



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

“Rol de la maquinaria celular de m⁶A en la replicación y expresión génica del virus respiratorio sincicial humano”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Fabian Figueroa Ahumada

Director del Seminario de Título:

Dra. Mónica Acevedo

Codirector del Seminario de Título

Dr. Ricardo Soto Rifo

Patrocinante del Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono

Abril del 2019

Santiago - Chile

BIOGRAFÍA



Mi nombre es Fabián Alejandro Figueroa Ahumada, nací un 26 de abril del año 1994 en Santiago. He vivido toda mi vida en la comuna de Puente alto, donde hice mi enseñanza básica y media en los colegios Norway School, Araucaria Cordillera y Monte de Asís. Desde pequeño siempre sentí un gusto por la lectura, los juegos de ingenio y las ciencias en general.

Durante mi estancia en el colegio participé de algunos cursos electivos de biología y ferias científicas, lo que, junto los consejos de algunos profesores, me incentivó a elegir la ciencia por sobre otras áreas. Por esto elegí estudiar Ingeniería en Biotecnología en la Universidad de Chile, como una forma de seguir aprendiendo y un día poder ocupar el conocimiento para buscar respuestas y soluciones para las preguntas y problemas que existen o las que nos haremos en un futuro.

DEDICATORIA

En la etapa final de lo que ha sido este paso por la universidad, quiero dedicar este trabajo en primer lugar a mi familia, que me han entregado su afecto y valores a lo largo de mi vida, factores que han sido fundamentales para poder terminar este proceso y forman parte importante de la persona que soy hoy en día.

También quiero dedicar este trabajo a todos los que creyeron en mí (amigos, compañeros de laboratorio, profesores), incluso cuando yo dudaba de mí mismo, porque gracias a ellos crecí mucho, me hicieron cambiar mi perspectiva y me ayudaron a resaltar mis virtudes sobre mis defectos.

A la Dra. Mónica Acevedo y el Dr. Ricardo Soto, quienes fueron mis tutores en esta etapa final, ya que creyeron en mí y me brindaron la oportunidad de trabajar con ellos, me enseñaron mucho, siempre se hicieron un tiempo para responder mis dudas, me ayudaron a crecer como científico, y, sobre todo, como persona.

Finalmente, dedicar un mensaje a la futura persona que pueda leer este trabajo, ojalá sea utilidad y si es otro estudiante, como yo, recordarle que, aunque a veces el camino de la ciencia es complejo y un poco ingrato, si haces lo que te gusta, con pasión y perseverancia, lograrás salir adelante, así que el mejor de los éxitos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia, por su constante apoyo a lo largo del desarrollo de mi carrera, su cariño e incondicionalidad.

Agradecer también a todos los amigos que hice en la carrera, pero en especial, Camila Durán, una de mis mejores amigas, que ha estado en las buenas y en las malas y ha tenido palabras de apoyo para mí, y a Álvaro Thadani y Esteban Valencia, amigos que han estado en todo momento, con quien comparto el gusto por las películas de Marvel, series y hablar de cosas mundanas mientras comemos chatarra.

A los amigos que hice en deporte, sobre todo a Fernando Vera, Sergio González, Claudio Astete, Matías Leal y Constanza Mardones, fieles amigos, grandes personas y grandes profesionales, que también fueron un pilar fundamental para generar un enorme cambio en mi persona e impulsarme a nuevos desafíos.

Sin lugar a dudas, a toda la gente que conocí en el laboratorio. A Camila Pereira y Alessandra Dellarossa, por ser las primeras en acogerme, enseñarme, con mucha paciencia, como trabajar en el laboratorio, recordarme lo importante que es nunca dejar de hacer las cosas que te apasionan y que los amigos y familia son lo más importante. A Natalia Poblete, por su buena onda, su humor, su ayuda y confianza. A Daniela Toro, porque aparte de ser una excelente persona y científica, siempre está dispuesta a ayudar y enseñar al que lo necesite. Francisco García de Gracia, por compartir ese humor “negro” con el que tanto reíamos (más él que yo, cabe decir) y por siempre hacerse un tiempo para ayudar, resolver dudas o dar un consejo, aunque a veces fueran pésimos. Sebastián Riquelme, que pese a ponerme apodoso solo para hacerme rabiar, es una excelente persona, científico y amigo (igual de bueno para enojarse que yo, o más, aunque lo niegue). Felipe Velásquez, una tremenda persona, humilde, carismático y gentil, capaz de siempre sacarte una sonrisa, incluso en los días más complejos. A Bárbara Araya, porque siempre tuvo buena predisposición para resolver mis dudas y por su siempre, aunque a veces un poco dura, honestidad. A Joseline y Alonso, con quienes trabajamos codo a codo, por su constante apoyo, por todas las sonrisas, su complicidad, confianza y respeto. A Paulina Aguilera, por ser una gran amiga, con una enorme predisposición a ayudar a la gente y siempre dispuesta a compartir lo que ella sabe. Al Dr. Fernando Valiente, por su alegría, liderazgo y humildad, un enorme ejemplo de superación y enseñarme que somos nosotros quienes nos ponemos límites. Y en general, a todos los agradezco por ayudarme a disfrutar un poco más de la vida, por sus sonrisas, amistad y el apoyo cada vez que lo necesite.

Finalmente, a mis tutores, la Dra. Mónica Acevedo y el Dr. Ricardo Soto. A Ricardo por aceptarme cuando iba en mi tercer año de carrera, dándome la oportunidad de empezar con una pasantía, la cual me permitió aprender mucho, ganar confianza y el cariño y fascinación por la virología. Por apoyarme en mis objetivos y por siempre darse el tiempo de escuchar mi opinión, mostrarme mis fortalezas y debilidades, y cuando fue necesario, aconsejarme respecto a mis dudas y problemas. A Mónica, por su enorme apoyo tanto en lo personal como lo profesional, por su paciencia, por su respeto, su enorme calidez como persona, por sus consejos y por siempre hacerse un tiempo para oír lo que tenía para decir, ya fuera alguna idea de que hacer o simplemente, para preguntarme como estaba. Ambos han sido, son y serán una enorme fuente de inspiración para mi hacer como científico, pero también como personas y líderes. Les agradezco enseñarme que al final del día, mi más grande enemigo y barrera a superar, son mis propios miedos e inseguridades.

INDÍCE DE CONTENIDOS

Biografía	I
Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Índice de Contenidos	IV
Índice de Tablas	V
Índice de figuras	VI
Lista de Abreviaturas.....	VII
Resumen.....	VIII
Introducción	1
Hipótesis	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos	9
Materiales Y Métodos	10
2.1 Producción de VRSh e infección de células HeLa	10
2.2 Determinación del título viral	10
2.3 Transfección e infección de células HEK-293T	11
2.4 Extracción de proteínas y cuantificación de proteínas	11
2.5 Western blot	12
2. 6 Extracción de ARN	13
2.7 RT-qPCR	13
2.8 Inmunoprecipitación	15
Resultados	17
3.1 Efecto de las proteínas metiltransferasas (escritoras)	17
3.2 Efecto de las proteínas desmetilasas (borradoras)	19
3.3 Efecto de las proteínas de unión a m6A (lectoras)	22
3.4 Unión de las proteínas lectoras a ARNg de VRS	24
Discusión y Proyecciones	26
Conclusiones	32
Referencias	33

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Ejemplos de virus que ven regulada su infección/replicación por la modificación m6A	5
TABLA 2. Partidores utilizados para RT-PCR y qPCR. La secuencia resaltada corresponde a la secuencia del partidor tag.....	14

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Proteínas que participan en la modificación m6A.....	3
FIGURA 2. Replicación y transcripción de VRSh.....	7
FIGURA 3. Esquema del genoma de VRSh.....	8
FIGURA 4. Perfiles térmicos para reacciones de transcripción reversa (RT) y PCR cuantitativo (qPCR).....	15
FIGURA 5. Efecto de la sobreexpresión de proteínas METTL3 y 14 en la expresión de la proteína viral F.....	18
FIGURA 6. Análisis de abundancia de ARN mensajeros y genómicos al sobreexpresar METTL3 y METTL14.....	19
FIGURA 7. Efecto de la sobreexpresión de proteínas FTO en la expresión de la proteína viral F.....	20
FIGURA 8. Análisis de abundancia de ARN mensajeros y genómicos al sobreexpresar FTO	21
FIGURA 9. Efecto de la sobreexpresión de proteínas ALKBH5 en la expresión de la proteína viral F	21
FIGURA 10. Análisis de abundancia de ARN mensajeros y genómicos al sobreexpresar ALKBH5	22
FIGURA 11. Efecto de la sobreexpresión de proteínas YTHDF1,2 y 3, en la expresión de la proteína viral F	23
FIGURA 12. Análisis de abundancia de ARN mensajeros y genómicos al sobreexpresar las proteínas YTHDF1 ,2 y 3.....	24
FIGURA 13. Enriquecimiento de ARN genómicos de VRSh al inmunoprecipitar proteínas YTHDF1, 2 y 3.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR Región 3' no traducida	qPCR PCR cuantitativo
ADN Ácido Desoxirribonucleico	RRE Elemento de Respuesta a Rev
IAV Virus de la Influenza Tipo A	RT Transcripción Reversa
ALKBH5 Dioxigenasa Número 5 Homologa a ALKB dependiente de Alpha-cetoglutarato	SDS Dodecil sulfato de sodio
ARN Ácido Ribonucleico	TBS Solución salina Tris-tamponada
ARNc ARN complementario al genoma viral	TBS-T Solución salina Tris-tamponada con Tween 20
ARNg ARN genómico Viral	TEMED N, N, N',N' tetrametiletildiamina
ARNm ARN Mensajero	Tween 20 Polisorbato 20
DTT Ditioneitol	Tris-HCL Tris-Clorhidrato
FTO Proteína Asociada a la Obesidad y Masa Corporal	VRS_h Virus respiratorio sincicial humano
HCV Virus de la Hepatitis C	VIH-1 Virus de la Inmunodeficiencia Humana de tipo 1
IP Inmunoprecipitación	WB Western Blot
m⁶A N-6-metiladenosina	YTHDF1 Proteína 1, Miembro de la Familia de Dominio YTH
METTL3 Proteína Metiltransferasa Tipo 3	YTHDF2 Proteína 2, Miembro de la Familia de Dominio YTH
METTL14 Proteína Metiltransferasa Tipo 14	YTHDF3 Proteína 3, Miembro de la Familia de Dominio YTH
mg Miligramo	ZKV Virus Zika
mM Milimolar	µg Microgramos
mL Mililitro	µL Microlitros
NP-40 nonyl phenoxy polyethoxy ethanol	
ORF Marco de Lectura Abierto	
PBS Buffer Fosfato Salino	
PCR Reacción de polimerasa en cadena	

RESUMEN

N⁶-Metiladenosina (m⁶A) es la modificación química más abundante encontrada en los ARN mensajeros (ARNm) de células eucariontes. Esta modificación regula el metabolismo de los ARNm a diferentes niveles incluidos el corte y empalme de exones, traducción, estabilidad y degradación. Existen tres grupos de proteínas que regulan estos procesos: aquellas que catalizan la adición de la modificación, las proteínas metiltransferasas METTL3 y METTL14, las que remueven la metilación, las desmetilasas FTO y ALKBH5, y finalmente, las que reconocen m⁶A y actúan como efectoras de esta modificación, las proteínas lectoras YTHDF1,2 y 3.

Recientemente se ha descrito la presencia de m⁶A en el ARN de diferentes virus que replican en el citoplasma, como los virus de la hepatitis C, virus Zika e influenza A, donde la modificación m⁶A regula la expresión de proteínas virales, estabilidad de los ARN virales (genómicos y mensajeros) y por ende la replicación viral. Sin embargo, se desconoce su rol en la replicación de otros virus de importancia clínica, como el virus respiratorio sincicial humano (VRSh).

VRSh es uno de los principales causantes de enfermedades respiratorias en menores de 3 años, adultos mayores e inmunodeprimidos. Es un virus que infecta células del tracto respiratorio replicando en el citoplasma de estas. Posee un ARN genómico de simple hebra de polaridad negativa y actualmente no existen vacunas licenciadas ni tratamientos antivirales para combatir su infección.

El objetivo de este trabajo fue determinar si las proteínas que participan en la adición, remoción y reconocimiento de m⁶A, tienen un impacto en la replicación del VRSh. Para esto, se sobreexpresaron las proteínas metiltransferasas, desmetilasas y lectoras en células HEK293T infectadas con VRSh y se estudió la expresión de la proteína viral de fusión (F) por Western Blot (WB). Además, se cuantificó los niveles

del ARNm de F y el ARN genómico intra y extracelular mediante RT-qPCR bajo las mismas condiciones.

Los resultados obtenidos muestran que la sobreexpresión de las metiltransferasas disminuyó la expresión de la proteína F y los niveles del ARNg viral, mientras que la sobreexpresión de las desmetilasas tuvo el efecto contrario, sugiriendo que m⁶A afecta de forma negativa la expresión de proteínas virales y la replicación del genoma de VRSh.

Por otra parte, la sobreexpresión de las proteínas YTHDF1, 2 y 3 aumentó los niveles del ARNm de la proteína F, aunque disminuyó los niveles del ARNg del virus. Además, mediante ensayos de inmunoprecipitación de estas proteínas se observó que tanto YTHDF1, 2 y 3 se unen al ARNg de VRSh, sugiriendo que la modificación m⁶A se encuentra en el ARNg de VRSh.

En conjunto, estos resultados sugieren la presencia de m⁶A en el ARN de VRSh, posiblemente regulando la síntesis de ARN mensajeros y ARN genómico, al igual que la expresión de proteínas virales, mediado por la actividad de las proteínas YTHDF1, 2 y 3.

INTRODUCCIÓN

N⁶-metiladenosina (m⁶A) es la modificación química interna más abundante en los ARNm (1) y fue descrita en los años 1970 en diferentes líneas celulares y virus que replican en el núcleo celular (Dubin & Taylor, 1975; Lavi & Shatkin, 1975; Perry, Kelley, Friderici, & Rottman, 1975; C. Wei & Gershowitz, 1975). Se determinó que la modificación m⁶A se encuentra dentro de la secuencia consenso RRACH (R=A o G; H=A, C o U). Sin embargo, pese al número de veces que podían observar este motivo en una secuencia, solamente algunos residuos de adenosina se encuentran metilados (m⁶A), lo que fue una primera evidencia de que la presencia de esta modificación no depende solo del motivo RRACH, sino que debe existir otros mecanismos de regulación (Batista, 2017). Fue hasta hace unos pocos años, que se masificó y profundizó el estudio de m⁶A gracias a técnicas de secuenciación de alto rendimiento que han permitido caracterizar desde la topología de esta modificación a nivel de transcriptoma así como también las diferentes proteínas involucradas en la adición de la metilación, hasta el rol que cumple la m⁶A en la regulación de diversas etapas del metabolismo de los ARNm (Dominissini et al., 2012; Meyer K. et. al, 2013).

La capacidad de m⁶A para regular el metabolismo de los ARNm, radica en tres grupos de proteínas: escritoras, borradoras y lectoras. Estas proteínas hacen de la regulación mediada por m⁶A un proceso dinámico. Debido a la similitud con la regulación epigenética, la regulación mediada por m⁶A a nivel de ARNm se denomina epitranscriptómica (Cui et al., 2017). Las proteínas escritoras son un complejo de proteínas que catalizan la adición de la metilación a una adenosina y está compuesto principalmente por las metiltransferasas 3 y 14 (METTL3, METTL14), de 68 y 60 kDa respectivamente, que actúan como un heterodímero (Liu et al., 2014). Pese a que ambas poseen un dominio metiltransferasa, la que transfiere el grupo metilo a la adenosina es METTL3, mientras que METTL14 estabiliza la interacción entre METTL3 y el ARN blanco (Śledź & Jinek, 2016; Wang, P., Doxtade, K. A. and Nam, 2015; Xiang

Wang et al., 2016). Existe evidencia que la adición de esta modificación ocurriría durante la transcripción de un ARN, es decir, sería co-transcripcional. Esta proposición se basa en que se ha observado que existe una mayor interacción entre el complejo metiltransferasa y la ARN polimerasa II (ARNPII), y por ende, un aumento de m⁶A, cuando la velocidad de transcripción disminuye o existen múltiples pausas durante este proceso (Slobodin et al., 2017).

Principalmente, se ha observado que la modificación m⁶A se encuentra en regiones 3'-UTR, regiones cercanas a los codones de término e intrones, lo que sugiere que la regulación de la expresión génica, por parte de m⁶A, es a nivel post-transcripcional (Śledź & Jinek, 2016). Por otra parte, el descubrimiento de las proteínas desmetilasas o borradoras de m⁶A dieron la primera evidencia de que esta modificación pudiese ser dinámicamente regulada en la célula (Figura 1). A la fecha, se han descrito dos enzimas que cumplen esta función: FTO y ALKBH5. Ambas pertenecen a la familia de proteínas dioxigenasa AlkB no-heme Fe(II)- y α-ketoglutarato-dependiente y no requieren de un motivo específico en los ARNm para catalizar su función (Zou et al., 2016). Finalmente, las proteínas lectoras o efectoras que se unen a ARNm que contienen m⁶A, regulan el metabolismo de los ARNm modificados, ya sea por medio de un aumento en los niveles de traducción o por la degradación del ARNm modificado, entre otros mecanismos. Dentro de este grupo de proteínas encontramos principalmente aquellas proteínas que poseen un dominio YTH (dominio con homología a YT521-B), que es el que reconoce m⁶A (Figura 1) (Dominissini et al., 2012; Schwartz et al., 2014; Xiao et. al. Wang, 2014). Entre los miembros de esta familia de proteínas se encuentran aquellas que localizan en el núcleo, como YTHDC1, y en el citoplasma, como son las proteínas YTHDF 1, 2 y 3, además de la proteína YTHDC2. Las proteínas lectoras de m⁶A mejor caracterizadas son YTHDF1-3, las que cumplen diferentes roles. Por su parte, la proteína YTHDF1 es una proteína que interactúa con proteínas de la maquinaria de traducción, como el factor de inicio

de la traducción eIF3, lo que promueve la traducción de sus ARNm blanco metilados (Xiao et. al. Wang, 2015). Por otra parte, la proteína YTHDF2 traslada los ARNm metilados que no están siendo traducidos hacia los cuerpos de procesamiento (*P-bodies*), promoviendo el reclutamiento del complejo deadenilasa CCR4-NOT que elimina la cola poli-A de ARNm, favoreciendo así su degradación (Du et al., 2016; Xiao et. al. Wang, 2014). La proteína YTHDF3, pese a que se ha observado que tiene un impacto en la expresión de génica, aún se desconoce por cual mecanismo lo hace. Sin embargo, se especula que tiene un rol cooperativo con las proteínas YTHDF1 e YTHDF2 promoviendo la traducción o la degradación de ARNm metilados, respectivamente (Shi et al., 2017).

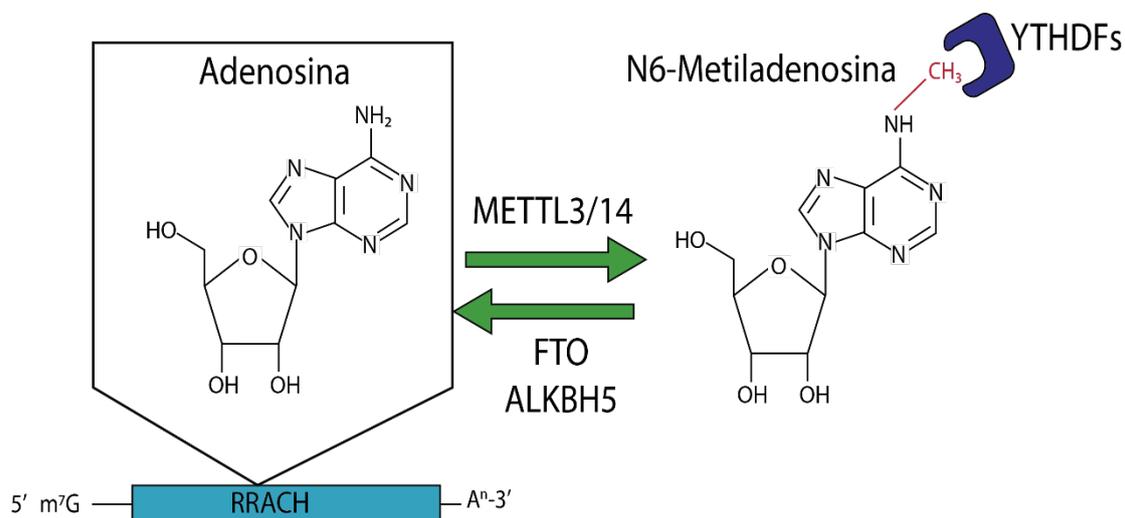


Figura 1. Proteínas que participan en la modificación m⁶A. La metilación de adenosinas presentes dentro de una secuencia RRACH (R: A o G/H: A, C o U) es catalizada por el heterodímero formado por las proteínas METTL3 y METTL14 en conjunto con otros cofactores. La remoción de esta modificación es realizada por las proteínas FTO y ALKBH5, sin la necesidad de una secuencia específica. Finalmente, el efecto de esta modificación es catalizado por las proteínas de unión a m⁶A, como son las proteínas con dominio YTH.

En la actualidad se ha observado la presencia de m⁶A en los ARNm de diferentes organismos eucariontes, como *Sacharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* y en diferentes mamíferos, demostrando que la regulación a través de esta modificación es muy conservada. En estos organismos se

ha observado que m⁶A cumple un rol fundamental, ya que la carencia de las proteínas que regulan esta modificación impide un correcto desarrollo de estos organismos (Agarwala, Blitzblau, Hochwagen, & Fink, 2012; Bodi et al., 2012; Clancy, 2002; Lence et al., 2016; Vespa, 2004; Zhao et al., 2017; Zhong et al., 2008).

Recientemente, se ha descrito la participación de m⁶A en enfermedades como el cáncer donde se ha identificado que m⁶A regula la expresión de diferentes oncogenes y genes supresores de tumores. Por ejemplo, un silenciamiento de las proteínas metiltransferasas, METTL3 y/o METTL14, tuvo como efecto un aumento en los niveles de expresión de los oncogenes KLF4, ADAM19, EPHA3, mientras que se ve disminuida la expresión de los genes supresores de tumores CDKN2A y BRCA (Cui et al., 2017).

En los últimos años se ha estudiado el rol de m⁶A en la biología de diferentes virus de relevancia en la salud de la población (Tabla 1) como son VIH-1, virus de la hepatitis C (HCV), virus Zika (ZIKV) y el virus influenza A (IAV), bajo la premisa de que esta modificación se había encontrado en los ARNm del virus del sarcoma de Rous entre otros (Dubin & Taylor, 1975)(Pereira-Montecinos, 2017). En VIH-1 se ha descrito la presencia de m⁶A en el ARN genómico y, tres grupos distintos han estudiado el rol de esta modificación en la replicación de este virus (Kennedy et al., 2016; Lichinchi, Gao, et al., 2016; Tirumuru et al., 2016) en los que han llegado al consenso de que al disminuir la expresión de METTL3/14 conlleva a una disminución en la expresión de proteínas virales debido a una disminución de los niveles de ARNm que codifican para estas proteínas. Por el contrario, el silenciamiento de FTO y ALKBH5, aumenta la expresión génica y los niveles de ARNm viral (Lichinchi, Zhao, et al., 2016; Tirumuru et al., 2016). Sin embargo, no han podido llegar al consenso de cuál es el efecto que tienen las proteínas de unión a m⁶A, ya que algunos grupos proponen que ayudan a la expresión génica viral (Kennedy et al., 2016; Lichinchi, Zhao, et al., 2016) y otro que disminuyen la infectividad de las partículas. (Tirumuru et al., 2016).

Por otra parte, se ha reportado que, pese a replicar en el citoplasma, los flavivirus como HCV y ZIKV poseen m⁶A en sus ARN y son regulados por la maquinaria (escritoras, borradoras y lectoras). Esto debido a que las proteínas escritoras y borradoras también se encuentran a nivel citoplasmático (Gokhale et al., 2016; Lichinchi, Zhao, et al., 2016). En HCV se ha observado que las proteínas YTHDF1, 2 y 3 cambian su localización subcelular concentrándose en gotas lipídicas, regiones subcelulares donde se lleva a cabo la replicación viral, donde se unen a los ARN virales que poseen la modificación m⁶A (Gokhale et al., 2016). En conjunto con lo observado en VIH-1 y HCV, se puede concluir que el efecto que puede tener m⁶A variará dependiendo del virus, por lo que es necesario estudiar cada caso en particular.

Tabla 1. Ejemplos de virus que ven regulada su infección/replicación por la modificación m⁶A

Virus	Función atribuida a la presencia de m ⁶ A	Referencia
Virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1 (VIH-1)	- Participa en exportar ARNg del virus por la vía dependiente de Rev y aumenta la abundancia de ARNm virales. - YTHDF1-3 inducen la degradación de ARN virales después de la entrada del virus.	(Kennedy et al., 2016; Lichinchi, Gao, et al., 2016; Tirumuru et al., 2016)
Virus Hepatitis C	YTHDF1-3 inducen la degradación del ARN viral	(Gokhale et al., 2016)
Virus Zika	YTHDF1-3 inducen la degradación del ARN viral	(Gokhale et al., 2016; Lichinchi, Zhao, et al., 2016)
Virus influenza A	YTHDF1-3 inducen a un aumento en la expresión de transcritos virales y en la replicación	(Courtney et al., 2017)

El virus respiratorio sincicial humano (VRS_h), al igual que HCV, ZIKV e influenza A, es un virus que replica exclusivamente en el citoplasma de la célula que infecta y

actualmente no existen antecedentes de que sea regulado a nivel epitranscriptómico. VRSh es el principal causante de enfermedades respiratorias en niños menores de 3 años, inmunodeprimidos y adultos mayores, para el cual actualmente no existen vacunas o antivirales aprobados. Únicamente existe el anticuerpo monoclonal contra la proteína de fusión de este virus, que se utiliza como profilaxis en prematuros previo a las temporadas de invierno, época en la que destacan las infecciones por este virus (Junge, Nokes, Simões, & Weber, 2016; Olchanski et al., 2018).

VRSh pertenece al género *Orthopneumovirus* dentro de la familia *Pneumoviridae* (Amarasinghe et al., 2018). Es un virus envuelto, con un genoma de ARN de polaridad negativa de aproximadamente 15,2 Kb que se caracteriza por la formación de sincicios, que corresponden a la fusión de las membranas plasmáticas de las células infectadas por acción de la proteína de fusión del virus (Collins & Karron, 2013). El genoma de VRSh está compuesto por 10 genes que codifican para 11 proteínas: NS1, NS2, N, P,M,SH,G,F M2-1,M2-2 y L (Figura 2), en el extremo 3' del genoma se encuentran las secuencias leader (Le) y en el extremo 5' se encuentra la secuencia trail (Tr). La secuencia Le consta de 44 nucleótidos y es esencial para el inicio de la transcripción de los ARNm virales y la replicación del genoma, donde este último proceso requiere de la síntesis de un antígenoma complementario, que será utilizado para la síntesis del genoma viral y que posee una región TrC (secuencia complementaria a Tr), esencial para este proceso (Figura 2) (Peeples & Collins, 2000). Dentro de la región Le, se ha descrito que los nucleótidos del 1-13, son suficientes para reclutar el complejo de la ARN polimerasa L del virus e iniciar la transcripción de genes virales y la replicación de su genoma, mientras que para la síntesis del antígenoma completo, son requeridos los nucleótidos del 1-44 de la región Le (Fearn, Peeples, & Collins, 2002).

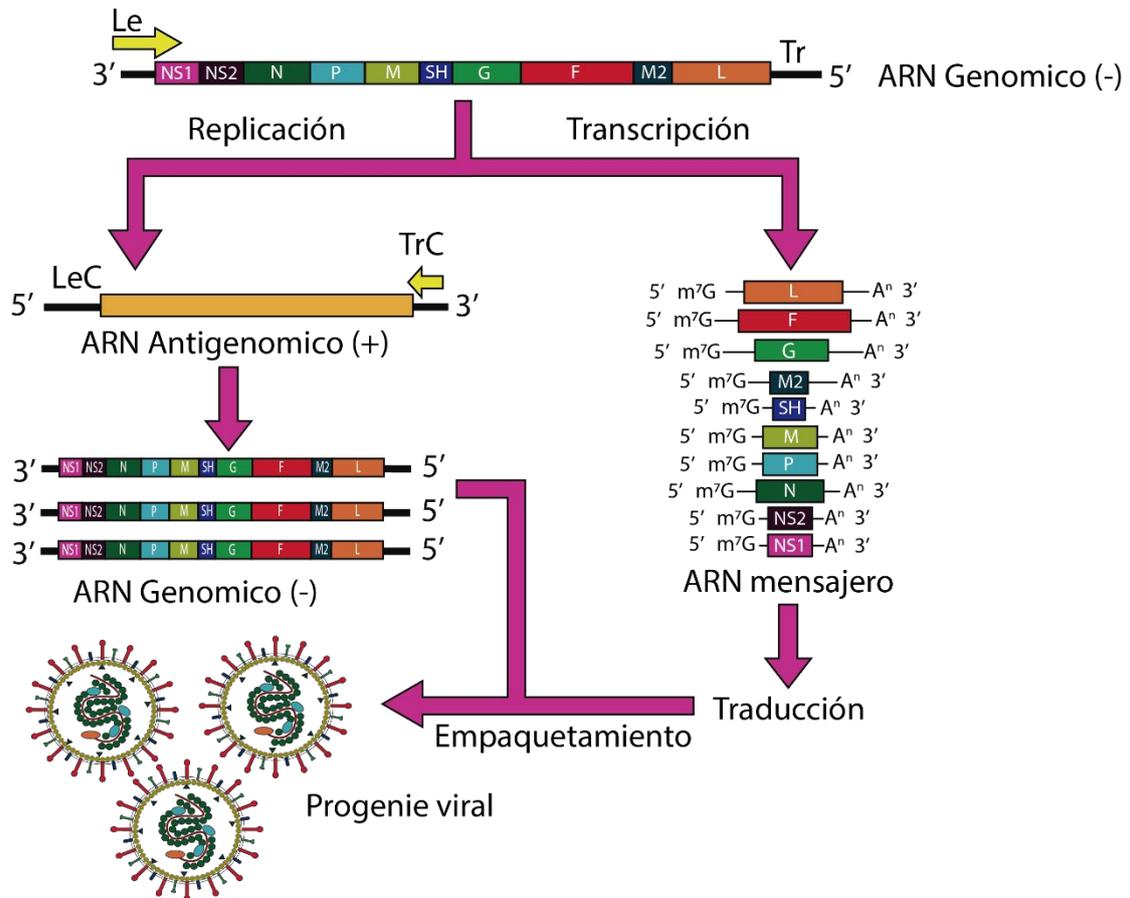


Figura 2. Replicación y transcripción de VRSh El ARNg de VRSh es usado como matriz para la transcripción de los genes virales y para la síntesis del antigenoma, secuencia complementaria al genoma, que es necesario para la replicación del genoma viral. Ambos procesos son realizados por la ARN polimerasa viral dependiente de ARN.

La transcripción de los genes virales comienza con la unión de la ARN polimerasa L en la señal de inicio *Gene-Start* (GS), que se encuentra río arriba de cada gen, y finaliza en la señal *Gene-End* (GE), que se encuentra río abajo de cada gen. Además la ARN polimerasa L participa en la adición del cap a los ARNm nacientes, el cual es fundamental para la elongación estable del gen hasta la señal GE, permitiendo así la liberación del ARNm y por ende, la unión de la ARN polimerasa a la señal GS del gen siguiente (Kuo, Grosfeld, Cristina, Hill, & Collins, 1996).

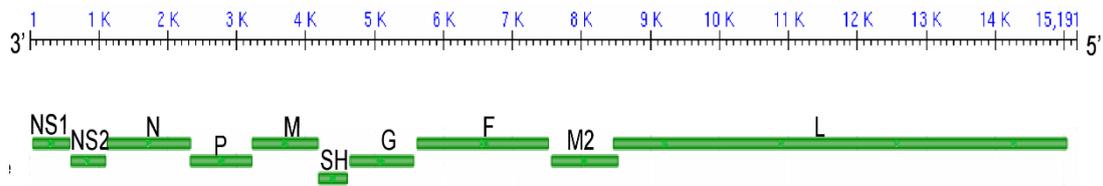


Figura 3. Esquema del genoma de VRSh El genoma de VRSh está compuesto por 10 genes, que codifican para 11 proteínas, siendo el caso M2 donde se encuentran dos marcos de lectura abierto (ORF), dando origen a las proteínas M2-1 y M2-2. En los extremos se encuentran las regiones “le” y “tr”, que son esenciales para la transcripción y replicación de VRSh.

A diferencia de los otros genes, M2 tiene dos marcos de lectura abierto (ORF) que se sobrelapan por lo que da origen a 2 proteínas (Figura 3), M2-1 que es la proteína anti-terminación de la transcripción y M2-2, que está involucrada en la regulación de la transición desde transcripción a replicación. Controlar los niveles de expresión de M2-2 parece ser esencial para el virus, ya que la sobreexpresión de esta proteína es negativa para la replicación viral, al igual que la pérdida de esta (Cheng, Park, Zhou, & Jin, 2005; Collins, P. L., Bermingham, 1999).

Resulta evidente que el metabolismo de los ARN virales, la regulación de la transición de transcripción a replicación o el cambio en el marco de lectura que ocurre en el gen M2, es esencial para la replicación exitosa de VRSh. Es por esto, en conjunto a lo observado en otros virus que replican en el citoplasma, que surge la interrogante de si una modificación de los ARN virales, como es m⁶A, estaría regulando el metabolismo de los ARN mensajero y genómico de VRSh y, por consiguiente, la replicación viral, lo que permitiría una mayor comprensión del ciclo de vida de este virus y sería la primera evidencia que la replicación en VRSh sería regulada a nivel epitranscriptómico.

HIPÓTESIS

La maquinaria de m⁶A celular regula la replicación y expresión génica de VRSh.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el rol de la maquinaria de m⁶A en la replicación y la expresión génica de VRSh.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el efecto de la sobreexpresión de las proteínas escritoras, borradoras y lectoras de m⁶A, en la expresión de la proteína viral F.
2. Analizar el efecto de la sobreexpresión de las proteínas escritoras, borradoras y lectoras de m⁶A en los niveles del ARNm que codifica para la proteína viral F.
3. Analizar el efecto de la sobreexpresión de las proteínas escritoras, borradoras y lectoras de m⁶A en los niveles de ARNg de VRSh

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de VRSh e infección de células

La producción de los virus se realizó mediante la infección de células Hep-2 (ATTC® CCL-23™), con el virus respiratorio sincicial cepa Tracy_____ en botellas T75 al 75% de confluencia con medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) y una mezcla de penicilina/estreptomicina. El sobrenadante se recuperó a los 4-5 días post infección o hasta observar un 80% de efecto citopático y se almacenó en alícuotas a -80°C.

Determinación del título viral

Para determinar el título viral, se realizaron ensayos de placas de lisis. Para esto, se sembraron células Hep-2 en placas de 6 pocillos y se esperó hasta que alcanzaran una confluencia de 80-90% (1-2 días). Luego, se retiró el medio de cultivo y se infectaron con 500µl de diluciones seriadas (por duplicado) 10⁻⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ de una alícuota de sobrenadante conteniendo VRS en DMEM suplementado con 3% SFB. El virus fue adsorbido durante dos horas con agitación cada 15 minutos. Posteriormente el medio de cultivo se reemplazó por 2-3 mL de una mezcla de DMEM 2X suplementado con SFB 3% y agarosa al 1,2% en proporciones iguales (1:1). Se incubó a 37 °C durante 7 días, se fijaron las células con 1mL de para-formaldehído 4% durante 15-30 minutos. Luego, las células se lavaron con agua destilada retirando la mezcla de agarosa y para-formaldehído. Las células se tiñeron con cristal violeta al 2% (diluido en agua ultra pura) durante 30 minutos. Las células se lavaron y se contaron las unidades formadoras de placas (PFU) en cada dilución. El título viral se determinó utilizando la ecuación 1

$$\text{Ecuación 1 } PFU/ml = \frac{PFU\#1+PFU\#2}{0,5 \text{ ml volumen total}^*} \times \text{Factor de Dilución}$$

*Volumen utilizado para infectar.

Transfección e infección de células HEK-293T

Para estudiar el efecto de la maquinaria de m⁶A, se transfectaron 120.000-200.000 células de la línea HEK293T en placas de 12 pocillos, con 1 µg o 2 µg de cada plásmido usando Fugene6® (Promega) según el protocolo del fabricante, utilizando los siguientes plásmidos: pCDNA-Flag-METLL3 (Addgene Plasmid #53739) y pCDNA-Flag-METTL14 (Addgene Plasmid #53740), para la sobreexpresión de las proteínas escritoras; pCDNA-Flag-YTHDF1 (Cedido por Dr. Ricardo Soto), pCDNA-Flag-YTHDF2 (Addgene Plasmid #53200) y pCDNA-Flag-YTHDF3 (Cedido por Dr. Ricardo Soto), que codifican las proteínas lectoras y pEGFP-ALKBH5-GFP (Cedido por Dr. Ricardo Soto) o pCDNA-3xFlag-FTO (Cedido por Dr. Ricardo Soto) para las proteínas borradas de m⁶A. Después de 6 horas de transfección, se les cambió el medio y las células fueron infectadas con VRSh a cepa Tracy a una MOI de 1 por 24 horas.

Extracción de proteínas y cuantificación de proteínas

Células HEK293T previamente transfectadas e infectadas, se soltaron por incubación con 100-200 µl de tripsina por 3 min. Las células se resuspendieron con PBS 1X y se concentraron por centrifugación a 5000 rpm por 3 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió con 100 µl de solución de lisis NP-40 (Tris-HCl pH 7,4 10mM, NaCl 100mM, EDTA 1mM, NP-40 al 0,5% y coctel de inhibidor de proteasas cComplete™ 1X (Roche) y se incubó en hielo durante 20 min. Finalmente se centrifugó durante 20 minutos a 4 °C a 12.000 rpm. Se conservó el sobrenadante y se procedió a cuantificar las proteínas o se almacenaron a -20 °C.

Los extractos de proteínas fueron cuantificados mediante método de Bradford (Kruger, 1996). En placas de 96 pocillos, se agregó 199 µl de Bradford 1X por pocillo y 1 µl del lisado celular resuspendiendo brevemente, y se incubó por 3 minutos, para posteriormente determinar la absorbancia a 596 nm utilizando el equipo Synergy™

HTX Multi-Mode Microplate Reader (BioTek). La medición de cada muestra se realizó por duplicado y se calculó el promedio de la absorbancia. Finalmente, se extrapolo la absorbancia a una curva previamente construida con diferentes concentraciones de BSA diluido en solución de lisis NP-40.

Western blot

Se cargaron 20 µg de proteínas totales con solución de carga a una concentración 1X (20% Glicerol, 10% SDS, 25% β- Mercaptoetanol, 0.125M Tris-HCL pH 6.8, 0.0625% Azul de Bromofenol) en geles de poliacrilamida al 10%. La electroforesis se corrió durante 105 minutos a 120V en solución de corrida 1X (3,03g de Tris-Base 250 mM, 14,4g de glicina, 1g de SDS y aforado a 1L con agua destilada estéril). Posteriormente, se realizó la transferencia hacia una membrana de nitrocelulosa en solución de transferencia 1X (3,03g de Tris-Base 250 mM, 14,4g de glicina, 200 ml de metanol y aforado a 1L con agua destilada estéril) a 120V durante 60-90 minutos. Las membranas se bloquearon con solución de bloqueo Blotting-Grade Blocker (BioRad) al 5% en TBS-T 1X (TBS 1X, 1% Tween -20) durante 1 hora. Luego de lavar 3 veces con TBST 1X, se incubó con cada anticuerpo primario correspondiente: (1) el anticuerpo mouse anti-F (2F7, Santa Cruz) se utilizó para detectar la proteína F del virus a una dilución 1:500 en solución de bloqueo al 2% en TBS-T 1 X durante 16 horas a 4 °C, (2) el anticuerpo mouse anti- GAPDH (Santa Cruz, sc-5190), que se utilizó como control de carga a una dilución 1:5000 en solución de bloqueo al 5% en TBS-T 1X durante 16 horas a 4 °C y (3) el anticuerpo rat anti- Flag (BioLegend,637303) a una dilución 1:5000 para detectar las proteína sobreexpresadas, Flag-METTL3,Flag-METTL14, 3xFlag-FTO-Flag y mouse anti-GFP (Santa Cruz,sc-9996) a una dilución 1:5000 para detectar ALKBH5-EGFP durante 16 horas a 4 °C. Luego de lavar la membrana 3 veces con TBS-T 1X se incubó con los anticuerpos secundarios: goat anti-mouse-HRP (Jackson Inmuno Research, 115-035-003) en la dilución 1:2000 y goat anti-Rat-HRP (Jackson Inmuno Research,

112-035-175) en una dilución 1:30000 y se incubaron durante 60-90 minutos a temperatura ambiente. Luego de cada incubación, se realizaron 3 lavados con TBS-T 1X.

El revelado de las membranas se realizó mediante el kit de revelado “Pierce® ECL Western Blotting Substrate” (Thermo Fisher Scientific, 32106) y el uso del escáner de quimioluminiscencia C-Digit® Blot Scanner (Li-Cor).

Extracción de ARN

La extracción de ARN total se realizó a la sedimentación de las células HEK293T transfectadas e infectadas y su sobrenadante (conteniendo las partículas virales en suspensión), utilizando TRIzol Reagent (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del proveedor.

RT-qPCR

A partir de extractos de ARN de células infectadas y sobrenadante, se realizó una transcripción inversa con el kit *High Capacity cDNA Reverse transcription* (Applied Biosystems) con la siguiente mezcla de reacción: tampón RT 1X, 2 mM de dNTP's, 1µM de cada partidor, 25 unidades de enzima transcriptasa reversa (Multiscribe-Thermo Fisher Scientific, 4311235) y 2µl de muestra para un volumen final de 10 µl. Los partidores utilizados en esta reacción (obtenidos en Integrated DNA Technologies) son RNA-F(-) RSV/RT o RNA-F(+) RSV/RT, en conjunto con HMBS-reverse (Tabla 2), para la amplificación del ARNg y ARNm del fragmento del gen F de VRSh, respectivamente (Tabla 2). La secuencia destacada, corresponde a una “cola”, para la amplificación específica del gen viral durante la fase de cuantificación por PCR (qPCR), evitando la amplificación de regiones inespecíficas (Bessaud M, 2008). El perfil térmico utilizado se muestra en la Figura 4A.

Posteriormente, se realizó el qPCR utilizando el partidor *Tag-cDNA/RSV* tanto para la amplificación del ARNg y ARNm, y los primer *cDNA-F(-)RSV* o *cDNA-F(+)RSV*,

respectivamente. Como gen de referencia se amplificó el gen HMBS, para lo cual se utilizaron los partidores *HMBS forward* y *HMBS reverse* (Tabla 2). El perfil térmico de amplificación se muestra en la Figura 4. La mezcla de reacción contiene 10 µl de *2X Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix* (Agilent Technologies), 4 µl de cDNA, 300nM de los partidores *Tag-cDNA/RSV* y cDNA-F(-) RSV(qPCR) o cDNA-F(+) RSV(qPCR) para amplificar el gen F del ARNg o ARNm, respectivamente. Paralelamente, se amplificó el gen HMBS con las mismas condiciones señaladas antes. La reacción se llevó a cabo en el equipo AriaMX de Agilent con el perfil térmico indicado en la Figura 4B. Se realizó una cuantificación relativa de cada gen usando la formula descrita por Pfaffl (Ecuación 2), que considera la eficiencia (E) de los partidores para el gen objetivo (*target*) (F) y el gen de referencia (*reference*) (HMBS) (E=1,92 y E=1,95 respectivamente) (Pfaffl, 2001).

Tabla 2. Partidores utilizados para RT-PCR y qPCR. La secuencia resaltada corresponde a la secuencia del partidor tag

Nombre Partidor	Secuencia
RNA-F(-) RSV/RT	5'- CGG TCA TGG TGG CGA ATA AAT TGA TCA ATG ATA TGC CTA TAA-3'
RNA-F(+) RSV/RT	5'- CGG TCA TGG TGG CGA ATA ATA TTA TAG ACA TGA TAG AAT AAC T-3'
Tag-cDNA/RSV	5'- CGG TCA TGG TGG CGA ATA A -3'
cDNA-F(-) RSV(qPCR)	3'-TAT TAT AGA CAT GAT AGA ATA ACT TTG-5'
cDNA-F(+) RSV(qPCR)	3'-ATT GAT CAA TGA TAT GCC TAT AAC A-5'
HMBS forward	5'-CACGATCCCGAGACTCTGCT-3'
HMBS reverse	5'-TACTGGCACACTGCAGCCTC-3'

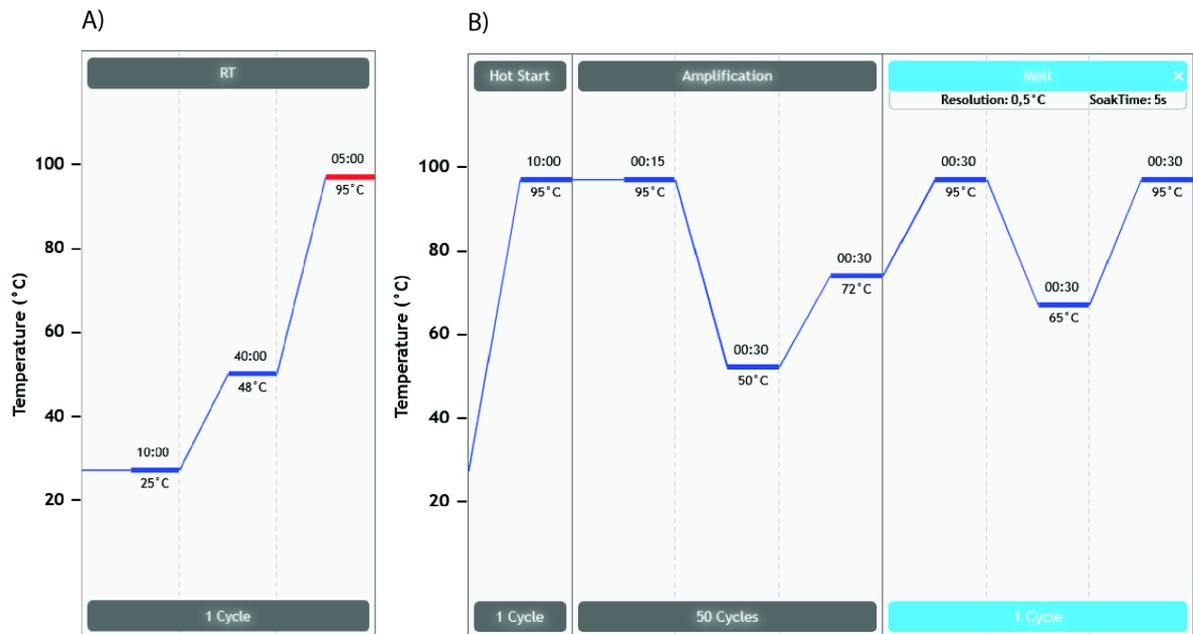


Figura 4. Perfiles térmicos para reacciones de transcripción reversa (RT) y PCR cuantitativo (qPCR) **A)** Corresponde a los ciclos utilizados en la reacción de transcripción reversa, donde el ciclo de 25 °C corresponde a la unión de los partidores, 48 °C se produce la transcripción reversa y a 95 °C la separación de las cadenas. **B)** Corresponde a los ciclos que se utilizaron para PCR cuantitativo. Tiene un “Hot start” para separar las posibles dobles hebra de ADNc y activar la polimerasa, luego 50 ciclos de amplificación, los 95 °C para separar las dobles hebras, 50 °C para la unión del partidor y 72°C extensión de la polimerasa, y finalmente un ciclo para terminar la reacción.

Inmunoprecipitación

Luego de 24 horas post infección, las células tripsinizadas se resuspendieron con 1,5-2,0 mL de PBS 1X filtrado y se centrifugaron a 5000 r.p.m durante 3-5 minutos a 23 °C. Al sedimento celular se le agregó 200 µL solución de lisis de polisoma (100mM KCl; 5mM MgCl₂; 10mM Hepes pH 7,0; 0,5% Nonidet P-40; Inhibidor de proteasa 1X, Inhibidor ARNsa (VRC) 2mM y Ditiotretitol (DTT) 1mM, solubilizados en agua ultra pura). Se resuspendió suavemente y se incubó durante 15 minutos en hielo. Se centrifugó a 4°C, durante 15 minutos a 12.000 r.p.m. Se tomó 20 µl del lisado y se guardó a -20°C. El resto del lisado se adicionó a un microtubo que contiene las partículas magnéticas unidas al anticuerpo Anti-Flag (Anti-FLAG® M2 Magnetic Beads, Sigma-Aldrich) las cuales se ambientaron con una solución de lavado NT2 (50mM Tris-HCl pH 7,4; 150mM NaCl, 1mM MgCl₂; 0,05% Nonidet P-40), utilizando

una gradilla de microtubos magnética para fijar las partículas magnéticas unidas al anticuerpo. Se incubó las Anti-FLAG® M2 Magnetic Beads (Sigma-Aldrich) con el extracto de proteínas durante toda la noche a 4°C en agitación suave, tras lo cual se recuperaron las bolitas magnéticas, las que contienen unida la muestra de interés mediante la gradilla para microtubos magnética. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el anticuerpo unido a las partículas magnéticas se lavó 5 veces con el buffer NT2. Finalmente, las partículas magnéticas se resuspendieron en 100µl de solución NT2, de los cuales 20µl se guardan a -20°C para confirmar la presencia de la proteína mediante Western blot y, al remanente se le realizó extracción la de ARN para amplificación por RT-qPCR del fragmento correspondiente a F del ARN genómico.

RESULTADOS

Para determinar si la maquinaria de m⁶A tiene un rol regulador en la infección por VRSh, se sobreexpresaron las proteínas escritoras, lectoras y borradoras en células HEK293-T infectadas con VRSh y se analizaron los cambios en la expresión de la proteína viral de fusión (proteína F), la abundancia del ARNm codificante para F y el ARN genómico por medio de la amplificación del fragmento del gen codificante para F.

Efecto de las proteínas metiltransferasas (escritoras)

Para determinar el rol de las metiltransferasas METTL3 y METTL14, ambas se transfectaron en células HEK293T durante 6 horas y posteriormente infectadas con VRSh durante 24 horas y se analizó los niveles de expresión de la proteína F del virus mediante Western blot (WB). Como se observa en la Figura 5, observamos una disminución en la expresión de la proteína F cuando se sobreexpresa el complejo METTL3/14 con respecto al control, donde se sobreexpresó la proteína d2EGFP.

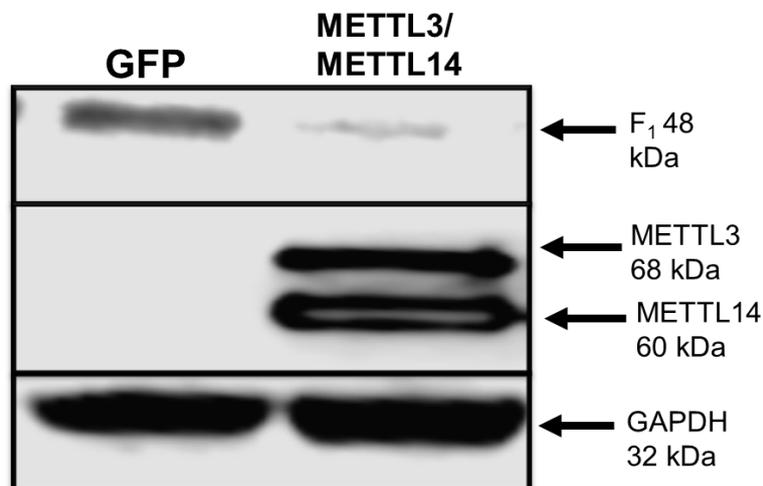


Figura 5. Efecto de la sobreexpresión de proteínas METTL3 y 14 en la expresión de la proteína viral F. Se analizó por Western Blot, la expresión de la proteína viral F (F₁, 48kDa) al sobreexpresar las proteínas METTL3 (68 kDa) y METTL14 (60 kDa) y 24 post-infección (h.p.i). Como control de carga se observó la expresión de Gapdh (32kDa). La imagen es la más representativa de un N=3.

Luego de verificar la sobreexpresión de las proteínas METTL3 (68 kDa) y METTL14 (60kDa), por medio de WB anti-FLAG (Figura 5), se analizó los niveles de ARN mensajero (ARNm) y ARN genómico (ARNg) del virus, para lo cual se extrajo el ARN total, tanto de células como del sobrenadante y se amplificaron por RT-qPCR, los fragmentos correspondientes al gen codificante para F, tanto de la hebra positiva (mensajero), como de la negativa (genómico). Como se observa en la Figura 6, la sobreexpresión de las proteínas metiltransferasa no tiene un efecto significativo en los niveles de los ARNm que codifican para F, mientras que los niveles de ARNg, tanto a nivel intra como extracelular, disminuyen significativamente respecto a la condición control (sobreexpresión de d2EGFP).

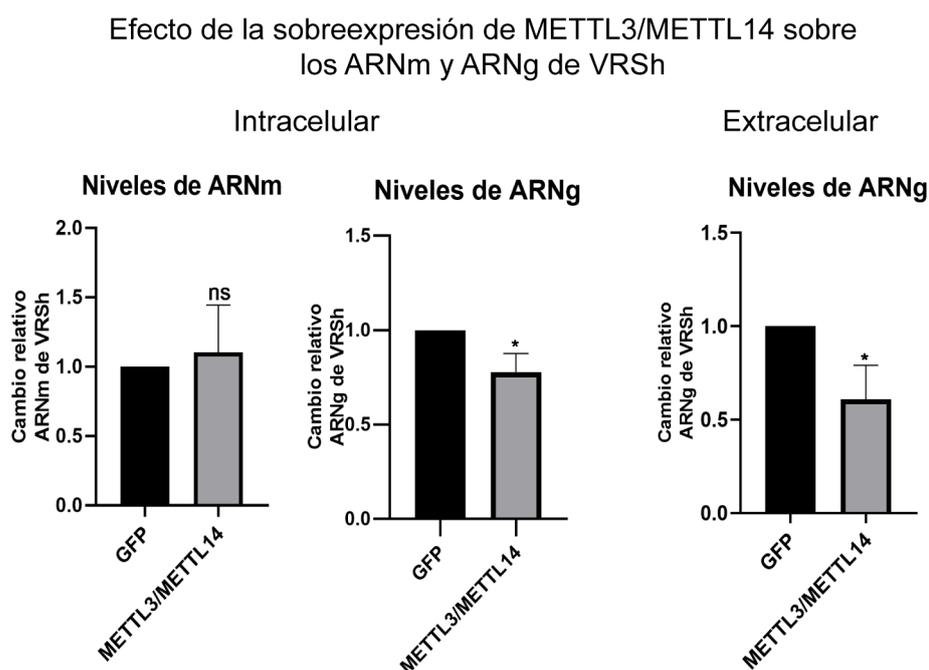


Figura 6. Análisis de abundancia de ARN mensajeros y genómicos al sobreexpresar METTL3 y METTL14 A través de RT-qPCR, se amplificó y cuantificó los niveles de ARN mensajeros y genómico (intra y extracelular) luego de la sobreexpresión de METTL3/14 y 24 h.p.i. Como gen de referencia se utilizó el gen HMBS y se calculó las veces que varía (veces de cambio) la expresión de F respecto a la condición control con d2EGFP. Los resultados se presentan como el promedio +/- la desviación estándar obtenida en 3 experimentos independientes (ns=no significativo; * p<0,05).

Efecto de las proteínas desmetilasas (borradoras)

Posteriormente, se sobreexpresaron las proteínas borradoras de la metilación: FTO y ALKBH5 y al igual que el experimento anterior se analizaron los niveles de expresión de la proteína F por WB y tanto el ARNm como el ARNg mediante RT-qPCR.

Se puede observar que la sobreexpresión de la proteína FTO, produce un aumento en la expresión de la proteína F de VRSh con respecto al control, donde se sobreexpresó la proteína d2EGFP (Figura 7)

Luego de verificar la sobreexpresión de las proteínas FTO (58 kDa) por medio de WB anti-FLAG (Figura 7A), se analizó el efecto de los niveles de ARNm y ARNg del virus. En la Figura 8 se puede observar que la sobreexpresión de FTO lleva a un aumento significativo en las copias relativas tanto del ARNm codificante para F, como del ARNg a nivel intracelular (Figura 8). Sin embargo, no se observa un cambio significativo en los niveles de ARNg a nivel extracelular (Figura 8).

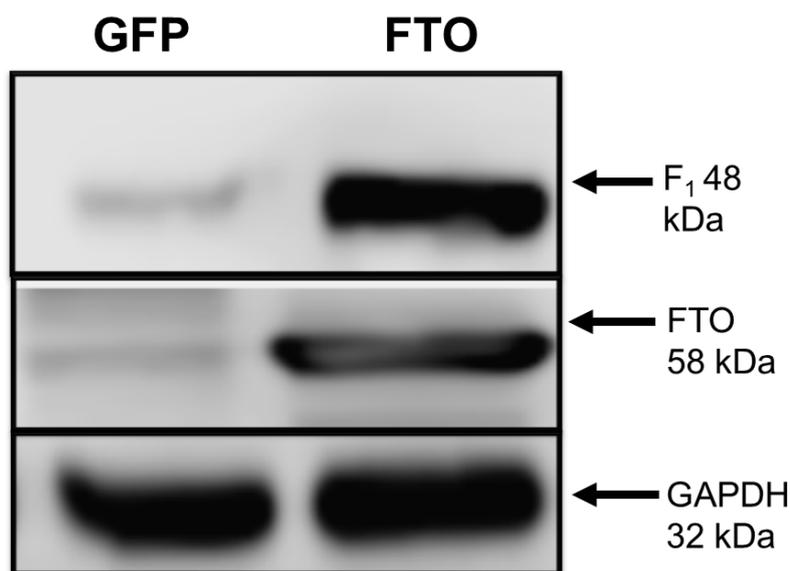


Figura 7. Efecto de la sobreexpresión de proteínas FTO en la expresión de la proteína viral F.

El efecto de la sobreexpresión de FTO se analizó por Western blot, luego de sobreexpresar cada proteína y 24 h.p.i. La banda de 48 kDa corresponde a F₁, mientras que la banda de 58 kDa corresponde a FTO. Como control de carga se utilizó Gapdh (32 kDa). La imagen es la más representativa de un N=3.

Efecto de la sobreexpresión de FTO sobre los ARNm y ARNg de VRSh

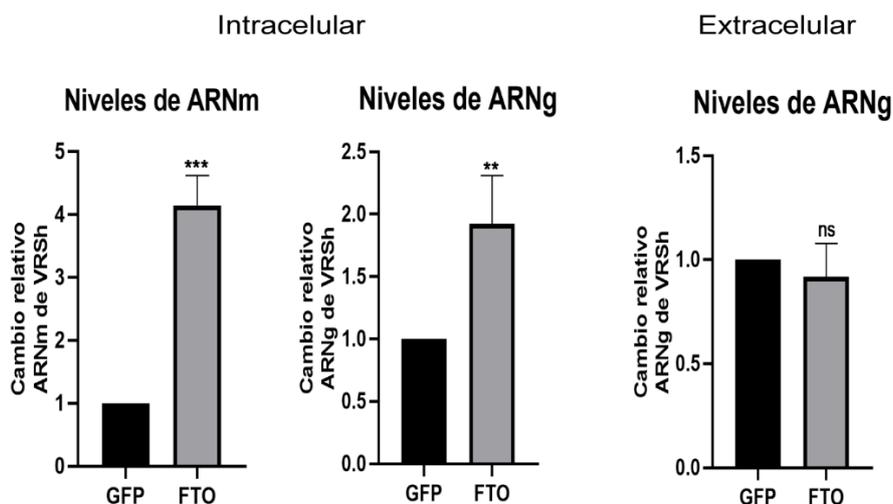


Figura 8. Análisis de abundancia de ARN mensajeros y genómicos al sobreexpresar FTO. A través de RT-qPCR, se amplificó y cuantificó los niveles de ARN mensajeros y genómico (intra y extracelular) luego de la sobreexpresión de FTO y 24 h.p.i. Como gen de referencia se utilizó el gen HMBS y se calculó las veces de cambio de la expresión de F respecto a la condición control con GFP. N=3 para cada ensayo. Los resultados se presentan como el promedio +/- la desviación estándar obtenida en 3 experimentos independientes (ns=no significativo; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

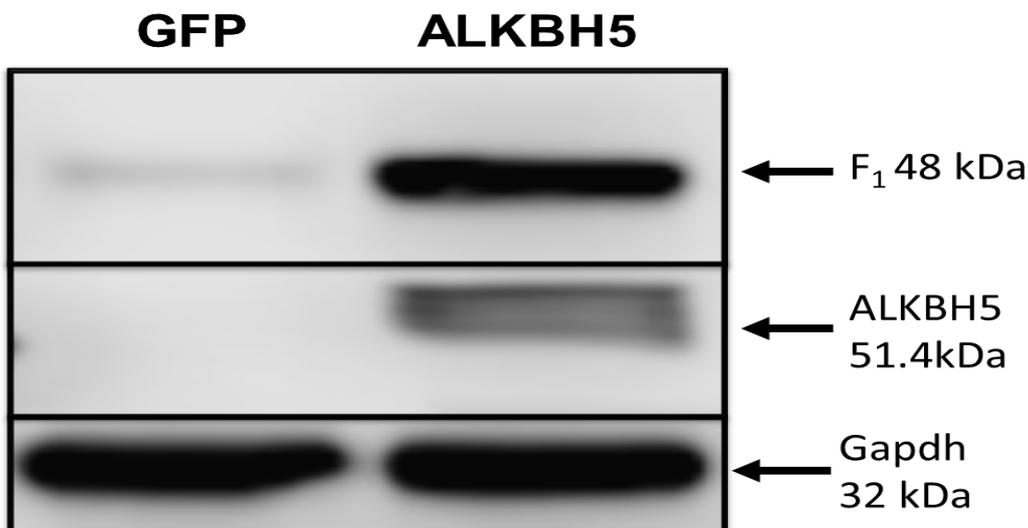


Figura 9. Efecto de la sobreexpresión de proteínas ALKBH5 en la expresión de la proteína viral F. El efecto de la sobreexpresión de ALKBH5 se analizó por Western blot, luego de sobreexpresar cada proteína y 24 h.p.i. **A)** La banda de 48 kDa corresponde a F₁, mientras que la banda de 51,4 kDa corresponde a ALKBH5. Como control de carga se utilizó Gapdh (32 kDa). La imagen es la más representativa de un N=3.

Luego analizamos el rol de ALKBH5, como se muestra en la figura 9 y similar a lo observado con FTO es posible observar que la sobreexpresión de ALKBH5 lleva a un aumento en la expresión de la proteína viral F con respecto al control.

Al sobreexpresar ALKBH5, se observa que hay un aumento en los niveles de ARNm, al igual que en el ARNg, tanto a nivel intracelular como extracelular. Sin embargo, estos aumentos, no son estadísticamente significativos.

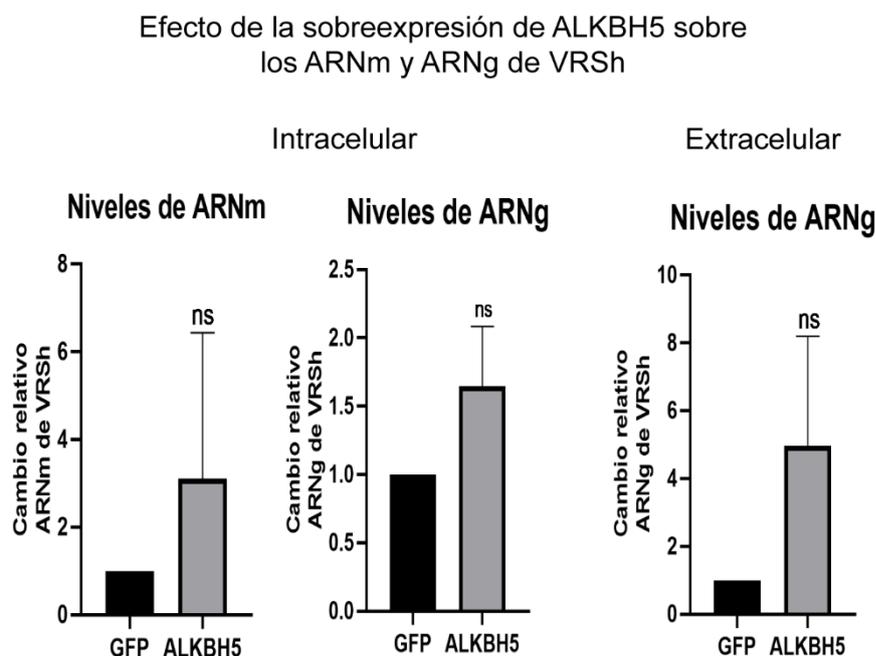


Figura 10. Análisis de abundancia de ARN mensajeros y genómicos al sobreexpresar ALKBH5 A través de RT-qPCR, se amplificó y cuantificó los niveles de ARN mensajeros y genómico (intra y extracelular) luego de la sobreexpresión de ALKBH5 y 24 h.p.i. Como gen de referencia se utilizó el gen HMBS y se calculó las veces de cambio de la expresión de F respecto a la condición control con GFP. N=3 para cada ensayo. Los resultados se presentan como el promedio +/- la desviación estándar obtenida en 3 experimentos independientes (ns=no significativo; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Efecto de las proteínas de unión a m⁶A (lectoras)

Posteriormente, se analizó el efecto de la sobreexpresión de las proteínas lectoras de m⁶A (YTHDF1, 2 y 3) sobre la expresión de la proteína F del virus. Como se observa en la figura 11, la sobreexpresión de las proteínas YTHDF1 e YTHDF2, no cambió la expresión de la proteína F con respecto al control, mientras que con la proteína YTHDF3 se puede apreciar un leve aumento de F respecto al control.

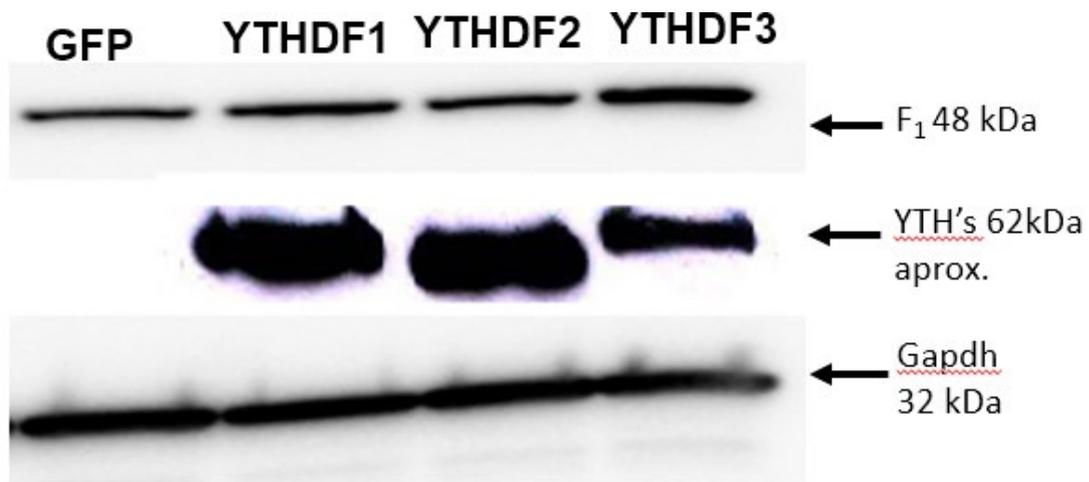


Figura 11. Efecto de la sobreexpresión de proteínas YTHDF1,2 y 3, en la expresión de la proteína viral F A) Se analizó por Western Blot, la expresión de la proteína viral F (F₁, 48kDa) al sobreexpresar las proteínas YTHDF1 (~61 kDa) YTHDF2 (~62 kDa) e YTHDF3 (~63 kDa). Como control de carga se observó la expresión de Gapdh (32kDa). La imagen es la más representativa de un N=3

Por otra parte, podemos observar en la Figura 12 que los niveles de ARNm que codifican para F aumentan al sobreexpresar las proteínas YTHDF1-3, aunque este no es estadísticamente significativo. A nivel intracelular, podemos observar que hay una disminución significativa en la abundancia de ARNg al sobreexpresar las proteínas YTHDF1 e YTHDF2, mientras que la disminución causada por YTHDF3 no es significativa. A nivel extracelular, observamos que YTHDF1 causa una disminución no significativa en los niveles de ARNg, mientras que la disminución causada por YTHDF2 e YTHDF3, si lo es.

Efecto de la sobreexpresión de YTHDF1,2 o 3 sobre los ARNm y ARNg de VRSh

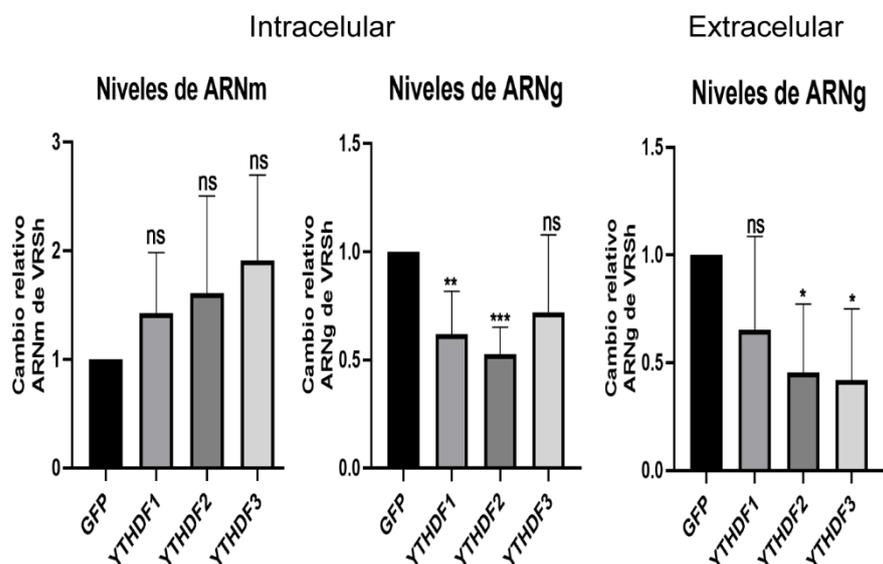


Figura 12. Análisis de abundancia de ARN mensajeros y genómicos al sobreexpresar las proteínas YTHDF1, 2 y 3 A través de RT-qPCR, se amplificó y cuantificó los niveles de ARN mensajeros y genómico (intra y extracelular) luego de la sobreexpresión de YTHDF1,2 o 3 y 24 h.p.i. Como gen de referencia se utilizó el gen HMBS y se calculó las veces de cambio de la expresión de F respecto a la condición control con GFP. N=4 para cada ensayo. Los resultados se presentan como el promedio +/- la desviación estándar obtenida en 4 experimentos independientes (ns=no significativo; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Unión de las proteínas lectoras a ARNg de VRS

Con la finalidad de determinar si las proteínas lectoras YTHDF1,2 y 3 se unen a los ARNg del virus, células HEK-293T se transfectaron con los vectores que codifican para estas proteínas conteniendo una etiqueta Flag y luego de 24 h.p.i., las células fueron lisadas utilizando una solución de lisis débil con bajo porcentaje de detergente, con el fin de mantener la interacción proteína-ARN y se realizó una inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Flag. A los complejos inmunoprecipitados se le extrajo el ARN y se amplificó el fragmento correspondiente al gen F del ARN genómico. Observamos que existe un enriquecimiento, en relación al control con el vector con GFP, de los ARN genómicos de VRS cuando se inmunoprecipita cada una

de las tres proteínas lectoras (Figura 13), lo que indica que las proteínas YTHDF1, 2 y 3 se estarían uniendo al genoma viral.

Enriquecimiento de ARNg por inmunoprecipitación de proteínas YTH

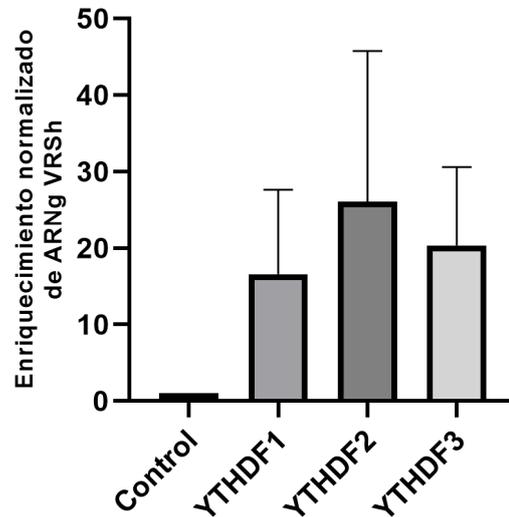


Figura 13. Enriquecimiento de ARN genómicos de VRSh al inmunoprecipitar proteínas YTHDF1, 2 y 3. Tras sobreexpresar las proteínas YTHDF1, 2 o 3, se inmunoprecipitaron estas proteínas, unidas a los ARN y posteriormente, por RT-qPCR, se amplificó y cuantificó el fragmento de la proteína F en el ARN genómico, comparándola con una condición donde no se sobreexpresaron estas proteínas (vector que codifica para d2EGFP) N=2.

DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

En el presente trabajo, se analizó el rol de la maquinaria celular asociada a la regulación por m⁶A en la replicación y expresión génica de VRSh, donde se evidenció que ésta tiene un impacto sobre la expresión de la proteína de fusión de VRSh y en la abundancia de ARN mensajero y genómico en células HEK293T.

Cuando se sobreexpresó el complejo metiltransferasa y, por lo que se espera, un aumento de m⁶A en la célula y/o en los ARN virales, se obtuvo como efecto una disminución en la expresión de la proteína viral F (Figura 5) y en los niveles del genoma viral tanto a nivel intracelular como extracelular, mientras que a nivel del mensajero no fue posible observar un cambio significativo (Figura 6). La disminución en la expresión de la proteína F, sin una disminución en los ARNm que codifican para esta, puede significar que m⁶A y su maquinaria podrían afectar la traducción del transcrito viral.

Al sobreexpresar las desmetilasa FTO y ALKBH5, proteínas que remueven m⁶A, se obtuvo el efecto contrario al de las metiltransferasas, aumentando la expresión de la proteína F (Figuras 7 y 9). En cuanto a los niveles de ARN virales, al sobreexpresar FTO, observamos un aumento significativo de los ARNm y del ARNg a nivel intracelular, mientras que a nivel extracelular no observamos un cambio significativo (Figura 8). Es interesante notar que, pese a que existe un aumento en la expresión de la proteína viral F y un aumento en los niveles de ARNg del virus a nivel intracelular, no vaya ligado a un aumento en los niveles de ARNg del virus a nivel extracelular, ya que esto indicaría que el número de partículas virales liberadas al medio no estaría siendo alterado. Las razones de que observemos este fenómeno pueden ser varias, y con estos resultados no es posible determinar que ocurre. Una forma de explicar esto, puede ser que la sobreexpresión de FTO favorece la expresión F y también a un aumento en los niveles de ARNg de VRSh, como se observa en las Figuras 7 y 8, pero puede estar afectando negativamente la expresión de otras proteínas virales,

como son N o L, indispensables para la formación de la partícula viral. (Collins & Karron, 2013), lo que podría explicar el que no haya un aumento a nivel extracelular del genoma viral. Otras posibilidades, es que algunos sitios de m⁶A puedan ser requeridos para el empaquetamiento de la partícula viral o para la infección, como se ha descrito previamente en influenza A, donde la presencia de esta modificación influye en la infectividad de las partículas virales. (Courtney et al., 2017).

Por su parte, la sobreexpresión de ALKBH5 o FTO muestra una tendencia al aumento en los ARNm y ARNg intra y extracelular, aunque ninguno de estos resultados es estadísticamente significativo. El aumento en los niveles del ARN mensajero que codifica para F, puede implicar que la ausencia de m⁶A favorece su transcripción o impide su degradación, lo que finalmente se traduce en el aumento de la proteína viral F. Sin embargo, este efecto no necesariamente es extrapolable al resto de los mensajeros virales.

Se han observado diferentes efectos de m⁶A sobre la replicación en otros modelos virales, como VIH-1, donde por un lado desfavorece las etapas tempranas de replicación previo a la integración, pero favorece aquellas tardías posteriores a la formación del provirus (Kennedy et al., 2016; Lichinchi, Zhao, et al., 2018; Tirumuru et al., 2016). Para entender porque ocurre esto, es necesario estudiar otros aspectos, como que ocurre con la infectividad de las partículas virales resultantes de cada condición, interacción de ARN y proteínas virales con los diferentes elementos de la célula infectada, entre otros.

Los resultados de la sobreexpresión de las proteínas escritoras y borradoras nos permite concluir a grandes rasgos que m⁶A tendría un efecto negativo en la expresión de la proteína de fusión de VRSh y causaría una disminución en los niveles de ARNg, mientras que la remoción de esta modificación, por la actividad desmetilasa de FTO y

ALKBH5, favorecerían la expresión de F y llevaría a un aumento en la abundancia del ARNm que codifica para F y del ARNg a nivel intracelular. Cabe destacar, que con ALKBH5 a diferencia de FTO, si se estaría observando un aumento en los ARNg virales a nivel extracelular, lo que llama la atención, ya que ambas son enzimas desmetilasas. Recientemente, se ha descrito que FTO puede actuar sobre distintas modificaciones (m^6A y m^6A_m en ARNm y ARNpn o m^1A en ARNt) y con diferente preferencia, dependiendo del tipo o localización celular (J. Wei et al., 2018), por lo que el efecto observado puede deberse a que FTO y ALKBH5 tienen diferentes ARN blanco o que desmetilan en diferentes posiciones a la misma molécula de ARN.

Por otra parte, con la sobreexpresión de las proteínas lectoras YTHDF1 y 2, se observó mediante el análisis del Western Blot un leve aumento en la expresión de F con respecto al control, mientras que con YTHDF3 hubo un leve aumento (Figura 11). A nivel de los ARNm, se observó un aumento, aunque no estadísticamente significativo, al sobreexpresar YTHDF1, 2 y 3. Esto no está dentro de lo que cabría esperar, ya que estas son las proteínas que se unen a m^6A y son aquellas que llevan a cabo el efecto de esta modificación, por lo que, al igual que la sobreexpresión de las proteínas escritoras, se hubiese esperado que también existiese una disminución en la expresión de F y una mantención o disminución de los niveles de ARNm. Al mismo tiempo, la sobreexpresión de las proteínas YTHDF1, 2 y 3, causan una disminución del ARNg del virus a nivel intracelular (disminución estadísticamente significativa tanto para YTHDF1 como para YTHDF 2, no así para YTHDF3). En la fracción extracelular, YTHDF2 e YTHDF3 muestran una disminución significativa del ARNg, mientras que YTHDF1 tienden a causar una disminución en los niveles de ARNg de VRSh no estadísticamente significativa. Esto último concuerda con los resultados obtenidos al sobreexpresar las proteínas escritoras, lo que sugiere que, el efecto negativo que tiene la presencia de m^6A sobre el virus, pueda ser sobre otros genes o regiones reguladoras del virus o de la célula, por lo que un aumento de la actividad

metiltransferasa, y por ende m^6A estaría afectando indirectamente la expresión de la proteína F de VRSh.

Cabe destacar, que tanto a nivel de ARNm como del ARNg, las tres proteínas lectoras tienen el mismo efecto, siendo que estas, en la célula eucarionte, cumplen diferentes roles, donde YTHDF1 aumenta la traducción de los ARNm a los que se une e YTHDF2 lleva a la degradación de estos (Du et al., 2016; Shi et al., 2017; Xu et al., 2015). Este efecto redundante de las tres proteínas lectoras se ha observado al estudiar el efecto de m^6A en otros virus, como VIH-1, virus Zika, virus hepatitis C (HCV), influenza A y no se han descrito razones por lo que esto pueda estar ocurriendo, por lo que es necesario más estudios para clarificar este fenómeno (Gokhale et al., 2016; Lichinchi, Gao, et al., 2016; Lichinchi, Zhao, et al., 2016).

La sobreexpresión de los diferentes componentes de la maquinaria de m^6A nos permite saber si esta modificación tiene un impacto en la replicación de VRSh, pero no si la modificación se encuentra en los ARN virales (mensajeros, genómico o incluso el anti-genómico), por ende, no sabemos si m^6A está regulando directamente el metabolismo de estos. Es por esto por lo que se realizó la inmunoprecipitación de las proteínas YTHDF1, 2 y 3, para la posterior extracción de los ARN asociados, amplificación y cuantificación del fragmento del gen F del genoma de VRSh por RT-qPCR. Como se puede observar en la Figura 13, hubo un enriquecimiento del genoma viral al inmunoprecipitar estas proteínas, lo que indicaría que estas proteínas estarían uniéndose a algún sitio del genoma de VRSh y, ya que se sabe que estas proteínas se unen a m^6A , permiten hipotetizar la presencia de esta modificación en el ARNg y que esta podría estar regulando el metabolismo de este ARN viral. Para determinar qué papel juega m^6A en la replicación e infección de VRSh, es necesario determinar si esta modificación se encuentra realmente dentro de los ARN virales, en que secuencias se encontraría y qué relevancia tiene esta para la replicación virus. Para determinar la presencia de m^6A , se han usado técnicas como la inmunoprecipitación

de los ARN que poseen esta modificación, utilizando un anticuerpo que reconoce m⁶A, para luego, por secuenciación masiva, conocer los ARN y sitios modificados. Una vez identificados estos ARN, lo siguiente sería determinar la posición en la que se encuentra m⁶A dentro de estos utilizando por ejemplo la técnica miClip (Individual-Nucleotide Resolution Using Crosslinking and Immunoprecipitation) (Linder et al., 2015). Finalmente, para determinar el rol que cumple esta modificación, pueden generarse mutantes que pierdan la adenosina que se modifica y estudiar posteriormente que efecto tiene esto en la expresión de proteínas virales, niveles de ARN mensajeros y genómicos, infectividad del virus, etc.

Sería interesante estudiar que sucede con los niveles de las proteínas M2-1 y M2-2, ya que estas son importantes para regular la transcripción-replicación del genoma de VRS, siendo M2-1 una proteína que favorece la continuidad de la transcripción mientras que M2-2 participa en la regulación entre el paso de transcripción a replicación (Cheng et al., 2005; Collins, P. L., Bermingham, 1999), por lo que, un cambio en la expresión de estas proteínas, al sobreexpresar las diferentes proteínas que componen la maquinaria de m⁶A, podrían sugerir que esta modificación es requerida para controlar este proceso.

En VIH-1, se ha descrito la presencia de m⁶A dentro de la región RRE (Elemento de Respuesta a Rev o *Rev Response Element* de su sigla en inglés) (Lichinchi, Zhao, et al., 2016) secuencia esencial para la exportación del genoma viral desde el núcleo hacia el citoplasma. Esto es evidencia de que m⁶A puede encontrarse dentro o cerca de regiones que regulan la replicación del virus, por lo que es posible hipotetizar la presencia de m⁶A en las regiones “Le” (secuencia “*leader*”), “Tr” (secuencia “*trail*”), “GS” (“*gene-start*”) y “GE” (“*gene-end*”) o adyacentes a esta. La importancia de estas secuencias radica en que regulan los procesos de transcripción y replicación de VRS. Las secuencias GS y GE cumplen el rol de indicar el inicio y termino de la transcripción de cada gen, por acción de la polimerasa L del virus, mientras que la secuencia Le es

esencial tanto para la replicación del genoma, como para el inicio de la transcripción de los genes virales (Tremaglio, Noton, Deflube, & Fearn, 2013) y TrC (secuencia complementaria de Tr en el antígenoma) que es necesaria para la síntesis del genoma viral (Peeples & Collins, 2000). A la fecha, no se conoce el mecanismo por el cual el virus pasa de transcripción a la replicación, siendo el estudio de m⁶A, una oportunidad de poder comprender como este proceso está regulado.

Una de las principales acotaciones para este trabajo, fue el reducido número de muestras utilizados para los análisis por RT-qPCR, donde en algunas condiciones se observa que hay una tendencia al aumento o la disminución, sin embargo, los análisis estadísticos arrojan que no es significativo, al utilizar un valor de $P < 0,05$. En estos casos, se observa una desviación estándar muy grande, como se observa en las Figuras 10 y 12, problema que podría solucionarse al repetir el ensayo un mayor número de veces.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que la maquinaria de m⁶A tiene un impacto sobre la expresión de la proteína viral F y el metabolismo de los ARN virales (ARNm de F y ARN genómico). Finalmente, los resultados obtenidos en este seminario de título son la primera evidencia de que m⁶A podría tener un rol en el ciclo replicativo de VRSh, y de la participación de proteínas metiltransferasa, desmetilasas o de unión a m⁶A, en la regulación de la transcripción y/o replicación de ARN virales y/o expresión de proteínas en VRSh.

CONCLUSIONES

- La sobreexpresión de las proteínas metiltransferasa METTL3 y METTL14 disminuyó los niveles de ARNg, tanto a nivel intra como extracelular, y la expresión de la proteína viral F, por lo que tendría un efecto negativo sobre la replicación de VRSh,
- La sobreexpresión de las proteínas desmetilasas, FTO y ALKBH5, muestran el efecto contrario a las metiltransferasas, las que aumentaron los niveles de ARNg a nivel intracelular en el caso de FTO y, a nivel intra y extracelular en el caso de ALKBH5, además ambas proteínas aumentaron el ARNm que codifica para F. En cuanto a la expresión de F, tanto FTO como ALKBH5 aumentaron la expresión de esta proteína.
- La sobreexpresión de las proteínas lectoras aumentó los niveles de ARNm que codifican para F, pero al mismo tiempo redujo los niveles intra y extracelular de los ARNg de VRSh. Con respecto a la expresión de F, los resultados no son concluyentes, siendo necesarias nuevas aproximaciones experimentales.
- Las proteínas YTHDF 1, 2 y 3 se unen al ARNg de VRSh, sugiriendo la presencia de la modificación m⁶A en el genoma de VRSh.

En base a los resultados antes expuesto podemos decir que la hipótesis se aprueba, ya que la sobreexpresión de los diferentes componentes de la maquinaria de m⁶A, muestran tener un impacto en la expresión de la proteína viral F y en el nivel de los ARN mensajero y genómico de VRSh.

REFERENCIAS

- Agarwala, S. D., Blitzblau, H. G., Hochwagen, A., & Fink, G. R. (2012). RNA methylation by the MIS complex regulates a cell fate decision in yeast. *PLoS Genetics*, 8(6), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002732>
- Amarasinghe, G. K., Aréchiga Ceballos, N. G., Banyard, A. C., Basler, C. F., Bavari, S., Bennett, A. J., ... Kuhn, J. H. (2018). Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2018. *Archives of Virology*, 163(8), 2283–2294. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3814-x>
- Batista, P. J. (2017). The RNA Modification N6-methyladenosine and Its Implications in Human Disease. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences and Genetics Society of China. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2017.03.002>
- Bodi, Z., Zhong, S., Mehra, S., Song, J., Graham, N., Li, H., ... Fray, R. G. (2012). Adenosine Methylation in Arabidopsis mRNA is Associated with the 3' End and Reduced Levels Cause Developmental Defects. *Frontiers in Plant Science*, 3(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00048>
- Cheng, X., Park, H., Zhou, H., & Jin, H. (2005). Overexpression of the M2-2 Protein of Respiratory Syncytial Virus Inhibits Viral Replication, 79(22), 13943–13952. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.13943>
- Clancy, M. J. (2002). Induction of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* leads to the formation of N6-methyladenosine in mRNA: a potential mechanism for the activity of the IME4 gene. *Nucleic Acids Research*, 30(20), 4509–4518. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf573>
- Collins, P. L., Bermingham, A. (1999). The M2–2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription, 96(September), 11259–11264. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11259>
- Collins, P. L., & Karron, R. A. (2013). Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In P. Fields, B.; Knipe, D. M.; Howley (Ed.), *Fields Virology* (6th ed., pp. 1086–1123). Philadelphia.
- Courtney, D. G., Kennedy, E. M., Dumm, R. E., Bogerd, H. P., Tsai, K., Heaton, N. S., & Cullen, B. R. (2017). Epitranscriptomic Enhancement of Influenza A Virus Gene Expression and Replication. *Cell Host and Microbe*, 22(3), 377–386.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.08.004>
- Cui, Q., Shi, H., Ye, P., Li, L., Qu, Q., Sun, G., ... Shi, Y. (2017). m6A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Reports*, 18(11), 2622–2634. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.059>
- Dominissini, D., Moshitch-moshkovitz, S., Schwartz, S., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., ... Rechavi, G. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 485(7397), 201–206. <https://doi.org/10.1038/nature11112>
- Du, H., Zhao, Y., He, J., Zhang, Y., Xi, H., Liu, M., ... Wu, L. (2016). YTHDF2 destabilizes m6A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex. *Nature Communications*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms12626>
- Dubin, D. T., & Taylor, R. H. (1975). The methylation state of poly A-containing-messenger RNA from cultured hamster cells, 2(10), 1653–1668.
- Fearn, R., Peeples, M. E., & Collins, P. L. (2002). Mapping the Transcription and Replication Promoters of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*, 76(4), 1663 LP-1672. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.4.1663-1672.2002>
- Gokhale, N. S., McIntyre, A. B. R., McFadden, M. J., Roder, A. E., Kennedy, E. M., Gandara,

- J. A., ... Horner, S. M. (2016). N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes Regulates Infection. *Cell Host and Microbe*, 20(5), 654–665. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.09.015>
- Junge, S., Nokes, D. J., Simões, E. A. F., & Weber, M. W. (2016). Respiratory Syncytial Virus. *International Encyclopedia of Public Health*, 337–346. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00384-2>
- Kennedy, E. M., Bogerd, H. P., Kornepati, A. V. R., Kang, D., Ghoshal, D., Marshall, J. B., ... Cullen, B. R. (2016). Posttranscriptional m6A Editing of HIV-1 mRNAs Enhances Viral Gene Expression. *Cell Host and Microbe*, 19(5), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.002>
- Kruger, N. J. (1996). The Bradford Method From: The Protein Protocols Handbook, 2nd Edition The Bradford Method for Protein Quantitation. In *The Protein Protocols Handbook* (2nd Editio, pp. 15–20). Totowa: NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-259-9_4
- Kuo, L., Grosfeld, H., Cristina, J., Hill, M. G., & Collins, P. L. (1996). Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 70(10), 6892 LP-6901. Retrieved from <http://jvi.asm.org/content/70/10/6892.abstract>
- Lavi, S., & Shatkin, A. J. (1975). Methylated simian virus 40-specific RNA from nuclei and cytoplasm of infected BSC-1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(6), 2012–2016. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.6.2012>
- Lence, T., Akhtar, J., Bayer, M., Schmid, K., Spindler, L., Ho, C. H., ... Roignant, J. Y. (2016). M6A modulates neuronal functions and sex determination in Drosophila. *Nature*, 540(7632), 242–247. <https://doi.org/10.1038/nature20568>
- Lichinchi, G., Gao, S., Saletore, Y., Gonzalez, G. M., Bansal, V., Wang, Y., ... Rana, T. M. (2016). Dynamics of the human and viral m(6)A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells. *Nature Microbiology*, 1(4), 16011. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.11>
- Lichinchi, G., Zhao, B. S., Wu, Y., Lu, Z., Qin, Y., He, C., & Rana, T. M. (2016). Dynamics of Human and Viral RNA Methylation during Zika Virus Infection. *Cell Host and Microbe*, 20(5), 666–673. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.002>
- Linder, B., Grozhik, A. V., Olarerin-George, A. O., Meydan, C., Mason, C. E., & Jaffrey, S. R. (2015). Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. *Nature Methods*, 12(8), 767–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3453>
- Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., ... He, C. (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6 -adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 10(2), 93–95. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432.A>
- Meyer K. et. al. (2013). Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3' UTRs and Near Stop Codons, 149(7), 1635–1646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.003>. Comprehensive
- Olchanski, N., Hansen, R. N., Pope, E., D'Cruz, B., Fergie, J., Goldstein, M., ... Sullivan, S. D. (2018). Palivizumab prophylaxis for respiratory syncytial virus: Examining the evidence around value. *Open Forum Infectious Diseases*, 5(3), 1–9. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy031>
- Peebles, M. E., & Collins, P. L. (2000). Mutations in the 5' trailer region of a respiratory syncytial virus minigenome which limit RNA replication to one step. *J. Virol.*, 74(1), 146–155. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.1.146-155.2000>
- Perry, R. P., Kelley, D. E., Friderici, K., & Rottman, F. (1975). The methylated constituents of L cell messenger RNA: Evidence for an unusual cluster at the 5' terminus. *Cell*, 4(4), 387–394. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90159-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90159-2)
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification.pdf, 29(9), 16–21.

<https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

- Schwartz, S., Agarwala, S. D., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Mertins, P., Shishkin, A., ... Regev, A. (2014). High-resolution mapping reveals a conserved, widespread, dynamic meiotically regulated mRNA methylation program. *Schraga*, 155(6), 1409–1421. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.047>.High-resolution
- Shi, H., Wang, X., Lu, Z., Zhao, B. S., Ma, H., Hsu, P. J., ... He, C. (2017). YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA. *Cell Research*, 27(3), 315–328. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.15>
- Śledź, P., & Jinek, M. (2016). Structural insights into the molecular mechanism of the m6A writer complex. *ELife*, 5(September), 1–16. <https://doi.org/10.7554/eLife.18434>
- Slobodin, B., Han, R., Calderone, V., Vrieland, J. A. F. O., Loayza-Puch, F., Elkon, R., & Agami, R. (2017). Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional N6-adenosine Methylation. *Cell*, 169(2), 326–337.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.031>
- Tirumuru, N., Zhao, B. S., Lu, W., Lu, Z., He, C., & Wu, L. (2016). N6-methyladenosine of HIV-1 RNA regulates viral infection and HIV-1 Gag protein expression. *ELife*, 5(2016JULY), 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.15528>
- Tremaglio, C. Z., Noton, S. L., Deflube, L. R., & Fearn, R. (2013). Respiratory Syncytial Virus Polymerase Can Initiate Transcription from Position 3 of the Leader Promoter. *Journal of Virology*, 87(6), 3196–3207. <https://doi.org/10.1128/JVI.02862-12>
- Vespa, L. (2004). The Immunophilin-Interacting Protein AtFIP37 from Arabidopsis Is Essential for Plant Development and Is Involved in Trichome Endoreduplication. *Plant Physiology*, 134(4), 1283–1292. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028050>
- Wang, P., Doxtade, K. A. and Nam, Y. (2015). Structural basis for cooperative function of Mett13 and Mett14 methyltransferases. *Chemistry*, 91(2), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.037>.Reactivity
- Wang, X. et. al. (2014). m6A-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 505(7481), 1–20. <https://doi.org/10.1038/nature12730>.m
- Wang, X. et. al. (2015). -methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell*, 161(6), 1388–1399. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.014>.N
- Wang, X., Feng, J., Xue, Y., Guan, Z., Zhang, D., Liu, Z., ... Yin, P. (2016). Structural basis of N6-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex. *Nature*, 534(7608), 575–578. <https://doi.org/10.1038/nature18298>
- Wei, C., & Gershowitz, A. (1975). Methylated Nucleotides Block 5' Terminus of HeLa Cell Messenger RNA, 4(April), 379–386.
- Wei, J., Liu, F., Lu, Z., Jia, G., Chen, J., He, C., ... Su, R. (2018). Mediated by FTO in the Cell Nucleus and Cytoplasm Differential m6A, m6Am, and m1A Demethylation Mediated by FTO in the Cell Nucleus and Cytoplasm. *Molecular Cell*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.011>
- Xu, C., Liu, K., Ahmed, H., Loppnau, P., Schapira, M., & Min, J. (2015). Structural basis for the discriminative recognition of N6-Methyladenosine RNA by the human YT521-B homology domain family of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 290(41), 24902–24913. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680389>
- Zhao, B. S., Wang, X., Beadell, A. V., Lu, Z., Shi, H., Kuuspalu, A., ... He, C. (2017). M6A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 542(7642), 475–478. <https://doi.org/10.1038/nature21355>
- Zhong, S., Li, H., Bodi, Z., Button, J., Vespa, L., Herzog, M., & Fray, R. G. (2008). MTA Is an Arabidopsis Messenger RNA Adenosine Methylase and Interacts with a Homolog of a Sex-Specific Splicing Factor. *The Plant Cell Online*, 20(5), 1278–1288.

<https://doi.org/10.1105/tpc.108.058883>

Zou, S., Toh, J. D. W., Wong, K. H. Q., Gao, Y. G., Hong, W., & Woon, E. C. Y. (2016). N⁶-Methyladenosine: A conformational marker that regulates the substrate specificity of human demethylases FTO and ALKBH5. *Scientific Reports*, 6(February), 1–12.
<https://doi.org/10.1038/srep25677>