratoconjuntivitis adenovíricas: actualización*. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, 2013. **88**(3): p. 108-115.
8. Lynch, J.P., 3rd and A.E. Kajon, *Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention*. Semin Respir Crit Care Med, 2016. **37**(4): p. 586-602.
9. Kojaoghlanian, T., P. Flomenberg, and M.S. Horwitz, *The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host*. Rev Med Virol, 2003. **13**(3): p. 155-71.
10. Kim, Y.J., M. Boeckh, and J.A. Englund, *Community respiratory virus infections in immunocompromised patients: hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients, and individuals with human immunodeficiency virus infection*. Semin Respir Crit Care Med, 2007. **28**(2): p. 222-42.
11. King, J.C., Jr., *Community respiratory viruses in individuals with human immunodeficiency virus infection*. Am J Med, 1997. **102**(3a): p. 19-24; discussion 25-6.
12. Wigger, H.J. and W.A. Blanc, *Fatal hepatic and bronchial necrosis in adenovirus infection with thymic aplasia*. N Engl J Med, 1966. **275**(16): p. 870-4.
13. Dagan, R., et al., *Severe diffuse adenovirus 7a pneumonia in a child with combined immunodeficiency: possible therapeutic effect of human immune serum globulin containing specific neutralizing antibody*. Pediatr Infect Dis, 1984. **3**(3): p. 246-51.
14. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields Virology*. 2007: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
15. Benkó, M., et al., *First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses*. J Virol, 2002. **76**(19): p. 10056-9.
16. Fauquet, C.M., et al., *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2005: Academic Press.
17. Nemerow, G.R., P.L. Stewart, and V.S. Reddy, *Structure of human adenovirus*. Curr Opin Virol, 2012. **2**(2): p. 115-21.
18. Giberson, A.N., A.R. Davidson, and R.J. Parks, *Chromatin structure of adenovirus DNA throughout infection*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(6): p. 2369-76.
19. Fields, B.N.K.D.M.H.P.M., *Fields virology*. 2007, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
20. Wickham, T.J., et al., *Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment*. Cell, 1993. **73**(2): p. 309-19.
21. Maier, O., et al., *An N-terminal domain of adenovirus protein VI fragments membranes by inducing positive membrane curvature*. Virology, 2010. **402**(1): p. 11-9.
22. Moyer, C.L., et al., *Functional Genetic and Biophysical Analyses of Membrane Disruption by Human Adenovirus*. Journal of Virology, 2011. **85**(6): p. 2631-2641.
23. Chardonnet, Y. and S. Dales, *Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome*. Virology, 1970. **40**(3): p. 462-77.
24. Dales, S. and Y. Chardonnet, *Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells: IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum*. Virology, 1973. **56**(2): p. 465-483.

25. Nagata, K., R.A. Guggenheimer, and J. Hurwitz, *Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(20): p. 6177-81.
26. Flint, S.J., P.H. Gallimore, and P.A. Sharp, *Comparison of viral RNA sequences in adenovirus 2-transformed and lytically infected cells*. J Mol Biol, 1975. **96**(1): p. 47-68.
27. Babich, A. and J.R. Nevins, *The stability of early adenovirus mRNA is controlled by the viral 72 kd DNA-binding protein*. Cell, 1981. **26**(3 Pt 1): p. 371-9.
28. Berk, A.J., et al., *Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs*. Cell, 1979. **17**(4): p. 935-44.
29. Raychaudhuri, P., et al., *Activation of the E2F transcription factor in adenovirus-infected cells involves E1A-dependent stimulation of DNA-binding activity and induction of cooperative binding mediated by an E4 gene product*. J Virol, 1990. **64**(6): p. 2702-10.
30. Querido, E., et al., *Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells*. J Virol, 1997. **71**(5): p. 3788-98.
31. Querido, E., 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**(23): p. 3104-17.
32. Wolff, G., *Adenovirus Vectors for Gene Therapy*, in *Gene Therapy: Principles and Applications*, T. Blankenstein, Editor. 1999, Birkhäuser Basel: Basel. p. 29-45.
33. Kelly, T.J., Jr. and R.L. Lechner, *The structure of replicating adenovirus DNA molecules: characterization of DNA-protein complexes from infected cells*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1979. **43 Pt 2**: p. 721-8.
34. Lutz, P. and C. Kedinger, *Properties of the adenovirus IVa2 gene product, an effector of late-phase-dependent activation of the major late promoter*. J Virol, 1996. **70**(3): p. 1396-405.
35. Tribouley, C., et al., *The product of the adenovirus intermediate gene IVa2 is a transcriptional activator of the major late promoter*. J Virol, 1994. **68**(7): p. 4450-7.
36. Toth, M., W. Doerfler, and T. Shenk, *Adenovirus DNA replication facilitates binding of the MLTF/USF transcription factor to the viral major late promoter within infected cells*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(19): p. 5143-8.
37. Parks, C.L. and T. Shenk, *Activation of the adenovirus major late promoter by transcription factors MAZ and Sp1*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 9600-7.
38. Morris, S.J., G.E. Scott, and K.N. Leppard, *Adenovirus late-phase infection is controlled by a novel L4 promoter*. J Virol, 2010. **84**(14): p. 7096-104.
39. Morris, S.J. and K.N. Leppard, *Adenovirus serotype 5 L4-22K and L4-33K proteins have distinct functions in regulating late gene expression*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 3049-58.
40. Backström, E., et al., *Adenovirus L4-22K stimulates major late transcription by a mechanism requiring the intragenic late-specific transcription factor-binding site*. Virus Res, 2010. **151**(2): p. 220-8.
41. McConnell, M.J. and M.J. Imperiale, *Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(11): p. 1022-33.
42. Greber, U.F., et al., *The role of the adenovirus protease on virus entry into cells*. Embo j, 1996. **15**(8): p. 1766-77.

43. Chen, P.H., D.A. Ornelles, and T. Shenk, *The adenovirus L3 23-kilodalton proteinase cleaves the amino-terminal head domain from cytokeratin 18 and disrupts the cytokeratin network of HeLa cells*. J Virol, 1993. **67**(6): p. 3507-14.
44. Tollefson, A.E., et al., *The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells*. J Virol, 1996. **70**(4): p. 2296-306.
45. Walters, R.W., et al., *Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape*. Cell, 2002. **110**(6): p. 789-99.
46. Pombo, A., et al., *Adenovirus replication and transcription sites are spatially separated in the nucleus of infected cells*. Embo j, 1994. **13**(21): p. 5075-85.
47. Puvion-Dutilleul, F., et al., *Rearrangements of intranuclear structures involved in RNA processing in response to adenovirus infection*. J Cell Sci, 1994. **107 (Pt 6)**: p. 1457-68.
48. Puvion-Dutilleul, F. and E. Pichard, *Segregation of viral double-stranded and single-stranded DNA molecules in nuclei of adenovirus infected cells as revealed by electron microscope in situ hybridization*. Biol Cell, 1992. **76**(2): p. 139-50.
49. Ornelles, D.A. and T. Shenk, *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): p. 424-9.
50. Malette, P., S.P. Yee, and P.E. Branton, *Studies on the phosphorylation of the 58000 dalton early region 1B protein of human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1983. **64**(Pt 5): p. 1069-78.
51. Teodoro, J.G., et al., *Phosphorylation at the carboxy terminus of the 55-kilodalton adenovirus type 5 E1B protein regulates transforming activity*. J Virol, 1994. **68**(2): p. 776-86.
52. Teodoro, J.G. and P.E. Branton, *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**(5): p. 3620-7.
53. Wimmer, P., et al., *SUMO modification of E1B-55K oncoprotein regulates isoform-specific binding to the tumour suppressor protein PML*. Oncogene, 2010. **29**(40): p. 5511-22.
54. Endter, C., et al., *SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11312-7.
55. Endter, C., et al., *Blockage of CRM1-dependent nuclear export of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa protein augments oncogenic transformation of primary rat cells*. Oncogene, 2005. **24**(1): p. 55-64.
56. Kolbe, V., et al., *Conserved E1B-55K SUMOylation in Different Human Adenovirus Species Is a Potent Regulator of Intracellular Localization*. J Virol, 2022. **96**(3): p. e0083821.
57. Fiedler, M., et al., *Protein-Protein Interactions Facilitate E4orf6-Dependent Regulation of E1B-55K SUMOylation in HAdV-C5 Infection*. Viruses, 2022. **14**(3).
58. Hidalgo, P., et al., *The biology of the adenovirus E1B 55K protein*. FEBS Letters, 2019. **593**(24): p. 3504-3517.
59. Gonzalez, R., et al., *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): p. 964-74.

60. Cardoso, F.M., et al., *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**(2): p. 339-46.
61. Castillo-Villanueva, E., et al., *The Mre11 Cellular Protein Is Modified by Conjugation of Both SUMO-1 and SUMO-2/3 during Adenovirus Infection*. *ISRN Virology*, 2014. **2014**: p. 14.
62. Liu, Y., et al., *Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex*. *J Virol*, 2005. **79**(22): p. 14004-16.
63. Trentin, J.J., Y. Yabe, and G. Taylor, *The quest for human cancer viruses*. *Science*, 1962. **137**(3533): p. 835-41.
64. Yew, P.R. and A.J. Berk, *Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein*. *Nature*, 1992. **357**(6373): p. 82-5.
65. Schwartz, R.A., et al., *Distinct requirements of adenovirus E1b55K protein for degradation of cellular substrates*. *J Virol*, 2008. **82**(18): p. 9043-55.
66. Harada, J.N., et al., *Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery*. *J Virol*, 2002. **76**(18): p. 9194-206.
67. Stracker, T.H., C.T. Carson, and M.D. Weitzman, *Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex*. *Nature*, 2002. **418**(6895): p. 348-52.
68. Orazio, N.I., et al., *The adenovirus E1b55K/E4orf6 complex induces degradation of the Bloom helicase during infection*. *J Virol*, 2011. **85**(4): p. 1887-92.
69. Baker, A., et al., *Adenovirus E4 34k and E1b 55k oncoproteins target host DNA ligase IV for proteasomal degradation*. *J Virol*, 2007. **81**(13): p. 7034-40.
70. Schreiner, S., et al., *Control of human adenovirus type 5 gene expression by cellular Daxx/ATRAX chromatin-associated complexes*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(6): p. 3532-50.
71. Gupta, A., et al., *Tip60 degradation by adenovirus relieves transcriptional repression of viral transcriptional activator E1A*. *Oncogene*, 2013. **32**(42): p. 5017-25.
72. Schreiner, S., et al., *SPOC1-mediated antiviral host cell response is antagonized early in human adenovirus type 5 infection*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(11): p. e1003775.
73. Chalabi Hagkarim, N., et al., *Degradation of a Novel DNA Damage Response Protein, Tankyrase 1 Binding Protein 1, following Adenovirus Infection*. *J Virol*, 2018. **92**(12).
74. Dallaire, F., et al., *Identification of integrin alpha3 as a new substrate of the adenovirus E4orf6/E1B 55-kilodalton E3 ubiquitin ligase complex*. *J Virol*, 2009. **83**(11): p. 5329-38.
75. Nazeer, R., et al., *Adenovirus E1B-55K targets SMARCA1 for degradation during infection and modulates cellular DNA replication*. *J Virol*, 2019.
76. Schreiner, S., et al., *Proteasome-dependent degradation of Daxx by the viral E1B-55K protein in human adenovirus-infected cells*. *J Virol*, 2010. **84**(14): p. 7029-38.
77. Miller, D.L., et al., *The adenoviral E1B 55-kilodalton protein controls expression of immune response genes but not p53-dependent transcription*. *J Virol*, 2009. **83**(8): p. 3591-603.
78. Chahal, J.S., J. Qi, and S.J. Flint, *The human adenovirus type 5 E1B 55 kDa protein obstructs inhibition of viral replication by type I interferon in normal human cells*. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(8): p. e1002853.

79. Chahal, J.S., et al., *The repression domain of the E1B 55-kilodalton protein participates in countering interferon-induced inhibition of adenovirus replication.* J Virol, 2013. **87**(8): p. 4432-44.
80. Doucas, V. and R.M. Evans, *The PML nuclear compartment and cancer.* Biochim Biophys Acta, 1996. **1288**(3): p. M25-9.
81. Lallemand-Breitenbach, V. and H. de Thé, *PML nuclear bodies: from architecture to function.* Curr Opin Cell Biol, 2018. **52**: p. 154-161.
82. Li, Y., et al., *PML Nuclear Body Biogenesis, Carcinogenesis, and Targeted Therapy.* Trends in Cancer, 2020. **6**(10): p. 889-906.
83. Van Damme, E., et al., *A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics.* Int J Biol Sci, 2010. **6**(1): p. 51-67.
84. Carvalho, T., et al., *Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies.* J Cell Biol, 1995. **131**(1): p. 45-56.
85. Doucas, V., et al., *Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure.* Genes Dev, 1996. **10**(2): p. 196-207.
86. Ching, W., T. Dobner, and E. Koyuncu, *The human adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton protein is phosphorylated by protein kinase CK2.* J Virol, 2012. **86**(5): p. 2400-15.
87. Wimmer, P., et al., *Cross-talk between phosphorylation and SUMOylation regulates transforming activities of an adenoviral oncoprotein.* Oncogene, 2013. **32**(13): p. 1626-37.
88. Kindsmuller, K., et al., *Intranuclear targeting and nuclear export of the adenovirus E1B-55K protein are regulated by SUMO1 conjugation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(16): p. 6684-9.
89. Pennella, M.A., et al., *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): p. 12210-25.
90. Martin, M.E. and A.J. Berk, *Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro.* J Virol, 1998. **72**(4): p. 3146-54.
91. Yew, P.R., X. Liu, and A.J. Berk, *Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53.* Genes Dev, 1994. **8**(2): p. 190-202.
92. Hung, G. and S.J. Flint, *Normal human cell proteins that interact with the adenovirus type 5 E1B 55kDa protein.* Virology, 2017. **504**: p. 12-24.
93. Tejera, B., et al., *The human adenovirus type 5 E1B 55kDa protein interacts with RNA promoting timely DNA replication and viral late mRNA metabolism.* PLoS One, 2019. **14**(4): p. e0214882.
94. Yang, U.C., W. Huang, and S.J. Flint, *mRNA export correlates with activation of transcription in human subgroup C adenovirus-infected cells.* Journal of Virology, 1996. **70**(6): p. 4071-4080.
95. Huang, J.T. and R.J. Schneider, *Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein.* Cell, 1991. **65**(2): p. 271-80.
96. Dolph, P.J., J.T. Huang, and R.J. Schneider, *Translation by the adenovirus tripartite leader: elements which determine independence from cap-binding protein complex.* Journal of Virology, 1990. **64**(6): p. 2669-2677.

97. Babich, A., et al., *Effect of adenovirus on metabolism of specific host mRNAs: transport control and specific translational discrimination*. Molecular and Cellular Biology, 1983. **3**(7): p. 1212-1221.
98. Berk, A.J., *Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus*. Oncogene, 2005. **24**(52): p. 7673-85.
99. Beltz, G.A. and S.J. Flint, *Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection. Restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus*. J Mol Biol, 1979. **131**(2): p. 353-73.
100. Hodge, L.D. and M.D. Scharff, *Effect of adenovirus on host cell DNA synthesis in synchronized cells*. Virology, 1969. **37**(4): p. 554-64.
101. Huang, J. and R.J. Schneider, *Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein*. Cell, 1991. **65**(2): p. 271-280.
102. Corbin-Lickfett, K.A. and E. Bridge, *Adenovirus E4-34kDa requires active proteasomes to promote late gene expression*. Virology, 2003. **315**(1): p. 234-44.
103. Woo, J.L. and A.J. Berk, *Adenovirus Ubiquitin-Protein Ligase Stimulates Viral Late mRNA Nuclear Export*. Journal of Virology, 2007. **81**(2): p. 575-587.
104. Schmid, M., et al., *The E3 ubiquitin ligase activity associated with the adenoviral E1B-55K-E4orf6 complex does not require CRM1-dependent export*. J Virol, 2011. **85**(14): p. 7081-94.
105. Yatherajam, G., W. Huang, and S.J. Flint, *Export of adenoviral late mRNA from the nucleus requires the Nxf1/Tap export receptor*. J Virol, 2011. **85**(4): p. 1429-38.
106. Leppard, K.N. and T. Shenk, *The adenovirus E1B 55 kd protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism*. EMBO J, 1989. **8**(8): p. 2329-36.
107. Herrmann, C., et al., *Adenovirus-mediated ubiquitination alters protein-RNA binding and aids viral RNA processing*. Nature Microbiology, 2020. **5**(10): p. 1217-1231.
108. Alemán, M.V., et al., *Global Transcriptome Analyses of Cellular and Viral mRNAs during HAdV-C5 Infection Highlight New Aspects of Viral mRNA Biogenesis and Cytoplasmic Viral mRNA Accumulations*. Viruses, 2022. **14**(11).
109. Hidalgo, P., et al., *E1B-55K Is a Phosphorylation-Dependent Transcriptional and Posttranscriptional Regulator of Viral Gene Expression in Human Adenovirus C5 Infection*. J Virol, 2022. **96**(5): p. e0206221.
110. Tejera, B., et al., *The human adenovirus type 5 E1B 55kDa protein interacts with RNA promoting timely DNA replication and viral late mRNA metabolism*. PLOS ONE, 2019. **14**(4): p. e0214882.
111. Price, A.M., et al., *Adenovirus prevents dsRNA formation by promoting efficient splicing of viral RNA*. Nucleic Acids Research, 2021. **50**(3): p. 1201-1220.
112. Blackford, A.N. and R.J. Grand, *Adenovirus E1B 55-kilodalton protein: multiple roles in viral infection and cell transformation*. J Virol, 2009. **83**(9): p. 4000-12.
113. Hidalgo, P., et al., *The biology of the adenovirus E1B 55K protein*. FEBS Lett, 2019. **593**(24): p. 3504-3517.
114. Blanchette, P., et al., *Control of mRNA export by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins during productive infection requires E4orf6 ubiquitin ligase activity*. J Virol, 2008. **82**(6): p. 2642-51.
115. Fulcher, L.J. and G.P. Sapkota, *Functions and regulation of the serine/threonine protein kinase CKI family: moving beyond promiscuity*. Biochem J, 2020. **477**(23): p. 4603-4621.

116. Agostinis, P., et al., *A synthetic peptide substrate specific for casein kinase I*. FEBS Lett, 1989. **259**(1): p. 75-8.
117. Fiol, C.J., et al., *Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3*. J Biol Chem, 1987. **262**(29): p. 14042-8.
118. Reich, N.C., et al., *Monoclonal antibodies which recognize native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein*. Virology, 1983. **128**(2): p. 480-4.
119. Sarnow, P., et al., *Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells*. Cell, 1982. **28**(2): p. 387-94.
120. Wang, H., et al., *Improved seamless mutagenesis by recombineering using ccdB for counterselection*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(5): p. e37.
121. Garcés, Y., et al., *Automatic detection and measurement of viral replication compartments by ellipse adjustment*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 36505.
122. Gonzalez, R.A. and S.J. Flint, *Effects of mutations in the adenoviral E1B 55-kilodalton protein coding sequence on viral late mRNA metabolism*. J Virol, 2002. **76**(9): p. 4507-19.
123. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nature Methods, 2012. **9**(7): p. 671-675.
124. Nevels, M., et al., *"Hit-and-Run" Transformation by Adenovirus Oncogenes*. Journal of virology, 2001. **75**: p. 3089-94.
125. Wimmer, P., et al., *PML isoforms IV and V contribute to adenovirus-mediated oncogenic transformation by functionally inhibiting the tumor-suppressor p53*. Oncogene, 2016. **35**(1): p. 69-82.
126. Busch, H., et al., *ISOLATION OF NUCLEOLI*. Exp Cell Res, 1963. **24**: p. Suppl9:150-63.
127. Andersen, J.S., et al., *Directed proteomic analysis of the human nucleolus*. Curr Biol, 2002. **12**(1): p. 1-11.
128. Brison, O., C. Kedinger, and J. Wilhelm, *Enzymatic properties of viral replication complexes isolated from adenovirus type 2-infected HeLa cell nuclei*. J Virol, 1977. **24**(2): p. 423-35.
129. Wilhelm, J., et al., *Characterization of adenovirus type 2 transcriptional complexes isolated from infected HeLa cell nuclei*. J Virol, 1976. **19**(1): p. 61-81.
130. Hicks, M.J., B.J. Lam, and K.J. Hertel, *Analyzing mechanisms of alternative pre-mRNA splicing using in vitro splicing assays*. Methods, 2005. **37**(4): p. 306-13.
131. Hertweck, M., R. Hiller, and M.W. Mueller, *Inhibition of nuclear pre-mRNA splicing by antibiotics in vitro*. Eur J Biochem, 2002. **269**(1): p. 175-83.
132. Kato, S.E., W. Huang, and S.J. Flint, *Role of the RNA recognition motif of the E1B 55 kDa protein in the adenovirus type 5 infectious cycle*. Virology, 2011. **417**(1): p. 9-17.
133. Groitl, P. and T. Dobner, *Construction of adenovirus type 5 early region 1 and 4 virus mutants*. Methods Mol Med, 2007. **130**: p. 29-39.
134. Sohn, S.Y. and P. Hearing, *Adenovirus Early Proteins and Host Sumoylation*. mBio, 2016. **7**(5).

135. Dobbstein, M., et al., *Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence*. *Embo J*, 1997. **16**(14): p. 4276-84.
136. Goodrum, F.D., T. Shenk, and D.A. Ornelles, *Adenovirus early region 4 34-kilodalton protein directs the nuclear localization of the early region 1B 55-kilodalton protein in primate cells*. *J Virol*, 1996. **70**(9): p. 6323-35.
137. Marshall, L.J., et al., *RUNX1 permits E4orf6-directed nuclear localization of the adenovirus E1B-55K protein and associates with centers of viral DNA and RNA synthesis*. *J Virol*, 2008. **82**(13): p. 6395-408.
138. Leppard, K.N. and R.D. Everett, *The adenovirus type 5 E1b 55K and E4 Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components*. *J Gen Virol*, 1999. **80** (Pt 4): p. 997-1008.
139. Komatsu, T., T. Sekiya, and K. Nagata, *DNA replication-dependent binding of CTCF plays a critical role in adenovirus genome functions*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 2187.
140. Holm, P.S., et al., *YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(12): p. 10427-34.
141. Souquere-Besse, S., et al., *Adenovirus infection targets the cellular protein kinase CK2 and RNA-activated protein kinase (PKR) into viral inclusions of the cell nucleus*. *Microsc Res Tech*, 2002. **56**(6): p. 465-78.
142. Liu, C., et al., *Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism*. *Cell*, 2002. **108**(6): p. 837-47.
143. Xu, Y., et al., *Role of CK1 in GSK3beta-mediated phosphorylation and degradation of snail*. *Oncogene*, 2010. **29**(21): p. 3124-33.
144. Hidalgo, P. and R.A. Gonzalez, *Isolation of Viral Replication Compartment-enriched Sub-nuclear Fractions from Adenovirus-infected Normal Human Cells*. 2015(105): p. e53296.
145. Bischoff, J.R., et al., *An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells*. *Science*, 1996. **274**(5286): p. 373-6.
146. Lu, W., et al., *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): p. 3634-8.
147. Yu, W. and H. Fang, *Clinical trials with oncolytic adenovirus in China*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007. **7**(2): p. 141-8.
148. Rothmann, T., et al., *Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells*. *J Virol*, 1998. **72**(12): p. 9470-8.
149. Turnell, A.S., R.J. Grand, and P.H. Gallimore, *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): p. 2074-83.
150. Schmid, M., et al., *DNA virus replication compartments*. *J Virol*, 2014. **88**(3): p. 1404-20.
151. Ishov, A.M. and G.G. Maul, *The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition*. *J Cell Biol*, 1996. **134**(4): p. 815-26.
152. Hiscox, J.A., *The nucleolus--a gateway to viral infection?* *Arch Virol*, 2002. **147**(6): p. 1077-89.
153. Rodrigues, S.H., et al., *The behavior of the coiled body in cells infected with adenovirus in vitro*. *Mol Biol Rep*, 1996. **23**(3-4): p. 183-9.

154. James, N.J., et al., *The role of Cajal bodies in the expression of late phase adenovirus proteins*. *Virology*, 2010. **399**(2): p. 299-311.
155. Besse, S. and F. Puvion-Dutilleul, *Compartmentalization of cellular and viral DNAs in adenovirus type 5 infection as revealed by ultrastructural in situ hybridization*. *Chromosome Res*, 1994. **2**(2): p. 123-35.
156. Bridge, E., et al., *Dynamic organization of splicing factors in adenovirus-infected cells*. *J Virol*, 1995. **69**(1): p. 281-90.
157. Evans, J.D. and P. Hearing, *Relocalization of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex by the adenovirus E4 ORF3 protein is required for viral replication*. *J Virol*, 2005. **79**(10): p. 6207-15.
158. Reichelt, M., et al., *Entrapment of Viral Capsids in Nuclear PML Cages Is an Intrinsic Antiviral Host Defense against Varicella-Zoster Virus*. *PLOS Pathogens*, 2011. **7**(2): p. e1001266.
159. Ou, H.D., et al., *A structural basis for the assembly and functions of a viral polymer that inactivates multiple tumor suppressors*. *Cell*, 2012. **151**(2): p. 304-19.
160. Zheng, X., et al., *Adenovirus E1B55K region is required to enhance cyclin E expression for efficient viral DNA replication*. *J Virol*, 2008. **82**(7): p. 3415-27.
161. Meggio, F. and L.A. Pinna, *One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?* *Faseb j*, 2003. **17**(3): p. 349-68.
162. Doble, B.W. and J.R. Woodgett, *GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 7): p. 1175-86.
163. El-Guindy, A.S. and G. Miller, *Phosphorylation of Epstein-Barr virus ZEBRA protein at its casein kinase 2 sites mediates its ability to repress activation of a viral lytic cycle late gene by Rta*. *J Virol*, 2004. **78**(14): p. 7634-44.
164. Malik, P. and J.B. Clements, *Protein kinase CK2 phosphorylation regulates the interaction of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus regulatory protein ORF57 with its multifunctional partner hnRNP K*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(18): p. 5553-69.
165. Koffa, M.D., et al., *CK2 protein kinase is stimulated and redistributed by functional herpes simplex virus ICP27 protein*. *J Virol*, 2003. **77**(7): p. 4315-25.
166. Rojas, S., et al., *ICP27 phosphorylation site mutants are defective in herpes simplex virus 1 replication and gene expression*. *J Virol*, 2010. **84**(5): p. 2200-11.
167. Hidalgo, P., et al., *Morphological, Biochemical, and Functional Study of Viral Replication Compartments Isolated from Adenovirus-Infected Cells*. *J Virol*, 2016. **90**(7): p. 3411-27.

12.-ANEXOS

12.1 Anexo 1. Automatic detection and measurement of viral replication compartments by ellipse adjustment. *Scientific Reports*,


12.2 Anexo 2. The human adenovirus type 5 E1B 55kDa protein interacts with RNA promoting timely DNA replication and viral late mRNA metabolism

PLOS ONE, 2019.

12.3 Anexo 3. E1B-55K Is a Phosphorylation-Dependent Transcriptional and Posttranscriptional Regulator of Viral Gene Expression in Human Adenovirus C5 Infection. *Journal of Virology*.

12.4 Anexo 4. Temporal CK1-, CK2- and GSK3-dependent phosphorylation of the human adenovirus type 5 E1B-55K protein regulates both DNA replication and viral gene expression.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Automatic detection and measurement of viral replication compartments by ellipse adjustment

Received: 21 April 2016
Accepted: 13 October 2016
Published: 07 November 2016

Yasel Garcés¹, Adán Guerrero^{3,4}, Paloma Hidalgo^{2,3}, Raul Eduardo López^{2,3}, Christopher D. Wood^{3,4}, Ramón A. Gonzalez² & Juan Manuel Rendón-Mancha¹

Viruses employ a variety of strategies to hijack cellular activities through the orchestrated recruitment of macromolecules to specific virus-induced cellular micro-environments. Adenoviruses (Ad) and other DNA viruses induce extensive reorganization of the cell nucleus and formation of nuclear Replication Compartments (RCs), where the viral genome is replicated and expressed. In this work an automatic algorithm designed for detection and segmentation of RCs using ellipses is presented. Unlike algorithms available in the literature, this approach is deterministic, automatic, and can adjust multiple RCs using ellipses. The proposed algorithm is non iterative, computationally efficient and is invariant to affine transformations. The method was validated over both synthetic images and more than 400 real images of Ad-infected cells at various timepoints of the viral replication cycle obtaining relevant information about the biogenesis of adenoviral RCs. As proof of concept the algorithm was then used to quantitatively compare RCs in cells infected with the adenovirus wild type or an adenovirus mutant that is null for expression of a viral protein that is known to affect activities associated with RCs that result in deficient viral progeny production.

Virus replication can induce extensive rearrangement of cellular components that results in de novo formation of specialized intracellular compartments where the viral genome is replicated. Depending on the virus family such compartments, which have been termed viroplasms, virus factories, replication centers or compartments (RCs), may associate with cellular membranes, the cytoskeleton, or nuclear domains^{1,2}. In every case RCs assemble complex macromolecular platforms, where viral and cellular proteins responsible for viral genome replication are concentrated, thus increasing viral replication efficiency. Interestingly, the same compartments recruit, regulate and co-opt cellular factors that participate in a variety of host defense mechanisms. Therefore, RCs seem to act as molecular hubs where many aspects of virus-host cell interaction are controlled and there is considerable interest in understanding the impact of their formation on virus replication as well as on the cellular activities that are altered as a consequence of their assembly.

Like other DNA viruses that replicate in the cell nucleus, adenoviruses induce formation of RCs (AdRC) that assemble in association or adjacent to specific nuclear domains (ND). However, most aspects of the structure and function of AdRC remain to be explored; some of these include the relationship between their molecular components and the activities they regulate, as well as the molecules involved in their structural integrity and the dynamics of their assembly.

A strategy that has been commonly used to study RCs has relied on the phenotypic analysis of recombinant viruses that harbor substitutions or deletions in the genes that are known or suspected to affect RCs formation or activities. Such studies have typically used fluorescence microscopy to screen for alterations in the morphology

¹Centro de Investigación en Ciencias, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Cuernavaca, Morelos, México. ²Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Cuernavaca, Morelos, México. ³Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Morelos, México. ⁴Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Morelos, México. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.M.R.-M. (email: rendon@uaem.mx)

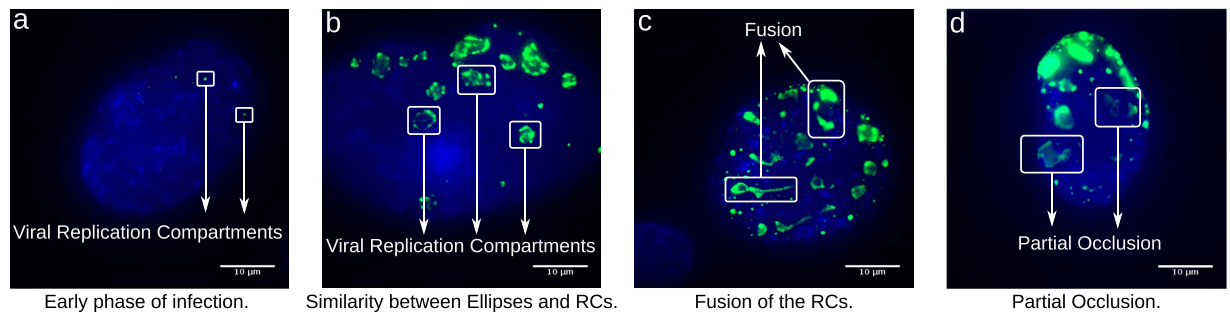


Figure 1. Examples of Ad-infected cells, at various times post-infection. The green color marks the viral replication compartments revealed by DBP staining, and DNA is marked with DAPI staining in blue. **(a)** AdRC appear as foci during the early phase of the replication cycle. **(b)** During the late phase AdRC form doughnut, crescent or spherical structures. **(c)** Very late in the replication cycle some RCs coalesce resulting in amorphous structures. **(d)** In the viral replication cycle, some RCs can present partial occlusion in some areas. For these four images the contrast of the images was increased to improve the visualization.

or dynamics of formation of RCs at different times of the viral replication cycle³. Because the viral DNA binding protein (DBP) associates with ssDNA, it is a useful marker to study RCs by fluorescence microscopy. Analysis by fluorescence microscopy of AdRC formation through the viral replication cycle has shown that the DBP protein initially accumulates in small foci that seem to increase in size and number resulting in doughnut-shaped, crescent or spherical structures. Very late during the replication cycle, the latter structures appear to coalesce resulting in complex amorphous structures that may occupy most of the cell-nucleus. Although informative, these studies have major drawbacks and provide limited information because they are qualitative and depend on subjective visual analysis for classification of the RCs at different stages of assembly. Previous data on the visual analysis of RCs suggest that these structures can be approximated as ellipse-shaped structures, a potentially oversimplified approach considering the complexity and variability of their number, shape and size during the viral replication cycle (see Fig. 1). Nevertheless, the use of ellipses allows for considerable data reduction and simplification, and consequently provides a fast and simple image analysis pipeline to be employed.

Some of the best known image processing approaches for detection and adjustment of ellipses are the Hough Transform^{4–6}, Random Sample Consensus (RANSAC)^{7–10} and least squares^{11–14}. Grouping approaches (Hough Transform and RANSAC) are robust against noise and detect multiple ellipses, but are relatively slow, require a lot of memory and suffer from low accuracy. On the other hand, least squares approaches are comparatively fast and accurate, yet can only adjust one ellipse at a time and are sensitive to noise. In 1996 Fitzgibbon¹⁵ proposed a new algorithm for adjustment of ellipses in scattered data. The main idea is to force the least squares problem in a way that the solution is always an ellipse, taking into account the constraint $4ac - b^2 = 1$. The optimization problem is solved using Lagrange multipliers and generalized eigenvectors. Two years after the initial proposal of Fitzgibbon's algorithm, Halir and Flusser presented a numerically stable version, incorporating a block decomposition strategy¹⁶. This is the most commonly used alternative for the implementation of the “Direct Least Square Fitting Ellipse” or DLSFE algorithm. This method is known to be a robust deterministic algorithm, invariant under affine transformations, computationally efficient and a non-iterative approach whose result is always an ellipse. A simple Matlab implementation is available in the paper of Halir and Flusser¹⁶. The DLSFE can only adjust one ellipse to a data set (it is not possible to adjust multiple ellipses) and it is very sensitive to outliers. For these reasons, the direct application of this algorithm in problems of image segmentation is not generally considered viable. To our knowledge RCs measurements have never been performed using ellipse adjustment, nor are there any reports where RCs have been analyzed making quantitative measurements.

In this work a very simple and efficient approach to detect RCs by adjusting ellipses is proposed. This new algorithm is automatic, deterministic, non iterative, can simultaneously detect multiple viral RCs and has a linear computational complexity. The algorithm was validated using a synthetic ground truth image base, and was then applied to real images obtained by fluorescence microscopy of Ad-infected cells processed at various time-points post-infection. As a proof of concept, it was then used to adjust and measure various parameters of AdRC in cells infected with the wild type virus (Ad wt) or with a virus mutant that does not express an adenoviral oncogene, which encodes the multifunctional protein E1B-55K, that is known to associate with RCs and affect various activities that result in inhibition of cellular defense mechanisms and production of viral progeny. Using a set of useful parameters: the number of RCs per cell nucleus; the area of RCs within nuclei; the intensity of the signal associated with RCs; and the ellipse eccentricity, as a measure that facilitates distinction between different RCs morphologies, the method allowed the automatic determination of a previously unrecognised effect of this mutation on the dynamics of formation of AdRC.

Results

Segmentation of the viral replication compartments. To study the dynamics of the formation of AdRC, we developed a new algorithm that provides an efficient approach to automatically detect and measure RCs by adjusting ellipses. Fluorescence microscopy images generated as described in the methods section were used. The fluorescent staining of DBP was used as a bona fide marker to detect RCs, which were approximated through ellipses at various times of the viral replication cycle. As shown in Fig. 1, very late in the replication cycle,

RCs may coalesce forming complex amorphous structures. The following steps summarize the work-flow of the algorithm (described in detail in the methods section):

1. Filter RCs zones: This step consists in thresholding the image in order to segment the zones of interest (remove noise and atypical values). Our proposal performs an automatic selection of threshold value for each image \mathbf{I} ($n \times m$) considering the mean value (M_1) and the standard deviation (S_1) per column of the image. The threshold value is defined by:

$$T_{lower} = \min \left(\frac{M_1}{\sum_{j=1}^m \mathbf{I}(1, j)}, \dots, \frac{M_n}{\sum_{j=1}^m \mathbf{I}(n, j)} \right) + 2 \max \left(\sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m (\mathbf{I}(1, j) - M_1)^2}{m}}, \dots, \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m (\mathbf{I}(n, j) - M_n)^2}{m}} \right) \quad (1)$$

$$\mathbf{I}_{new}(i, j) = \begin{cases} 0, & I(i, j) \leq T_{lower} \\ I(i, j), & \text{in other cases} \end{cases} \quad (2)$$

New Image

2. Compute the connected components: The connected components labelling is used to detect connected regions in the image (there exists a digital continuous path between all pairs of points in the same component). This heuristic consists of visiting each pixel of the image and creating exterior boundaries using pixel neighbours according to a specific type of connectivity. These arcs belong to the viral replication centers because the algorithm only uses the information of the color that marks the RCs. The results of this step are N connected components A_i , $i = 1, 2, \dots, N$, where each A_i is part of one RCs.
3. Adjust the exterior boundaries using ellipses: For each connected component A_i apply the DLSFE algorithm. For more details see the methods section.

Step 1 of the algorithm filters out noise and atypical values, step 2 divides the images in N connected components on the location of the RCs, and finally, the DLSFE adjusts each RC with an ellipse. These three steps constitute the adaptation of the DLSFE for detection and adjustment of multiple ellipses in images of any size or resolution. In the Fig. 2(1) we show graphically the steps of the proposed algorithm.

The results shown in panels 2b and 2c of Fig. 2 are consequences of eliminating some steps of the proposed algorithm. Both images show poor adjustment to RCs, because there is no delimitation of each RC. This is a consequence of the global adjustment by one ellipse. The results of our algorithm are shown in Fig. 2 panel 2d, where a good fit of the RCs is observed, suggesting this algorithm provides a tool that can be used to make automatic and quantitative measurements of RCs.

The algorithm presented in this work is automatic, deterministic, non-parametric, non iterative, and these results demonstrate that it can detect and adjust multiple ellipses of any size, eccentricity, position or rotation angle. Furthermore, this new method has a linear computational complexity and is invariant under affine transformations.

Validation of the algorithm. The algorithm validation was performed using synthetic ground truth images generated taking into account diffraction, white noise, dark-current noise and signal amplification¹⁷. These images contain ellipses of different sizes, eccentricities, positions and rotation angles, for which real parameters of their implicit equations are known. This facilitates analysis of the algorithm's response against several plausible events, hence permitting comparison of the obtained results with "ground-truth" ellipses considering different signal/noise ratios (SNR).

The results are shown in Fig. 3, where panels 3(a) to 3(c) show some examples of these images considering three levels of noise and panels 3(d) to 3(f), the results obtained from these images. In each case we obtained an adequate adjustment regardless of the level of noise, size, position or eccentricity of RCs, demonstrating that this approach can be used to adjust multiple viral RCs through ellipses with a small error.

Microscopy images of viral RCs may present partial overlapping in some zones, which might lead to erroneous results for most segmentation algorithms (Fig. 1(d))¹⁸. This problem is significant when the aim is to obtain precise and quantitative measurements of the properties of RCs. Therefore, we tested the algorithm against images presenting partially overlapping RCs. For this, the algorithm was applied to twenty-five synthetic images presenting different levels of partial occlusion, and different levels of lack of information. Fig. 4(a–c) show three of these images considering different angles of partial occlusion.

Figure 4(d–f) show the algorithm outcome obtained for the synthetic images of 4(a), 4(b), and 4(c) respectively. In the test images all viral RCs were detected successfully. Regarding an approximate qualitative assessment of the accuracy of the adjustment, each partial occlusion angle determines the degree of information eliminated in the simulated viral RCs. In Fig. 4(d,e) an accurate adjustment of RCs is observed, even in zones where information is poor and can be confused with the image background (see the red arrows). In the case of $\theta = \pi$, Fig. 4(f) shows results of decreased accuracy despite the detection of all RCs. In this example, where only 50% of the data for each image generated is preserved and can be considered as an extreme and unusual case (note that it is difficult to detect the position and form of some RCs by visual inspection), the algorithm can still adjust RCs, although with lower accuracy. The proposed method for detection and approximation of the RCs was evaluated

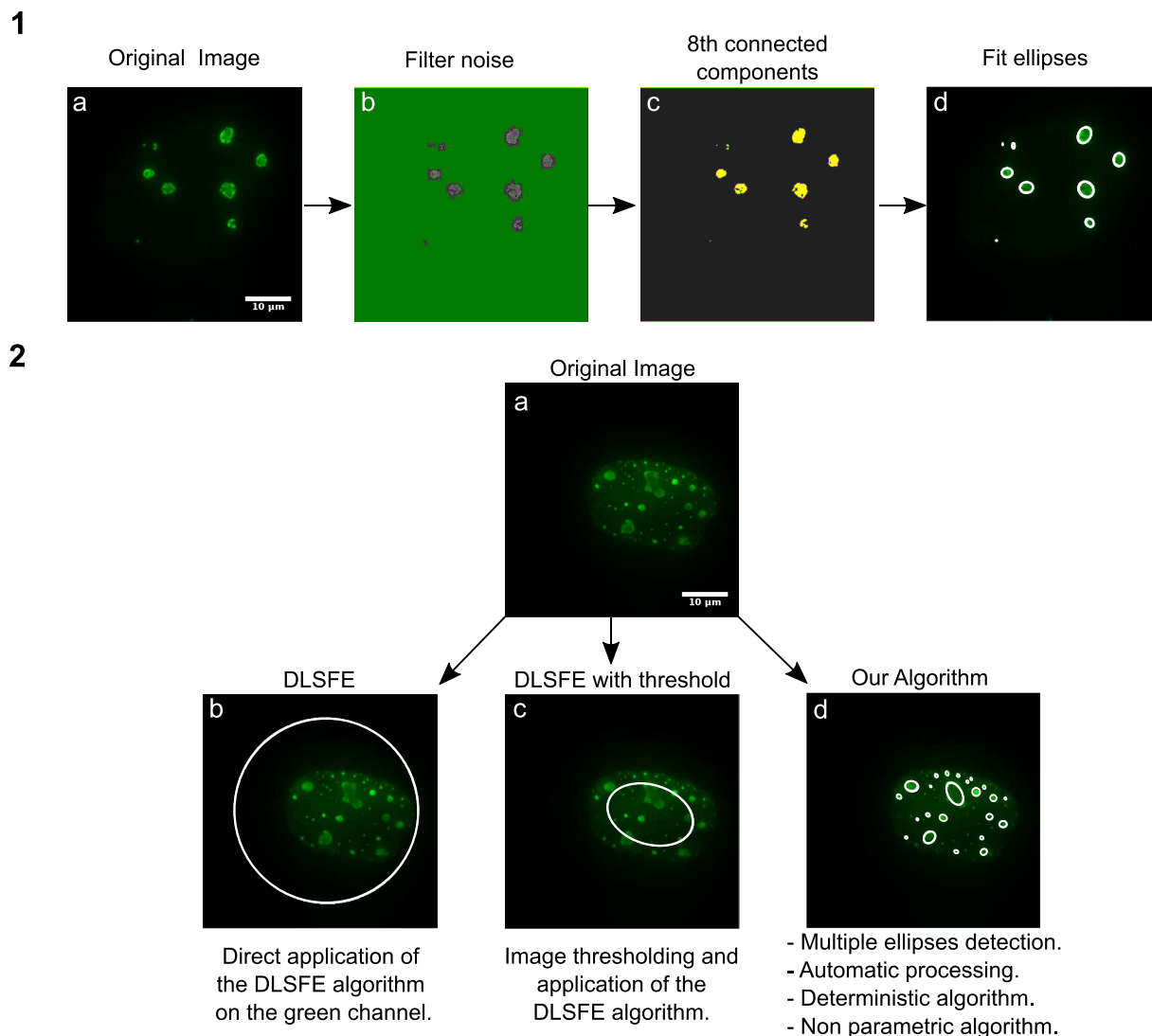


Figure 2. Visual comparison of our algorithm with other applications of the DLSFE algorithm. Panels 1a–d: Shows the steps of the proposed algorithm in a real image. Panel 2a: Original image. Panel 2b: DLSFE algorithm using all the pixels with non-zero value in green channel. Panel 2c: DLSFE algorithm application to the filtered image considering the threshold defined by Eq. (1). Panel 2d: Result using our algorithm.

quantitatively using synthetic images. Images were generated drawing ellipses from analytical formulas. The parameters (a , b , cx , cy) of analytical formulas are the ground truth used for evaluation. The rotation angle was not taken into account in this manuscript. However in Supplementary Information the performance of the proposed algorithm is scrutinized against the impact of noise over the identification of rotation angles.

In order to evaluate the thresholding process (Step 1) of the algorithm, we compared our proposed algorithm with four well known thresholding alternatives: Intermodos, MaxEntropy, Otsu and Yen. Intermodos smoothes the histogram in an iterative way until only two peaks remain¹⁹. MaxEntropy chooses the threshold which maximizes entropies of distributions above and below the threshold²⁰. Otsu's method selects the thresholding that maximizes interclass variance and minimizes intraclass variance²¹. Yen's method uses a maximum correlation criterion to select threshold²². The experiment was conducted taking into account that each image (one for each level of SNR) contains a set of synthetic RCs with different sizes, positions and eccentricities. For the validation we used the index of Jaccard, the Precision and the Recall in order to evaluate the performance of the methods in different scenarios like noise and partial occlusion. More details about these indexes and their application in our specific problem are explained in the methods section.

Figure 5 shows the obtained results for the Precision, Recall and Jaccard Index for 6 different Signal/Noise ratios ($SNR = \{2.3, 2.5, 2.8, 3.2, 4, 7.6\}$). With methods like Otsu, MaxEntropy and Yen we obtain bad results for all Signal/Noise ratios, even with high quality in the images (high Signal/Noise level). On the other hand, the best results can be observed when we use our method or the Intermodos alternative, in this case the Precision, Recall and Jaccard index are all superior with our proposal for any SNR. For these experiments we generated synthetic images with low Signal/Noise ratios ($SNR = \{2.3, 2.5, 2.8\}$), even though real microscopy images do not have such

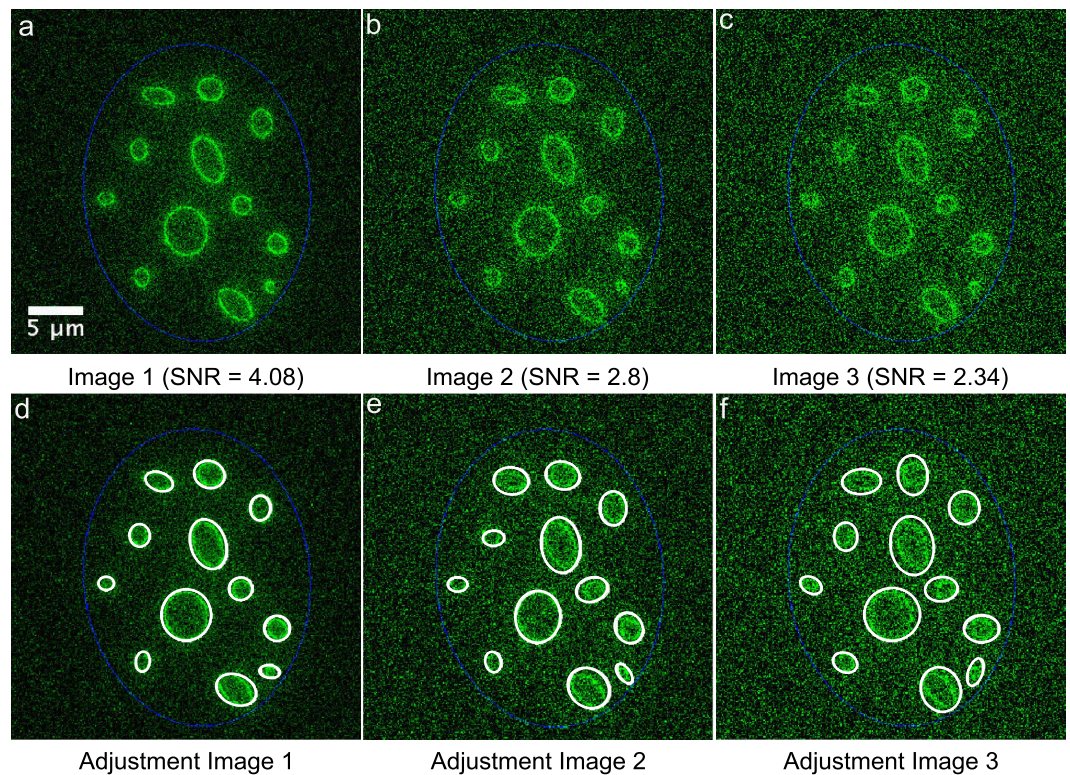


Figure 3. Adjustment of artificial images with different levels of Signal/Noise. The panels 3(a), 3(b), 3(c) show the synthetic images generated artificially. In the second row panels 3(d) to 3(f) show the results of our algorithm for these images. The blue ellipses simulate the nucleus of the cell.

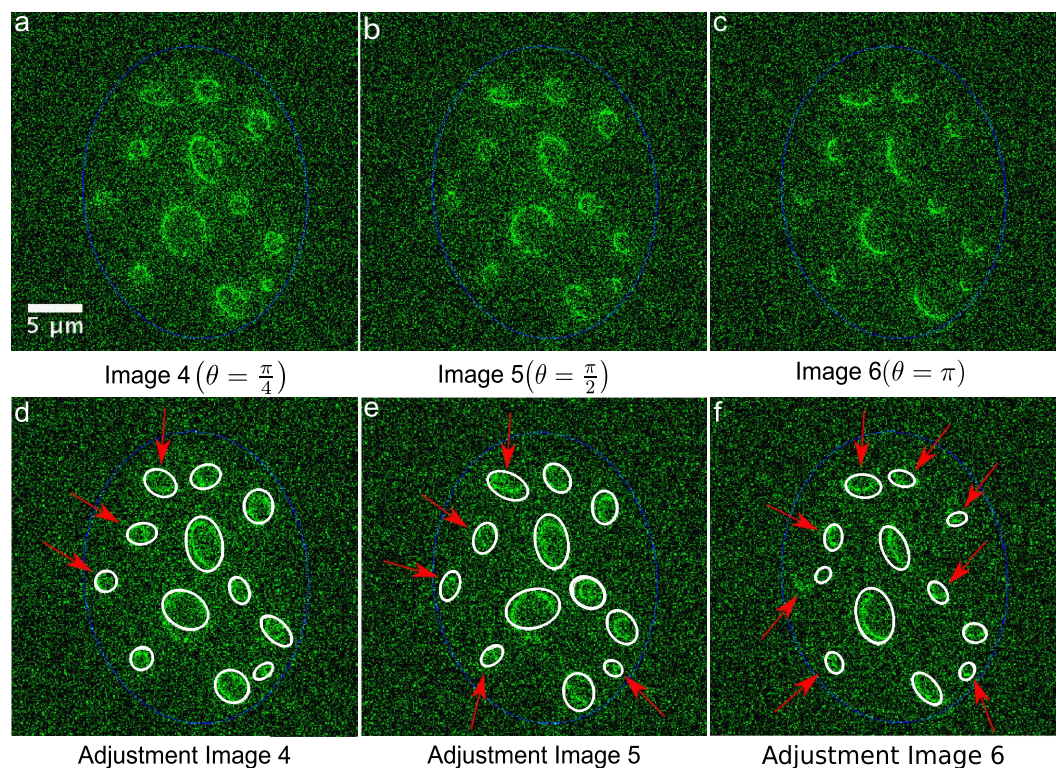


Figure 4. Adjustment of artificial images with partial occlusion (SNR = 2.34). The panels 4(a), 4(b), 4(c) show the synthetic images generated artificially with partial occlusion. In the second row, panels d to f, show the results of the algorithm for these images.

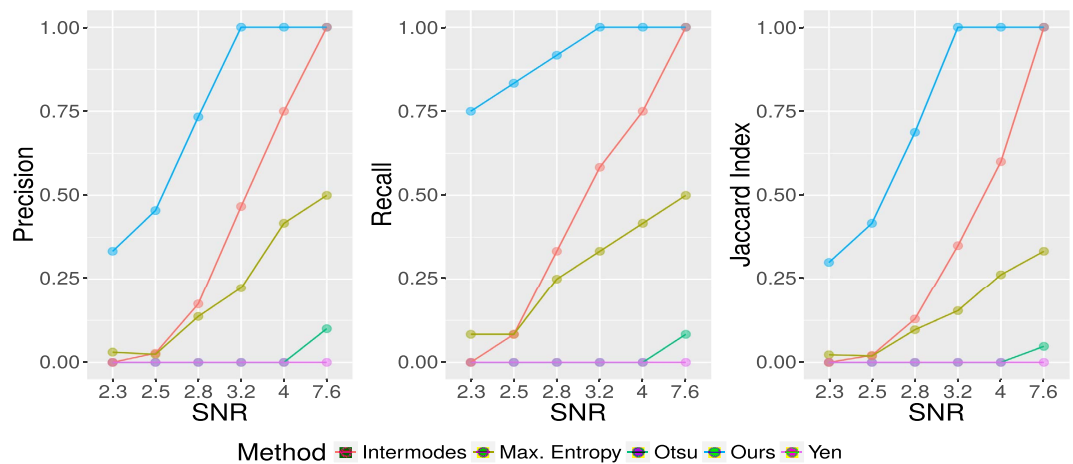


Figure 5. Precision, Recall and Jaccard indices for the detection and approximation of the viral RCs considering different levels of signal/noise in the synthetic images. Five different thresholding methods were tested (Intermodos, Maximum Entropy, Otsu, Yen and our method), each panel illustrates the results for these alternatives.

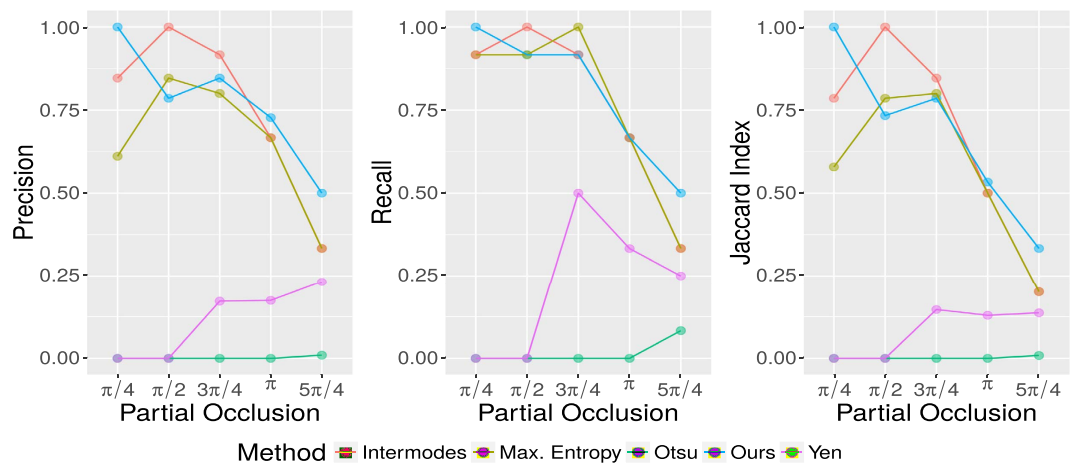


Figure 6. Precision, Recall and Jaccard indices for the detection and approximation of the viral RCs considering different levels of partial occlusion in the synthetic images. Five different thresholding methods were tested (Intermodos, Maximum Entropy, Otsu, Yen and our method).

poor quality. With these SNR values the algorithm could detect successfully some RCs (Precision, Recall, and Jaccard indices >0.25 in all cases). For images with SNR that are closer to expected values ($\text{SNR} = \{3.2, 4\}$), our method can correctly detect all RCS (Precision, Recall, and Jaccard indices equal to 1).

Figure 6 shows the performance of our method compared with four alternative thresholding techniques in synthetic images with partial occlusion. For this experiment we consider a fixed SNR equal to 3.2 and five angles for partial occlusion $\theta = \{\pi/4, \pi/2, 3\pi/4, \pi, 5\pi/4\}$. The SNR value of 3.2 was chosen as representative of the SNR “normally” found in epifluorescence images. The worst results are obtained with the threshold of Otsu and Yen. In these cases the Precision and Jaccard indices are always less than 0.25, while the Recall have a maximum value of 0.5 with a partial occlusion $\theta = 3\pi/4$. The performance of the proposed algorithm by means of considering Intermodos thresholding is superior to the other tested thresholding algorithms for $\pi/2$ and $3\pi/4$ degrees of partial occlusion. In these particular cases, the heights of the two peaks of the histogram computed from their corresponding synthetic images were comparably similar, therefore Intermodos outperforms other thresholding methods. However, such particular cases are far from being representative. In general, the results shown in Fig. 5 indicate that Intermodos thresholding does not guarantee the identification of the best threshold level for all images. Whatever the case, the data presented in Fig. 6 represent a particular adaptation of the proposed algorithm, which itself is completely compatible with any desired thresholding method. More thresholding algorithms might provide an advantage for other given particular cases, e.g. local thresholding will perform much better than global thresholding in images taken with heterogeneous illumination. When partial occlusion angles are within

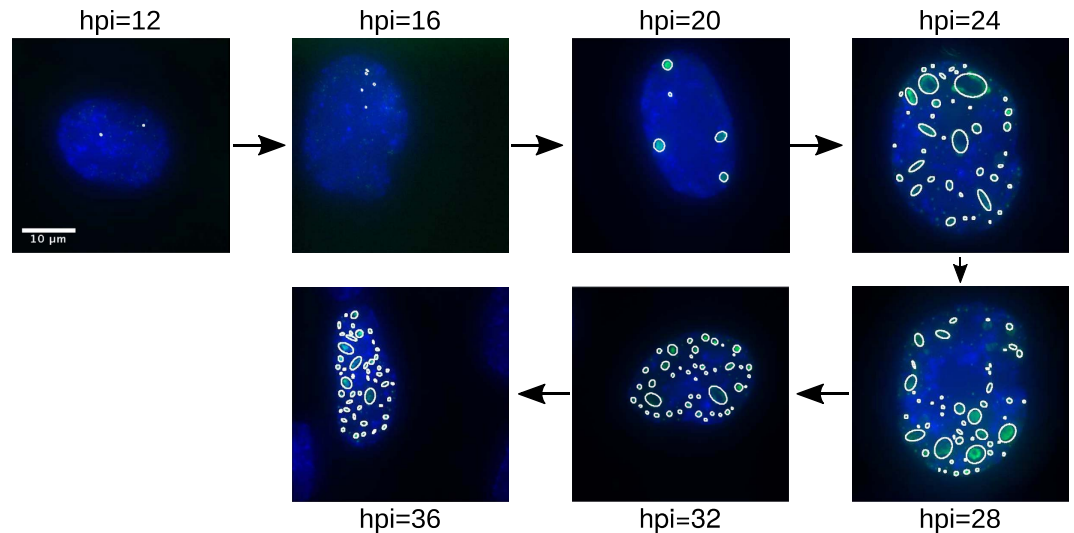


Figure 7. Detection and adjustment of the RCs in real images. A set of images each representative of a different time point of the viral replication cycle, and the results obtained using the algorithm are shown.

interval $[0, \pi)$ the Precision, Recall and Jaccard indices are relatively high, i.e. the proposed algorithm is reliable when more than half of the data of interest are present.

Analysis of viral replication compartments in Ad-infected cells. The algorithm was then used to analyze RCs in Ad-infected cells. Images of Ad-infected cells obtained at various times post-infection by fluorescence microscopy were grouped in eight different sets (12; 16; 20; 24; 28; 32; and 36 hpi). For each time-point, 60 images of infected cells were recorded, hence the results of this section represent the analysis of 420 images of the adenovirus infection process (a typical personal computer requires about 0.01 seconds to process a single image).

Figure 7 depicts representative results obtained for each time-point. At the earlier time-points ($hpi = \{12, 16\}$), before the onset of viral DNA replication, RCs are just becoming apparent, and those which were detected by the algorithm were small dot-like foci. At 20 hpi, although still scarce and isolated, RCs were larger and better defined. Qualitatively, in the time period between 20 and 32 hpi a significant rise in the number of RCs, as well as of their size and the fluorescence intensity, was observed. The results obtained at 36 hpi, showed an appreciable rise in the number of RCs in comparison with the previous time-points. At the latter time-points the larger RCs seem to coalesce, occupying a large proportion of the cell nucleus and forming complex amorphous structures, for which the adjustment of ellipses is no longer accurate (see Discussion section).

One of the main advantages of approximation through ellipses is the possibility to obtain quantitative data, e.g. position, area, perimeter, form and average fluorescence intensity of the RCs. These indicators allow for a statistic study of the behaviour of RCs at different time-points, providing relevant information about the viral replication cycle.

Therefore, we conducted statistical analysis of the data obtained by the algorithm from processing images of cells infected either with the wt virus (Ad5 H5pg4100) or with a mutant virus (Ad5 H5pm4149), as described in the methods section. This virus mutant (E1B-) does not direct the synthesis of the early protein, E1B-55K, and has been shown to display defects in viral late gene expression, as well as in inhibition of cellular anti-viral defenses, resulting in decreased production of viral progeny. The results obtained are shown in Fig. 8, where violin plots of the number of RCs per cell nucleus; the area of RCs; their fluorescence intensity; and eccentricity of RCs were plotted against various time-points post-infection. For clarity, the analysis was divided into three different time intervals ($hpi = \{12-16\}$; $hpi = \{20-28\}$; $hpi = \{32-36\}$). The analysis of the data showed that except for few time-points and parameters (the area at 12 hpi; the intensity at 32 and 36 hpi; and the eccentricity at 28 hpi) there exists in all variables a statistically significant difference between the wild type and mutant virus according to the test of Kruskal-Wallis²³.

At the time interval between 12 and 16 hpi, the violin plots (see Fig. 8) show that for the Ad5 wt virus there was a clear increase in the number of RCs, and a slight increase in their area and intensity. Interestingly, for the E1B- virus, while a slight rise in the number of RCs was observed, their area, intensity and eccentricity decreased in this time interval. Significantly, these data indicate that during the early times post-infection the algorithm is able to distinguish small changes in the number, size and shape of RCs. During the next time interval (20 to 28 hpi), viral genome replication initiates and the expression of viral late genes is known to increase several fold. In the Ad5 wt-infected cells, the number of RCs displayed further increase from the 16 hpi time point, and they reached their maximum area and intensity between 24 and 28 hpi. In contrast, cells infected with the E1B-virus displayed a complex behaviour, as the RCs increased in number between 16 and 20, but dropped slightly at 24 hpi. Interestingly, the area of RCs increased only transiently (at 24 hpi) before 32 hpi. The interval between 32 and 36 hpi corresponds to a phase during viral replication where viral late proteins and genomes are produced in large quantities and assembly of viral progeny reaches its highest level. The number of RCs detected in the Ad5 wt infected cells showed a steady rise during this interval; however, in contrast to the wt virus, where RCs

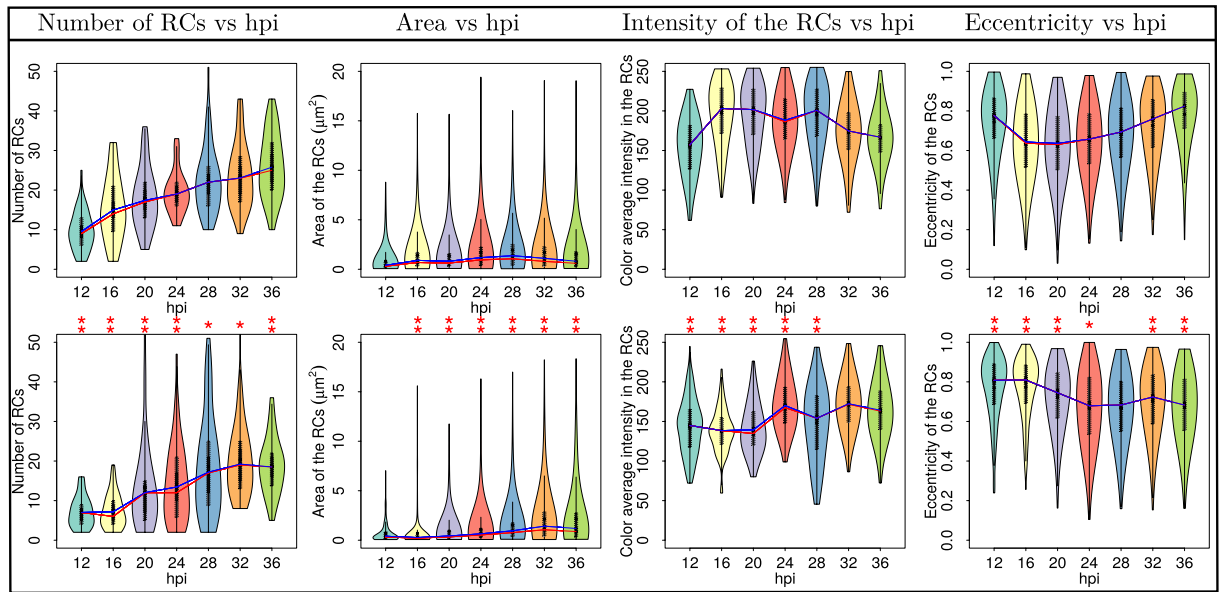


Figure 8. Descriptive statistical analysis of the number, area, mean intensity and eccentricity of the RCs. First row: Ad5 wt virus violin graphs (H5pg4100); second row: Ad5 mutant virus (H5pm4149). The number of cells analysed for each experimental condition was $n \geq 60$. The blue line represents the mean and the red line the median. The red asterisks represent the statistical significance difference between the wild type and mutant virus using the test of Kruskal-Wallis²³. * p -value ≤ 0.05 ; ** p -value ≤ 0.01 .

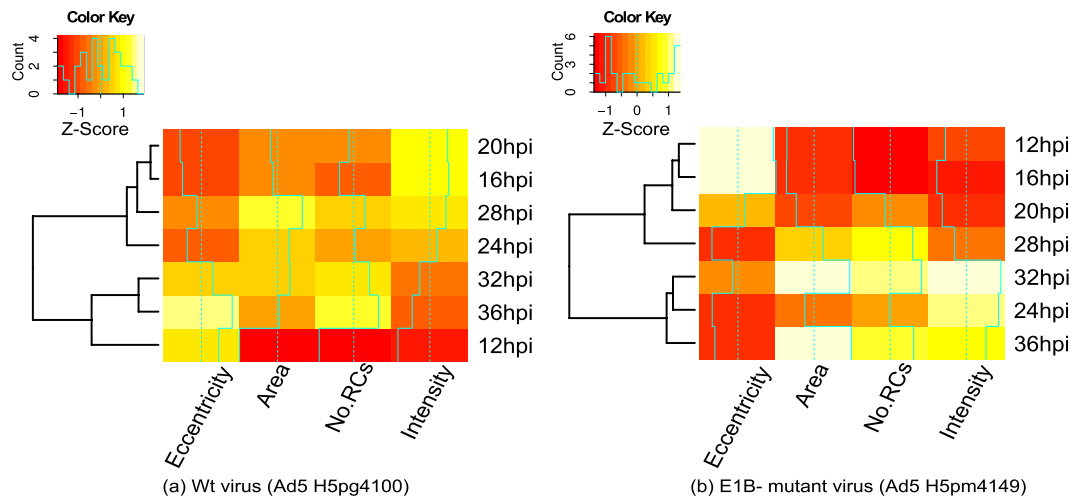


Figure 9. Hierarchically clustered heatmap for eccentricity, area, number of RCs and intensity, considering all times post-infection.

reach a size that is nearly constant between the 20 hpi and 32 hpi time-point, the mutant virus showed again a complex behaviour in which RCs reached a maximum value that decreased not only in size but also in number after 32 hpi. An altered behaviour was also matched by the fluctuations in intensity and eccentricity of the RCs for the E1B- virus. For the Ad5 wt the maximum level of intensity after the initial rise at 16 hpi was reached at 28 hpi; in contrast a nearly opposite behaviour was observed for the E1B- virus as the initial rise that was observed only after 20 hpi was followed by a clear drop at 28 hpi. Interestingly, while the lowest values of eccentricity are reached in the 16–20 hpi interval in Ad5 wt, for the E1B- virus the lowest values are only reached at 24 hpi.

The hierarchical clustering maps presented in Fig. 9 for the Ad5 wt and E1B- mutant virus show some of the characteristics of RCs described above. The dendrograms indicate conglomerates according to qualitative and quantitative results: For the Ad5 wt virus the first group level contains classes {16, 20}, {32, 36}. The second group level contains {12, 32, 36}, {16, 20, 28}, while the third level contains {16, 20, 24, 28}. The latter group was an expected result because the items of each class are different to each other by 4 hours, and therefore, the results are more similar for any two time-points that are chronologically close to each other; however, it is interesting to note that such hierarchical clustering would be anticipated for the progressive formation of RCs as the viral replication

cycle advances. In contrast, the results for the E1B- mutant virus display different sets of conglomerates, where the 12, 16 and 28 hpi time-points remain ungrouped in the first two or three levels, respectively, and seem to display an arrest, as there is no clear progression from the 12 hpi to the 20 hpi in the area, intensity or number of RCs, and a similar defect is apparent between the 24 and 28 hpi time points. These results indicate a defective progression from these two time-points, which correspond to the initial formation of RCs (12 hpi) and to the transition to the late phase of the viral replication cycle (20 to 24 hpi). The dendrograms also show that for both Ad5 wt and the E1B- mutant virus conglomerates tend to group around the 24, 28 and 32 time-points, suggesting these two time points may be of particular relevance for RCs during latter periods post-infection.

Significant differences between Ad5 wt and E1B- through the viral replication cycle were clearly detected by the algorithm, as in contrast to Ad5 wt, where the transition to the late phase of infection clearly showed an increase in the area and intensity of the RCs, as well as a shift of decreased eccentricity, the E1B- mutant displayed a seemingly biphasic behaviour for the number, intensity and eccentricity of RCs.

Discussion

The formation of RCs and the association of viral and cellular molecules to these structures have been studied using a variety of experimental strategies that have relied mostly on fluorescence or electron microscopy^{24–33}. Because the viral DBP associates with ssDNA and participates directly in viral DNA replication, many studies have used this protein as a bona fide marker of RCs. The data produced by such studies indicate that RCs assemble in association with the viral DNA, where transcription and post-transcriptional processing of viral genes progressively results in the recruitment to these sites of viral and cellular proteins that direct the various steps of regulated gene expression²⁷. As the late phase of viral replication progresses RCs display changes in their size, number and shape. And although it is clear that the dynamics of their formation parallel not only progression of the viral replication cycle, but also the inhibition of cellular defenses, quantitative studies of the dynamic behaviour of RCs have not been conducted. The adjustment of the viral RCs using ellipses presented in this work allowed us to obtain for the first time relevant quantitative data, such as the area, perimeter and form of RCs within the nuclei of infected cells, enabling statistical analysis of these parameters at various time-points of the adenoviral replication cycle.

During the earliest times post-infection, the initial localization of DBP was detected in a few small nuclear foci (at 12 hpi), followed by a progressive increase in their number and size. At time-points post-infection that are known to correspond to the initiation of viral DNA synthesis and the resulting transition to the late phase of the viral replication cycle (between 20 and 24 hpi), larger spherical or doughnut-shaped structures were prominent. Both of these structures increased in number at the later time-point (32–36 hpi). At very late time (36 hpi) some RCs coalesce, resulting in decreased precision of the algorithm. Therefore, except for the latest time-points, when the likelihood of RCs fusion becomes higher, and the adjustment using ellipses can be used for an initial approximation with other strategies, like Level Set, or other dynamic instead of global thresholding methods, the detection of RCs throughout viral replication by the algorithm is in agreement with the qualitative description that has been reported previously by various studies^{24,27,34,35}.

In addition to the qualitative description of RCs formation the algorithm allowed us to obtain quantitative measurements that had hitherto not been performed. The statistical analysis of RCs from Ad5 wt compared with the E1B- mutant showed that the absence of the E1B protein is clearly associated with a previously unidentified lower efficiency of RCs formation and altered morphological features of RCs at different time-points of viral replication (Fig. 8). The E1B protein is known to participate in both the selective and efficient expression of viral late genes^{36–40} and in the inhibition of cellular factors that participate in the anti-viral cellular response⁴¹. The association of E1B with these structures correlates also with efficient viral DNA synthesis^{37,42–46}. The accumulated evidence indicates that E1B is a multifunctional protein that participates in various processes of viral replication, and that its timely synthesis and localization are necessary for the protein to function as a transcriptional repressor of interferon-inducible genes^{47,48}, and presumably formation of RCs. The latter, however, has not been demonstrated and the data obtained here allowed us to quantitatively determine for the first time that the E1B impacts each of the parameters used to measure RCs formation. In the absence of E1B, formation of RCs between 12 and 16 hpi displayed similar characteristics as Ad wt, however a clear decrease in their number, area, intensity and eccentricity (Fig. 8), as well as a marked difference in the hierarchical clustering of the 12 hpi time-point (Fig. 9) suggest this early protein may be required for the initial steps of RCs formation. Moreover, the large differences in the range and distribution of the average fluorescence intensity, which indicate variations in the level of DBP that is associated to different RCs, suggest that in the absence of E1B fewer of the DBP-containing small foci that form early or increase in size and give rise to the larger doughnut-shaped structures. These results were not anticipated and suggest that E1B may impact the association of DBP to RCs; experiments are currently in progress to assess this possibility.

The defects displayed by the E1B- mutant virus were not limited to the early time-points. In the absence of this protein the violin plots (Fig. 8) displayed a sine behaviour with the time post-infection, where similar times were observed for the maximum number and intensity of RCs (32 hpi), which paralleled the times for the maximum value for eccentricity (especially at 28 hpi). Interestingly, while hierarchically clustering the variables used to analyze RCs formation dynamics in Ad5 wt-infected cells showed that, as expected, any two time-points that are chronologically closer are more similar to each other (between 16 and 28 hpi), and describe a continuous progression of increasing size, number and intensity of RCs as viral replication progresses (Fig. 9), the area and intensity of RCs reach a maximum value at a time that corresponds to the peak of viral DNA synthesis (28 hpi). In stark contrast, the E1B- mutant displayed alterations in the hierarchical clustering of variables. Notably, the 20 to 24 hpi time-points, which correspond to the initiation of viral DNA synthesis, were no longer grouped together, suggesting that the absence of E1B results in a defect in the adequate formation of RCs that correlates and may be directly linked to the initiation of viral DNA replication.

In summary, in this work the development of a simple and efficient approach to detect and quantitatively measure viral RCs is presented. The proposed algorithm is automatic, non iterative and can detect multiple ellipses of any size and eccentricity. It is deterministic, has a linear algorithmic complexity, and is robust against noisy datasets, even with partial occlusion. This algorithm does not depend on the size or resolution of the images and is invariant to affine transformations. Quantitative statistic analyses of RCs could detect some defects in the formation and maturation of RCs in cells infected with the E1B- mutant virus, indicating that the algorithm represents a simple and powerful tool with predictive capabilities that can be used for the detailed study of RCs formed in cells infected with adenovirus as well as other viruses that induce formation of RCs.

Methods

Cells and viruses. Primary human foreskin fibroblasts (HFFs) were maintained in monolayer cultures in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum (Gibco-Invitrogen Corp.) for no more than 14 passages. HFFs were infected with Ad5, wt or with an E1B- mutant at 30 PFU/cell, as described previously³⁹. The Ad5 H5pg4100 and Ad5 H5pm4149 viruses^{49,50} were propagated in monolayers of HEK-293 cells. Viruses were titered as fluorescent forming units (FFU) on HEK-293 cells as described previously⁴⁹.

Antibodies. The primary antibodies used for immunofluorescence assays were rabbit polyclonal Ab specific for Ad5 DBP (a kind gift from Thomas Dobner, Heinrich-Pette Leibniz Institute, Hamburg, Germany). The secondary antibodies used were, either anti rabbit Alexa Fluor 350 or anti rabbit Alexa fluor 488 (Invitrogen). DAPI was used to stain DNA.

Fluorescence microscopy. For immunofluorescence, HFF cells grown on coverslips to approximately 90% confluence were mock-infected or infected with Ad5 wt or E1B- mutant. Cells were processed for immunofluorescence as described previously³⁹. After application of specific primary antibodies, cells were incubated with secondary antibodies. The cover-slips were mounted on glass slides in PBS/10% glycerol and samples were examined using a Zeiss Axiovert 200 M 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.). For each condition 60 2D images were collected. The final images were created with ImageJ v1.48o and were later analyzed in Matlab R2011b.

Implementation and details about the proposed algorithm. The objective of the thresholding algorithm is to separate the background from the foreground. Because fluorescence images can have different levels of intensity in the background and it is possible that some columns will not have any information for the RCs, we compute the minimum of the mean intensity of all columns to estimate the average intensity of the background. The standard deviation for the columns was taken into account to estimate the maximum variation of the intensity.

The third step of our algorithm uses the DLSFE approach to adjust the RCs using ellipses, details of this method are presented below:

Direct Least Square Fitting Ellipses (DLSFE). The equation of a conic is given by¹¹:

$$F(\Phi, X) = ax^2 + bxy + cy^2 + dx + ey + f = 0,$$

where $\Phi = [a, b, c, d, e, f]^t$ (parameters) and $X = [x^2, xy, y^2, x, y, 1]^t$ (data points in \mathbb{R}^2). Given n points $X_i, i = \overline{1, n}$ the adjustment to the general form of a conic can be seen like the next minimization problem:

$$\min_{\Phi} \sum_{i=1}^n F(\Phi, X_i)^2. \quad (3)$$

The restriction $b^2 - 4ac < 0$ guarantees that the conic $F(\Phi, X)$ is an ellipse, and since $F(\Phi, X)$ and $\alpha F(\Phi, X)$ is the same conic for all scalar $\alpha \neq 0$, it is possible to rescale the parameters and consider the next restriction:

$$b^2 - 4ac = -1 \Leftrightarrow 4ac - b^2 = 1.$$

The problem (3) can be expressed as:

$$\begin{cases} \min_{\Phi} \sum_{i=1}^n F(\Phi, X_i)^2 \\ \text{subject to: } 4ac - b^2 = 1 \end{cases}. \quad (4)$$

The matrix form of the equation (4) is given by:

$$\min_{\Phi} \|D\Phi\|^2 \text{ subject to: } \Phi^t C \Phi = 1, \quad (5)$$

where

$$D = \underbrace{\begin{pmatrix} x_1^2 & x_1 y_1 & y_1^2 & x_1 & y_1 & 1 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ x_i^2 & x_i y_i & y_i^2 & x_i & y_i & 1 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ x_n^2 & x_n y_n & y_n^2 & x_n & y_n & 1 \end{pmatrix}}_{\text{design matrix of } n \times 6} \text{ and } C = \underbrace{\begin{pmatrix} 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}}_{\text{constraint matrix of } 6 \times 6}.$$

The following system is obtained using Lagrange multipliers and differentiating in problem (5):

$$\begin{cases} 2D^t D \Phi - 2\lambda C \Phi = 0 \\ \Phi^t C \Phi = 1 \end{cases} \tag{6}$$

which can be expressed as the equivalent system,

$$S \Phi = \lambda C \Phi \tag{7}$$

$$\Phi^t C \Phi = 1, \tag{8}$$

where S is the dispersion matrix:

$$S = D^t D = \begin{pmatrix} S_{x^4} & S_{x^3 y} & S_{x^2 y^2} & S_{x^3} & S_{x^2 y} & S_{x^2} \\ S_{x^3 y} & S_{x^2 y^2} & S_{x y^3} & S_{x^2 y} & S_{x y^2} & S_{x y} \\ S_{x^2 y^2} & S_{x y^3} & S_{y^4} & S_{x y^2} & S_{y^3} & S_{y^2} \\ S_{x^3} & S_{x^2 y} & S_{x y^2} & S_{x^2} & S_{x y} & S_x \\ S_{x^2 y} & S_{x y^2} & S_{y^3} & S_{x y} & S_{y^2} & S_y \\ S_{x^2} & S_{x y} & S_{y^2} & S_x & S_y & S_1 \end{pmatrix} \text{ and } S_{x^a y^b} = \sum_{i=1}^n x_i^a y_i^b.$$

The representation (7) is solved using generalized eigenvectors. In this case the solution is composed of 6 real eigenvalues because the matrices C and D are symmetrical. If (λ_i, u_i) (u_i is an eigenvector associated to an eigenvalue λ_i) solve (7), then for all μ , the pair $(\lambda_i, \mu u_i)$ is the solution to (7). Taking into account the equation (8):

$$\mu_i^2 u_i^t C u_i = 1 \Rightarrow \mu_i = \sqrt{\frac{1}{u_i^t C u_i}}.$$

The solutions of the system (6) are of the form $\hat{\Phi}_i = \mu_i u_i$. Since there are six solutions, the problem (5) is solved considering the solution associated to the less positive eigenvalue λ_i .

All methods have been coded and run in Matlab R2011b (7.13.0.564), under Linux-Ubuntu 14.04, with a processor Intel(R) Core(TM) i5-2450M CPU @ 2.50 GHz and 16 GB of RAM.

Generation of synthetic images. The steps to generate the synthetic images are the following¹⁷:

1. Create an image A containing ellipses of different sizes, eccentricities and positions according to desired characteristics.
2. Convolute A using the point spread function (PSF). For this step we use the plug-in “Diffraction PSF-3D” of ImageJ with the following parameters: Index of refraction of the media $n = 1.33$, Numerical Aperture $NA = n \sin(\theta) = 1.3$, Wavelength $\gamma = 510 \text{ nm}$, Image Pixel Spacing $px = 100 \text{ nm}$, Width (pixels) = 512, Height (pixels) = 512. Rayleigh resolution $r = 0.61 \lambda / NA = 240 \text{ nm}$. For more details of this plug-in see⁵¹.
3. Add Gaussian noise in order to consider auto-fluorescence and Poisson noise for the purpose of considering electronic noise. Finally, amplification in an EM-CCD detector has been included¹⁷. The description of the method to compute the SNR has been included as Supplementary Information.

Generation of partial occlusion in synthetic images. Each synthetic image has n viral RCs simulated through ellipses, whose implicit equation parameters are known. In order to simulate the partial occlusion of the RCs the representation in polar coordinates of the ellipse is considered:

$$r(\theta) = \frac{1}{\sqrt{\frac{\cos^2 \theta}{a^2} + \frac{\sin^2 \theta}{b^2}}}.$$

Varying θ in a specific interval, points are generated only in the arc determined by this interval, which can be considered as a simulated effect of partial occlusion. Figure 10 shows an example of the ellipse arc generated for $\theta \in \left[\frac{\pi}{4}, 2\pi\right]$, the information enclosed into the angular interval $\left(0, \frac{\pi}{4}\right)$ is eliminated as a consequence of the partial occlusion.

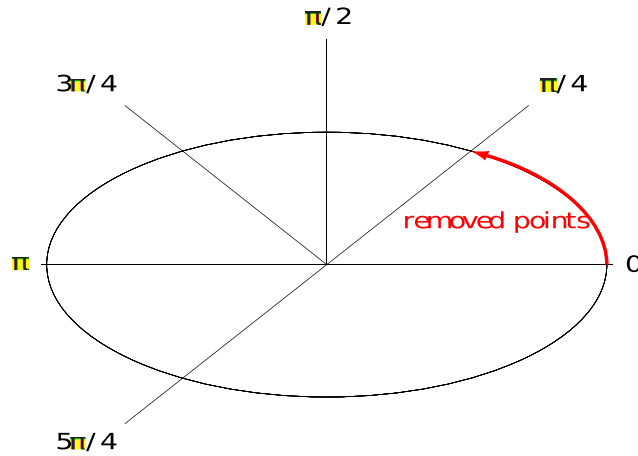


Figure 10. Partial occlusion simulation.

The percentage of points conserved with respect to the total, based on the partial occlusion angle is given by:

$$P_{\%} = 100 \left(1 - \frac{\theta}{2\pi} \right).$$

In the case of Fig. 10, 87.5% of total data is conserved.

Validation of the algorithm. The validation of the algorithm was conducted using measures like the Jaccard index, the Recall and the Precision. Hereinafter each ellipse is represented as a vector of four components $E = (a, b, cx, cy)$, where the elements of this vector are the coefficients of the implicit form of the ellipse, that is:

$$\underbrace{E = (a, b, cx, cy)}_{\text{ellipse in vector form}} \Leftrightarrow \underbrace{\frac{(x - cx)^2}{a^2} + \frac{(y - cy)^2}{b^2} = 1}_{\text{implicit form of the ellipse}}.$$

Let $\hat{E} = \{\hat{E}_i = (\hat{a}_i, \hat{b}_i, \hat{c}x_i, \hat{c}y_i), i = \overline{1, n}\}$ the set of n ellipses that simulate the RCs in the image I , and $E^r = \{E_j^r = (a_j^r, b_j^r, cx_j^r, cy_j^r), j = \overline{1, k}\}$ the set of k ellipses obtained as a result of the segmentation of the image I . The sets \hat{E} and E^r can be compared following the next rules of classification:

1. True Positive (TP): $E_j^r \in E^r$ is a true positive (good adjust) if:

$$\{\exists \hat{E}_i \in \hat{E}: |\hat{E}_i - E_j^r| = |(\hat{a}_i, \hat{b}_i, \hat{c}x_i, \hat{c}y_i) - (a_j^r, b_j^r, cx_j^r, cy_j^r)| \leq (0.5, 0.5, 0.5, 0.5)\mu m\}.$$

That is, that the absolute error in each coefficient is less than $0.5 \mu m$.

2. False Positive (FP): $E_j^r \in E^r$ is a false positive (bad adjust) if:

$$\{\nexists \hat{E}_i \in \hat{E}: |\hat{E}_i - E_j^r| = |(\hat{a}_i, \hat{b}_i, \hat{c}x_i, \hat{c}y_i) - (a_j^r, b_j^r, cx_j^r, cy_j^r)| \leq (0.5, 0.5, 0.5, 0.5)\mu m\}.$$

3. False Negative (FN): $\hat{E}_i \in \hat{E}$ is a false negative if:

$$\{\nexists E_j^r \in E^r: |\hat{E}_i - E_j^r| = |(\hat{a}_i, \hat{b}_i, \hat{c}x_i, \hat{c}y_i) - (a_j^r, b_j^r, cx_j^r, cy_j^r)| \leq (0.5, 0.5, 0.5, 0.5)\mu m\}.$$

A true positive is a detected ellipse that is similar enough to one of the synthetic ellipses. A false positive is a detected ellipse that is not similar enough to any of the synthetic ellipses and a false negative is a synthetic ellipse that was not detected.

The Jaccard index⁵² is defined as:

$$J(\hat{E}, E^r) = \frac{\hat{E} \cap E^r}{\hat{E} \cup E^r}, \text{ in our specific problem and considering}$$

the three rules above we obtain that

$$= \frac{\sum TP}{\sum TP + \sum FP + \sum FN},$$

where $\sum TP$, $\sum FP$ and $\sum FN$ indicate the total number of true positive, false positive and false negative respectively.

The Recall⁵³ in the context of our application can be referred as the true positive rate or sensitivity, and it is defined as:

$$\text{Recall} = \frac{\sum TP}{\sum TP + \sum FN}$$

On the other hand, the Precision⁵³ is also referred to as positive predictive value, and it is defined as:

$$\text{Precision} = \frac{\sum TP}{\sum TP + \sum FP}$$

The 0.5 μm threshold was chosen based on the resolution limit of optical microscopes, which in agreement with Rayleigh's criteria, is $r = (0.61\lambda)/NA$, with λ being the emission wavelength of the fluorophore and NA the numerical aperture of the objective. For fluorophores that emit in the visible spectrum the optical resolution of a common epifluorescence microscope is approximately 0.25 – 0.3 μm (along the xy imaging plane). For a single emitter, r approximates the radius of the zero order Airy ring. For the sake of simplicity, we define a 0.5 μm threshold as an approximation to the diameter of the zero order Airy ring, because in diffraction limited images it does not make sense to segment replication compartments smaller than $2r$. Moreover, transmission electron microscopy (TEM) has shown that replication centers measure between 0.5 and 2 μm in diameter⁵⁴.

Statistical analyses. All statistical tests were performed using R version 3.2.4 (2016-03-16) software.

References

- Boon, J., Diaz, A. & Ahlquist, P. Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host Microbe* **8**, 77–85 (2010).
- Schmid, M., Speiseder, T., Dobner, T. & Gonzalez., R. DNA virus replication compartments. *Journal of Virology* **88**, 1404–1420 (2014).
- Wimmer, P. *et al.* Cross-talk between phosphorylation and SUMOylation regulates transforming activities of an adenoviral oncoprotein. *Oncogene* **32**, 1626–1637 (2013).
- Hough V, P. C. Method and means for recognizing complex patterns (1962).
- Wang, C., Kaba, D. & Li, Y. Level set segmentation of optic discs from retinal images. *Journal of Medical and Bioengineering* **4** (2015).
- Mukhopadhyay, P. & Chaudhuri, B. A survey of hough transform. *Pattern Recognition, Elsevier* **48**, 993–1010 (2015).
- Fischler, M. & Bolles., R. Random sample consensus: a paradigm for model fitting with applications to image analysis and automated cartography. *Communications of the ACM* **24** (1981).
- Hongxia, G., Jianhe, X., Yueming, H. & Ze., Y. Hough-RANSAC: A fast and robust method for rejecting mismatches. *Communications in Computer and Information Science* **483**, 363–370 (2014).
- Hassner, T., Assif, L. & Wolf, L. When standard RANSAC is not enough: cross-media visual matching with hypothesis relevancy. *Machine Vision and Applications* **25**, 971–983 (2014).
- Litman, R., Korman, S., Bronstein, A. & Avidan., S. Inverting RANSAC: Global model detection via inlier rate estimation. *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition* 5243–5251 (2015).
- Fitzgibbon, A., Pilu, M. & Fisher., B. Direct least squares fitting of ellipses. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* **21** (1999).
- Kuo, N. *et al.* Automatic segmentation of radiographic fiducial and seeds from X-ray images in prostate brachytherapy. *Medical Engineering & Physics* **34**, 64–77 (2012).
- Nectow, A., Kilmer, M. & Kaplan., D. Quantifying cellular alignment on anisotropic biomaterial platforms. *Journal of Biomedical Materials Research* **102**, 420–428 (2014).
- Prasada, D., Leungb, K. & Queka., C. Ellifit: An unconstrained, non-iterative, least squares based geometric ellipse fitting method. *Pattern Recognition* **46**, 1449–1465 (2013).
- Fitzgibbon, A., Pilu, M. & Fisher., B. Direct least squares fitting of ellipses. In *International Conference on Pattern Recognition* (1996).
- Halir, R. & Flusser., J. Numerically stable direct least-squares fitting of ellipses. In *Sixth International Conference of Computer Graphics and Visualization* (1998).
- Sinko, J., Szabó, G. & Erdélyi., M. Ray tracing analysis of inclined illumination techniques. *Optics Express* **22**, 18940–18948 (2014).
- Arteta, C., Lempitsky, V., Noble, J. & Zisserman., A. Detecting overlapping instances in microscopy images using extremal region trees. *Medical Image Analysis* **27**, 3–16 (2015).
- Prewitt, J. & Mendelsohn., M. The analysis of cell images. *Annals of the New York Academy of Sciences* **128**, 1035–1053 (1965).
- Kapur, N., Sahoo, P. & CWong., A. A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Computer vision, graphics, and image processing*. **29**, 273–285 (1985).
- Otsu., N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*. **9**, 62–66 (1979).
- Yen, J., Chang, F. & Chang., S. A new criterion for automatic multilevel thresholding. *IEEE Transactions on Image Processing* **4**, 370–378 (1995).
- Kruskal, H. & Wallis., W. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* **47**, 583–621 (1952).
- Puvion-Dutilleul, F. & Pichard., E. Segregation of viral double-stranded and single-stranded DNA molecules in nuclei of adenovirus infected cells as revealed by electron microscope *in situ* hybridization. *Biology of the Cell* **46**, 139–150 (1992).
- Puvion-Dutilleul, F., Roussev, R. & Puvion., E. Distribution of viral RNA molecules during the adenovirus type 5 infectious cycle in HeLa cells. *Journal of Structural Biology* **108**, 209–220 (1992).
- Besse, S. & Puvion-Dutilleul., F. Anchorage of adenoviral RNAs to clusters of interchromatin granules. *Gene Expression* **5**, 79–92 (1995).
- Pombo, A., Ferreira, J., Bridge, E. & Carmo-Fonseca., M. Adenovirus replication and transcription sites are spatially separated in the nucleus of infected cells. *The EMBO Journal* **13**, 5075–5085 (1994).
- Puvion-Dutilleul, F., Bachellerie, J., Visa, N. & Puvion., E. Rearrangements of intranuclear structures involved in RNA processing in response to adenovirus infection. *Journal of cell science* **107**, 1457–1468 (1994).
- Rebello, L. *et al.* The dynamics of coiled bodies in the nucleus of adenovirus-infected cells. *Molecular Biology of the Cell* **7**, 1137–1151 (1996).
- Aspegren, A. & Bridge., E. Release of snRNP and RNA from transcription sites in Adenovirus-Infected cells. *Experimental Cell Research* **276**, 273–283 (2002).

31. Lawrence, F., McStay, B. & Matthews., D. Nucleolar protein upstream binding factor is sequestered into adenovirus DNA replication centres during infection without affecting RNA polymerase I location or ablating rRNA synthesis. *Journal of Cell Science* **119**, 2621–2631 (2006).
32. Hindley, C., Andrew, D. & Matthews., D. Relationship between adenovirus DNA replication proteins and nucleolar proteins B23.1 and B23.2. *Journal of General Virology* **88**, 3244–3248 (2007).
33. Lam, Y., Evans, V., Heesom, K., Lamond, A. & Matthews., D. Proteomics analysis of the nucleolus in adenovirus-infected. *Cells. Molecular & Cellular Proteomics* **9**, 117–130 (2010).
34. Puvion-Dutilleul, F. & Puvion., E. Replicating single-stranded adenovirus type 5 DNA molecules accumulate within well-delimited intranuclear areas of lytically infected HeLa cells. *European Journal of Cell Biology* **52**, 379–388 (1990).
35. Lam, Y., Trinkle-Mulcahy, L. & Lamond., A. The nucleolus. *Journal of Cell Science* **118**, 1335–1337 (2005).
36. Babiss, L., Ginsberg, H. & Darnell., J. Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Molecular and Cellular Biology* **5**, 2552–2558 (1985).
37. 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. *Molecular and Cellular Biology* **6**, 470–476 (1986).
38. Leppard., K. Selective effects on adenovirus late gene expression of deleting the e1b 55k protein. *Journal of General Virology* (1993).
39. Gonzalez, R., Huang, W., Finnen, R., Bragg, C. & Flint., S. 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. *Journal of virology* **80**, 964–974 (2006).
40. Woo, L. & Berk., J. Adenovirus ubiquitin-protein ligase stimulates viral late mRNA nuclear export. *Journal of Virology* **81**, 575–587 (2007).
41. Querido, E. *et al.* Degradation of p53 by adenovirus e4orf6 and e1b55k proteins occurs via a novel mechanism involving a cullin-containing complex. *Genes & Development* **15**, 3104–3117 (2001).
42. Leppard, K. & Shenk., T. The adenovirus E1B 55 kd protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *EMBO Journal* **8**, 2329–2336 (1989).
43. Bridge, E. & Ketner., G. Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression. *Virology* **174**, 345–353 (1990).
44. Gonzalez, R. & Flint., S. Effects of mutations in the adenoviral E1B 55-kilodalton protein coding sequence on viral late mRNA metabolism. *Journal of Virology* **76**, 4507–4519 (2002).
45. Cardoso, F., Kato, S., Huang, W., Flint, S. & Gonzalez., R. 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. *Journal of Virology* **378**, 339–346 (2008).
46. Chahal, J. & Flint., S. Timely synthesis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton protein is required for efficient genome replication in normal human cells. *Journal of Virology* **86**, 3064–3072 (2012).
47. Chahal, J., Qi, J. & Flint., S. The human adenovirus type 5 E1B 55 kDa protein obstructs inhibition of viral replication by type I interferon in normal human cells. *PLOS Pathogens* **8** (2012).
48. Chahal, J., Gallagher, C., DeHart, C. & Flint., S. The repression domain of the E1B 55-kilodalton protein participates in countering interferon-induced inhibition of adenovirus replication. *Journal of Virology* **87** (2013).
49. Groitl, P. & Dobner., T. Construction of adenovirus type 5 early region 1 and 4 virus mutants. *Methods in molecular medicine* **130**, 29–39 (2007).
50. Jones, N. & Shenk., T. Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells. *Cell* **17**, 683–689 (1979).
51. Dougherty, B. Diffraction PSF 3D (2005). <http://www.optinav.com/Diffraction-PSF-3D.htm>.
52. Pang-Ning, T., Steinbach, M. & Kumar, V. *Introduction to Data Mining* (2005).
53. https://en.wikipedia.org/wiki/Precision_and_recall (2016).
54. K. Murti, a., Davis, D. & Kitchingman, G. Localization of adenovirus-encoded dna replication proteins in the nucleus by immunogold electron microscopy. *Journal of General Virology* **71**, 2847–2857 (1990).

Acknowledgements

This work was supported by grants from CONACyT-SEP (168497) and PRODEP-SEP for R.A.G. Y.G., P. H. and R.E.L. received scholarships from CONACyT (574382, 447442 and 575241, respectively).

Author Contributions

Y.G., J.M.R.-M., R.A.G. and A.G. conceived the project, participated in the design and drafting of the manuscript. P.H., R.E.L. and A.G. performed the experiments. Y.G. developed the algorithms for the quantitative, automated analysis of the viral replication compartments. J.M.R.-M. and A.G. supervised the elaboration of the algorithms. Y.G. and A.G. created the synthetic data. C.D.W. contributed to writing the paper. All authors approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Garcés, Y. *et al.* Automatic detection and measurement of viral replication compartments by ellipse adjustment. *Sci. Rep.* **6**, 36505; doi: 10.1038/srep36505 (2016).

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



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

RESEARCH ARTICLE

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

Berto Tejera¹, 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, Ramón A. Gonzalez^{1*}

1 Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México, **2** Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México, **3** 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, Cuernavaca, México, **4** Institute of Virology, Technische Universität München/Helmholtz Zentrum München, Munich, Germany, **5** Heinrich Pette Institute, Leibniz Institute for Experimental Virology, Hamburg, Germany

☯ These authors contributed equally to this work.

* rgonzalez@uaem.mx



OPEN ACCESS

Citation: Tejera B, López RE, Hidalgo P, Cárdenas R, Ballesteros G, Rivillas L, et al. (2019) The human adenovirus type 5 E1B 55kDa protein interacts with RNA promoting timely DNA replication and viral late mRNA metabolism. PLoS ONE 14(4): e0214882. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214882>

Editor: Michael Nevels, University of St Andrews, UNITED KINGDOM

Received: December 26, 2018

Accepted: March 21, 2019

Published: April 3, 2019

Copyright: © 2019 Tejera et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: BT received support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Scholarship 266820, México. <https://www.conacyt.gob.mx>; PH received support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Scholarship 447442, México. <https://www.conacyt.gob.mx>; RAG was supported by grants from

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

CONACyT CB-2011-01-168497 and Programa para el Desarrollo Profesional Docente-Secretaría de Educación Pública (PRODEP-SEP). <http://www.dgesu.ses.sep.gob.mx/prodep.htm>; TD and the Heinrich Pette Institute is supported by the Freie und Hansestadt Hamburg and the Bundesministerium für Gesundheit (BMG). <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/>; R.A.G. and T.D. received support from the Research Group Linkage Program of the Alexander von Humboldt Foundation. <https://www.humboldt-foundation.de/web/home.html>; NO - The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

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 $\alpha 3$ 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 post-translationally 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 Δ284–289 carry nucleotide substitutions (or a deletion in the case of Δ284–289) 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 7,353 (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 [55,56]. 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 MgCl_2 , and 10% D_2O , 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 GUSI [57–59].

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 (IFN β 1) (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: TGTTCATTCCTTGCCAGCC, 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 [60] 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 [61] 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 [61] and in the server web page). The resulting models were submitted to the PDB2PQR/APBS servers [62,63] to calculate their electrostatic potentials at pH 7 with CHARMM36 [64] charges and atomic radii. Both models were also submitted to HDock [65] 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 [66].

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, Δ284–289, and W289F were immunoprecipitated with the anti-E1B 55K MAb-2A6, and the pulled-down RNA were amplified by RT qPCR (Fig 1).

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 [67, 68, 69]. 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 Δ284–289 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

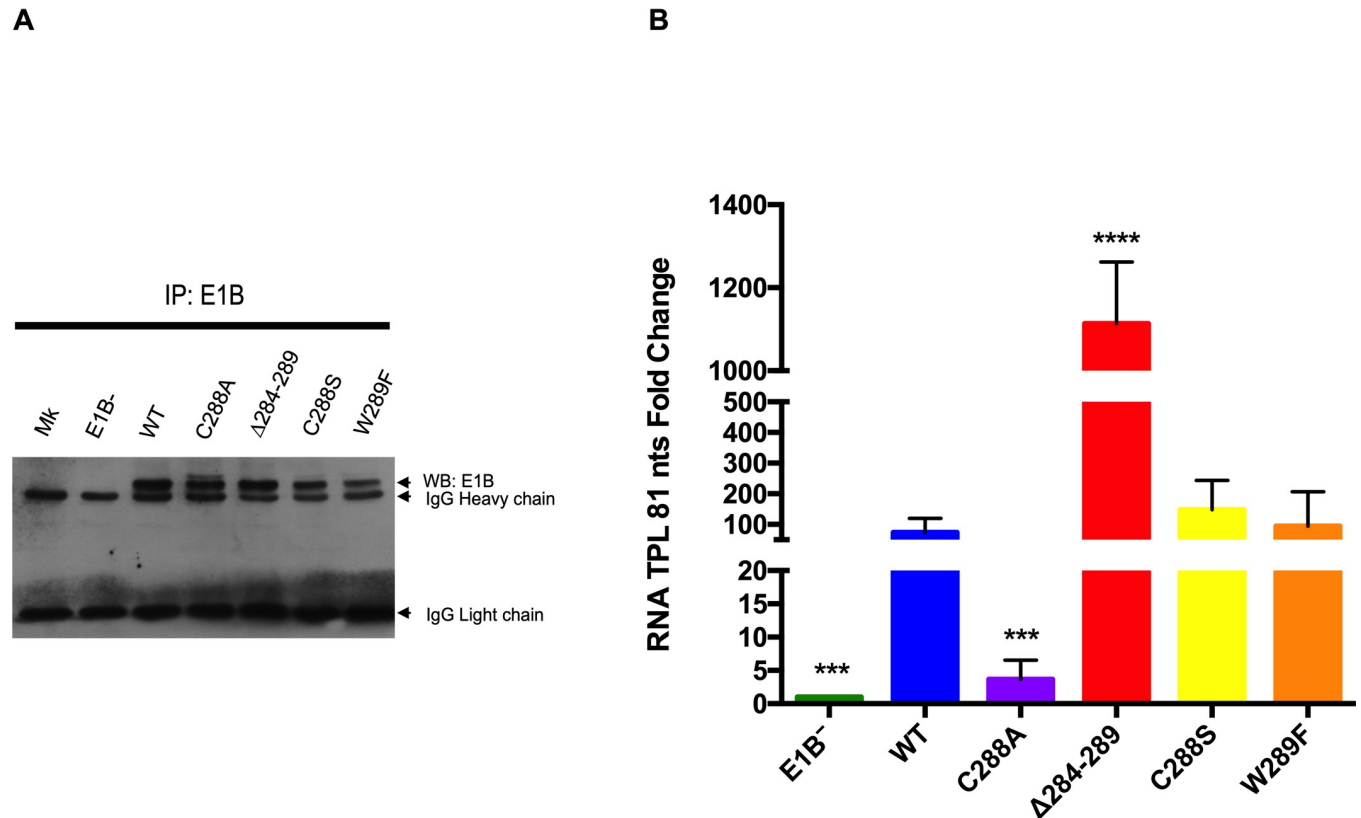


Fig 1. E1B 55K interacts with RNA in Ad5 WT-infected cells and RNP substitutions affect RNA binding. HFF cells infected with the indicated viruses were harvested at 36hpi. E1B 55K was immunoprecipitated with the 2A6 MAb, RNA was isolated and RT qPCR were performed to detect a sequence corresponding to 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. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214882.g001>

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 [68,69]. 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).

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.

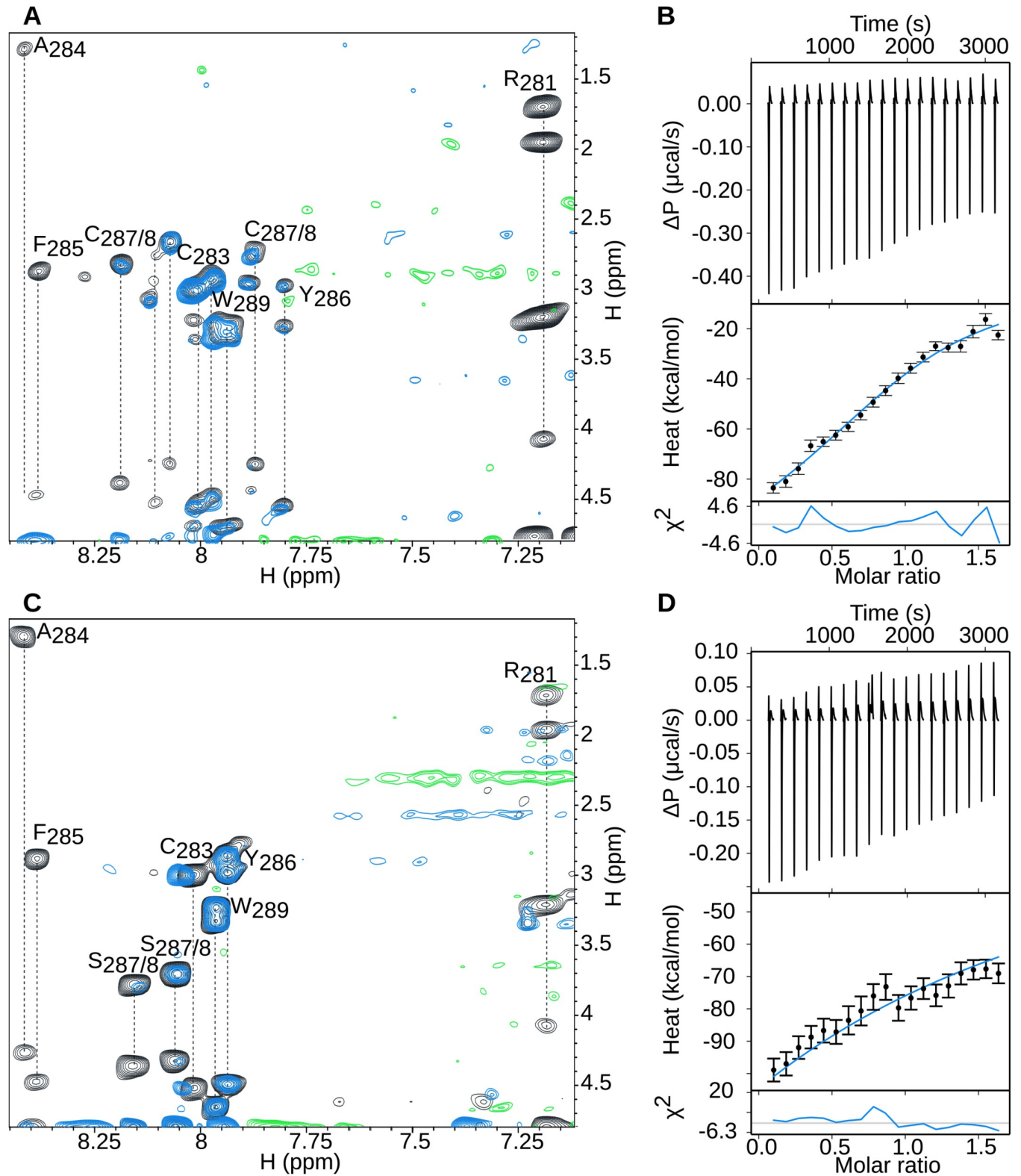


Fig 2. E1B 55K-RNP peptides interact with TPL RNA 196nts *in vitro*. (A) Expanded region of an overlay of TOCSY spectra of free WT peptide (black) and WT peptide bound to the TPL RNA 196nts probe (blue). (B) Heat exchanged from each injection of WT peptide into a solution containing the TPL RNA 196nts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

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214882.g002>

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 (Fig 2A and 2C). Furthermore, the ITC titration confirmed RNA binding for both peptides (Fig 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).

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).

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,

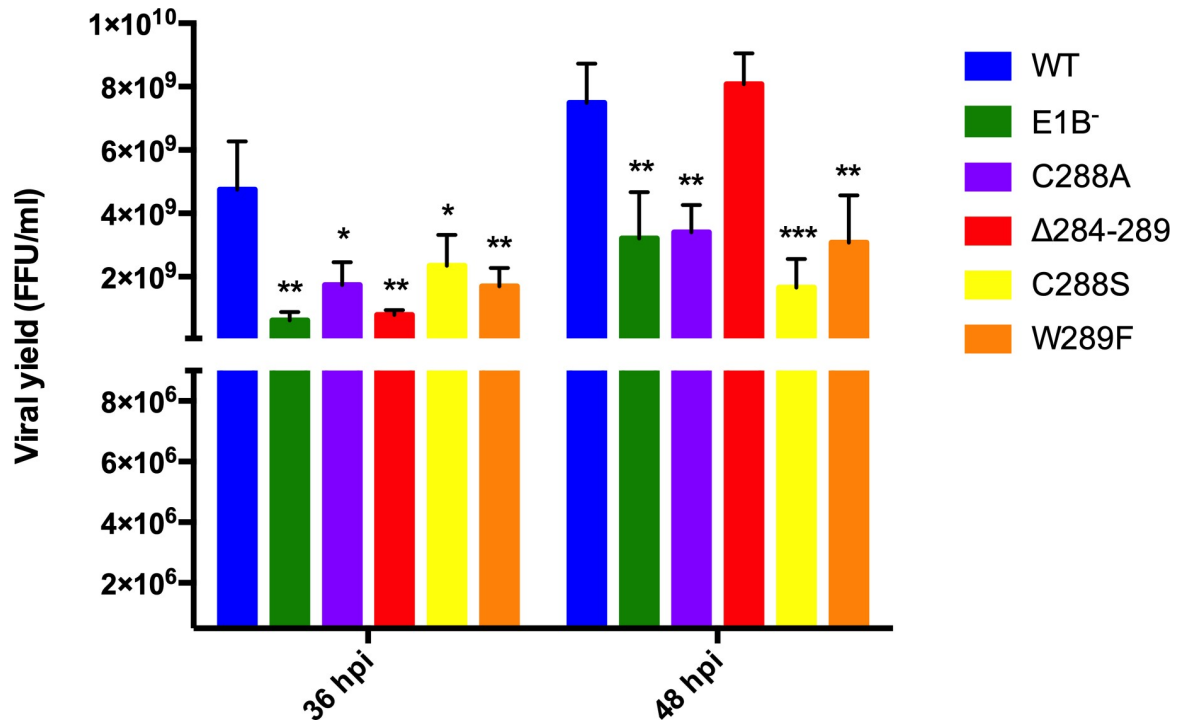


Fig 3. Effect of substitutions in the E1B 55K RNP motif on viral progeny production. HFF cells were infected at a MOI 30 FFU/cell and harvested at 36 and 48 hpi. Viral titers were determined in 293 cells by fluorescent foci using a mouse monoclonal anti-E2 72K (DBP) antibody. The standard deviations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

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214882.g003>

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).

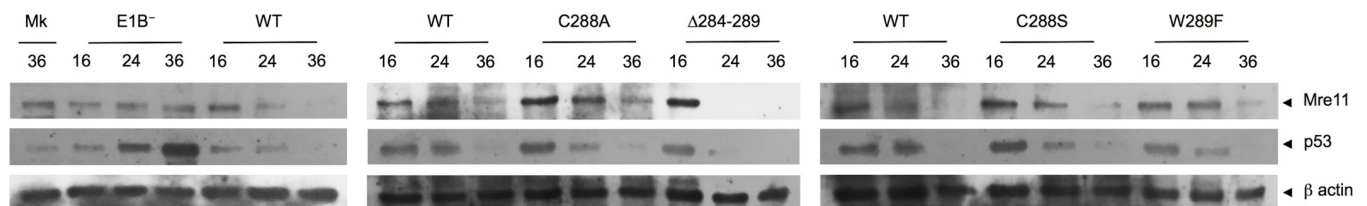


Fig 4. E1B 55k RNP substitutions do not impair degradation of Mre11 and p53. HFF cells were infected and harvested at 16, 24 and 36 hpi. Total protein extracts were obtained and Western blot assays were performed employing anti-Mre11 (Novus Biologicals) and anti-p53 DO1 (Santa Cruz Biotechnology) antibodies.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

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214882.g004>

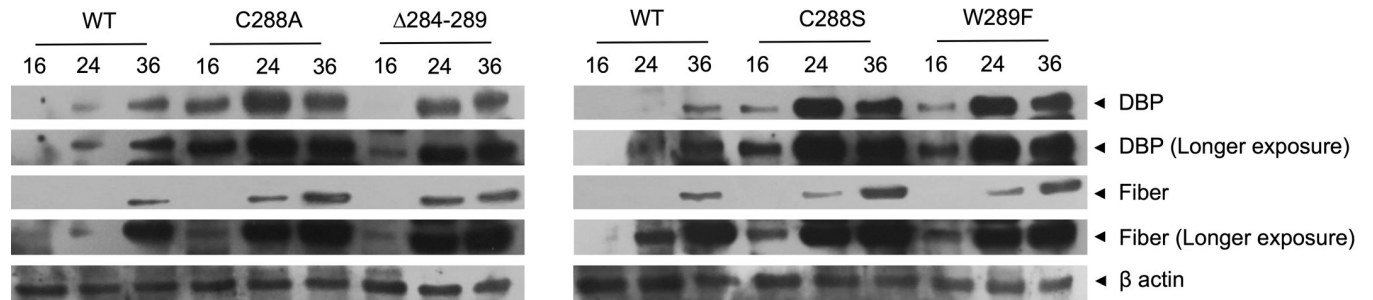


Fig 5. Effect of substitutions in the E1B 55K RNP on kinetics of accumulation of viral proteins, DBP and fiber. HFF cells infected with Ad5 WT or E1B 55K mutants were harvested at 16, 24 and 36 hpi. Total protein extracts were obtained and western blot assays were performed using the anti-DBP (B6) and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

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214882.g005>

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 [5,36,39,70]. 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).

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

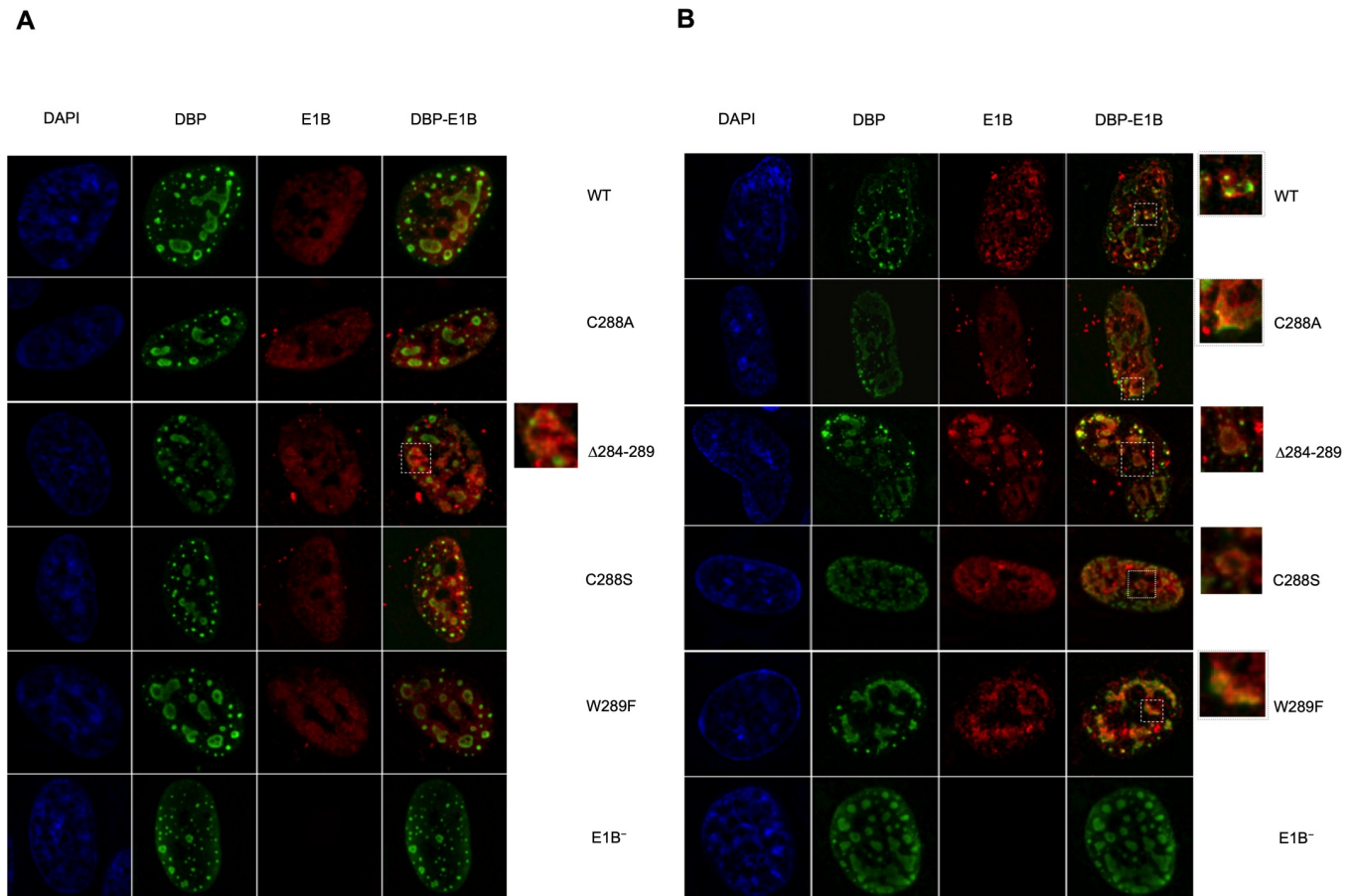


Fig 6. Localization of DBP and E1B 55K to viral RC in Ad5 WT- or RNP mutants-infected HFF cells. HFF cells infected with Ad5 WT or E1B 55K mutant viruses were fixed and processed for immunofluorescence as described in materials and methods. Blue (DAPI), green (DBP), red (E1B 55K). (A) 24hpi, (B) 36hpi.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

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214882.g006>

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).

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

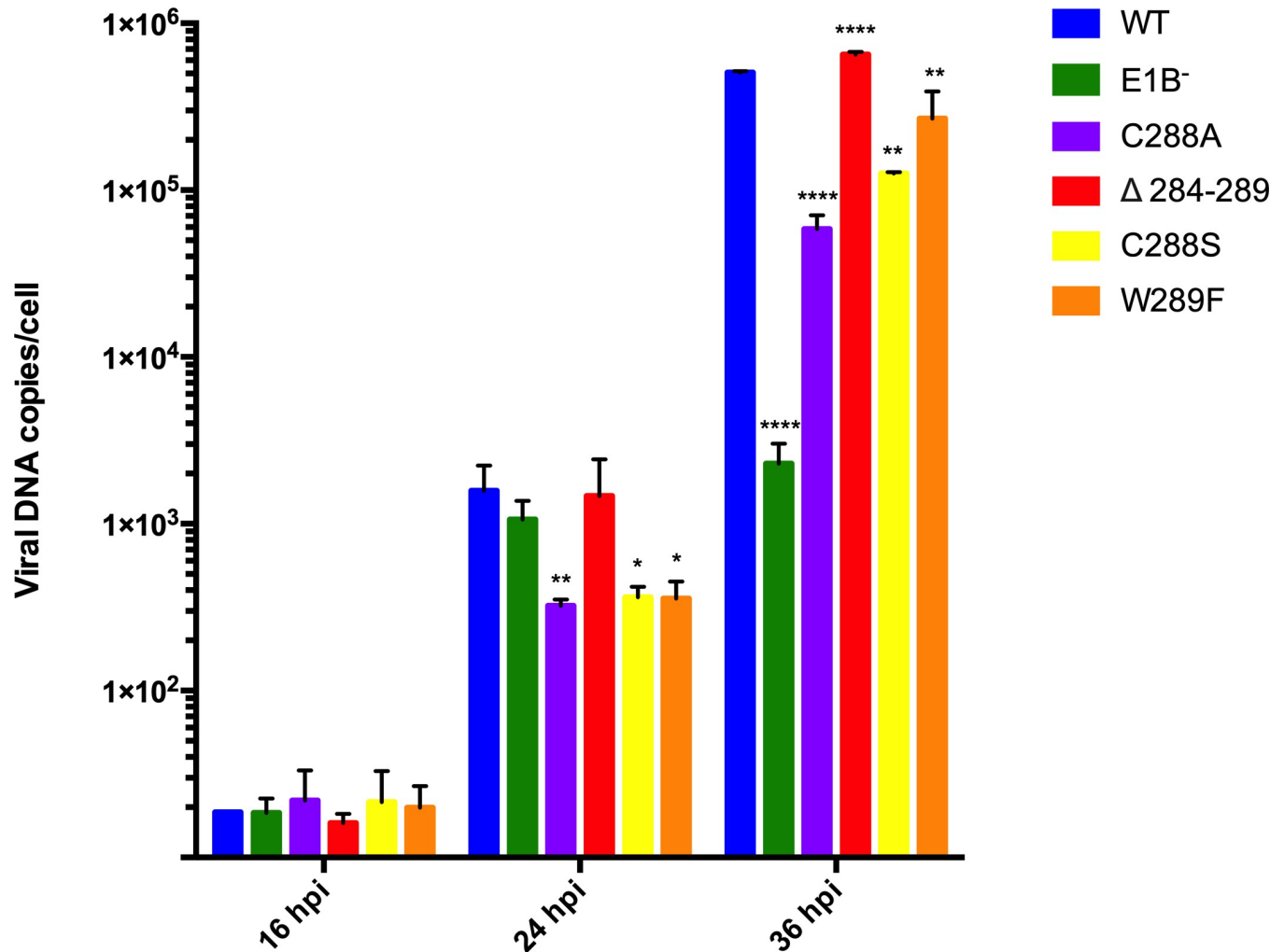


Fig 7. Kinetics of viral DNA accumulation are altered by mutations of the E1B 55K RNP motif. HFF cells infected with Ad5 WT or E1B 55K mutants were harvested at 16, 24 and 36 hpi and total DNA was isolated. Viral DNA was amplified through a quantitative PCR and a viral DNA absolute quantification was 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.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214882.g007>

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).

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 (Fig 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 Δ284–289, an effect that was opposite to what was expected, given

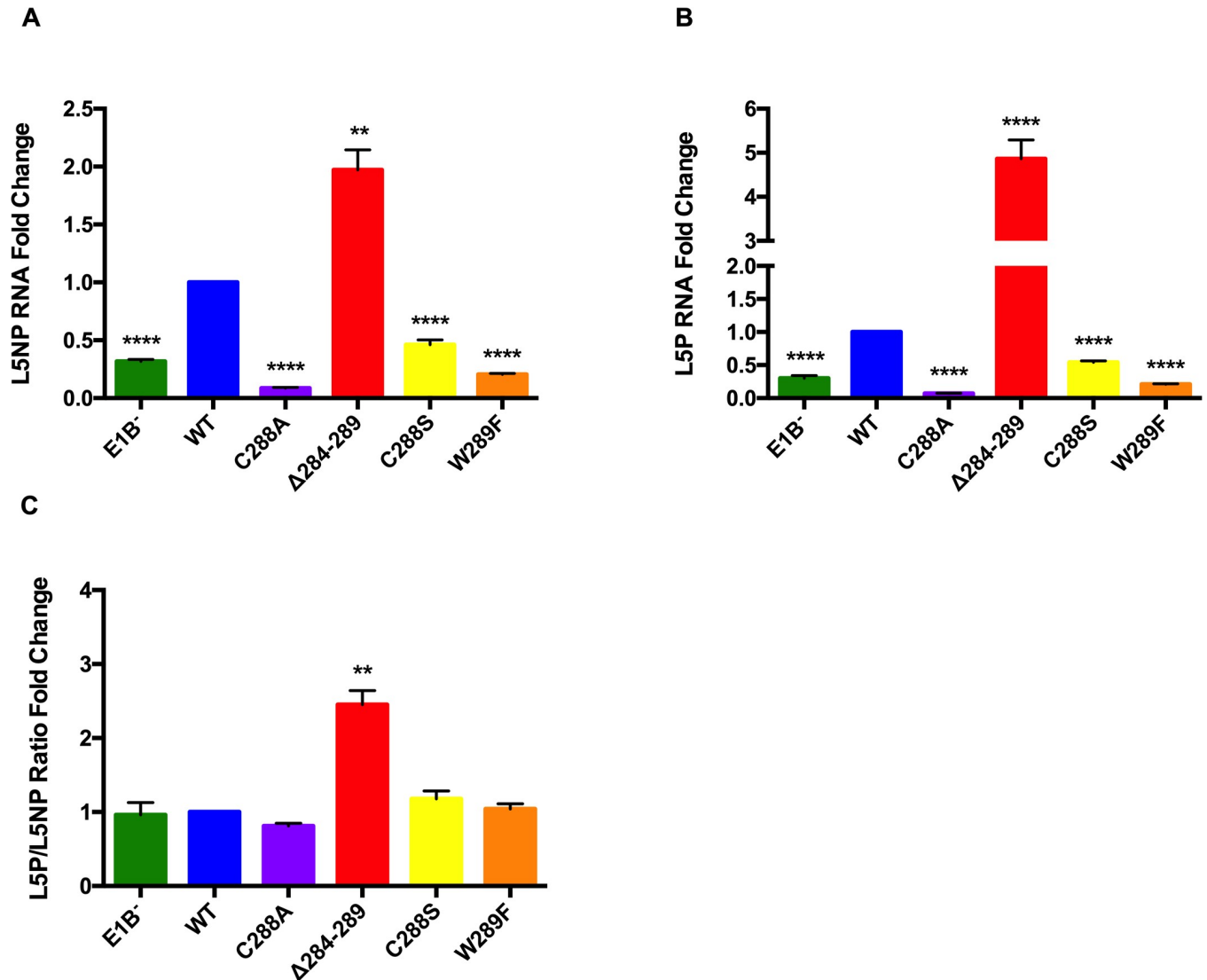


Fig 8. Substitutions in E1B 55K RNP affect viral late mRNA biogenesis. HFF cells infected with Ad5 WT or E1B 55K mutants were harvested at 36 hpi and total RNA was isolated. Viral late pre-mRNA levels were determined for L5 RNA by RT qPCR against an (A) intron-exon (L5NP) or (B) Exon-exon (L5P) junction, 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. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214882.g008>

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

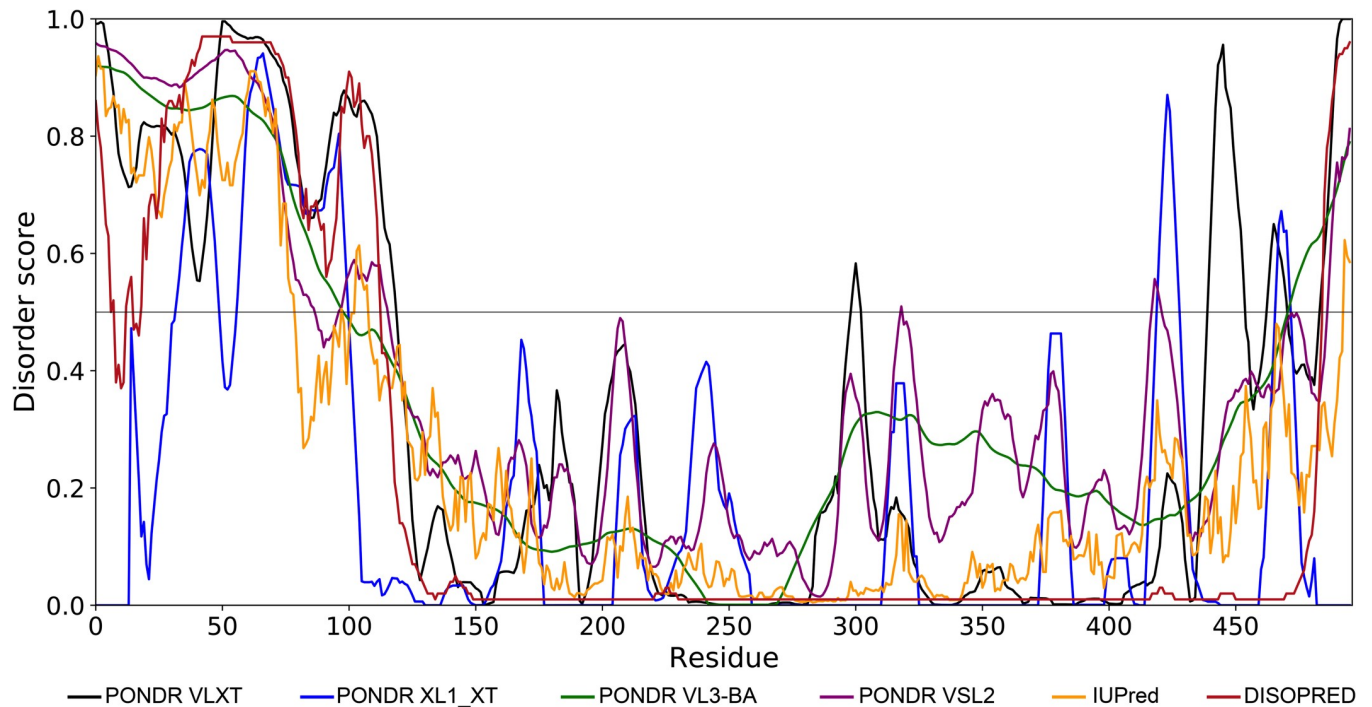


Fig 9. Intrinsic disorder in E1B 55K. PONDR VLXT, PONDR XL1_XT, PONDR VL3-BA, PONDR VSL2, IUPred and DISOPRED predictors were used for disorder analysis. All predictors indicate a high level of intrinsic disorder in the N- and C-terminus.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214882.g009>

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).

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 [60]. 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 $\Delta 284\text{--}289$ 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.

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 [60] (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.

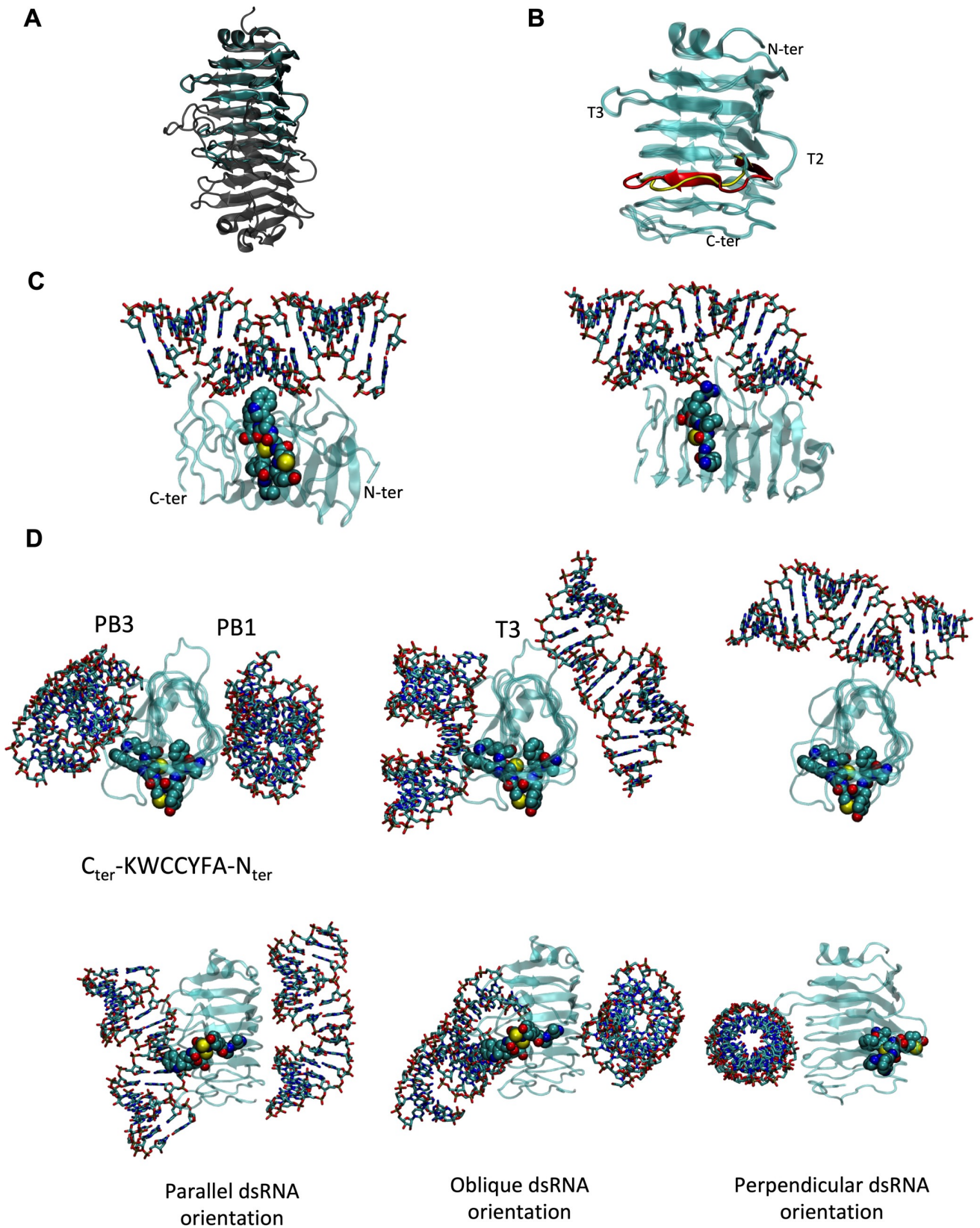


Fig 10. E1B 55K-RNA interaction model. (A) Superposition of the model for the wild-type central domain that contains the putative dsRNA binding motif (solid cyan ribbons) and the parent LH3 structure (transparent gray ribbons). (B) Superposition of the models for the wild-type (cyan and red ribbons) 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).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214882.g010>

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 [60]). 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 cystein ladder in

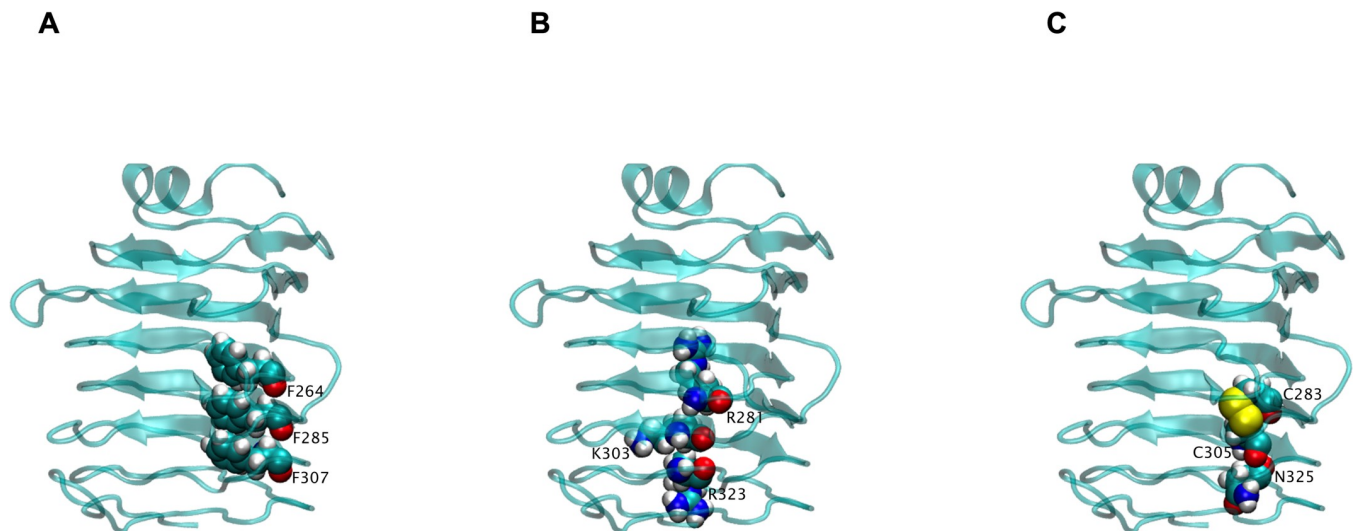


Fig 11. Representation of amino acids with highest probability of coevolution on the E1B 55K model. Three-dimensional model of the E1B 55K central region with VDW representation of amino acid with highest probability of coevolution. A) F264-F285-F307. B) R281-K303-R323. C) C283-C305-N325.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214882.g011>

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 [31,71], a site where the protein is likely to exert its role on viral DNA replication and viral gene expression [70], 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 (Figs 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 [72]. 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 [73]. Moreover, the intriguing finding that the E4 Orf6 protein is associated to the virus surface and may function as a portal for genome packaging [74] 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 [75]. 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.

Supporting information

S1 Table. Amino acids with highest scores of coevolution.

(TIF)

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.

(TIF)

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.

(TIF)

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).

(TIF)

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.

(TIF)

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.

(TIF)

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).

(TIF)

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).

(TIF)

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).

(TIF)

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.

(TIF)

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.

Author Contributions

Conceptualization: Lina Rivillas, Carlos Amero, Nina Pastor, Thomas Dobner, Ramón A. Gonzalez.

Data curation: Berto Tejera, Raúl E. López, Paloma Hidalgo, Reinier Cárdenas, Grisel Balles-teros, Leidys French, Carlos Amero, Nina Pastor, Ángel Santiago.

Formal analysis: Berto Tejera, Raúl E. López, Paloma Hidalgo, Reinier Cárdenas, Grisel Bal-lesteros, Lina Rivillas, Leidys French, Carlos Amero, Nina Pastor, Ángel Santiago, Ramón A. Gonzalez.

Funding acquisition: Thomas Dobner, Ramón A. Gonzalez.

Investigation: Berto Tejera, Paloma Hidalgo, Lina Rivillas, Leidys French, Carlos Amero, Nina Pastor, Peter Groitl, Thomas Dobner, Ramón A. Gonzalez.

Methodology: Berto Tejera, Raúl E. López, Paloma Hidalgo, Reinier Cárdenas, Grisel Balles-teros, Leidys French, Nina Pastor, Ángel Santiago, Peter Groitl, Ramón A. Gonzalez.

Project administration: Ramón A. Gonzalez.

Supervision: Peter Groitl, Thomas Dobner, Ramón A. Gonzalez.

Validation: Ramón A. Gonzalez.

Visualization: Ramón A. Gonzalez.

Writing – original draft: Berto Tejera, Raúl E. López.

Writing – review & editing: Paloma Hidalgo, Reinier Cárdenas, Lina Rivillas, Leidys French, Carlos Amero, Nina Pastor, Ángel Santiago, Peter Groitl, Thomas Dobner, Ramón A. Gonzalez.

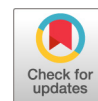
References

1. Berk AJ. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene*. 2005; 24: 7673–7685. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209040> PMID: 16299528
2. Dobner T, Kzhyshkowska J. Nuclear export of adenovirus RNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2001; 259: 25–54. PMID: 11417126
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. PMID: 12747554
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. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.01.013> PMID: 28135605
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. PMID: 2529118
6. Harada JN, Berk AJ. p53-independent and dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J. Virol.* 1999; 73: 5333–5344. PMID: 10364280
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.02269-08> PMID: 19211769
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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002853> PMID: 22912576
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.03387-12> PMID: 23388716
10. Martin ME, Berk AJ. Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. *J. Virol.* 1998; 72: 3146–3154. PMID: 9525640
11. Yew PR, Liu X, Berk AJ. Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev.* 1994; 8(2): 190–202. PMID: 8299938
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. <https://doi.org/10.1101/gad.926401> PMID: 11731475
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. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg630> PMID: 14657032
14. Stracker TH, Carson CT, Weitzman MD. Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad 50- NBS1 DNA repair complex. *Nature*. 2002; 418: 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature00863> PMID: 12124628
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.02134-10> PMID: 21123383
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.00029-07> PMID: 17459921
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.00469-14> PMID: 24623443

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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt064> PMID: 23396441
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.18.9194-9206.2002> PMID: 12186903
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. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.534> PMID: 23178490
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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003775> PMID: 24278021
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.02034-17> PMID: 29593045
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.00089-09> PMID: 19297475
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.00074-10> PMID: 20484509
25. Dobbelsstein 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. PMID: 9250671
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. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203395> PMID: 10702793
27. Teodoro JG, Halliday T, Whalen SG, Takayasu 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. PMID: 8289381
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. PMID: 9094635
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. <https://doi.org/10.1073/pnas.191361798> PMID: 11553772
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.00925-08> PMID: 18614635
31. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702158104> PMID: 17428914
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.01442-10> PMID: 20861261
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. PMID: 226719
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. PMID: 9733834
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. PMID: 10668806
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.2.964-974.2006> PMID: 16378998

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. <https://doi.org/10.1128/JVI.02368-10> PMID: 21561915
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.02108-10> PMID: 21123381
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. PMID: 1824641
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. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.07.012> PMID: 21851959
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.9.4507-4519.2002> PMID: 11932416
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. PMID: 9765492
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. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.04.014> PMID: 21605885
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. PMID: 8832876
45. Lu W, Zheng S, Li XF, Huang JJ, Zheng X, Li Z. *World J Gastroenterol*. 2004; 10(24): 3634–3638. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i24.3634> PMID: 15534920
46. Yu Wang, 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. PMID: 17346105
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. PMID: 9811680
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. PMID: 9971789
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. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.11.012> PMID: 15607965
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. PMID: 17401162
51. Williams JF. Oncogenic transformation of hamster embryo cells in vitro by adenovirus type 5. *Nature*. 1973; 243: 162–163. PMID: 4706286
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 PMID: 6310869
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. PMID: 6699935
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. <https://doi.org/10.1128/JVI.00033-16> PMID: 26764008
55. 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.
56. 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.
57. 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. <https://doi.org/10.1021/ac3007522> PMID: 22530732
58. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.11.012> PMID: 25477226
59. Brautigam CA. Calculations and publication-quality illustrations for analytical ultracentrifugation data. *Methods Enzymol*. 2015; 562: 109–133. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.05.001> PMID: 26412649

60. 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. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.08.007> PMID: 28943338
61. 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. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213> PMID: 25549265
62. 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
63. 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. <https://doi.org/10.1002/pro.3280> PMID: 28836357
64. Best RB, Zhu X, Shim J, Lopes PE, Mittal J, Feig M, 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. <https://doi.org/10.1021/ct300400x> PMID: 23341755
65. 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx407> PMID: 28521030
66. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 1996; 14(1): 33–38, 27–28. PMID: 8744570
67. 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. PMID: 269380
68. 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. PMID: 3839074
69. 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. PMID: 6587381
70. Schmid M, Speiseder T, Dobner T, Gonzalez RA. DNA Virus Replication Compartments. *J Virol*. 2014; 88(3): 1404–1420. <https://doi.org/10.1128/JVI.02046-13> PMID: 24257611
71. 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. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.187> PMID: 22614022
72. Komatsu T, Quentin-Froignant C, Carlon-Andres I, Lagadec F, Rayne F, Ragues J, et al. In vivo labeling of adenovirus DNA identifies chromatin anchoring and biphasic genome replication. *J Virol*. 2018 Aug 29; 92(18). pii: e00795–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00795-18> PMID: 29997215
73. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006320> PMID: 28448571
74. Ahí YS, Hassan AO, Vemula SV, Li K, Jiang W, Zhang GJ, et al. Adenoviral E4 34K protein interacts with virus packaging components and may serve as the putative portal. *Scientific Reports* 2017; 7: 7582. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07997-w> PMID: 28790440
75. Burck C, Mund A, Berscheminski J, Kieweg L, Muncieberg S, Dobner T, et al. KAP1 is a Host Restriction Factor That Promotes Human Adenovirus E1B-55K SUMO Modification. *J Virol*. 2016; 90: 930–946. <https://doi.org/10.1128/JVI.01836-15> PMID: 26537675



E1B-55K Is a Phosphorylation-Dependent Transcriptional and Posttranscriptional Regulator of Viral Gene Expression in Human Adenovirus C5 Infection

Paloma Hidalgo,^a Yasel Garcés,^b Eduardo Mundo,^c Raúl E. López,^{b,c} Luca D. Bertzbach,^a Thomas Dobner,^a Ramón A. González^c

^aDepartment of Viral Transformation, Leibniz Institute for Experimental Virology (HPI), Hamburg, Germany

^bInstituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México

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

ABSTRACT The multifunctional adenoviral E1B-55K phosphoprotein is a major regulator of viral replication and plays key roles in virus-mediated cell transformation. While much is known about its function in oncogenic cell transformation, the underlying features and exact mechanisms that implicate E1B-55K in the regulation of viral gene expression are less well understood. Therefore, this work aimed to unravel basic intranuclear principles of E1B-55K-regulated viral mRNA biogenesis using wild-type human adenovirus C5 (HAdV-C5) E1B-55K, a virus mutant with abrogated E1B-55K expression, and a mutant that expresses a phosphomimetic E1B-55K. By subnuclear fractionation, mRNA, DNA, and protein analyses as well as luciferase reporter assays, we show that (i) E1B-55K promotes the efficient release of viral late mRNAs from their site of synthesis in viral replication compartments (RCs) to the surrounding nucleoplasm, (ii) E1B-55K modulates the rate of viral gene transcription and splicing in RCs, (iii) E1B-55K participates in the temporal regulation of viral gene expression, (iv) E1B-55K can enhance or repress the expression of viral early and late promoters, and (v) the phosphorylation of E1B-55K regulates the temporal effect of the protein on each of these activities. Together, these data demonstrate that E1B-55K is a phosphorylation-dependent transcriptional and posttranscriptional regulator of viral genes during HAdV-C5 infection.

IMPORTANCE Human adenoviruses are useful models to study basic aspects of gene expression and splicing. Moreover, they are one of the most commonly used viral vectors for clinical applications. However, key aspects of the activities of essential viral proteins that are commonly modified in adenoviral vectors have not been fully described. A prominent example is the multifunctional adenoviral oncoprotein E1B-55K that is known to promote efficient viral genome replication and expression while simultaneously repressing host gene expression and antiviral host responses. Our study combined different quantitative methods to study how E1B-55K promotes viral mRNA biogenesis. The data presented here propose a novel role for E1B-55K as a phosphorylation-dependent transcriptional and posttranscriptional regulator of viral genes.

KEYWORDS human adenovirus, E1B-55K, viral replication compartments, splicing, transcription, viral mRNA synthesis, phosphorylation, dual transcriptional regulator

Human adenoviruses (HAdVs) are ubiquitous infectious agents that cause respiratory diseases commonly associated with pneumonia and acute respiratory infections in children under 5 years of age (1). HAdVs constitute an excellent and valuable model to study

Editor Rozanne M. Sandri-Goldin, University of California, Irvine

Copyright © 2022 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Ramón A. González, rgonzalez@uaem.mx.

The authors declare no conflict of interest.

Received 2 December 2021

Accepted 5 January 2022

Accepted manuscript posted online

12 January 2022

Published 9 March 2022

the molecular mechanisms involved in infection-associated metabolism changes, cell transformation, and cancer (2, 3). Moreover, HAdVs are one of the most common biological systems used as vectors in vaccines and gene therapies and as oncolytic vectors in anticancer therapies (4, 5). However, despite advances in elucidating the functions of many of the virus proteins and the possibility of manipulating the viral genome to obtain recombinant viruses that target specific tissues, the processes altered by the virus that result in HAdV-induced pathogenesis, oncogenic cell transformation, or metabolic alterations have not been completely characterized to date and remain incompletely understood.

The HAdV DNA replication and gene expression programs progress through complex and temporally regulated steps that differ between the early and late phases of the replication cycle (6, 7). During the early phase, optimal intracellular conditions necessary for efficient replication and expression of the viral genome are established by (i) the viral E1A proteins, which induce the infected cell to enter the S phase of the cell cycle; (ii) the inhibition of the immune response, apoptosis, and other antiviral mechanisms by early viral proteins that may otherwise block viral replication; and (iii) the initiation of the expression of the viral E2 genes that encode the proteins responsible for viral DNA replication (E2A-single-stranded DNA binding protein (DBP), E2B-pre-terminal protein (pTP), and E2B-viral DNA polymerase (Pol)) (8–12). During the late phase, HAdV expresses viral proteins that further promote the selective and regulated transcription of the viral genome, such as the L4 gene products, or that constitute structural proteins needed for the assembly of viral progeny (13, 14). In addition to this temporal regulation of gene transcription, viral RNAs also undergo alternative splicing, regulation of mRNA turnover, and nucleocytoplasmic transport. Some of these steps are controlled at virus-induced biomolecular condensates, termed viral replication compartments (RCs) (7, 15–19).

The adenoviral E1B-55K oncoprotein (referred to as E1B here) remains an important focus of attention due to its key roles in the viral replication cycle and the process of oncogenic cell transformation and due to the fact that HAdVs with E1B deletions or mutations in the E1B gene are being developed as oncolytic vectors (2, 20, 21). E1B is a multifunctional protein that promotes efficient virus replication. This protein is posttranslationally modified through SUMOylation and phosphorylation, modifications that regulate its activities and intracellular localization (reviewed in reference 21). An HAdV-C5 mutant that expresses a phosphomimetic E1B (E1B-PM) protein with the three carboxy-terminal phosphorylation sites (serines 490 and 491 and threonine 495) replaced by aspartic acids demonstrated that E1B phosphorylation enhances its SUMOylation and localization to viral RCs without altering intracellular E1B steady-state levels (22). Previous reports using E1B knockout viruses showed that E1B promotes the association of host transcription factors with viral RCs, like Y-box binding protein 1 (YB-1) and p53, which in turn activate the expression of viral genes (23, 24). E1B also regulates chromatin-remodeling host cell factors like Daxx, ATRX, Spoc1, and KAP1, which results in efficient viral DNA replication and gene expression (25–28). Additionally, E1B contributes to the regulation of host antiviral defenses as it assembles a Cullin 5-based E3 ubiquitin ligase complex, together with the viral E4Orf6 protein, that polyubiquitylates and targets for proteasomal degradation cellular antiviral restriction factors (29–31). Moreover, E1B represses the expression of antiviral genes such as p53-dependent genes (32) or interferon-stimulated genes (ISGs) (33, 34), which leads to the efficient formation of viral RCs and synthesis of viral DNA (34).

A selective gene expression program is established during the transition from the early to the late phase of HAdV infection, where several of the cellular mRNAs are not exported to the cytoplasm and cellular protein synthesis is shut off (35), while viral late mRNAs efficiently accumulate in the cytoplasm and get translated (36–41). It has been proposed that the E1B/E4Orf6-E3 ubiquitin ligase complex targets for degradation cellular proteins necessary for cellular mRNA export but dispensable for viral late mRNAs (42, 43). E1B does not participate in the nucleocytoplasmic transit of viral late mRNAs (44, 45), and previous findings have pinpointed that E1B facilitates the intranuclear transport of viral mRNAs prior to their association with nuclear membranes and export to the cytoplasm (18). Furthermore, recent findings have shown that most of the

potential targets of the E3 ubiquitin ligase are not degraded, but rather, their ubiquitylation may restrict the ability of cellular proteins to block viral mRNA processing or other steps during intranuclear viral mRNA biogenesis (46). Therefore, this compelling evidence suggests that the effect of E1B on viral mRNA biogenesis is at upstream intranuclear events during viral gene expression.

In the present work, we set out to address this missing link and aimed to determine the intranuclear role of HAdV-C5 E1B in viral mRNA biogenesis. Using a set of HAdV-C5 mutants as well as E1B plasmids, we show that E1B regulates the transcription and splicing rates of viral genes and modulates the release of viral mRNAs from viral RCs. Moreover, we show that E1B enhances or represses the activity of various adenoviral promoters depending on the time postinfection and in a phosphorylation-dependent manner. Together, these results reveal a novel role for E1B as a phosphorylation-dependent transcriptional and posttranscriptional regulator of both viral early and late genes.

RESULTS

E1B promotes partitioning of viral late mRNAs between viral RCs and the nucleoplasm. To determine the intranuclear role of E1B in viral mRNA metabolism, we first examined the partitioning of viral late pre-mRNAs and spliced mRNAs between their site of synthesis in viral RCs and the surrounding nucleoplasm (Npl). We used biochemically defined subnuclear fractions enriched with viral RCs that we isolated from HAdV-C5-infected cells, as previously described (17). RC and Npl fractions were obtained at 24 and 36 h postinfection (hpi) from cells infected with either wild-type (WT) HAdV or a virus that contains four premature stop codons near the 5' end of the E1B-55K coding sequence, thus abrogating the synthesis of the protein (E1B⁻) (47). RNA was isolated from both the RC and Npl fractions, and viral late mRNAs were measured by quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) with primers targeting sequences from mature mRNAs (hybridizing to exon-exon junctions) or unspliced mRNAs (hybridizing to intron-exon junctions) corresponding to the major late tripartite leader (ML TPL) (a sequence present in all viral late mRNAs) and the L5 mRNA (Fig. 1A), as described previously (17).

Up to 150-fold-lower levels of ML pre-mRNA (Fig. 1B) were synthesized by E1B⁻ than by the WT at 24 hpi. These defects were more pronounced for the L5 pre-mRNA, where we observed up to 300-fold decreases of L5 pre-mRNA (Fig. 1C). For mature mRNA at 24 hpi, we measured up to 160-fold-lower levels of ML mRNA (Fig. 1D) and roughly 30-fold-lower levels of the mature L5 mRNA in the absence of E1B (Fig. 1E). Twelve hours later, at 36 hpi, the overall differences decreased, but the levels of both ML and L5 mRNAs were still significantly lower with E1B⁻ infection than with WT infection (Fig. 1B to E). It has been shown that viral late mRNAs are synthesized in HAdV RCs (17). To compare the partitioning of viral mRNAs between the RCs and the Npl as a measure of their release from the site of synthesis, we plotted the relative steady-state levels of ML and L5 pre-mRNAs and mature mRNAs as an Npl/RC ratio (Fig. 1F to I). Infections with E1B⁻ reduced the Npl/RC ratios to below 1, with a more notorious effect on L5 than on ML and at the latter time postinfection (36 hpi). These results indicate that E1B is required for the efficient release of viral late mRNAs from their site of synthesis in the viral RCs to the surrounding Npl.

The phosphorylation of E1B increases the rates of viral late mRNA synthesis and splicing in viral RCs. Viral RNA synthesis and splicing as well as viral DNA synthesis are activities associated with HAdV RCs (reviewed in reference 7). We have previously described the use of isolated viral RC particles in *in vitro* assays to measure transcription, splicing, and DNA replication rates in the context of HAdV-C5 infection, where RC particles contain the necessary enzymatic activity to drive the *de novo* synthesis or splicing of viral RNAs, which are then measured by qPCR (17). Therefore, we employed this methodology to study the impact of E1B on viral transcription and splicing rates (Fig. 2). As described above, E1B phosphorylation regulates the protein's activity and localization to RCs and significantly correlates with the efficient production of viral progeny (see Fig. S1

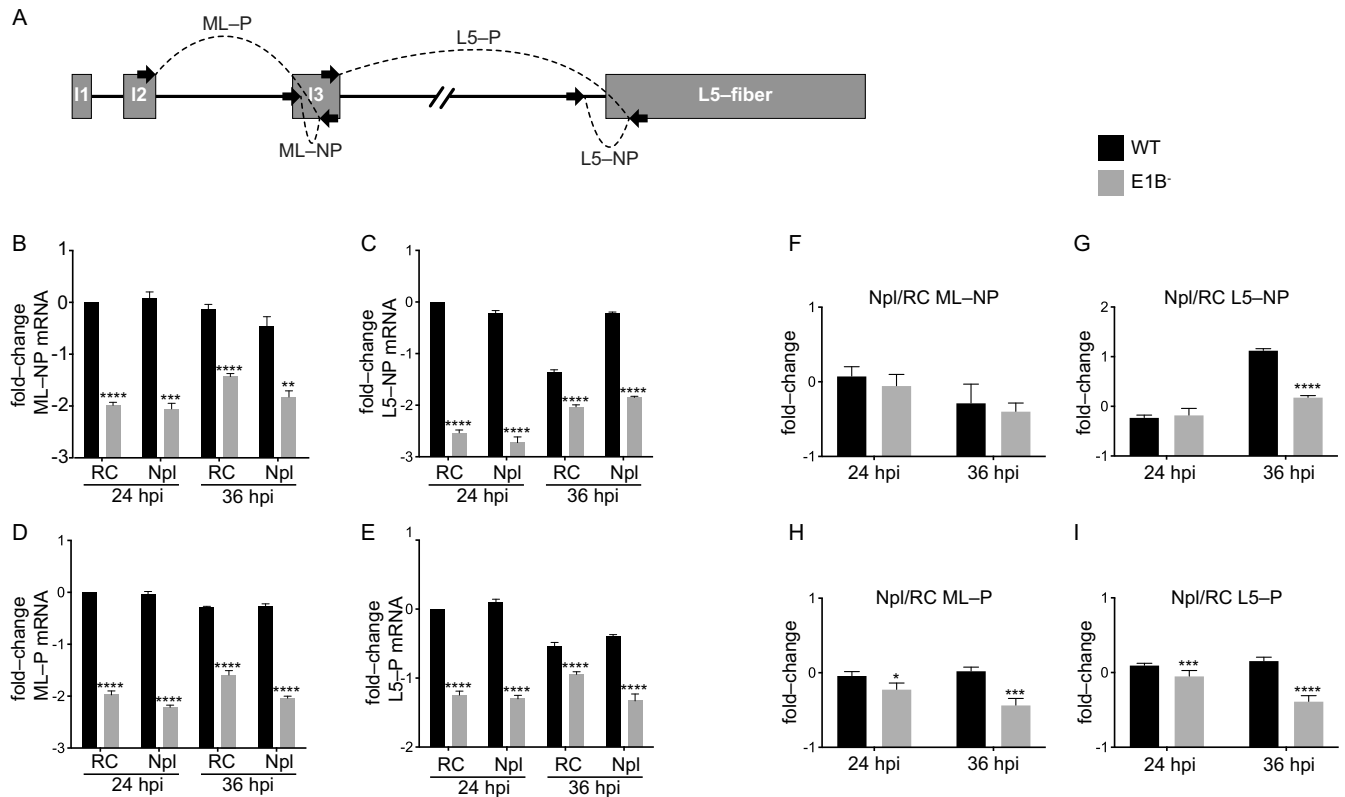


FIG 1 E1B is required for efficient accumulation and release of viral late mRNAs from their site of synthesis and processing in viral RCs to the surrounding nucleoplasm. (A) Schematic representation of the primer design to amplify mature/processed (ML-P and L5-P) and pre-mRNA/nonprocessed (ML-NP and L5-NP) mRNA species. The exons from the tripartite leader sequence, I1, I2, and I3, and from L5-fiber are shown. Exons are shown as gray boxes, introns are shown as black lines, and primers are shown as black arrows. (B to I) RC and Npl fractions were obtained from WT- or E1B⁻-infected HFF cells and harvested at 24 or 36 hpi. RNA was isolated from each fraction and quantified by RT-qPCR using the primers represented in panel A. (B to E) Graphs showing the log₁₀ fold changes for viral ML pre-mRNAs (B), ML mRNAs (D), L5 pre-mRNAs (C), and L5 mRNAs (E). (F to I) Npl/RC ratios of the indicated mRNAs. Data are shown as log₁₀ means ± standard deviations from two independent experiments, measured in technical triplicates. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ (by two-way ANOVA).

in the supplemental material). Hence, the E1B-PM mutant virus was also included in all further experiments.

To evaluate if E1B has an impact on viral late mRNA transcription, we performed *in vitro* transcription assays in isolated RCs (Fig. 2A and B). In WT infections, the rate of viral mRNA synthesis increased about 7-fold from 24 to 36 hpi (Fig. 2A, black bars). By comparing the levels of newly synthesized viral late mRNAs (+ATP +NTPs [nucleotide triphosphates]) to input levels (−ATP −NTPs), we determined 6-fold-higher levels at both 24 hpi and 36 hpi (Fig. 2B, black bars). In the absence of E1B, newly synthesized viral mRNAs yielded only 2 times more RNA at between 24 and 36 hpi (Fig. 2A, light gray bars) and 3 times less RNA than the WT compared to the input levels at both time points (Fig. 2B, light gray bars). Interestingly, the difference in the viral late mRNAs produced in RCs from E1B-PM-infected cells at between 24 and 36 hpi was 43-fold (Fig. 2A, dark gray bars), and in this case, viral mRNAs increased 6-fold at 24 hpi and almost 10-fold at 36 hpi compared to the input (Fig. 2B, dark gray bars). These results unambiguously demonstrate that the phosphorylation of E1B increases the rate of viral late mRNA synthesis in RCs. To directly evaluate the effect of E1B on the splicing of viral late mRNAs, RC particles obtained from WT-, E1B⁻, or E1B-PM-infected cells were incubated with ATP and creatine phosphate (CP) to measure *de novo* splicing rates, as described previously (17). In WT RCs, we measured a 1.2-fold increase in the splicing of viral late mRNA (+ATP and +CP) from 24 to 36 hpi (Fig. 2C, WT) and a 5-fold increase in splicing with respect to the input (−ATP and −CP) at both 24 and 36 hpi (Fig. 2C and D). In the absence of E1B, no significant increase in the *de novo* splicing of viral

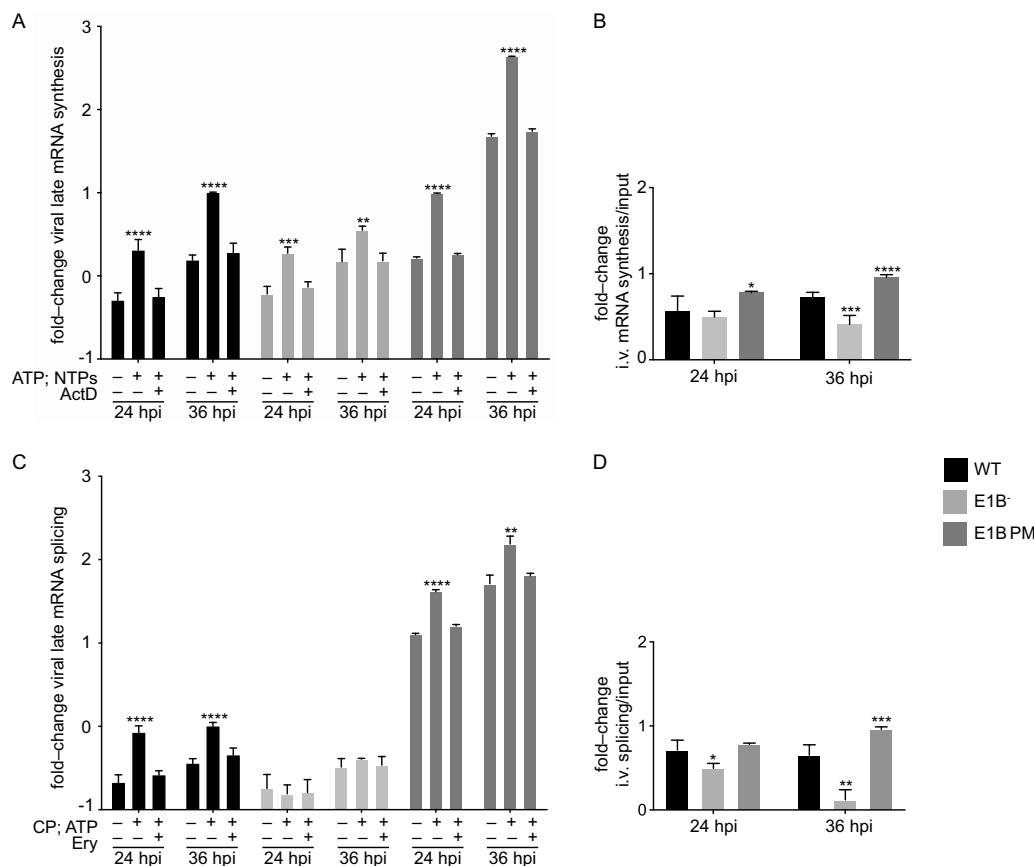


FIG 2 E1B phosphorylation increases the rates of viral late mRNA synthesis and splicing in viral RCs. (A) RC particles isolated from WT-, E1B⁻, or E1B-PM-infected HFF cells at 24 and 36 hpi were incubated with ATP and NTPs. RNAs were amplified by RT-qPCR using primers that hybridize on intron-exon junctions to measure newly synthesized pre-mRNA. ActD (25 μ g/mL) was used as a control to inhibit transcription. Log₁₀ mean fold change values \pm standard deviations for pre-mRNAs from two independent experiments, measured in technical triplicates, are shown relative to the WT at 36 hpi. (B) The *in vitro* (i.v.) transcription (ATP and NTPs)-over-input (without ATP and NTP) ratios were plotted for each condition. (C) RC particles were isolated from WT-, E1B⁻, or E1B-PM-infected HFF cells at 24 and 36 hpi. RC samples were incubated with ATP, and creatine phosphate (CP) mRNAs were amplified by RT-qPCR using primers that hybridize on exon-exon junctions to measure newly spliced mRNA. Erythromycin (Ery) (500 μ M) was used as a control to inhibit splicing. Log₁₀ mean fold change values \pm standard deviations for spliced RNA from two independent experiments, measured in technical duplicates, are shown, and values are plotted relative to the WT at 36 hpi. (D) The *in vitro* splicing (ATP and CP)-over-input (without ATP and CP) ratios were plotted for each condition. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ (by multiple *t* tests).

late mRNAs was detected (Fig. 2C and D, E1B⁻). In viral RCs isolated from E1B-PM-infected cells, the increase in viral mRNA splicing at between 24 and 36 hpi was close to 4-fold (Fig. 2C, PM), and we detected 6-fold (24 hpi) and 9-fold (36 hpi) increases in splicing compared to the input (Fig. 2C and D). These data demonstrate that HAdV-C5 with a constitutively phosphorylated E1B protein positively regulates the splicing rate of viral late mRNA in RCs. Taken together, the data presented in Fig. 2 show that the phosphorylation of E1B modulates the rates of both the synthesis and splicing of viral late mRNAs in RCs.

E1B promotes viral early gene expression, leading to efficient viral DNA replication. To determine the effect of E1B on viral genome replication, we first quantified absolute steady-state levels of viral genome copies by qPCR in total cell lysates of WT-, E1B⁻, and E1B-PM-infected human foreskin fibroblast (HFF) cells (Fig. 3A). In agreement with previous reports that showed an exponential increase in viral DNA synthesis from 20 to 24 hpi in HFF cells (49), we also observed an increase in WT DNA synthesis starting at 20 hpi (Fig. 3A, black bars).

In the absence of E1B, the exponential phase of viral DNA synthesis also started at

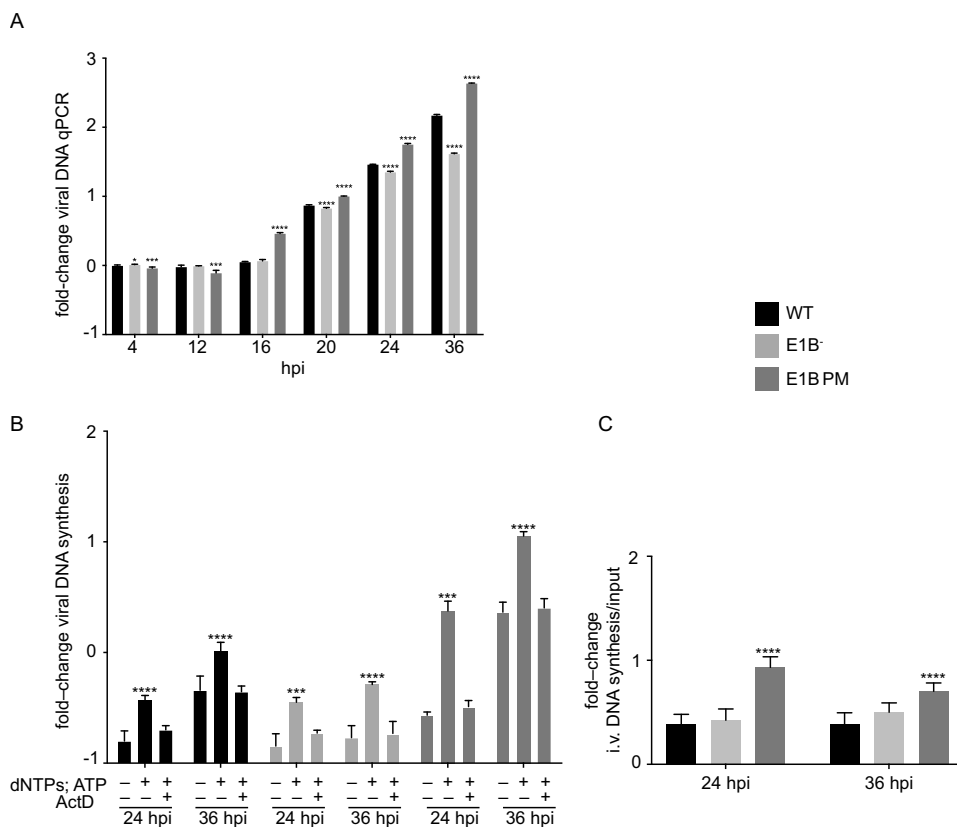


FIG 3 E1B promotes early steps in viral replication necessary for viral DNA synthesis. (A) DNA was isolated from HFF cell lysates infected with the WT, E1B⁻, or E1B-PM and analyzed by qPCR. The plot shows the mean number of viral DNA molecules from two independent experiments, measured in technical triplicates. Error bars represent the standard deviations. (B) RC particles were isolated from WT-, E1B⁻, or E1B-PM-infected HFF cells at 24 and 36 hpi. RC samples were incubated with ATP and dNTPs to promote DNA replication, and newly synthesized DNA molecules were amplified by qPCR. Actinomycin D (ActD) (100 ng/mL) was used as a control to inhibit DNA replication. Log₁₀ mean fold change values ± standard deviations from two independent experiments, measured in technical duplicates, are shown relative to the WT at 36 hpi. (C) The *in vitro* (i.v.) DNA replication (ATP and dNTPs)-over-input (without ATP and dNTPs) ratios were plotted for each condition. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ (by multiple *t* tests).

20 hpi, but DNAs accumulated to significantly lower levels than with the WT (Fig. 3A, light gray bars), similar to previous observations in HFF cells (49). In E1B-PM-infected cells, however, viral DNA levels increased earlier (16 hpi) and accumulated to significantly higher levels (up to 30-fold by 36 hpi) than in WT-infected cells (Fig. 3A, dark gray bars). These results indicate that the phosphorylation of E1B is necessary for the efficient accumulation of viral DNA molecules.

To evaluate the effect of E1B on the rate of viral DNA synthesis, RC particles were isolated from WT-, E1B⁻, or E1B-PM-infected HFF cells as described above (Fig. 3B). Although infection with the E1B-PM mutant virus resulted in a significant increase in the rate of viral genome replication, these values were comparable between E1B⁻ and the WT (Fig. 3C). Together, these results indicate that E1B does not directly facilitate viral DNA replication, but rather, the phosphorylation of E1B might promote an earlier step of the viral replication cycle that is needed to establish optimal conditions for viral DNA replication, such as the efficient formation of RCs or the expression of early genes, in agreement with previous findings described in the introduction.

E1B regulates the expression of viral early and late genes. To further dissect the role of E1B in the promotion of efficient viral gene expression, we performed time course analyses to measure the steady-state levels of viral mRNA species by RT-qPCR. As described in detail above, viral DNA replication depends on different processes that

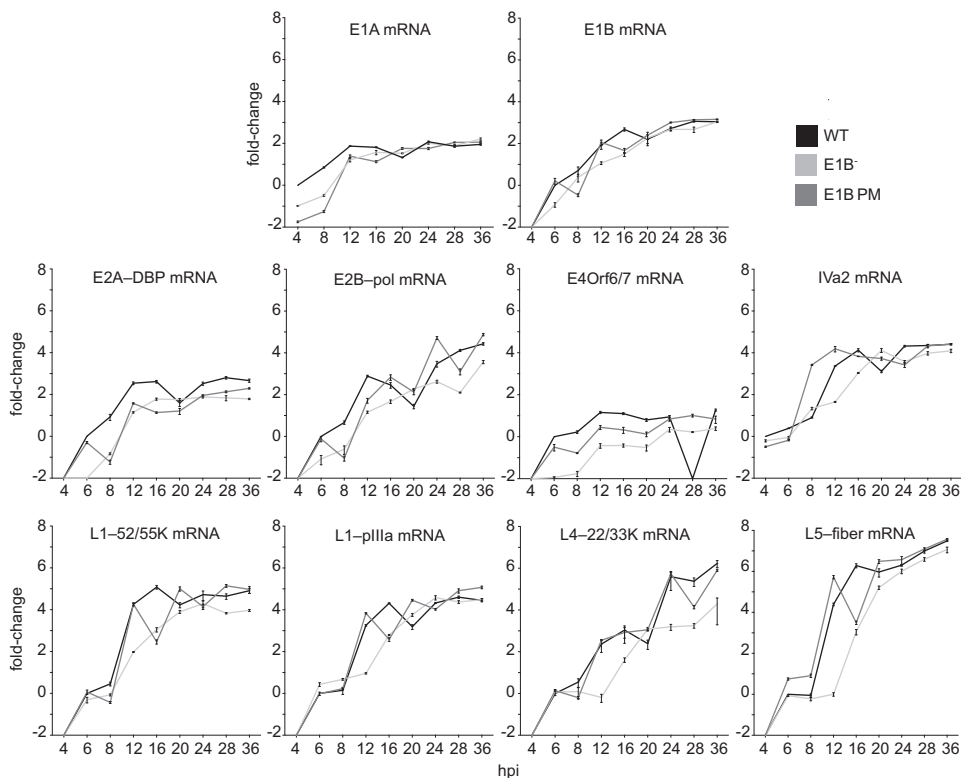


FIG 4 E1B impacts both viral early and late mRNA levels. Total RNA was isolated from HFF cells infected with the WT, E1B⁻, or E1B-PM and reverse transcribed. RT-qPCR was performed in triplicates to determine the relative steady-state levels of the indicated viral mRNAs at the indicated times postinfection. The plots show the log₁₀ mean fold change values \pm standard deviations for viral early and late mRNAs relative to the WT at 4 hpi (for E1A and IVa2) or 6 hpi (for the rest of the mRNAs) from two independent experiments, measured in technical triplicates, and the error bars represent standard deviations. The corresponding statistical analyses can be found in Table S1 in the supplemental material.

are established during the early phase of infection, such as the expression of early genes that encode proteins facilitating DNA replication and other proteins necessary for the transition to the late phase. Therefore, we included measurements of viral early mRNAs. Statistical analyses of these measurements can be found in Table S1 in the supplemental material.

E1A mRNAs were the first viral transcripts to be detected, followed by those of E4, E2A-DBP, E1B, and, later, IVa2 and E2B-Pol mRNAs (Fig. 4), temporal patterns of expression that are comparable to those in previous reports (6). Moreover, 1- to 2-log increases in viral late mRNA levels were measured at late time points postinfection (20 to 36 hpi) (Fig. 4). A surprising observation was that the levels of IVa2, L4 (L4-22K and -33K), L5, and L1-pIIIa increased from 12 hpi (Fig. 4) albeit at lower levels than at later time points.

In the absence of the E1B protein, the accumulation of IVa2 and viral late mRNAs also started at early time points (Fig. 4, light gray lines). However, the accumulation of these mRNAs was delayed, and most of the viral mRNA levels were lower in E1B⁻ infections than in WT infections.

Infections of HFF cells with E1B-PM resulted in comparable or high levels of viral mRNA compared to the WT (Fig. 4, dark gray lines). IVa2 and late mRNAs accumulated earlier but to levels similar to those of the WT. These results suggest that the phosphorylation of E1B may be necessary for the timely regulation of viral gene expression at different times of the viral replication cycle.

E1B is a phosphorylation-dependent transcriptional regulator of viral promoters. By considering the differences between the levels of WT mRNAs at two consecutive time

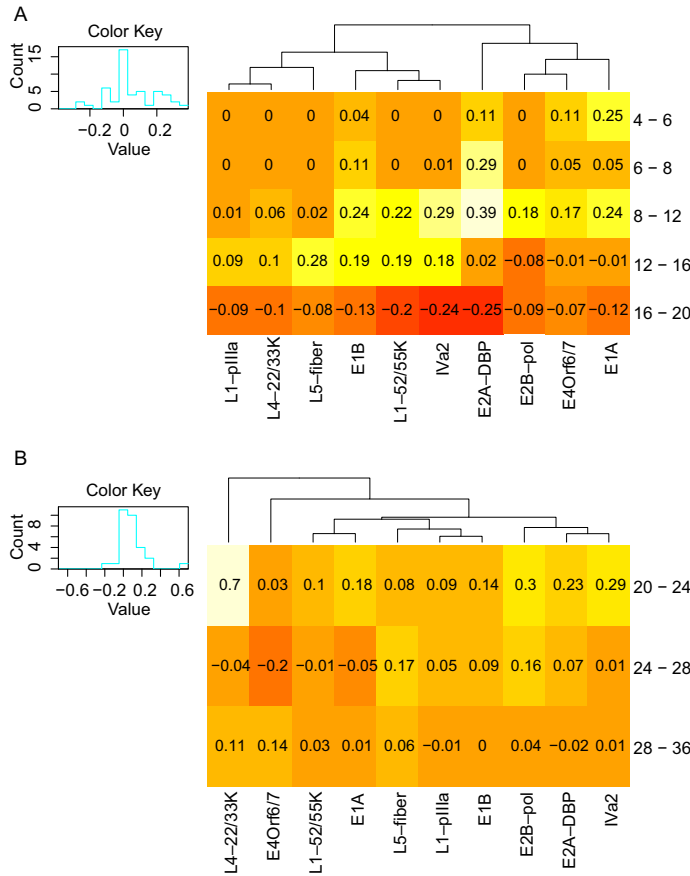


FIG 5 Hierarchically clustered heat maps of WT mRNAs predict gene regulatory networks that implicate E1B as a potential transcriptional regulator. The heat maps are presented as dendrograms at early (A) and late (B) times postinfection for all viral mRNAs measured by RT-qPCR from WT-infected HFF cells from the time course analysis in Fig. 4. The color key box (top left in each panel) shows the histogram of the matrix values (fold change value versus frequency) (see Materials and Methods) and how they correspond to the specified heat map color range. The values in the heat map boxes correspond to the changes between the mean fold change values from two consecutive time points for each mRNA.

points, we conducted hierarchical cluster analyses. We reasoned that this approach allows us to correlate time points postinfection and levels of expression of each mRNA and to group mRNAs according to their expression patterns in each phase of the viral replication cycle. The clusters are presented as dendrograms on heat maps, corresponding to early (Fig. 5A) and late (Fig. 5B) times postinfection.

At early times of infection (Fig. 5A), the genes grouped into two clusters: (i) E1A grouped with E2 and E4 mRNAs, and (ii) E1B and IVa2 grouped with viral late mRNAs. Four clusters were found at late times postinfection (Fig. 5B): (i) the L4 mRNAs occupied an outlier cluster, in agreement with the fact that their expression depends on the activation of the L4 promoter, independent from the rest of the major late (ML) mRNA (50); (ii) IVa2 clustered with the E2 mRNAs; (iii) E1A grouped with L1-52/55K; and (iv) E1B grouped with L1-pIIla and L5. These observations are relevant since E1A and IVa2 are transcriptional regulators of viral genes, suggesting that E1B may also participate in the regulation of the temporal expression of both viral early and late genes.

The steady-state levels of mRNAs may be influenced by several processes, like synthesis and turnover. So far, we have shown that E1B modulates the rates of transcription and splicing of viral mRNAs in RCs (Fig. 2). We also measured the effect of E1B on viral early (E1A) and late (L5) mRNA stability (Fig. S2), where a minor yet significant effect on viral mRNA stability was observed, especially for L5 mRNA.

To further explore E1B’s participation in viral gene transcription, we evaluated if E1B

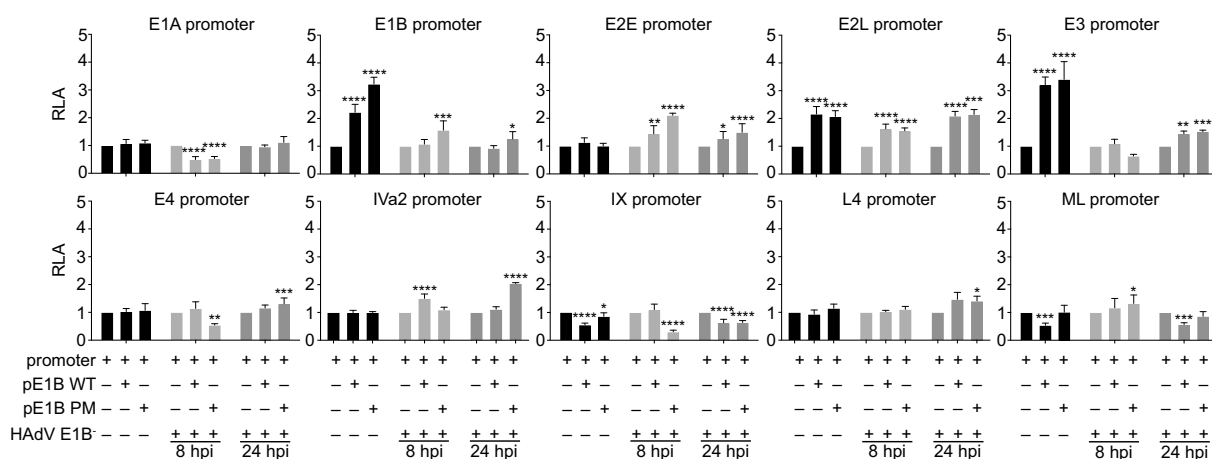


FIG 6 E1B is a phosphorylation-dependent transcriptional regulator that enhances or represses viral promoters. H1299 cells were cotransfected with the specified promoters cloned into the pGL3-basic vector and with the WT E1B- or E1B-PM-expressing plasmid (pE1B WT or pE1B PM, respectively). Cells were analyzed for luciferase activity at 48 h posttransfection (hpt) (black bars). In addition, luciferase activity was measured in the context of infection at 8 and 24 hpi (light and dark gray bars, respectively). The firefly luciferase signal was measured in at least two independent experiments, measured in technical triplicates, and normalized against the *Renilla* luciferase signal to yield the relative luciferase activity (RLA). Log₁₀ mean values \pm standard deviations are presented for each condition. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ (by one-way ANOVA).

regulates the activation of viral promoters by performing luciferase reporter assays (Fig. 6). We measured relative luciferase activity (RLA) in cells that transiently express E1B (Fig. 6, black bars) or during infection at 8 hpi (early phase) (Fig. 6, light gray bars) and 24 hpi (late phase) (Fig. 6, dark gray bars) in readily transfectable H1299 cells.

A clear effect of E1B on various promoters was observed (as shown in Fig. 6 and summarized in Table 1). In transient-expression assays, E1B-PM induced the expression of its own promoter as well as those of the E2 late (E2L) and E3 promoters (Fig. 6, black bars), which indicates that E1B activates these promoters in the absence of viral molecules.

During infection (Fig. 6, gray bars), the presence of E1B-PM correlated with increased expression of E1B, E2 early (E2E), and E2L promoters at both early and late times postinfection. The E3, E4, and L4 promoters were positively regulated by E1B-PM only at 24 hpi. An interesting observation was that at 8 hpi, WT E1B but not E1B-PM enhanced the activation of the IVa2 promoter, in contrast to 24 hpi, where only the E1B-PM protein enhanced this promoter (Fig. 6).

Contrary to the activating role of E1B in viral promoters, the sole expression of E1B in transfected cells resulted in lower levels of expression from the pIX and ML promoters, again indicating that E1B without other viral molecules, but possibly together with cellular factors, induces the repression of the pIX and ML promoters. During infection, E1B-PM expression resulted in lower expression levels from the E1A, pIX, and E4 promoters at 8 hpi as well as the pIX and ML promoters at 24 hpi (Fig. 6). Taken together, these results show that E1B modulates the rates of transcription and splicing efficiency in RCs and that E1B is a phospho-dependent transcriptional regulator that can enhance or repress both early and late promoters.

DISCUSSION

The present study contributes new insights into the intranuclear activities of E1B during viral replication, thereby providing a rationale for the mechanistic basis of its role in the regulation of viral gene expression in viral RCs. We show that E1B enhances or represses both viral early and late promoters and modulates viral mRNA posttranscriptional processing in a phosphorylation-dependent fashion.

As described above, the early-to-late switch of the canonical viral gene expression program is delimited by the onset of viral DNA replication. We show that E1B does not directly

TABLE 1 Summary of the effects of E1B on viral promoters and mRNA levels^b

Promoter	Effect of E1B on viral promoter ^a		Effect of E1B on mRNAs (compared to WT) ^a				Factors that enhance promoter expression ^c	Factors that repress promoter expression	Reference(s)
	Early	Late	mRNA(s) measured		Late				
			Early	Late	E1B ⁻	E1B ⁺			
E1A	-	0	E1A 135	0	+	0	cAMP, pIX, E1A, E3-19K-XBP1	E1A, E1B-19K, E1B ^a	51-56
E1B	+	+	E1B-55K	+	0	0	E1A, E1B-19K, Sp1, TFIID, E1B-PM ^a		54, 57
E4	-	+	E4Orf6/7	+	-	++	E1A, pIX, cAMP, E4F, ATF2, E1B-19K, E1B-PM ^a	DBP, E4Orf4, E1B-PM ^a	52, 53, 58, 59
E3	0	+	ND	+	-	-	E1A, TNF- α , NF- κ B, NF-1, AP-1, ATF, E1B-19K, E1B-PM ^a		54, 60, 61
E2E	+	+	E2A-DBP	-	-	-	E1A, PML-II, E2F, E4Orf6/7, ATF, TBP, DBP, E1B-19K, E1B-PM ^a	E1A-Nek9	54, 62-67
E2L	+	+	E2B-pol	+++	-	0	YB-1, CTCF, E1B-PM ^a	E1A	23, 68, 69
IVa2	+	+	IVa2	++	-	0	E1A, TFIID, TBP, MLTF, E1B-PM ^a	IVa2-RF	62, 70-72
pIX	-	-	ND	-	-	-	E1A, E1B-19K, E4, SP-1, TFIID, L4-22K, E1B-PM ^a	E1B-PM ^a	48
L4	0	+	L4-22K and 33K	+++	-	-	E1A, p53, E4Orf3, IVa2, E1B-PM ^a	L4-33K, TFIH	24, 50, 73
ML	+	-	L1-52/55K	0	-	+	E1A, pIX, DBP, IVa2, TFIID, USF1, CP-1, CTCF, MLTF, MAZ, Sp1, TBP, L4-22K, L4-33K, E1B-PM ^a	L4-22K+SP1 on R1, E1B ^a	52, 63, 68, 71, 74-78
			L5-fiber	++	-	0			

^aIn this study.

^b0, no change; ND, not determined. For promoters, + indicates enhancement, and - indicates repression. For mRNA levels, + indicates 20 to 40% enhancement; ++ indicates >40% or \leq 2-fold, enhancement; +++ indicates >2-fold enhancement; -- indicates 20 to 40% repression; --- indicates \geq 2-fold, repression; and --- indicates >2-fold repression.

^ccAMP, cyclic AMP; XBP1, X-box binding protein 1; TFIID, transcription factor II D; E4F, E4 factor; ATF2, activating transcription factor 2; TNF-(α), tumor necrosis factor α ; NF- κ B, nuclear factor κ B; NF-1, neurofibromin; AP-1, activator protein 1; ATF, activating transcription factor; PML-II, promyelocytic leukemia protein isoform II; E2F, E2 factor; TBP, TATA-binding protein 1; CTCF, CCCTC-binding factor; MLTF, major late transcription factor; USF1, upstream stimulatory factor 1; CP-1, CCAAT-binding protein; MAZ, MYC associated zinc finger protein.

modulate viral DNA synthesis; however, two not-mutually exclusive possibilities can be hypothesized to explain the differences measured in the steady-state levels of viral DNA molecules (Fig. 3): (i) it is not until sufficient levels of viral early proteins, including E1B, have accumulated that the cellular intrinsic response mechanisms that prevent viral DNA replication, such as the Mre11-Rad50-Nbs1-complex (MRN)-ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM) response, are inhibited (9, 79) and E2 proteins are synthesized so that viral DNA replication and late gene expression are initiated (80), or (ii) as proposed previously, E1B induces the repression of interferon-stimulated genes to facilitate the formation of viral RCs and efficient replication of the viral genome (34).

We observed an accumulation of viral DNA in HFF cells (Fig. 3A), which correlates well with the previously reported biphasic behavior of HAdV-C5 DNA replication in U2OS cells (81). Moreover, we found that IVa2 and some viral late mRNAs accumulated at times postinfection that coincide with the first phase of viral DNA synthesis (Fig. 4). These observations indicate that the initial increase in viral DNA molecules, which happens efficiently only in the presence of E1B, is sufficient for IVa2 expression and subsequently for the initial expression of viral late mRNAs (Fig. 4). Together with the hierarchical clustering data (Fig. 5), these results indicate that E1B is a key regulator in the transition process to the late phase of infection and in the regulation of viral late mRNA expression.

The role of E1B in the regulation of the activity of viral promoters could be due to the recruitment of transcription factors to RCs. E1B promotes the recruitment of YB-1 and p53 to RCs, which in turn activate the expression of the E2-L and L4 promoters, respectively (23, 24). Moreover, E1B levels correlate with efficient viral genome replication (82). Therefore, E1B could coopt factors to RCs that are necessary for RC-associated activities, which is worth investigating in future studies. Additionally, since the phosphomimetic form of E1B is highly SUMOylated and increases its localization to viral RCs (22), this feature could favor E1B's transcriptional regulator activity.

It was recently reported that efficient splicing of viral mRNAs is necessary to decrease the formation of double-stranded RNA (dsRNA) species that could activate the cellular innate response via the dsRNA-dependent protein kinase (PKR) (83). It is therefore tempting to speculate that E1B promotes the efficient splicing of viral late mRNAs (Fig. 2B and C), which, along with the E1B-mediated degradation of restriction factors (29–31) and the repression of antiviral genes (32–34), could be an additional mechanism by which E1B blocks cellular intrinsic and innate responses against HAdV infection.

Protein half-lives can largely differ from the half-lives of the corresponding mRNAs (84, 85). Therefore, the RNA levels detected in infected HFF cells (Fig. 4) are not sufficient to predict the corresponding protein levels (see Fig. S3 in the supplemental material), nor are they sufficient to predict the biological role of their variation in virus replication, which should be explored further. However, the time course and hierarchical clustering analyses (Fig. 4 and 5) show that mRNA levels are suitable to predict and describe new regulatory events in viral gene expression. Nonetheless, quantitative measurements of the steady-state levels of viral proteins at different time points of the viral replication cycle by proteomic approaches should be performed to compare and contrast the dynamic changes in mRNA levels with those of the corresponding proteins. These investigations are under way.

It is important to consider that we studied viral mRNA biogenesis at a cell population level, and cell cycles were not synchronized. Suomalainen and colleagues have recently shown that viral gene expression and replication are dependent on cell-to-cell variability, with low correlations between viral genome copies and the amount of viral mRNA (86). Therefore, further exploration and comparison of the transcriptional and posttranscriptional regulatory roles of E1B at a single-cell resolution should be performed in follow-up studies. The viruses used in the present work contain a deletion within the E3 transcriptional unit, including the z-leader present in some viral late mRNAs. Since E3 proteins were recently shown to enhance the expression of viral

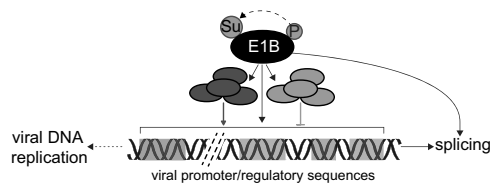


FIG 7 Proposed model of E1B as a dual transcriptional regulator. When modified by phosphorylation, which in turn promotes its SUMOylation, E1B associates with different proteins to bind viral promoters or transcriptional regulatory sequences to either repress (light gray ovals) or enhance (dark gray ovals) viral gene transcription. An additional possibility is that E1B may directly bind to DNA to regulate viral promoter/regulatory sequences (gray boxes). Independently from the role of E1B in viral transcription, E1B also promotes the efficient splicing of viral mRNA. P, phosphate groups; Su, SUMO molecules.

genes (56) and due to the fact that the full viral transcriptional repertoire may determine the use of initiation codons and alternative splicing of viral genes (87), it would be interesting to evaluate the role of E1B in transcription regulation in the context of a full-length virus that expresses all E3 genes.

Based on the findings presented here, a model can be proposed in which posttranslational modifications of E1B regulate its interaction with viral or cellular factors that result in either repression (Fig. 7, light gray ovals) or activation (Fig. 7, dark gray ovals) of viral gene transcription in RCs. These effects, either positive or negative, of E1B on viral promoters may lead to efficient viral DNA replication and the transition to the late phase of infection. We also show that E1B modulates both the rate of synthesis and the splicing efficiency of viral mRNAs, which are then efficiently released to the surrounding nucleoplasm (Fig. 1 and 2), functions that are likely to be independent of each other. Among the different viral and cellular E1B-interacting proteins (21, 88), WT1 is a host factor that coimmunoprecipitates with E1B (89) and has both transcriptional and splicing regulation activities (90). Moreover, WT1 is predicted to bind to the E1A, E4, pIX, and ML promoters (our unpublished data). Therefore, future research should address if WT1 supports E1B in promoting both viral transcription and splicing.

Whether the activity of E1B as a transcriptional and posttranscriptional regulator is limited to the interactions established with viral or host factors, similar to E1A transcriptional activity, or if E1B has additional abilities to bind directly to viral DNA regulatory sequences (proximal or distant) to regulate gene expression is not known. Work is in progress to define if E1B binds to promoters or any other transcriptional regulatory sequence by direct DNA interaction or through protein binding partners. The times postinfection and subcellular location of E1B are likely to be interdependent from each other and determine the protein's activities. But since viral gene transcription and splicing occur in RCs, the protein-protein interactions should be studied in these virus-induced biomolecular condensates.

In summary, in this study, we used WT HAdV-C5 and E1B mutants (E1B⁻ and E1B-PM) for quantitative analyses of viral pre-mRNAs and spliced mRNAs in different nuclear fractions combined with measurements of the transcription, splicing, and viral genome replication rates as well as an assessment of the regulation capacity of E1B on viral promoters. Together, our data demonstrate that E1B transcriptionally and posttranscriptionally regulates viral mRNA biogenesis in a phosphorylation-dependent manner.

MATERIALS AND METHODS

Cells. Primary human foreskin fibroblasts (HFFs) (a kind gift from Jesús Santa-Olalla, School of Medicine, UAEM) were maintained in monolayer cultures in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum (Gibco-Invitrogen Corp.), 100 U/mL penicillin, and 100 g/mL streptomycin at 37°C in 5% CO₂, for no more than 14 passages. Human embryonic kidney HEK-293 cells (ATCC CRL-1573) and human lung cancer H1299 cells (ATCC CRL-5803) were maintained in monolayer cultures in DMEM supplemented with 10% (vol/vol) bovine serum (Biowest), 100 U/mL penicillin, and 100 g/mL streptomycin at 37°C in 5% CO₂.

Viruses. The following HAdV-C5 viruses were used in this study: H5pg4100, which contains a deletion in the E3 region, was used as a wild-type (WT) virus; H5pm4227, containing aspartic acid

substitutions for three carboxy-terminal serine and threonine residues (S490D, S491D, and T495D) in the E1B-55K protein to mimic constitutively phosphorylated E1B-55K at the C-terminal end of the protein, was used as the E1B-PM mutant; and H5pm4149, containing four premature stop codons at the 5' end of the E1B-55K coding sequence, which abrogates the synthesis of the protein, was used as the E1B⁻ mutant (22, 47).

All viruses were propagated in HEK-293 cells and titrated in HFF cells (for experiments performed in HFF cells) or HEK-293 cells (for experiments performed in H1299 cells) as described previously (47). HFFs were infected with HAdV-C5 WT or mutant viruses at a multiplicity of infection (MOI) of 30, and H1299 cells were infected at an MOI of 10.

Plasmids. The HAdV-C5 E1B proteins examined in this study were expressed from their respective cDNAs under the control of the cytomegalovirus immediate early promoter derived from the pCDNA3 vector (Invitrogen) to express WT E1B-55K (pE1B WT) or E1B 3XPD (S490/491D and T495D) (pE1B PM) (26). E1B expression from both pE1B WT and pE1B PM has been shown to result in comparable levels of the E1B protein (22). The L4 promoter construct (L4-P) was generated by amplifying HAdV-C5 nucleotide positions 25887 to 26125 (50) using primers with restriction sites for XhoI (5' primer) and HindIII (3' primer) with the pGL3-basic luciferase reporter plasmid (Promega) as the vector. The lVa2 promoter construct (lVa2-P) was generated by synthesizing complementary primers containing the lVa2 promoter sequence (nucleotides 5801 to 5860) and restriction sites for XhoI (5' primer GATCCTCGAGCCGCGGTC CTCCTCGTATAGAACTCGGACCACTCTGAGACAAAGGCTCGCGTCCAGGCCAAGCTTCTG) and HindIII (3' primer CAGAAGCTTGGCCTGGACGCGAGCCTTTGTCTCAGAGTGGTCCGAGTTTCTATACGAGGAGGACCGCGG CTCGAGGAT). The primers were mixed, incubated at 80°C for 1 min and at 37°C for 2 h, and then digested with the corresponding restriction enzymes to be cloned into the pGL3-basic luciferase reporter plasmid. The sequences of both constructs were verified by Sanger sequencing. Plasmids for the HAdV-C5 E1A, E1B, E2-E, E2-L, E3, E4, pIX, and ML promoters were prepared as described previously (26).

Antibodies. Antibodies used for Western blotting included mouse monoclonal antibody (mAb) B6-8 targeting HAdV-C5 E2A-DBP (91); mouse mAb anti-HAdV-C2/HAdV-C5 E1A (289R and 249R), clone M73 (Merck); mouse mAb anti-fiber, clone 4D2 (Abcam); mouse mAb anti-hexon, clone D36J (Thermo Scientific); mouse mAb anti-alpha-tubulin, clone DM1A (eBioscience); and an anti-mouse secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (Jackson ImmunoResearch).

Primers. The CLC Sequence Viewer (CLC Bio), Primer Plex (Premier Biosoft), and Primer-BLAST (NCBI) programs were used to design primers specific for the viral and cellular nucleic acid sequences of interest. These primers allowed the amplification of a unique product of the expected size, as determined by melt curve analyses. All primers were validated to confirm an amplification efficiency of 100% ± 10%, as calculated by the linear regression obtained from standard curve assays. The primers for E1A allow the amplification of both 12S and 13S mRNAs. The ML primers allow the amplification of a sequence inside the tripartite leader. The primers for L4 mRNAs allow the amplification of a common sequence within the 5' region of both 22K and 33K. The primers used to quantify mRNAs are shown in Table 2.

Quantitative PCR and RT-PCR. DNA or RNA was isolated as described previously (17) from subcellular fractions or total lysates from mock-infected or HAdV-C5-infected cells with at least two biological replicates (1×10^7 cells per condition). To analyze RNA, equal volumes (approximately 100 ng) of RNA were reverse transcribed using Revert-Aid reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific) in 20- μ L reaction volumes.

Viral DNA or cDNA was quantified using the Power SYBR green PCR master mix kit according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The StepOne system (Applied Biosystems) was used for real-time thermocycling.

The cDNA samples were analyzed using the $\Delta\Delta C_T$ comparative method. β -Actin was used as the internal reference gene. WT samples at the earliest time point were used as the calibrator. For the transcription inhibition assays, the samples 0 h after triptolide treatment were used as the calibrator. All experiments were performed in technical triplicates for at least two independent experiments. RT-minus (RT⁻) and non-template control (NTC) controls were prepared for each experiment. The data were further analyzed as described below and in the supplemental material.

Genomic viral DNA samples were quantified by the absolute standard curve method. The DNA for the standard curve was produced by amplifying a region within the viral DNA that contains the TPL with the following primers: forward (Fwd) primer CGCAGCTTGTTGACCAGCTCG and reverse (Rev) primer GGGACCTCCGCATCACACG. This PCR product was column purified (Thermo Scientific) and quantified by using a Nanodrop instrument. Standard curves were generated with 1:5 dilution series of the standard DNA. The threshold cycle (C_T) of viral DNA from the different samples (different time points) was measured by qPCR using the ML-NP primers (Table 2). From the standard curve, viral genome copies per cell were calculated for each time point depending on their C_T values. NTC controls were prepared for each experiment.

Transient transfections and luciferase reporter assays. For dual-luciferase assays, subconfluent H1299 cells were treated with a transfection mixture of DNA and 25-kDa linear polyethylenimine as described previously (26), 28 h prior to the preparation of total cell extracts, or transfected and infected with E1B⁻ (H5pm4149) at 28 h posttransfection (hpt) (for the indicated times shown in Fig. 7). Promoter activity was evaluated with lysed extracts in an automated luminometer (Berthold Technologies). All samples were normalized for transfection efficiency by measuring *Renilla* luciferase activities from the cotransfected plasmid pTK-RL (Promega). All experiments were performed in at least two technical replicates of at least two independent experiments.

Preparation of subnuclear fractions from infected HFF cells. To isolate nucleoplasmic and RC fractions, 1×10^7 HAdV-C5-infected HFF cells were fractionated as previously described (92). This procedure

TABLE 2 Primers used for qPCR and RT-qPCR

Target gene(s)	Primer sequence (5'–3') ^a	Amplicon size (bp)
E1A	Fwd, TTGAACCCACTACCTTCACG Rev, CCTCCTCGTTGGGATCTTCG	69
E1B-55K	Fwd, TAGCGGTACGGTTTTCTGG Rev, CCGAACCCCTTACATCGGTCC	106
E2A-DBP	Fwd, AGCAGATCAAGGCTTTTATGCAGG Rev, GGCGAACGGAGTCAACTTTGG	149
E2B-Pol	Fwd, AGTTCTACATGCTAGGCTCTTACC Rev, CGCAGTAGTCCAGGGTTTCC	156
E4Orf6/7	Fwd, CGCACTCCGTACAGTAGGGATCG Rev, GGAGAAGTCCACGCGTTGTGC	132
IVa2	Fwd, AGGGCGTCTCCAAGTCTTCC Rev, TGTTCAGCCATATCCCTCC	126
ML-P	Fwd, GCCTCCGAACGGTACTCCGCC Rev, CGCCACGGTCTCAGCCTACC	121
ML-NP	Fwd, GAGCGAGGTGTGGGTGAGC Rev, GGATGCGACGACACTGACTTCA	81
L1-52/55K	Fwd, CAGTCGCAAGATGCATCCGG Rev, GATGTCGCCCTCTGACG	126
L1-pIIIa	Fwd, AGTCGCAAGATGATGCAAGACG Rev, CAGTCGTCGGTGGAGTAAAGG	89
L4-22K and -33K	Fwd, CAGTCGCAAGATGGCACCCA Rev, CTCTCCAGTCTTCCATCATGTCC	132
L5-P	Fwd, GTCACAGTCGCAAGATGAAGCG Rev, GGTAAGTAGAGTTCGGATAGGCG	139
L5-NP	Fwd, GTCATCCGCACCCACTATCTTC Rev, AAGGCACAGTTGGAGGACCG	117
β -Actin	Fwd, CTCCTTCTGGGCATGGAGTCC Rev, GCAATGCCAGGGTACATGGTGG	139

^aFwd, forward; Rev, reverse.

has been performed several times and has proven to be highly reproducible. Data were acquired from at least two replicate experiments.

Isolation of viral RCs to measure the rates of viral DNA replication, transcription, and splicing.

RC fractions were isolated at 24 and 36 hpi from 1×10^7 WT-, E1B⁻, or E1B-PM-infected HFF cells to determine the impact of E1B on RC-associated activities: viral DNA replication, late gene transcription, and mRNA splicing rates. This was performed by RT-qPCR (RNA) or qPCR (DNA) in three technical replicates from two independent experiments as previously described (17). Briefly, isolated RC fractions were incubated with (i) nucleotide triphosphates (NTPs) and ATP for 10 min at 37°C (to measure the rates of *de novo* synthesis of viral RNA in RC fractions), (ii) ATP and creatine phosphate for 90 min at 30°C (to measure *de novo* splicing of viral RNA in RC fractions), or (iii) deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) and ATP for 30 min at 30°C (to measure the rate of *de novo* viral DNA replication in RC fractions). Treatments with 25 μ g/mL of actinomycin D (ActD) served as controls to inhibit transcription, and the addition of 100 ng/mL of ActD was used to inhibit DNA replication. Erythromycin was used to inhibit splicing activity (17).

mRNA stability assays. HFF cells were seeded onto 6-well plates at a density of 2.5×10^4 cells/cm² and infected with WT HAd5 or the E1B⁻ or E1B-PM mutant. At 4 or 24 hpi, cells were treated with 1 μ M triptolide (Sigma) in 500 μ L DMEM for 1 h to inhibit transcription. Cells were collected using 500 μ L of TRIzol (Invitrogen) at 0, 2, 4, 6, 8, and 12 h posttreatment. cDNA synthesis was performed using 1/10 of the total RNA, and RT-qPCR assays were performed as described above to measure E1A and L5 mRNAs. The values were plotted against time after treatment with triptolide, using GraphPad Prism. The data were measured in three technical replicates from two independent experiments.

Western blotting. Total cell lysates from at least three independent experiments were used to evaluate steady-state levels of viral proteins at different time points between 4 and 36 hpi (as indicated in

Fig. S3 in the supplemental material). For immunoblotting, gels were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore) and incubated as described previously (93). Briefly, membranes were blocked for 2 h at room temperature with 3% nonfat milk and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. After successive washes with phosphate-buffered saline (PBS)–0.1% Tween 20, the membranes were incubated with secondary antibody coupled to HRP for 2 h at room temperature. Membranes were developed by enhanced chemiluminescence as recommended by the manufacturer (Pierce, Thermo Fisher Scientific), and bands were visualized on X-ray films (Carestream).

Statistical analyses. For gene expression measurements, it is highly recommended that the data express proportional changes (*viz.*, biologically relevant changes) rather than additive changes (94). For this reason, the fold change values of mRNA levels were log transformed (logarithm base 10) as a first step of our statistical analyses. For the hierarchical cluster analyses, the slope of each gene between two consecutive time points was computed to compare changes in mRNA expression. Initially, each mRNA was assigned its own cluster, and at each stage, the algorithm joined the two most similar clusters, until there was a single cluster. The distances between clusters were calculated using the Lance-Williams dissimilarity update formula (95, 96). The initial distance between the gene slopes was calculated according to the “complete-linkage” clustering method, which defines the distance between clusters X and Y as the maximum Euclidean distance between all the elements of X and Y , $\max_{x \in X, y \in Y} d(x, y)$ (95, 96), associating different mRNAs with a similar variation (slope) in expression. All the comparisons between two distribution functions were evaluated through Kolmogorov-Smirnov hypothesis tests (97). Both Kolmogorov’s D statistic and the P value were reported for each test. The lack of a significant difference means that there is not enough evidence to ensure that the distributions between the mRNAs of the tested viruses are different. All statistical tests on RT-qPCR data were performed using R, version 3.4.2 (98). For the rest of the data, two-way analysis of variance (ANOVA) and multiple t tests were performed using GraphPad 8 for macOS (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.2 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jesús Santa-Olalla (School of Medicine, UAEM) for providing the HFF cells and Grisel Ballesteros (Universidad Autónoma del Estado de Morelos) for excellent technical assistance.

R.E.L. and E.M. received support from CONACyT, scholarships 662169 and 762343, respectively; Y.G. received a postdoctoral scholarship from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA) in the Instituto de Biotecnología (IBt-UNAM); P.H. was supported by grants from CONACyT-SEP (A1-S8696) and CONACyT-SRE (S0016-280365); and R.A.G. and T.D. received support from the Research Group Linkage Program of the Alexander von Humboldt Foundation. The HPI is supported by the Freie und Hansestadt Hamburg and the German Bundesministerium für Gesundheit (BMG). The R.A.G. laboratory received grants from CONACyT-SEP (CB 2011-168497-B and A1-S8696) and CONACyT-SRE (S0016-280365).

We declare that we have no conflict of interest.

REFERENCES

- Ghebremedhin B. 2014. Human adenovirus: viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 4:26–33. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.4.2014.1.2>.
- Ip WH, Dobner T. 2020. Cell transformation by the adenovirus oncogenes E1 and E4. *FEBS Lett* 594:1848–1860. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13717>.
- Miller DL, Myers CL, Rickards B, Collier HA, Flint SJ. 2007. Adenovirus type 5 exerts genome-wide control over cellular programs governing proliferation, quiescence, and survival. *Genome Biol* 8:R58. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-4-r58>.
- Hensen LCM, Hoeben RC, Bots STF. 2020. Adenovirus receptor expression in cancer and its multifaceted role in oncolytic adenovirus therapy. *Int J Mol Sci* 21:6828. <https://doi.org/10.3390/ijms21186828>.
- Gao J, Mese K, Bunz O, Ehrhardt A. 2019. State-of-the-art human adenovirus vectorology for therapeutic approaches. *FEBS Lett* 593:3609–3622. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13691>.
- Crisostomo L, Soriano AM, Mendez M, Graves D, Pelka P. 2019. Temporal dynamics of adenovirus 5 gene expression in normal human cells. *PLoS One* 14:e0211192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211192>.
- Hidalgo P, Gonzalez RA. 2019. Formation of adenovirus DNA replication compartments. *FEBS Lett* 593:3518–3530. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13672>.
- Ben-Israel H, Kleinberger T. 2002. Adenovirus and cell cycle control. *Front Biosci* 7:d1369–d1395. <https://doi.org/10.2741/ben>.
- Kleinberger T. 2020. En guard! The interactions between adenoviruses and the DNA damage response. *Viruses* 12:996. <https://doi.org/10.3390/v12090996>.
- Wold WS, Doronin K, Toth K, Kuppuswamy M, Lichtenstein DL, Tollefson AE. 1999. Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. *Curr Opin Immunol* 11:380–386. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(99\)80064-8](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(99)80064-8).
- Atasheva S, Shayakhmetov DM. 2016. Adenovirus sensing by the immune system. *Curr Opin Virol* 21:109–113. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.08.017>.
- Swaminathan S, Thimmapaya B. 1995. Regulation of adenovirus E2 transcription unit. *Curr Top Microbiol Immunol* 199(Part 3):177–194. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79586-2_9.
- Thomas GP, Mathews MB. 1980. DNA replication and the early to late transition in adenovirus infection. *Cell* 22(2 Part 2):523–533. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90362-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90362-1).
- Morris SJ, Leppard KN. 2009. Adenovirus serotype 5 L4-22K and L4-33K proteins have distinct functions in regulating late gene expression. *J Virol* 83:3049–3058. <https://doi.org/10.1128/JVI.02455-08>.

15. Babich A, Nevins JR. 1981. The stability of early adenovirus mRNA is controlled by the viral 72 kd DNA-binding protein. *Cell* 26(3 Part 1):371–379. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90206-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90206-3).
16. Aspegren A, Rabino C, Bridge E. 1998. Organization of splicing factors in adenovirus-infected cells reflects changes in gene expression during the early to late phase transition. *Exp Cell Res* 245:203–213. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4264>.
17. Hidalgo P, Anzures L, Hernández-Mendoza A, Guerrero A, Wood CD, Valdés M, Dobner T, Gonzalez RA. 2016. Morphological, biochemical and functional study of viral replication compartments isolated from adenovirus-infected cells. *J Virol* 90:3411–3427. <https://doi.org/10.1128/JVI.00033-16>.
18. Leppard KN, Shenk T. 1989. The adenovirus E1B 55 kd protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *EMBO J* 8: 2329–2336. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08360.x>.
19. Hidalgo P, Pimentel A, Mojica-Santamaría D, von Stromberg K, Hofmann-Sieber H, Lona-Arrona C, Dobner T, González RA. 2021. Evidence that the adenovirus single-stranded DNA binding protein mediates the assembly of biomolecular condensates to form viral replication compartments. *Viruses* 13:1778. <https://doi.org/10.3390/v13091778>.
20. Cheng P-H, Wechman SL, McMasters KM, Zhou HS. 2015. Oncolytic replication of E1B-deleted adenoviruses. *Viruses* 7:5767–5779. <https://doi.org/10.3390/v7112905>.
21. Hidalgo P, Ip WH, Dobner T, Gonzalez RA. 2019. The biology of the adenovirus E1B 55K protein. *FEBS Lett* 593:3504–3517. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13694>.
22. Wimmer P, Blanchette P, Schreiner S, Ching W, Groitl P, Berscheminski J, Branton PE, Will H, Dobner T. 2013. Cross-talk between phosphorylation and SUMOylation regulates transforming activities of an adenoviral oncoprotein. *Oncogene* 32:1626–1637. <https://doi.org/10.1038/ncr.2012.187>.
23. Holm PS, Bergmann S, Jurchott K, Lage H, Brand K, Ladhoff A, Mantwill K, Curiel DT, Dobbstein M, Dietel M, Gansbacher B, Royer H-D. 2002. YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter. *J Biol Chem* 277:10427–10434. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106955200>.
24. Wright J, Leppard KN. 2013. The human adenovirus 5 L4 promoter is activated by cellular stress response protein p53. *J Virol* 87:11617–11625. <https://doi.org/10.1128/JVI.01924-13>.
25. Schreiner S, Wimmer P, Sirma H, Everett RD, Blanchette P, Groitl P, Dobner T. 2010. Proteasome-dependent degradation of Daxx by the viral E1B-55K protein in human adenovirus-infected cells. *J Virol* 84:7029–7038. <https://doi.org/10.1128/JVI.00074-10>.
26. Schreiner S, Bürck C, Glass M, Groitl P, Wimmer P, Kinkley S, Mund A, Everett RD, Dobner T. 2013. Control of human adenovirus type 5 gene expression by cellular Daxx/ATRAX chromatin-associated complexes. *Nucleic Acids Res* 41:3532–3550. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt064>.
27. Bürck C, Mund A, Berscheminski J, Kieweg L, Müncheberg S, Dobner T, Schreiner S. 2016. KAP1 is a host restriction factor that promotes human adenovirus E1B-55K SUMO modification. *J Virol* 90:930–946. <https://doi.org/10.1128/JVI.01836-15>.
28. Schreiner S, Kinkley S, Bürck C, Mund A, Wimmer P, Schubert T, Groitl P, Will H, Dobner T. 2013. SPOC1-mediated antiviral host cell response is antagonized early in human adenovirus type 5 infection. *PLoS Pathog* 9: e1003775. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003775>.
29. Schreiner S, Wimmer P, Dobner T. 2012. Adenovirus degradation of cellular proteins. *Future Microbiol* 7:211–225. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.153>.
30. Querido E, Blanchette P, Yan Q, Kamura T, Morrison M, Boivin D, Kaelin WG, Conaway RC, Conaway JW, Branton PE. 2001. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev* 15:3104–3117. <https://doi.org/10.1101/gad.926401>.
31. Ip W-H, Wilkens B, Solomatina A, Martin J, Melling M, Hidalgo P, Bertzbach LD, Speiseder T, Dobner T. 2021. Differential regulation of cellular FAM111B by human adenovirus C type 5 E1 oncogenes. *Viruses* 13: 1015. <https://doi.org/10.3390/v13061015>.
32. Yew PR, Liu X, Berk AJ. 1994. Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev* 8:190–202. <https://doi.org/10.1101/gad.8.2.190>.
33. Miller DL, Rickards B, Mashiba M, Huang W, Flint SJ. 2009. The adenoviral E1B 55-kilodalton protein controls expression of immune response genes but not p53-dependent transcription. *J Virol* 83:3591–3603. <https://doi.org/10.1128/JVI.02269-08>.
34. Chahal JS, Qi J, Flint SJ. 2012. The human adenovirus type 5 E1B 55 kDa protein obstructs inhibition of viral replication by type I interferon in normal human cells. *PLoS Pathog* 8:e1002853. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002853>.
35. Yang UC, Huang W, Flint SJ. 1996. mRNA export correlates with activation of transcription in human subgroup C adenovirus-infected cells. *J Virol* 70:4071–4080. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.6.4071-4080.1996>.
36. Beltz GA, Flint SJ. 1979. Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection. Restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus. *J Mol Biol* 131:353–373. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(79\)90081-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(79)90081-0).
37. Hodge LD, Scharff MD. 1969. Effect of adenovirus on host cell DNA synthesis in synchronized cells. *Virology* 37:554–564. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(69\)90273-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(69)90273-6).
38. Huang JT, Schneider RJ. 1991. Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein. *Cell* 65:271–280. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90161-q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90161-q).
39. Berk AJ. 2005. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene* 24:7673–7685. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209040>.
40. Dolph PJ, Huang JT, Schneider RJ. 1990. Translation by the adenovirus tripartite leader: elements which determine independence from cap-binding protein complex. *J Virol* 64:2669–2677. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.6.2669-2677.1990>.
41. Babich A, Feldman LT, Nevins JR, Darnell JE, Jr, Weinberger C. 1983. Effect of adenovirus on metabolism of specific host mRNAs: transport control and specific translational discrimination. *Mol Cell Biol* 3:1212–1221. <https://doi.org/10.1128/mcb.3.7.1212-1221.1983>.
42. Corbin-Lickfett KA, Bridge E. 2003. Adenovirus E4-34kDa requires active proteasomes to promote late gene expression. *Virology* 315:234–244. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00527-0](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00527-0).
43. Woo JL, Berk AJ. 2007. Adenovirus ubiquitin-protein ligase stimulates viral late mRNA nuclear export. *J Virol* 81:575–587. <https://doi.org/10.1128/JVI.01725-06>.
44. Schmid M, Kindsmuller K, Wimmer P, Groitl P, Gonzalez RA, Dobner T. 2011. The E3 ubiquitin ligase activity associated with the adenoviral E1B-55K-E4orf6 complex does not require CRM1-dependent export. *J Virol* 85: 7081–7094. <https://doi.org/10.1128/JVI.02368-10>.
45. Yatherajam G, Huang W, Flint SJ. 2011. Export of adenoviral late mRNA from the nucleus requires the Nxf1/Tap export receptor. *J Virol* 85: 1429–1438. <https://doi.org/10.1128/JVI.02108-10>.
46. Herrmann C, Dybas JM, Liddle JC, Price AM, Hayer KE, Lauman R, Purman CE, Charman M, Kim ET, Garcia BA, Weitzman MD. 2020. Adenovirus-mediated ubiquitination alters protein-RNA binding and aids viral RNA processing. *Nat Microbiol* 5:1217–1231. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0750-9>.
47. Groitl P, Dobner T. 2007. Construction of adenovirus type 5 early region 1 and 4 virus mutants. *Methods Mol Med* 130:29–39. <https://doi.org/10.1385/1-59745-166-5-29>.
48. Venkatesh LK, Chinnadurai G. 1987. Activation of the adenovirus 2 protein IX promoter by DNA replication in a transient expression assay. *Nucleic Acids Res* 15:2235–2250. <https://doi.org/10.1093/nar/15.5.2235>.
49. Gonzalez R, Huang W, Finnen R, Bragg C, Flint SJ. 2006. 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* 80:964–974. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.2.964-974.2006>.
50. Morris SJ, Scott GE, Leppard KN. 2010. Adenovirus late-phase infection is controlled by a novel L4 promoter. *J Virol* 84:7096–7104. <https://doi.org/10.1128/JVI.00107-10>.
51. Schaaek J, Logan J, Vakalopoulou E, Shenk T. 1991. Adenovirus E1A protein activates transcription of the E1A gene subsequent to transcription complex formation. *J Virol* 65:1687–1694. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.4.1687-1694.1991>.
52. Lutz P, Rosa-Calatrava M, Keding C. 1997. The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator. *J Virol* 71:5102–5109. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.7.5102-5109.1997>.
53. Engel DA, Hardy S, Shenk T. 1988. cAMP acts in synergy with E1A protein to activate transcription of the adenovirus early genes E4 and E1A. *Genes Dev* 2:1517–1528. <https://doi.org/10.1101/gad.2.12a.1517>.
54. White E, Denton A, Stillman B. 1988. Role of the adenovirus E1B 19,000-dalton tumor antigen in regulating early gene expression. *J Virol* 62: 3445–3454. <https://doi.org/10.1128/JVI.62.9.3445-3454.1988>.
55. Borrelli E, Hen R, Chambon P. 1984. Adenovirus-2 E1A products repress enhancer-induced stimulation of transcription. *Nature* 312:608–612. <https://doi.org/10.1038/312608a0>.
56. Prasad V, Suomalainen M, Jasiqi Y, Hemmi S, Hearing P, Hosie L, Burgert H-G, Greber UF. 2020. The UPR sensor IRE1alpha and the adenovirus E3-

- 19K glycoprotein sustain persistent and lytic infections. *Nat Commun* 11: 1997. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15844-2>.
57. Maxfield LF, Spector DJ. 1997. Readthrough activation of early adenovirus E1b gene transcription. *J Virol* 71:8321–8329. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.11.8321-8329.1997>.
 58. Jones C, Lee KA. 1991. E1A-mediated activation of the adenovirus E4 promoter can occur independently of the cellular transcription factor E4F. *Mol Cell Biol* 11:4297–4305. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.9.4297-4305.1991>.
 59. Bondesson M, Ohman K, Manervik M, Fan S, Akusjarvi G. 1996. Adenovirus E4 open reading frame 4 protein autoregulates E4 transcription by inhibiting E1A transactivation of the E4 promoter. *J Virol* 70:3844–3851. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.6.3844-3851.1996>.
 60. Kornuc M, Kliever S, Garcia J, Harrich D, Li C, Gaynor R. 1990. Adenovirus early region 3 promoter regulation by E1A/E1B is independent of alterations in DNA binding and gene activation of CREB/ATF and AP1. *J Virol* 64:2004–2013. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.5.2004-2013.1990>.
 61. Deryckere F, Burgert HG. 1996. Tumor necrosis factor alpha induces the adenovirus early 3 promoter by activation of NF-kappaB. *J Biol Chem* 271: 30249–30255. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.47.30249>.
 62. Neill SD, Hemstrom C, Virtanen A, Nevins JR. 1990. An adenovirus E4 gene product trans-activates E2 transcription and stimulates stable E2F binding through a direct association with E2F. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2008–2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.2008>.
 63. Chang LS, Shenk T. 1990. The adenovirus DNA-binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters. *J Virol* 64:2103–2109. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.5.2103-2109.1990>.
 64. Berscheminski J, Groitl P, Dobner T, Wimmer P, Schreiner S. 2013. The adenoviral oncogene E1A-135 interacts with a specific isoform of the tumor suppressor PML to enhance viral transcription. *J Virol* 87:965–977. <https://doi.org/10.1128/JVI.02023-12>.
 65. Yen R, Hung M. 1994. Complex regulation of the adenovirus e2 promoter by the viral oncoproteins e1a and e7 and tumor-suppressor rb. *Int J Oncol* 4:109–115. <https://doi.org/10.3892/ijo.4.1.109>.
 66. Swaminathan S, Thimmapaya B. 1996. Transactivation of adenovirus E2-early promoter by E1A and E4 6/7 in the context of viral chromosome. *J Mol Biol* 258:736–746. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0283>.
 67. Jung R, Radko S, Pelka P. 2016. The dual nature of Nek9 in adenovirus replication. *J Virol* 90:1931–1943. <https://doi.org/10.1128/JVI.02392-15>.
 68. Komatsu T, Sekiya T, Nagata K. 2013. DNA replication-dependent binding of CTCF plays a critical role in adenovirus genome functions. *Sci Rep* 3: 2187. <https://doi.org/10.1038/srep02187>.
 69. Guilfoyle RA, Osheroff WP, Rossini M. 1985. Two functions encoded by adenovirus early region 1A are responsible for the activation and repression of the DNA-binding protein gene. *EMBO J* 4:707–713. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1985.tb03687.x>.
 70. Pardo-Mateos A, Young CS. 2004. Adenovirus IVa2 protein plays an important role in transcription from the major late promoter in vivo. *Virology* 327:50–59. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.06.011>.
 71. Carcamo J, Lobos S, Merino A, Buckbinder L, Weinmann R, Natarajan V, Reinberg D. 1989. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Role of factors IID and MLTF in transcription from the adenovirus major late and IVa2 promoters. *J Biol Chem* 264:7704–7714. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83292-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83292-6).
 72. Lin HJ, Flint SJ. 2000. Identification of a cellular repressor of transcription of the adenoviral late IVa(2) gene that is unaltered in activity in infected cells. *Virology* 277:397–410. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0598>.
 73. Wright J, Atwan Z, Morris SJ, Leppard KN. 2015. The human adenovirus type 5 L4 promoter is negatively regulated by TFII-I and L4-33K. *J Virol* 89: 7053–7063. <https://doi.org/10.1128/JVI.00683-15>.
 74. Ali H, LeRoy G, Bridge G, Flint SJ. 2007. The adenovirus L4 33-kilodalton protein binds to intragenic sequences of the major late promoter required for late phase-specific stimulation of transcription. *J Virol* 81: 1327–1338. <https://doi.org/10.1128/JVI.01584-06>.
 75. Lan S, Ostberg S, Punga T, Akusjarvi G. 2015. A suppressive effect of Sp1 recruitment to the first leader 5' splice site region on L4-22K-mediated activation of the adenovirus major late promoter. *Virus Res* 210:133–140. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.07.026>.
 76. Lan S, Kamel W, Punga T, Akusjarvi G. 2017. The adenovirus L4-22K protein regulates transcription and RNA splicing via a sequence-specific single-stranded RNA binding. *Nucleic Acids Res* 45:1731–1742. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1145>.
 77. Parks CL, Shenk T. 1997. Activation of the adenovirus major late promoter by transcription factors MAZ and Sp1. *J Virol* 71:9600–9607. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.12.9600-9607.1997>.
 78. Toth M, Doerfler W, Shenk T. 1992. Adenovirus DNA replication facilitates binding of the MLTF/USF transcription factor to the viral major late promoter within infected cells. *Nucleic Acids Res* 20:5143–5148. <https://doi.org/10.1093/nar/20.19.5143>.
 79. Evans JD, Hearing P. 2005. Relocalization of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex by the adenovirus E4 ORF3 protein is required for viral replication. *J Virol* 79:6207–6215. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.10.6207-6215.2005>.
 80. Charman M, Herrmann C, Weitzman MD. 2019. Viral and cellular interactions during adenovirus DNA replication. *FEBS Lett* 593:3531–3550. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13695>.
 81. Komatsu T, Quentin-Froignant C, Carlon-Andres I, Lagadec F, Rayne F, Ragues J, Kehlenbach RH, Zhang W, Ehrhardt A, Bystricky K, Morin R, Lagarde J-M, Gallardo F, Wodrich H. 2018. In vivo labelling of adenovirus DNA identifies chromatin anchoring and biphasic genome replication. *J Virol* 92:e00795-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00795-18>.
 82. Cardoso FM, Kato SE, Huang W, Flint SJ, Gonzalez RA. 2008. 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* 378:339–346. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.06.016>.
 83. Price AM, Steinbock RT, Di C, Hayer KE, Li Y, Herrmann C, Parenti NA, Whelan JN, Weiss SR, Weitzman MD. 2011. Adenovirus prevents dsRNA formation by promoting efficient splicing of viral RNA. *Nucleic Acids Res* <https://doi.org/10.1093/nar/gkab896>.
 84. Chen W, Smeekens JM, Wu R. 2016. Systematic study of the dynamics and half-lives of newly synthesized proteins in human cells. *Chem Sci* 7: 1393–1400. <https://doi.org/10.1039/c5sc03826j>.
 85. Baudrimont A, Voegeli S, Vilorio EC, Stritt F, Lenon M, Wada T, Jaquet V, Becskei A. 2017. Multiplexed gene control reveals rapid mRNA turnover. *Sci Adv* 3:e1700006. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700006>.
 86. Suomalainen M, Prasad V, Kannan A, Greber UF. 2020. Cell-to-cell and genome-to-genome variability of adenovirus transcription tuned by the cell cycle. *J Cell Sci* 134:jcs252544. <https://doi.org/10.1242/jcs.252544>.
 87. Donovan-Banfield I, Turnell AS, Hiscox JA, Leppard KN, Matthews DA. 2020. Deep splicing plasticity of the human adenovirus type 5 transcriptome drives virus evolution. *Commun Biol* 3:124. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0849-9>.
 88. Hung G, Flint SJ. 2017. Normal human cell proteins that interact with the adenovirus type 5 E1B 55kDa protein. *Virology* 504:12–24. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.01.013>.
 89. Maheswaran S, Englert C, Lee SB, Ezzel RM, Settleman J, Haber DA. 1998. E1B 55K sequesters WT1 along with p53 within a cytoplasmic body in adenovirus-transformed kidney cells. *Oncogene* 16:2041–2050. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201741>.
 90. Davies RC, Calvio C, Bratt E, Larsson SH, Lamond AI, Hastie ND. 1998. WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev* 12:3217–3225. <https://doi.org/10.1101/gad.12.20.3217>.
 91. Reich NC, Samow P, Duprey E, Levine AJ. 1983. Monoclonal antibodies which recognize native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein. *Virology* 128:480–484. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90274-x](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90274-x).
 92. Hidalgo P, Gonzalez RA. 2015. Isolation of viral replication compartment-enriched sub-nuclear fractions from adenovirus-infected normal human cells. *J Vis Exp* 2015:e53296. <https://doi.org/10.3791/53296>.
 93. Gonzalez RA, Flint SJ. 2002. Effects of mutations in the adenoviral E1B 55-kilodalton protein coding sequence on viral late mRNA metabolism. *J Virol* 76:4507–4519. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.9.4507-4519.2002>.
 94. Quackenbush J. 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 32(Suppl):496–501. <https://doi.org/10.1038/ng1032>.
 95. Murtagh F, Legendre P. 2014. Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithms implement Ward's criterion? *J Classif* 31: 274–295. <https://doi.org/10.1007/s00357-014-9161-z>.
 96. Milligan GW. 1979. Ultrametric hierarchical clustering algorithms. *Psychometrika* 44:343–346. <https://doi.org/10.1007/BF02294699>.
 97. Kolmogorov AN. 1933. Sulla determinazione empirica di una legge di distribuzione. *G Ist Ital Attuar* 4:83–91.
 98. RStudio Team. 2015. RStudio: integrated development environment for R. RStudio, Boston, MA.