



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias



DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **Regulación por fosforilación de la actividad de la fosfoproteína E1B-55KDa de adenovirus tipo 5 como factor de transcripción**, que presenta el alumno **Eduardo Mundo Nájera (10033416)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

| NOMBRE | DICTAMEN | FIRMA |
|---|----------|-------|
| Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM | APROBADO | |
| Dra. Sonia Dávila Ramos CIDC-UAEM | APROBADO | |
| Dr. Carlos Sandoval Jaime IBT-UNAM | APROBADO | |
| Dra. Paloma Hidalgo Ocampo Leibniz Institute for Experimental Virology (HPI) Hamburg, Germany | APROBADO | |
| Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez CIDC-UAEM | APROBADO | |



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CARLOS SANDOVAL JAIME | Fecha:2021-05-31 21:15:57 | Firmante

d06ydXX1tmKaEAm8DbnmPSeFyYqdDCMSaVEXfws5d6AiYcUB2iqx5KMTIPE5jMKYwWd+PwQBvx7gnZGqQI6c+cTHLKYIUV4ELqUbFBZi/5yj76KsZeYoFhwWWB/dczUi2mUDaZ7T17vvFIZIB+2V7HaLcxlHkvP2yGQM3dnofQ4KSdRaE8DwIFXqarVTRlozfofc5GItA+hLoujgejhAqzGkKsiYcDZC1oxLg1MDd/5oQVTq8tQFTplSSKjmkujc0CaDqE9DMenzFIE06GHefqVvkUUUKXOWrrzqYLNQq6bPgUbd9IAou2jSPGcprRb/jMAiQ6ngY1rbjvO62+Pjw==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2021-05-31 21:22:18 | Firmante

Khgxoh5XdnBeyJD3jDf0wTYbtMrW3ZYSoRgJofpTVahN9gn09SQbg0QBn7rVLvDFGnSWFzGbr6fvSj8bSWgO+EFU8t2J8q+mw2FBv63qTY9qbmCmVlwrNGI9+dXWzLKYeEQQ0LmEnvdXTHH/cfurBmryi1D2+N1G06c1B1optQIWHVUrhYqdTDS1hMpvK9KLvGxhGCaKirEOxacWxSTntF7JA+pHjDALKY7Ue5Ztyceq1xzMsYSbSKfH4/Bp/XDjGntkxx3U4AswkNPL3E0PieHx2KccVl9mKUrDiiwALxbH1KQD0YLuaT0dQVAX0vu2QQohfsUI4P69Npy0w==

PALOMA ROSSANA HIDALGO OCAMPO | Fecha:2021-06-01 04:01:21 | Firmante

gJ8NxYVB/udi8Nnzckcnvb8+jRBtztWhDbLw2ktvg44oMDhAe03kEQZGY/LckNwjEwKPNiWQ0zZXBCW2vn8IGev9MqAU891eiWo9CK9IzTZ4oRkvGBEJmrl0ox6rD/fail0xMZxF6MpnH2angTczWTQP7i8zvC2OqMKC+YKbaOWtycTXNNvi6uWC1kEn0PTIUo1lvB6AsPBPvh7vgEI70tguQW2wHijYIGZ/RNjzb2oZlgcQW4M2HMTwHi9Y93axoMZ4gOsZcO+tDfbTUG+A1rQ/7dgvInN8uFUBXAzrP6oTzp51x7Oxz7FTZjJSFWRgN0oZccs3bwdrc2NK6v13Aa==

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2021-06-01 09:08:30 | Firmante

NxM2HKC582bEQCoSkKsGZO3VIBOR+4yinOQ6fkF1mElsuHGOy4yjklaENgHcEF4dd3VxyT2JyMSYWxlCbzUqwo5Za1aPEmN7I0tTklb0FoWg2JxM6k7YkxFPobzvC9r6hb7Au+rDrXpL0wFICFptCqcXg/7Ueh8jGXlw/GLXA2XshPJBcmPujZZcOHWQJI7HGsd4q/OoC1sZ9hCYh1Vh5fyfEkaA3dR+YpMwT36VOOy+A7AgJ8UYlpFJydWY3jTpC+tCdlhdopEwF+hZPDKR80+ARvA9t/8uPlvOA7md0HDZTZQGVDqJgJbriFHMv3XrX/Jqt994TmECTwQoW9IMoQ==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2021-06-02 08:57:46 | Firmante

GUPBX/vgeZQjQx9sYIOrm77PomvA/6uwuT+Q1p0YJVlqeFwJ1bZviBU8F0bqSsqf6dsGDF/74xmonSaana9AcZJMMocBQ2NOUHAZ37J81umUGey4yjtqP64kKTmVhyj4P8rtNuMwMTLgnsx6VbpcDAI/CVWxvAp0RNuY/MZqkwYCI5zT326c89AesNdH63Tj09tlqYtUrG8eC9kVq8o6lJ+rbc8Xk+b/ex5YYoWi41TyeMjJl6F3+coU7ZnGaXdMelRL3fdvysdFYBQ8VuDbvSJ20fCzXQ4AxGI25x/tf4U5WpXY+iLmB+GocZ8KobfufOqkfa3qq6UJUZSDX3F5sQ==

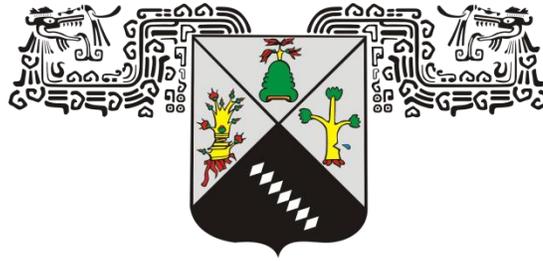
Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



MPCqob

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/B6LERAbjaw24cMXU58NzXzsHnkly9rfU>





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
Centro de Investigación en Dinámica Celular

**“Regulación por fosforilación de la actividad de la fosfoproteína
E1B-55KDa de adenovirus tipo 5 como factor de transcripción”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Eduardo Mundo Nájera

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Ramón A. González García-Conde

CUERNAVACA, MORELOS

Junio 2021

Resumen

La fosfoproteína E1B-55KDa (E1B) de adenovirus humano tipo 5 (HAdV) tiene diferentes actividades durante el ciclo de replicación viral. La E1B participa en la degradación de proteínas celulares; en la organización y actividades de dominios nucleares inducidos por el virus en donde se replica y expresa el genoma viral, conocidos como compartimentos de replicación viral (RC por sus siglas en inglés); en la represión de los genes de la respuesta a interferón y genes blanco de p53. Recientemente resultados del grupo han mostrado que la E1B es necesaria para la replicación eficiente del genoma viral y la regulación de la expresión de genes virales. Los mecanismos moleculares que implican a la E1B en cada una de estas actividades no se han descrito. Los resultados de nuestro grupo muestran que la E1B regula la expresión de genes virales a nivel transcripcional y post-transcripcional durante el ciclo de replicación viral. A nivel de la transcripción la proteína tiene un papel dual en la regulación de los promotores virales, ya que puede aumentar o disminuir la transcripción de varios promotores de adenovirus. Esta actividad dual depende del estado de fosforilación de la proteína. Se ha propuesto que la E1B tiene un dominio similar a un dedo de Zn^{2+} , sin embargo, no se ha determinado que la proteína interaccione con Zn^{2+} o que pueda asociarse al DNA. En el grupo se demostró recientemente que la E1B interacciona con RNA. En mi tesis de licenciatura, experimentos preliminares de inmunoprecipitación de cromatina mostraron que la E1B se asocia al promotor adenoviral de E1A. Además, haciendo una búsqueda en la literatura se estableció que de las 78 proteínas celulares o virales con las que la E1B interacciona, 18 tienen funciones asociadas a la regulación de la expresión de genes. El análisis bioinformático de las secuencias de los promotores virales identificó que otras proteínas celulares que interaccionan con la E1B tienen secuencias blanco en los promotores adenovirales. La transcripción del genoma viral ocurre en los RC, por lo que los factores de transcripción que interaccionan con E1B se buscaron en una base de datos del proteoma de los RC (datos no publicados) y se determinó que 3 proteínas celulares que se asocian a los RC, regulan la expresión de genes virales e interaccionan con la E1B. En conjunto, estos resultados sugieren que la actividad de la E1B como

factor de transcripción dual depende de su estado de fosforilación y que podría regular la transcripción de genes virales a través de su interacción con factores de transcripción celulares, por lo que en el presente proyecto se estudió si la E1B regula la actividad de los promotores intermedios IVa2 y L4P, el efecto de la fosforilación de la T495 sobre la actividad de la proteína en los promotores adenovirales, si la E1B puede interaccionar con los promotores y el análisis bioinformático de las posibles interacciones proteína-proteína en los Compartimentos de Replicación.

Introducción

Generalidades y clasificación de los adenovirus

Los adenovirus son agentes etiológicos de enfermedades respiratorias agudas, gastroenteritis y queratoconjuntivitis, además que podrían tener un efecto adipogénico y se han propuesto como factores etiológicos de obesidad en humanos [1, 2]. Los adenovirus (Ad) pertenecen a la familia *Adenoviridae* y se han aislado más de 130 tipos que se clasifican en cinco géneros [2]: los Aviadenovirus, que infectan a aves; los Atadenovirus, nombrados así por tener en su genoma un alto contenido de Adenina (A) y Timina (T), que incluyen adenovirus que infectan reptiles, aves, marsupiales y mamíferos; los Siadenovirus, cuyo genoma codifica para una sialidasa e incluyen adenovirus que infectan a reptiles, aves y anfibios; los Ichtadenovirus que infectan a peces [2]; y los Mastadenovirus, que infectan a mamíferos e incluyen a todos los adenovirus que infectan a humanos [3].

Los adenovirus que infectan a humanos (HAdV) se clasifican en 7 especies (A-G) y en 90 tipos diferentes. Los tipos más estudiados son los tipos 2 (HAdV2) y tipo 5 (HAdV5), debido a que fueron de los primeros en ser aislados, a su potencial como vectores terapéuticos y a que no son oncogénicos en modelos animales [5, 6]. El estudio de células infectadas con adenovirus ha permitido entender diferentes procesos celulares como el splicing, la regulación de la transcripción, ciclo celular y la organización nuclear, entre otros [5].

Estructura

Los adenovirus son virus no envueltos por membrana, con cápside icosaédrica y de un tamaño aproximado de 90nm de diámetro, con un genoma de doble cadena (dsDNA) lineal [6] (Fig. 1). La cápside viral está compuesta por 11 proteínas estructurales. La proteína más abundante es la proteína II que está organizada en 240 trímeros llamados hexón. La proteína pentón compuesta por la proteína III está asociada a la proteína IV, denominada fibra en la partícula viral. La proteína fibra se proyecta en cada uno de los 12 vértices de la partícula viral. Las proteínas IIIa, VI, VIII y IX se localizan en la parte interior de la cápside y estabilizan a la partícula viral. La nucleocápside está formada por las proteínas μ , VII, V y la proteína terminal (TP) que interaccionan con el genoma viral. Las proteínas de la nucleocápside, a excepción de la TP, son ricas en residuos de arginina y tienen como función el empaquetamiento del genoma viral dentro de la nucleocápside. La proteína TP se encuentra unida covalentemente a los extremos 5' del genoma viral. En la nucleocápside

está también la proteasa viral L3-23K. La proteasa promueve el desensamblaje y salida del endosoma de la partícula viral al citoplasma; permite la maduración de precursores proteicos y promueve el ensamblaje de la progenie viral [9, 10].

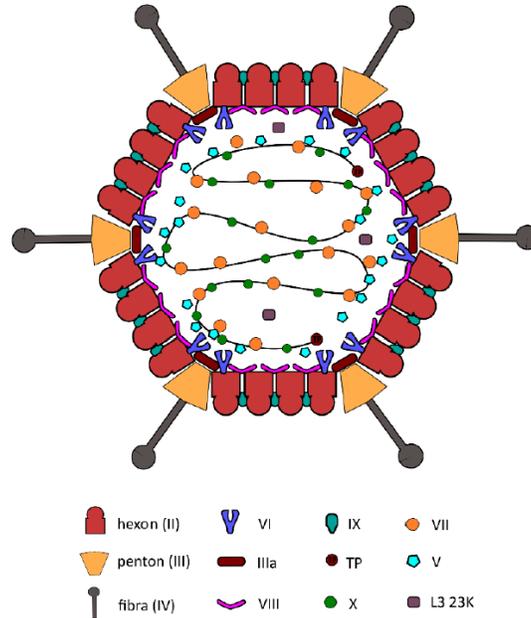
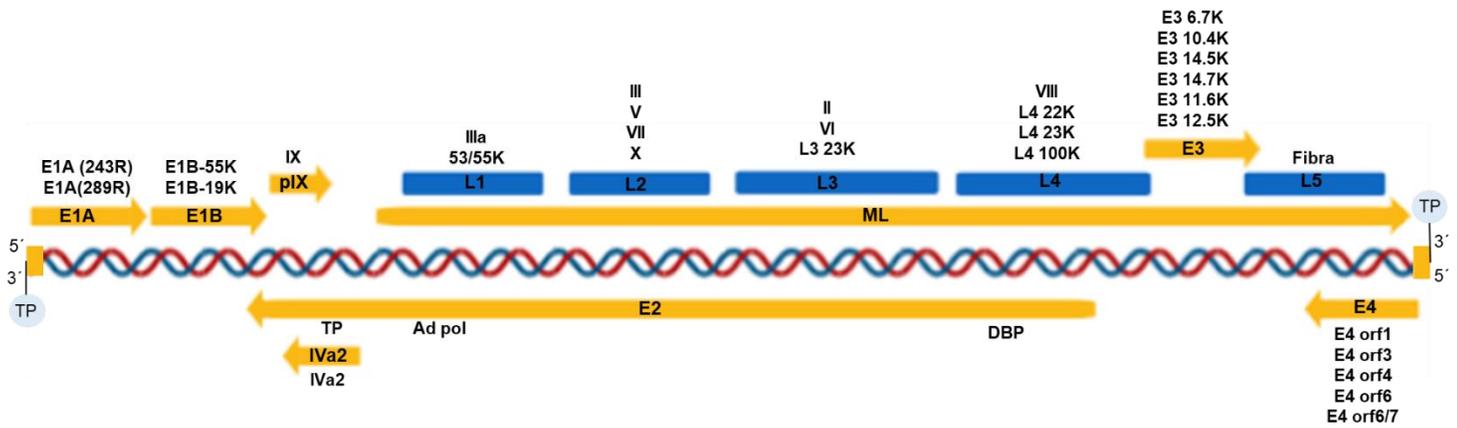


Figura 1. Diagrama de la estructura de adenovirus. En la figura se esquematizan las proteínas estructurales que componen a la partícula viral [8].

Organización del genoma viral

Como se mencionó antes, el genoma de HAdV es una molécula de DNA de doble cadena (dsDNA) lineal, de un tamaño aproximado de 36 kb y pertenece al grupo I de la clasificación de Baltimore [6]. Los extremos del genoma presentan repeticiones terminales invertidas (ITR) con una longitud de 103 pares de bases (pb) que contienen los orígenes de replicación [9]. Unidas covalentemente a los grupos fosfato de los extremos 5' del genoma viral, se encuentran las proteínas TP que participan en la replicación del DNA y encapsidación del genoma viral [12, 13]. El genoma de HAdV está organizado en cinco unidades transcripcionales (TU, por sus siglas en inglés) tempranas, tres TU tempranas retrasadas que se transcriben cuando inicia la replicación del genoma viral y una TU tardía. Las unidades transcripcionales tempranas son E1A, E1B, E2, E3 y E4. Las TU tempranas retrasadas son IX, IVa2 y L4. La TU tardía se llama Unidad Transcripcional Principal Tardía (MLTU, por sus siglas en inglés) y se organiza en cinco familias de mRNA tardíos (L1-L5) definidas por diferentes sitios de poliadenilación [8, 14]. Cada mRNA es procesado por splicing alternativo, excepto el gen que codifica para pIX. La transcripción de estos genes

virales depende de la RNA polimerasa II (RNAPII). Adicionalmente existen otras dos TU que son transcritas por la RNA polimerasa III (RNAPIII), que codifican para dos RNA virales no codificantes llamados virus asociado (VA, por sus siglas en inglés), VA RNA I y II [6]. Por convención, el genoma de adenovirus se representa de izquierda a derecha comenzando con la TU E1A del lado izquierdo. Los transcritos E1A, E1B, E3, IX, MLTU y VA RNA se encuentran codificados en una lectura que avanza de izquierda a derecha del genoma, mientras que las unidades transcripcionales E2, E4 y IVa2 están codificados en una lectura que avanza de derecha a izquierda y se encuentran en la cadena complementaria del genoma [10] (Fig. 2). La MLTU codifica un mínimo de 20 mRNAs diferentes. Todos los mRNAs virales tardíos comparten una secuencia común en el extremo 5' de 201 pb, llamada líder tripartita (TPL, por sus siglas en inglés), formada por la unión de 3 exones nombrados líder 1, 2 y 3 [8 ,14]. La clasificación de las TU en tempranas y tardías no es del todo precisa ya que los genes tempranos continúan expresándose durante la fase tardía y el promotor tardío de la MLTU está activo, aunque en menor medida, durante la



fase temprana [12].

Figura 2. Representación esquemática del genoma de adenovirus tipo 5 y de las proteínas codificadas de cada una de las Unidades Transcripcionales (TU). La figura muestra la organización del genoma (hélices en rojo y azul) de adenovirus tipo 5 con sus 5 TU (barras amarillas) y la dirección de transcripción de cada una de ellas (ilustrado por las flechas) [10]. Unida a los ITR's en los extremos 5' se muestra la proteína viral TP (círculos). Sobre las unidades transcripcionales se indican las proteínas que son codificadas a partir de las unidades transcripcionales [10].

Ciclo de Replicación Viral

Al igual que otros virus de DNA que se replican en el núcleo, el ciclo de replicación de adenovirus se divide en 2 fases, una temprana y otra tardía, separadas por el inicio de la replicación del genoma viral [7]. La fase temprana inicia cuando la proteína viral fibra interacciona con la proteína CAR (receptor de Coxsackie y adenovirus por sus siglas en inglés); posteriormente la proteína pentón interacciona con las integrinas $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$ e induce el desensamblaje de la proteína fibra del virión y permite la endocitosis mediada por clatrina [7]. En el endosoma, debido al bajo pH, el desensamblaje de la cápside viral continúa por la activación de la proteasa viral, que libera a las proteínas pentón, IIIa y hexón [6]. Se ha sugerido que la proteína viral VI facilita la lisis del endosoma y la liberación de la nucleocápside al citoplasma [13]. En el citoplasma la proteína celular motora, dineína, se une a la nucleocápside, permitiendo el desplazamiento del virión por los microtúbulos hacia el complejo del poro nuclear (NPC, por sus siglas en inglés). En el NPC se libera el genoma viral al núcleo e inicia la expresión de los genes tempranos. Durante la fase temprana se establecen condiciones óptimas para la expresión de los genes virales y la replicación del genoma viral [10]. La transición a la fase tardía ocurre con el inicio de la replicación del genoma viral y la activación de la MLTU [12]. La activación de la MLTU resulta en la producción de proteínas estructurales necesarias para el ensamblaje y encapsidación del genoma y para la producción de la progenie viral que es liberada por lisis celular [12].

Compartimentos de Replicación

Los virus utilizan una estrategia común para completar su ciclo de replicación viral. En el caso de los virus de DNA que se replican en el núcleo se induce la formación de dominios nucleares llamados compartimentos de replicación (RC) [7]. Los RC no están asociados a membrana y son dominios nucleares en los que se replica y se transcribe el genoma y se procesan los mRNA virales [7, 18]. Los RC cooptan diversas proteínas celulares. Entre ellas, proteínas que participan en la replicación, reparación y recombinación del DNA, la transcripción, procesamiento de mRNA, remodelación de cromatina y proteínas que participan en mecanismos de defensa antiviral, entre muchas otras [19, 20, 21, 22]. La formación de los RC establece microambientes óptimos para replicar, transcribir el genoma y procesar los mRNAs virales. Por lo tanto, los RC son dominios nucleares inducidos por el virus que funcionan para interactuar con la célula [18, 23, 24].

Regulación de la expresión de los genes virales

E1A

La expresión de genes durante el ciclo de replicación de adenovirus está regulada por proteínas celulares y virales. A partir de la TU E1A se transcriben dos mRNA que son procesados por splicing llamados 12S y 13S que codifican para las proteínas E1A 243R y E1A 289R, respectivamente [16]. Las E1A regulan la expresión de todos los demás genes virales. En la fase temprana E1A activa a las TU, E1B, E2, E3 y E4; cuando inicia la replicación del genoma viral, E1A activa a dos genes intermedios, IVa2 y IX y en la fase tardía activa a MLTU [17] [18]. E1A interacciona con las proteínas remodeladoras de histonas como p300/CBP, regulando la transcripción de genes virales y con la familia de proteínas de retinoblastoma, pRB (RB1, p107 y p130) liberando el factor transcripcional E2F, induciendo así a la célula a entrar a fase S (ver Tabla 1) [12]. Los cambios inducidos por las E1A conducen a la estabilización del supresor tumoral p53 y la activación de apoptosis.

E1B 55kDa

Para contrarrestar la estabilización de p53 y activación de la apoptosis, las proteínas virales codificadas en la TU E1B inhiben la respuesta celular inducida por las actividades genotóxicas de E1A [19]. La TU E1B codifica dos productos derivados del proceso de splicing alternativo, llamados 13S y 22S que codifican para las proteínas E1B-19KDa y E1B-55KDa, respectivamente [16]. La proteína E1B-19KDa inhibe apoptosis ya que tiene una estructura y función similar a la proteína antiapoptótica celular Bcl-2 que permite su interacción con BAK y BAX, previniendo su oligomerización, la liberación del citocromo C y la consecuente activación de la vía intrínseca de apoptosis por caspasa 9 [20]. La proteína E1B-55kDa, a la que se le llamará E1B en este trabajo, controla la respuesta antiviral del hospedero por dos mecanismos: i) la poliubiquitinación de factores antivirales por un complejo E3 ubiquitina ligasa inducido durante la infección que se describirá más adelante [19]; y ii) la composición y función de los compartimentos de replicación (RC) descritos anteriormente [14, 25]. La expresión de E1A y E1B establece condiciones en la célula infectada que conducen a un estado proliferativo en el que la célula no puede detener el estado de síntesis, ni morir por apoptosis, permitiendo la síntesis eficiente de macromoléculas virales.

E2

La TU E2 codifica proteínas necesarias para la replicación del DNA viral [6]. Dos transcritos son sintetizados y procesados por splicing, E2A y E2B, y están definidos por diferentes sitios de poliadenilación. Los productos pre-proteína terminal (pTP, que funciona como cebador para el inicio de replicación del genoma viral) [21] y la DNA polimerasa viral se encuentran codificados en E2B, mientras que la proteína de unión a DNA de cadena sencilla DBP (DBP, por sus siglas en inglés), se encuentra codificada en E2A [22]. La expresión de la TU E2 está regulada por dos promotores, el promotor E2 temprano (E2E) activo en la fase temprana y el promotor E2 tardío (E2L) activo en la fase tardía (ver Tabla 1) [23].

E3

La activación de la TU E3 está regulada por las proteínas celulares TNF- α , NF- κ B, NF-1, AP-1 y ATF y es activado por las proteínas virales E1A, E1B-19KDa y E1B (ver Tabla 1). Esta TU codifica para seis proteínas. La E3-19KDa se une al complejo mayor de histocompatibilidad-1 (MHC-1) en el retículo endoplásmico (RE) evitando su transporte y por lo tanto el reconocimiento de la célula infectada por linfocitos T y *natural killers* (NK) [6]. E3-14.7K inhibe los factores de necrosis tumoral (TNF) y modula la actividad de NF- κ B. E3-10.4K y E3-14.5K forman un complejo llamado *receptor de internalización y degradación* (RID, por sus siglas en inglés), que tiene como actividad regular la respuesta inflamatoria celular asociada a la infección y están asociadas a la proteína E3 6.7KDa [6].

E4

La TU E4 es activada en la fase temprana antes de las TU E2 y E3, y es regulada por las proteínas celulares de respuesta a cAMP, E4F y ATF y las proteínas virales E1A, pIX, E1B-19KDa y E1B (ver Tabla 2). La TU E4 dirige la síntesis de cinco productos resultado del procesamiento por splicing, denominadas E4orf 1, 3, 4, 6 y 6/7 que a diferencia de los productos de las otras TU, tienen actividades variadas como, la inhibición de la apoptosis, la regulación de la transcripción de genes y el procesamiento de los mRNA virales por splicing [6]. E4orf 1 y orf4 activan a la proteína cinasa mTOR en ausencia de nutrientes y señales mitogénicas, aumentando la síntesis de proteínas. E4orf3 inhibe la respuesta celular a daño en DNA de doble cadena (DDR), una respuesta debida al reconocimiento del genoma viral de doble cadena lineal [6]. E4orf6, ensambla el complejo E3 ubiquitina ligasa junto con E1B. E4orf6/7 dimeriza al factor transcripcional E2F, permitiendo la activación de la TU E2 (Tabla 1) [24].

MLTU

La síntesis de DNA viral activa los genes tempranos retrasados llamados IVa2, IX y L4. IVa2 codifica para una proteína con el mismo nombre que tiene actividades asociadas a la encapsidación del genoma viral y la activación de la MLTU y L4P [35-39]. Dentro de la MLTU está el promotor de L4P, que dirige la expresión de los genes de L4-22K y L4-33K [25]. La pIX es una proteína estructural que también participa en la activación de los promotores E1A, E4 y MLP. Iniciando la fase tardía la actividad del promotor de la MLTU aumenta cerca de 100 veces produciendo los mensajeros de las familias L1-L5 [11]. Los genes expresados en la fase tardía se encuentran organizados en una sola unidad transcripcional que puede producir un mRNA de 28 kb aproximadamente. Las proteínas virales sintetizadas en la fase tardía del ciclo de replicación son principalmente estructurales. La replicación del genoma viral y activación de los genes virales IVa2, pIX y L4 y la activación de la MLTU permiten una transición de la fase temprana a la fase tardía. [26].

Los mecanismos de regulación del programa de expresión de los genes virales por las proteínas virales puede dividirse en dos. La proteína E1A, que como se describió arriba puede participar en la regulación de la transcripción de cada uno de los promotores virales, puede asociarse a promotores a través de su interacción con proteínas que se asocian directamente con el DNA y de esta forma regula a cada una de las TU. En contraste la proteína viral IVa2 puede asociarse directamente al DNA y funcionar como un factor transcripcional regulando a MLP y L4. Hasta ahora se conoce que las proteínas virales IVa2, pIX, DBP, E4orf6/7, E4orf3, L4-22K y L4-33K tienen un efecto regulatorio en uno o dos promotores adenovirales. En contraste, evidencias recientes en el grupo muestran que la proteína E1B podría funcionar como un regulador de múltiples unidades transcripcionales.

| Promotor | Promueve | Reprime | Referencias |
|----------|---|-------------------------|--------------------------|
| E1A | Proteínas de respuesta a cAMP, pIX, E1A | E1A, E1B-19K, E1B-55KDa | [34] [35] [36] [37] [38] |
| E1B | E1A, E1B-19K, Sp1, TFIIID, E1B-55KDa | | [37] [39] [40] |
| E4 | E1A, pIX, cAMP, E4F, ATF2, E1B-19K, E1B-55KDa | DBP, E4Orf4, E1B-55KDa | [36] [38] [41] [42] |

| | | | |
|------|---|-----------------------|--|
| E3 | E1A, TNF- α , NF κ B, NF-1, AP-1, ATF, E1B-19K, E1B-55KDa | | [37] [43] [44] |
| E2E | E1A, PML-II, E2F, E4Orf6/7, ATF, TBP, DBP, E1B-19K, E1B-55KDa | | [37] [45] [46] [47] [48] |
| E2L | YB-1, CTCF, E1B-55KDa | E1A | [26][49] |
| Iva2 | E1A, TFIID, TBP, MLTF, E1B-55KDa | Iva2-RF | [45][50] [51] [52] |
| pIX | E1A, E1B-19KDa, E4, SP-1, TFIID, L4-22K, E1B-55KDa | E1B-55KDa | [52][53] |
| L4 | E1A, p53, E4Orf3, Iva2, E1B-55KDa | L4-33K, TFII-I | [32] [54] |
| ML | E1A, pIX, DBP, Iva2, USP, TFIID, USF1, CP-1, CTCF, MLTF, MAZ, Sp1, TBP, L4-22K, L4-33K, E1B-55KDa | L4-22K+SP1, E1B-55KDa | [50] [54] [55] [56] [49] [47] [57] [58] [38] |

Tabla 1. Factores proteínas que regulan a los promotores virales.

Regulación de promotores adenovirales por E1B-55KDa

Como se describió arriba, la E1B es una proteína multifuncional que es necesaria para la expresión eficiente de los genes virales tempranos y tardíos [27], la replicación eficiente del genoma viral [28], la producción eficiente de progenie viral [29] y la composición y función de los RC. Sin embargo, hasta el momento no se han descrito los mecanismos moleculares en cada uno de los casos. Se sabe que la modificación post-traducciona de la proteína por fosforilación en las Serina (S) 490 (S490), Serina (S) 491 (S491) y en la Treonina (T) 495 (T495) tiene un efecto en la localización celular y actividades de la proteína [29]. Se conoce que la fosforilación de la T495 es necesaria para su localización en los RC y esto correlaciona con la replicación eficiente del genoma viral; de la misma forma, la fosforilación en la S490, S491 y T495 afecta la localización de la E1B a los RC y correlaciona con la formación eficiente de los RC y producción de progenie viral [29]. En el grupo se demostró

que la E1B aumenta o disminuye la transcripción de un gen reportero regulando la actividad de varios promotores virales en tiempos tempranos y tardíos del ciclo de replicación viral [11]. Se demostró que en la fase temprana la E1B activa los promotores de E1B, E2E, E2L y MLTU en células infectadas [14, 33] y que en la fase tardía activa a los promotores E1B, E2E, E2L, E3 y E4. Adicionalmente, se encontró que la fosforilación de la E1B reprime a los promotores E1A, E3, pIX y E4 en la fase temprana y, pIX y ML en la fase tardía. Como se mencionó antes, las proteínas E1A regulan a cada uno de los genes virales y otras proteínas virales sólo regulan a uno o dos genes. Estos experimentos demuestran que la E1B regula la transcripción de ocho de los diez genes virales en diferentes tiempos del ciclo de replicación y que su estado de fosforilación regula la activación o represión de los promotores. Utilizando la técnica de inmunoprecipitación de cromatina se demostró que la E1B de HAdV-12 puede interactuar con el promotor p21 celular a través de su interacción con p53 [38, 39]. Esta evidencia sugiere que la proteína viral regula la transcripción de genes a través de su interacción con proteínas que hacen contacto directo con el DNA. Resultados preliminares de experimentos de inmunoprecipitación de cromatina han mostrado que la E1B se asocia al promotor de E1A. Sin embargo, no se ha determinado si la asociación con el promotor de E1A es directa sobre el DNA o a través de otras proteínas [22]. Se reportó que la E1B puede interactuar con más de 70 proteínas. Trabajos previos de mi licenciatura encontraron que dentro del interactoma de E1B hay 33 proteínas asociadas a la biogénesis de RNA. Además se analizaron las secuencias de los promotores virales y se encontró que proteínas celulares que interactúan con la E1B tienen una o dos secuencias blanco en los promotores virales. Estas proteínas son WTN1, RUNX1 y p53 [31]. Estas evidencias sugieren que la E1B podría regular la actividad de los promotores interactuando con otras proteínas que se asocian directamente al DNA.

Hipótesis

- La fosforilación de la proteína E1B-55KDa modula su actividad como regulador transcripcional dual.

Objetivo General

- Determinar el efecto de la fosforilación de E1B-55KDa sobre su actividad en la regulación de promotores adenovirales.

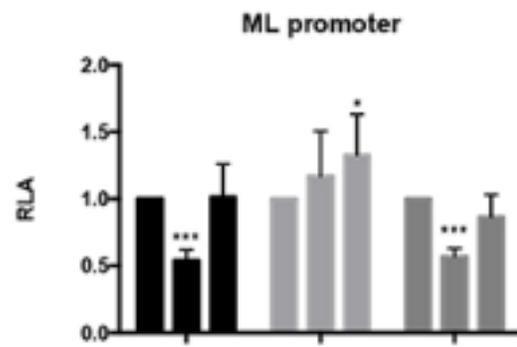
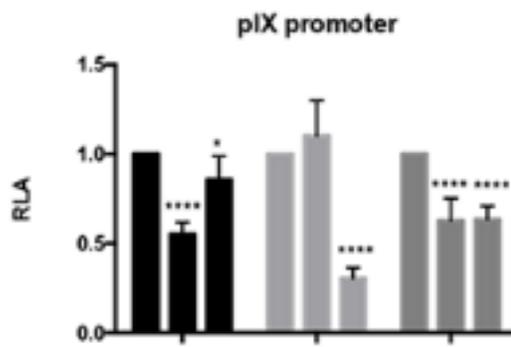
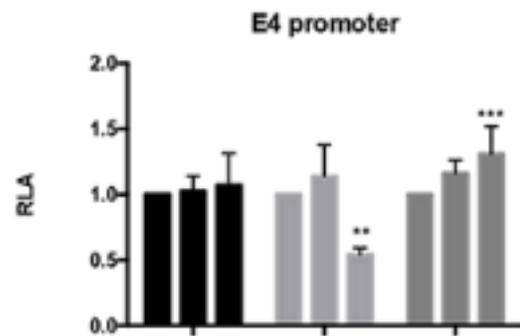
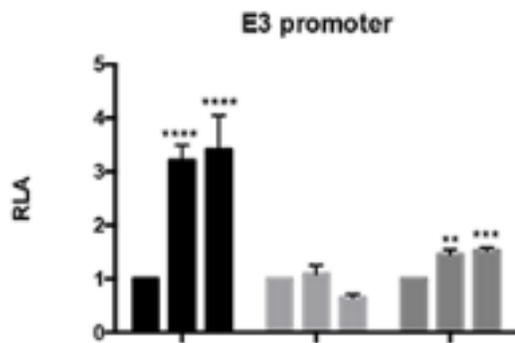
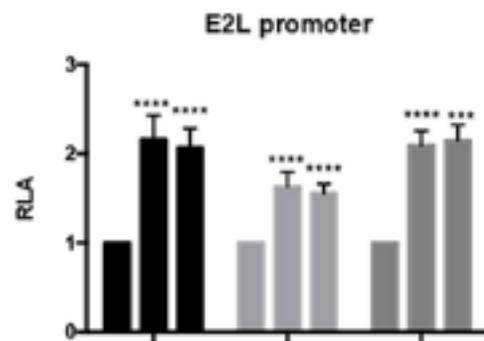
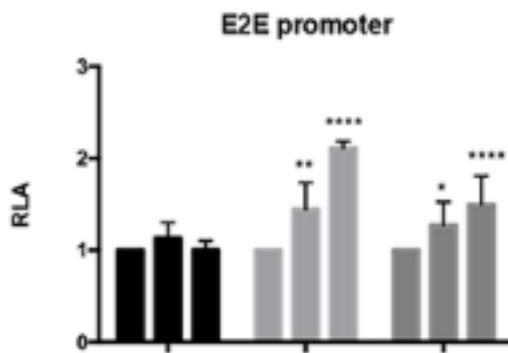
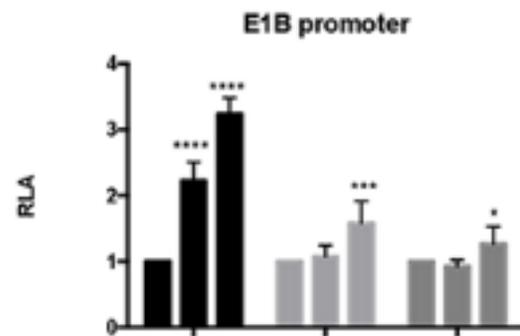
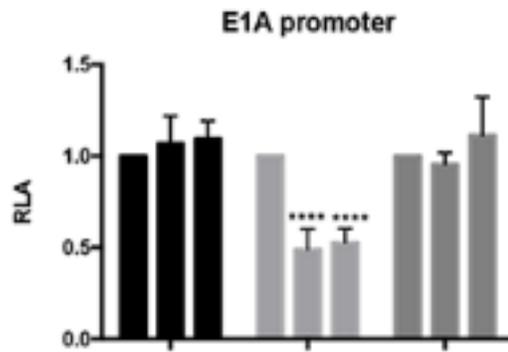
Objetivos Particulares

1. Determinar si la E1B regula a los promotores intermedios, IVa2 y L4P.
2. Determinar si la fosforilación de la E1B regula su actividad como factor de transcripción.
3. Determinar el efecto de la fosforilación en la T495 sobre la actividad de la proteína E1B en los promotores.
4. Determinar si la E1B interacciona con los promotores adenovirales en células transfectadas.
5. Análisis bioinformático para identificar posibles interacciones de la E1B con proteínas en los Compartimentos de Replicación.
6. Análisis bioinformático del efecto de la E1B sobre la asociación de proteínas que participan en la regulación de la expresión génica a los Compartimentos de Replicación.

Resultados

La proteína E1B regula la actividad de los promotores intermedios tempranos

Como se describió en la introducción, la regulación de la expresión de los genes de adenovirus durante el ciclo de replicación viral está coordinado por proteínas celulares y virales. La combinación de las diferentes proteínas es necesaria para la producción eficiente de progenie viral. Como se mencionó en la introducción el ciclo de replicación viral está dividido en dos fases, una temprana y una tardía, separados por el inicio de la replicación del genoma viral. Durante la transición de la fase temprana a la tardía, se activan genes virales intermedios IVa2 y L4P. Los productos IVa2, L4-22K y L4-33K son necesarios para la activación eficiente del promotor MLP. Utilizando a los promotores virales que dirigen la expresión del gen reportero de luciferasa en células que fueron transfectadas con plásmidos que expresan a la proteína E1B Wt o la E1B en la que los tres sitios susceptibles de ser fosforilados fueron sustituidos por aspartatos (E1B-PM) mimetizando el estado constitutivamente fosforilado de la proteína (Fig. 3, barras negras), y en células que fueron transfectadas con estos plásmidos y posteriormente infectadas con un adenovirus mutante que no dirige la expresión de la E1B (barras grises). Las células se cosecharon a un tiempo temprano (8 hpi, barras gris claro) y un tiempo tardío (24 hpi, barras gris oscuro) y se midió la actividad de luciferasa. Los experimentos demostraron que la E1B puede regular a 8 promotores adenovirales. Hasta el momento no se conocía si la E1B podía regular a los promotores intermedios, que son necesarios para una eficiente activación del promotor MLP. Resultado en la eficiente transición de la fase temprana a la tardía y la producción eficiente de progenie viral [11].



| Prom | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
|----------|---|---|---|-------|---|---|--------|---|---|
| pE1B WT | - | + | - | - | + | - | - | + | - |
| pE1B PM | - | - | + | - | - | + | - | - | + |
| H5pm4149 | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| | | | | 8 hpi | | | 24 hpi | | |

| Prom | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
|----------|---|---|---|-------|---|---|--------|---|---|
| pE1B WT | - | + | - | - | + | - | - | + | - |
| pE1B PM | - | - | + | - | - | + | - | - | + |
| H5pm4149 | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| | | | | 8 hpi | | | 24 hpi | | |

Para determinar si la E1B puede regular la actividad de los promotores tempranos intermedios se midió la expresión del gen reportero de la luciferasa dirigida por el promotor de IVa2 o L4P. Se establecieron las mismas condiciones que se mencionaron antes, se transfectaron células con los plásmidos que expresan a la proteína E1B Wt o la E1B en la que los tres sitios susceptibles de ser fosforilados fueron sustituidos por aspartatos (E1B-PM) mimetizando el estado constitutivamente fosforilado de la proteína (Fig. 4, barras negras), y en células que fueron transfectadas con estos plásmidos y posteriormente infectadas con un adenovirus mutante que no dirige la expresión de la E1B (barras grises), como se describe en Materiales y Métodos. Las células se cosecharon a un tiempo temprano (8 hpi, barras gris claro) y un tiempo tardío (24 hpi, barras gris oscuro) y se midió la actividad de luciferasa como se describe en Materiales y Métodos. Como controles se incluyó tanto la transfección, como la transfección e infección, de células con combinaciones del plásmido que porta el promotor de IVa2 o L4 sin la co-

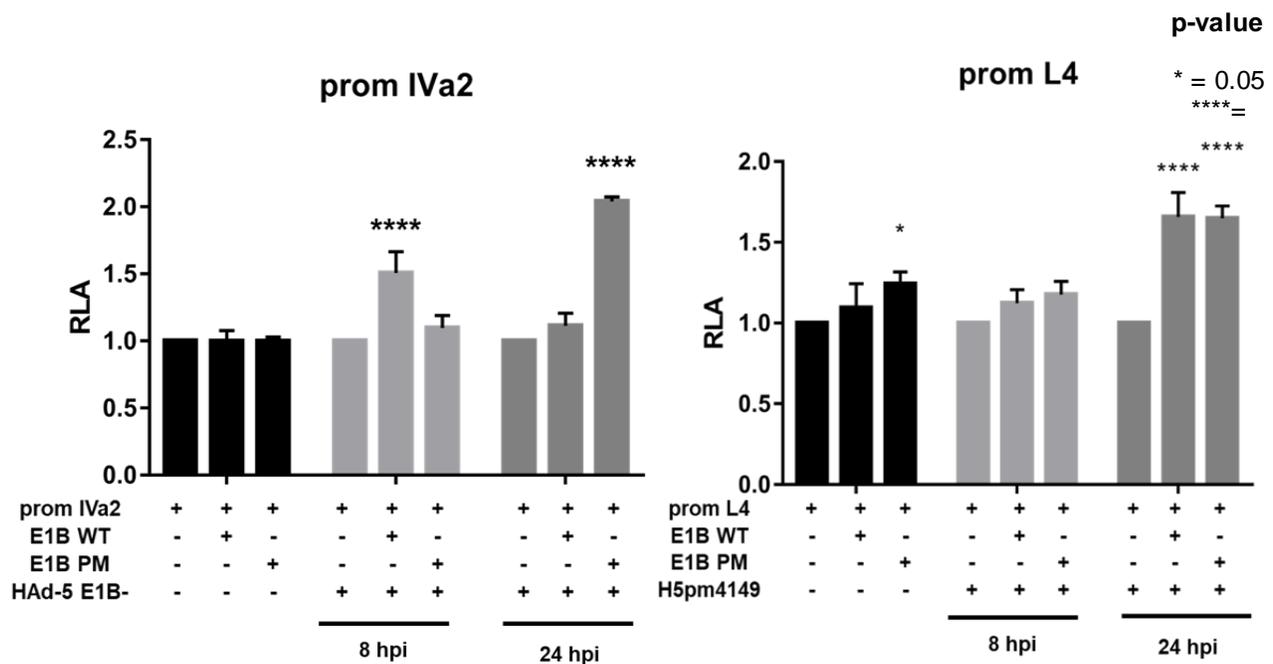


Figura 4. TITULO DESCRIPTIVO DEL EXPTO Y RESULTADOS: EFECTO DE E1B SOBRE LOS PROMOTORES DE IVA2 Y L4P. Células H1299 fueron transfectadas con la construcción de promotores clonados con el vector pGL3-Basic y co-transfectadas con el NOMBRE DE LOS PLASMIDOS que expresa a E1B-WT o E1B-PM. Las muestras fueron analizadas a las 28 horas post-transfección (28hpt). Además las mismas condiciones fueron analizadas en el contexto de la infección a 8 y 24 hpi. La actividad relativa de luciferasa se normalizó contra la actividad de la luciferasa de Renilla.

transfección de los plásmidos que expresan a E1B Wt o E1B-PM. Los resultados se presentan en la Fig. 4 en donde los datos se expresan como unidades relativas de la actividad de luciferasa en células transfectadas o infectadas en ausencia de la E1B o presencia de la E1B Wt o la E1B-PM. La E1B WT en la fase temprana activa al promotor de IVa2, interesantemente la E1B-PM en la fase tardía activa al promotor de IVa2. En células transfectadas la E1B en su estado constitutivamente fosforilado (E1B-PM) aumentó la expresión dirigida por el promotor L4, de la misma forma en células infectadas, la E1B-PM y a la E1B WT tiene un efecto similar en la fase tardía sobre el promotor L4. Estos experimentos demuestran que la E1B puede regular genes intermedios que resultan en la producción eficiente de las proteínas IVa2, L4-22K y L4-33K que activan al promotor MLP y una eficiente transición de la fase temprana a la tardía. En conclusión se determinó que la E1B regula a todos los genes virales. Además que la fosforilación de la E1B es determinante para la regulación de los promotores virales.

La fosforilación en la Treonina 495 de la E1B regula su actividad como factor de transcripción

Cómo se mencionó arriba la fosforilación de la E1B es necesaria para la regulación de todos los promotores virales, además trabajos previos en el laboratorio demostraron que cuando se mimetiza el estado fosforilado de la T495 por Aspartato, E1B-T/D, la E1B se relocaliza eficientemente en los RC y esto correlaciona con la eficiente acumulación de DNA y producción de progenie viral. Por lo que nos preguntamos cual es el efecto de la fosforilación en la Treonina 495 de la E1B sobre la regulación de promotores adenovirales. Utilizando a los promotores E1A, E1B y MLP virales que dirigen la expresión del gen reportero de luciferasa en células que fueron transfectadas con plásmidos que expresan a la proteína E1B Wt, la proteína E1B que mimetiza el estado fosforilado en la T495, E1B-T/D, o la E1B que no puede ser fosforilada en la T495, porque tiene la mutación por Alanina, E1B-T/A (Fig. 4, barras negras), y en células que fueron transfectadas con estos plásmidos y posteriormente infectadas con un adenovirus mutante que no dirige la expresión de la E1B (barras grises).

Las barras negras indican células transfectadas y en las barras grises se indican células infectadas y co-transfectadas representando dos tiempos del ciclo de replicación viral; uno temprano (8hpi) y uno tardío (24 hpi). La E1B-T/A en células transfectadas tiene un efecto activador sobre el promotor E1A, por otro lado, la E1B-T/D, activa al promotor de E1A. Sobre el promotor de E1B la proteína E1B Wt y la E1B-T/D activan al promotor. Interesantemente cuando la E1B no puede ser fosforilada en la T495, E1B-T/A no hay cambios en la regulación del promotor. En células infectadas y co-transfectadas, en presencia de otras proteínas virales la E1B Wt a las 8 hpi reprime al promotor de E1A y activa al promotor de MLP, interesantemente, la E1B-T/D tiene un efecto similar sobre el promotor de E1A. Para el promotor MLP a las 8 hpi la E1B Wt y la E1B-T/D activan al promotor. En células transfectadas con la E1B-T/A el efecto regulatorio se anula. A las 24 hpi solo la E1B-T/D activa al promotor de E1B. Estos experimentos demuestran que la fosforilación de la E1B en la T495 es determinante para la regulación de los promotores virales.

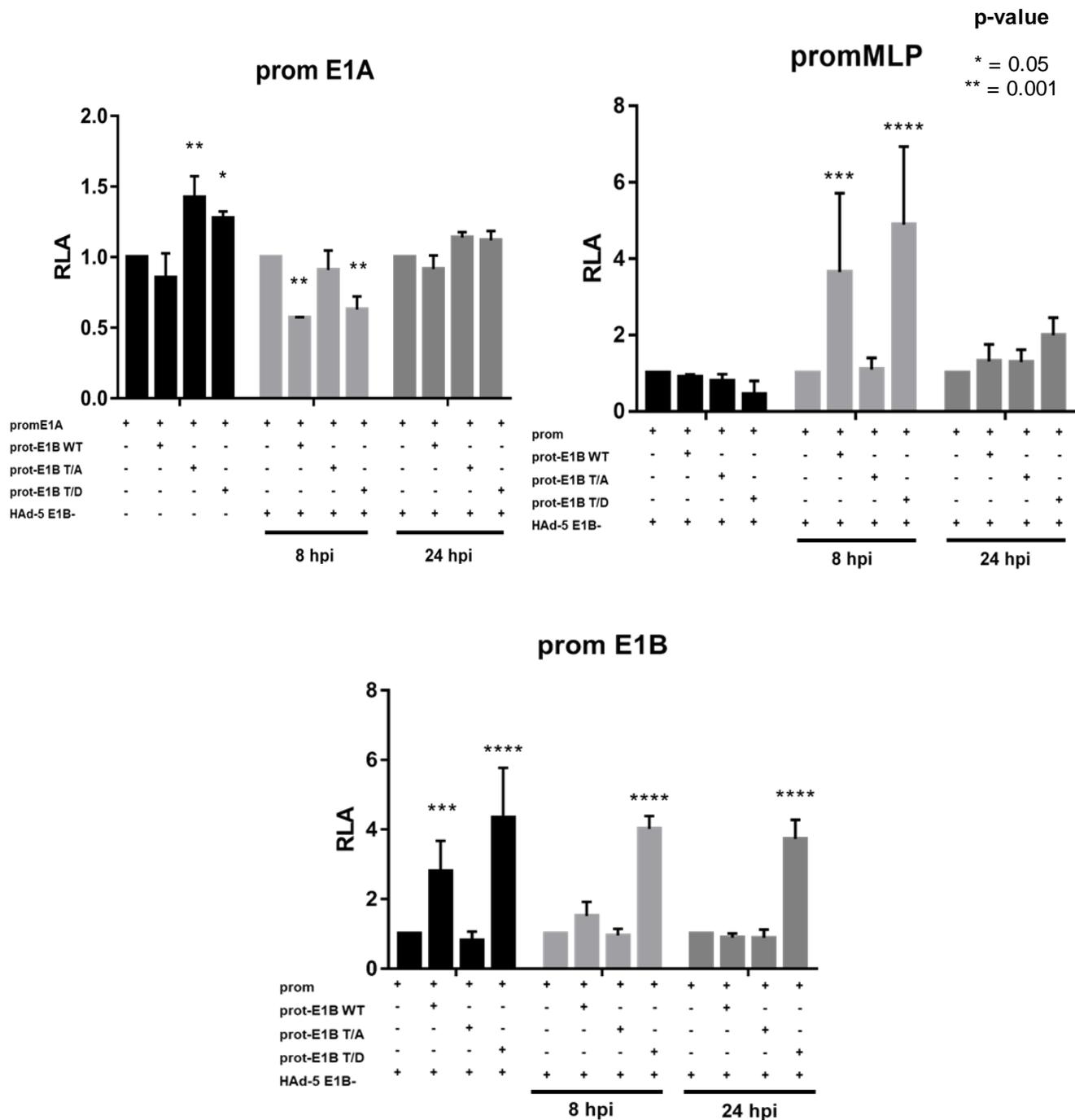


Figura 5. La fosforilación de la T495 de la E1B regula su actividad como factor de transcripción. Células H1299 fueron transfectadas con la construcción de promotores clonados con el vector pGL3-Basic y co-transfectadas con el pCDNA que expresa a E1B-WT, E1B-T495A o E1B-T495D. Las muestras fueron analizadas a las 28 horas post-transfección (28hpt). Además esas mismas condiciones fueron analizadas en el contexto de la infección a 8 y 24 hpi. La actividad relativa de luciferasa se normalizó contra la actividad de la luciferasa de Renilla.

Avances preliminares de Inmunoprecipitación de Cromatina

Cómo se mencionó antes, la E1B participa en diferentes actividades durante el ciclo de replicación viral, sin embargo, no se conocen cuáles son los mecanismos moleculares por los que lleva a cabo cada una de sus actividades. Se determinó que la E1B regula la actividad de cada uno de los promotores adenovirales, no obstante, no se conoce si la E1B se asocia directamente a DNA o interacciona con proteínas que tienen secuencias blanco en los promotores adenovirales. Para determinar si la E1B se asocia, directa o indirectamente, con promotores adenovirales se utilizó la técnica de Inmunoprecipitación de Cromatina acoplada a PCR. El experimento fue dirigido al promotor E1A, ya que se conoce que la E1B disminuye la actividad de este promotor en los ensayos de actividad relativa de la luciferasa [11]. Se co-transfectaron células H1299 con las siguientes combinaciones de plásmidos. Se establecieron nueve condiciones de co-transfección en el siguiente experimento utilizando células H1299 mostradas en la **Tabla 2**.

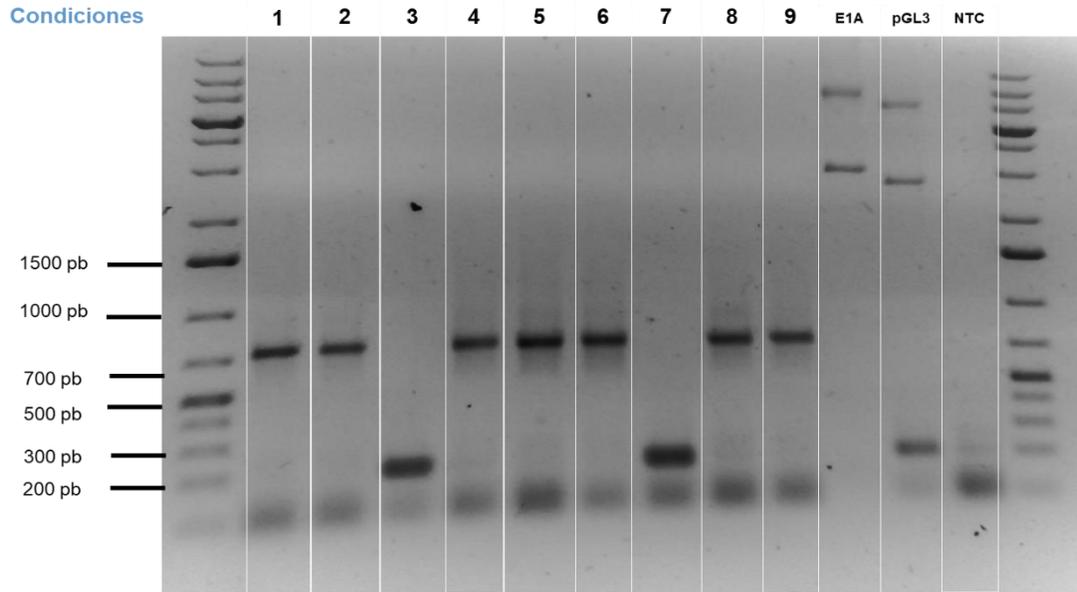
| Condiciones de co-transfección | 1° | 2° | 3° | 4° | 5° | 6° | 7° | 8° | 9° |
|--------------------------------|----------|---------------|----------|----------|----------|---------------|----------|----------|---------------|
| pCDNA que expresa a: | pE1A 13S | pE1A 13S | pE1A 13S | pCDNA 3 | pE1B 22S | pE1B 22S | pE1B 22S | pCDNA 3 | pCDNA 3 |
| | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Promotor | prom E1A | prom E1A | pGL3 | prom E1A | prom E1A | prom E1A | pGL3 | prom E1A | prom E1A |
| | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Anticuerpo | M73 | IgG anti-alfa | M73 | M73 | 2A6 | IgG anti-alfa | 2A6 | 2A6 | IgG anti-alfa |

Tabla 2. Condiciones de co-transfección para la Inmunoprecipitación de Cromatina.

Se co-transfectaron células con el plásmido que expresa a la proteína E1A 289R (E1A) y el plásmido que contiene al promotor de E1A (Tabla 2, condiciones 1 y 2). La condición uno se usó como control positivo para inmunoprecipitar al promotor E1A, la condición dos se usó como control negativo, se inmunoprecipito con el anticuerpo inespecífico anti-alfa tubulina, En la tercera condición se co-transfectaron

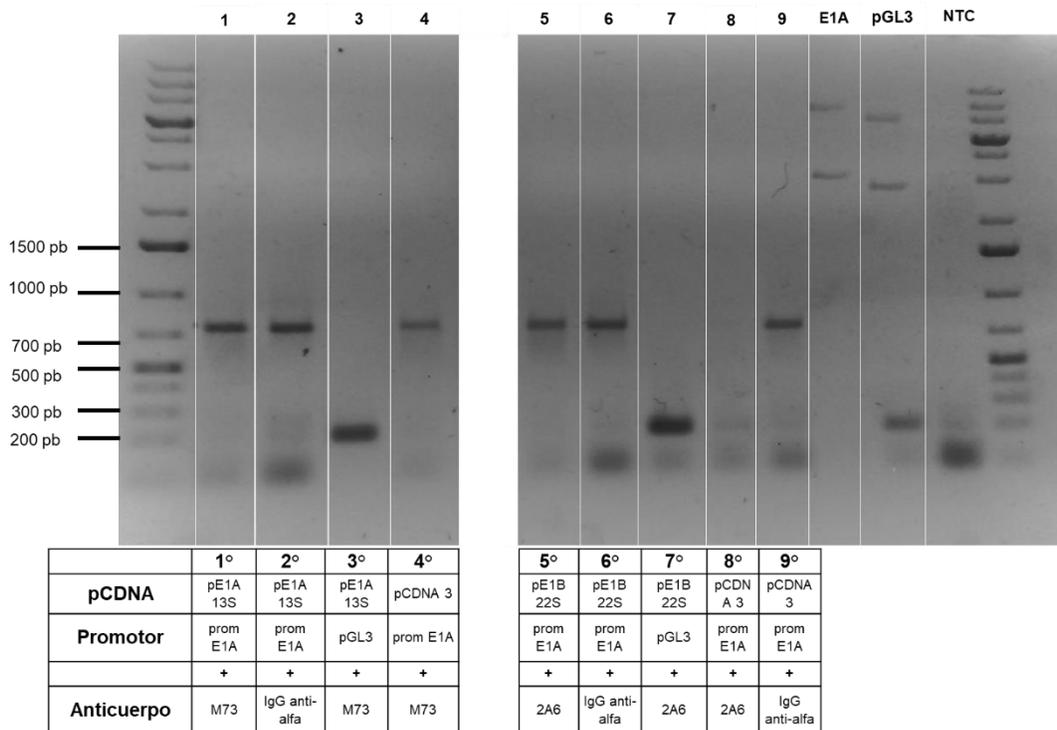
células con el plásmido que expresa a E1A y el plásmido que no contiene al promotor E1A, como control negativo, que demuestra que la proteína E1A no se une a regiones inespecíficas del plásmido pGL3-Basic. De la misma forma se co-transfectaron células con el plásmido que expresa a la proteína E1B con el promotor de E1A (condiciones 5 y 6). La condición 5 se utilizó para demostrar que la E1B puede asociarse e inmunoprecipitarse al promotor E1A, utilizando su anticuerpo anti-E1B, la condición 6 se usó como control negativo, se inmunoprecipito con el anticuerpo inespecífico anti-alfa tubulina En la séptima condición se co-transfectaron células con el plásmido que expresa a la E1B con el plásmido que no contiene al promotor de E1A (pGL3) como control negativo, que demuestra que la proteína E1B no se une a regiones inespecíficas del plásmido pGL3-Basic. Las condiciones 4, 8 y 9 se co-transfectaron células con el plasmido pCDNA 3.0 que no expresa a ninguna proteína viral con el promotor de E1A. Donde se utilizaron los anticuerpo anti-E1A, anti-E1B y anti-alfa tubulina que demuestran que los anticuerpos específicos no inmunprecipitan a proteínas celulares asociadas al promotor E1A. Para determinar que las células transfectadas tuvieran el plásmido del promotor E1A o el plásmido vacío de pGL3 se utilizó el lisado total de núcleos de cada una de las condiciones y se hizo PCR (figura 6). El producto de PCR esperado que contiene al promotor de E1A es de 737 nt para las condiciones 1, 2 4-6. 8 y 9. El producto esperado de PCR para las condiciones 3 y 7 es de 195 nt que corresponde al pGL3. Así mismo se utilizaron controles positivos para la reacción de PCR. En el carril 10 y 11 se utilizó como control positivo el templado que contiene al promotor E1A y el pGL3 respectivamente. En el carril 11 se utilizó como control una reacción de PCR sin templado. Estos resultados nos permiten concluir que las células transfectadas contienen al promotor de E1A y al pGL3. Para determinar si la proteína E1B puede asociarse e inmunorprecipitarse con el promotor de E1A se utilizaron las diferentes combinaciones de anticuerpos indicados en la figura 7 y se utilizaron los lisados totales de núcleos. El resultado esperado es que solo la condición uno con la combinación de plásmidos E1A, promotor E1A con M73 inmunoprecipiten con el promotor de E1A y la condición cinco con la combinación de plásmidos E1B, promotor E1A con el 2A6 inmunoprecipten con el promotor de E1A. Las condiciones

2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9 no debieron amplificar al promotor de E1A o al pGL3. Estos avances nos indican que la E1B si puede ser inmunoprecipitada con el promotor E1A, no obstante, es necesario modificar diferentes pasos de la inmunoprecipitación de cromatina para hacer más astringente las interacciones inespecíficas entre anticuerpos-proteína y demostrar que la E1B puede asociarse e inmunoprecipitarse a los promotores virales.



| | 1° | 2° | 3° | 4° | 5° | 6° | 7° | 8° | 9° |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| pCDNA | pE1A 13S | pE1A 13S | pE1A 13S | pCDN A 3 | pE1B 22S | pE1B 22S | pE1B 22S | pCDN A 3 | pCD NA 3 |
| | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Promotor | prom E1A | prom E1A | pGL3 | prom E1A | prom E1A | prom E1A | pGL3 | prom E1A | prom E1A |

Figura 6. Producto de PCR de núcleos totales lisados de células H1299 transfectadas.



| | 1° | 2° | 3° | 4° |
|-------------------|----------|---------------|----------|----------|
| pCDNA | pE1A 13S | pE1A 13S | pE1A 13S | pCDNA 3 |
| Promotor | prom E1A | prom E1A | pGL3 | prom E1A |
| | + | + | + | + |
| Anticuerpo | M73 | IgG anti-alfa | M73 | M73 |

| | 5° | 6° | 7° | 8° | 9° |
|-------------------|----------|---------------|----------|----------|---------------|
| pCDNA | pE1B 22S | pE1B 22S | pE1B 22S | pCDN A 3 | pCDNA 3 |
| Promotor | prom E1A | prom E1A | pGL3 | prom E1A | prom E1A |
| | + | + | + | + | + |
| Anticuerpo | 2A6 | IgG anti-alfa | 2A6 | 2A6 | IgG anti-alfa |

Figura 7. Producto de PCR de inmunoprecipitación de cromatina de células H1299 co-transfectadas.

Identificación de factores de transcripción del interactoma de E1B asociados a los Compartimentos de Replicación.

La técnica de inmunoprecipitación de cromatina no permite determinar si la interacción de la E1B con el DNA es directa o si la E1B interactúa con el DNA a través de otras proteínas. Lisa Y. Zhao et al. en 2007 determinaron que la E1B de adenovirus humanos tipo 12 (HAdV12) se asocia a secuencias blanco de p53 en el promotor de celular p21 [30]. En HAdV5 se identificó el interactoma de la E1B [32]. Dentro del interactoma se determinó que 5 proteínas celulares y 2 virales tienen secuencias blanco en los promotores adenovirales [31]. Adicionalmente experimentos de proteómica identificaron la composición de los RC (datos no publicados). Por lo que nos preguntamos cuáles proteínas celulares o virales que interactúan con las 6 proteínas celulares que tienen secuencias blanco en los promotores adenovirales están en los RC. Utilizando la herramienta bioinformática *R-studio* se identificaron 7 proteínas que interactúan con p53 y 3 proteínas que interactúan con RUNX1 y están en los RC (Fig. 8). Estos resultados nos permiten concluir que la E1B podría interactuar con diferentes TF en los RC y regular la actividad de los promotores virales a través de estas proteínas.

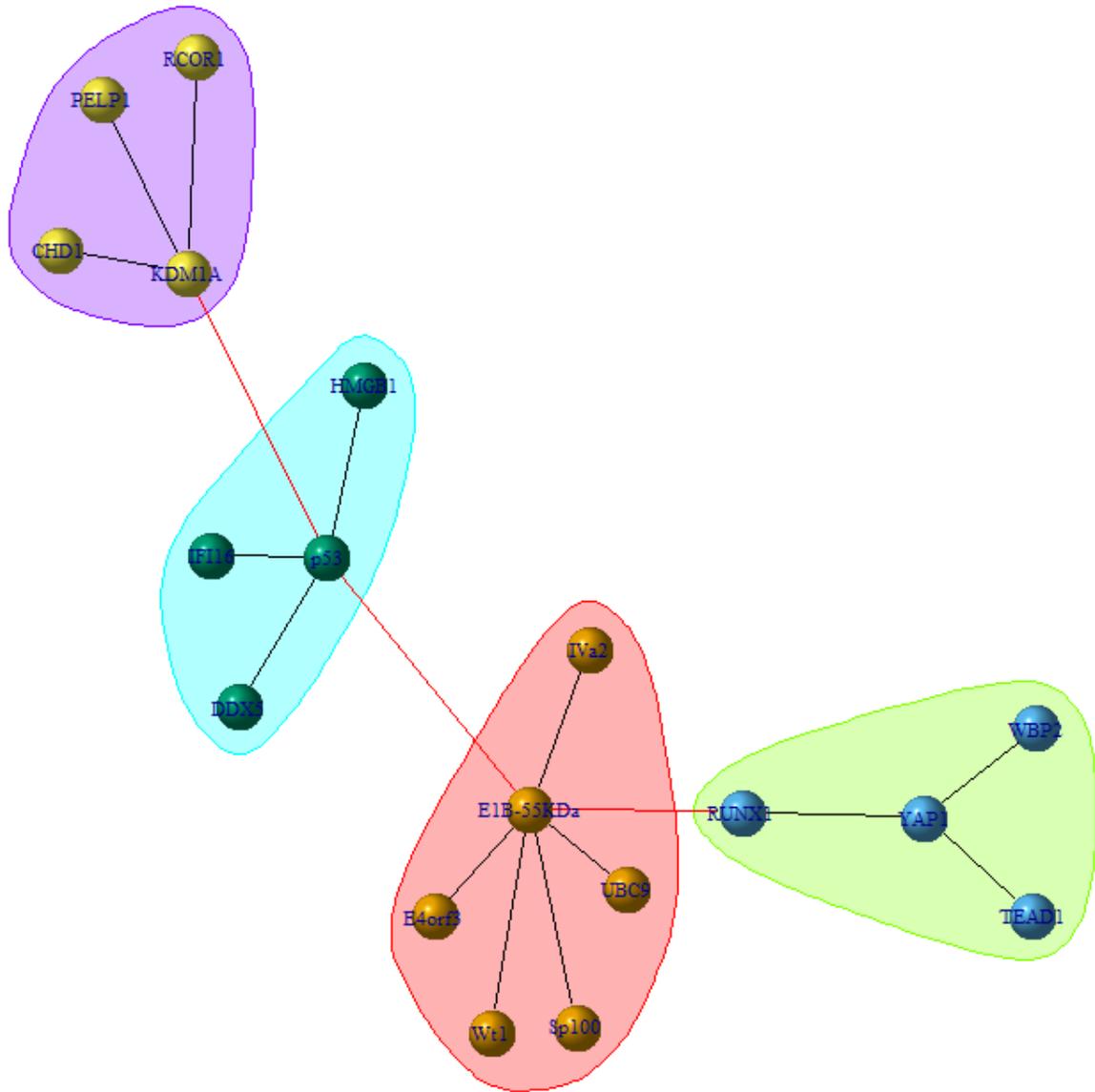


Figura 8. Red de interacción de los factores de transcripción asociados a los Compartimentos de Replicación que interactúan con E1B-55KDa. En rojo se muestran las proteínas que forman una agrupación (cluster) con la E1B, en verde se muestra el cluster del factor de transcripción RUNX1, en amarillo de Sp1, en azul de p53 y en morado del factor de transcripción KDMA.

Efecto de la E1B sobre la asociación de proteínas a los Compartimentos de Replicación durante el ciclo de replicación viral.

Como se describió en la introducción, en los compartimentos de replicación inducidos por la infección de Had-5 ocurre la síntesis de DNA viral, la transcripción y el procesamiento de los mRNAs. Se determinó que los RC cooptan diversas

proteínas celulares. Entre ellas, proteínas que participan en la replicación, reparación y recombinación del DNA, la transcripción, procesamiento de mRNA, remodelación de cromatina y proteínas que participan en mecanismos de defensa, entre muchas otras. En el laboratorio se establecieron condiciones para aislar fracciones de los RC [33]. Para determinar las diferencias en la composición de los RC durante el ciclo de replicación se infectaron células HFF con el virus silvestre Had-5 y el virus que no expresa a la proteína E1B. Posteriormente se cosecharon las células en tres tiempos diferentes, uno temprano 16hpi, uno intermedio cuando se replica el genoma viral 24 hpi y uno tardío y se analizaron por la técnica de aislamiento de RC para ser procesadas por espectrometría de masas a las 36 hpi. Hasta el momento no se conocen las interacciones proteína-proteína (IPP) que puedan ocurrir dentro de los RC. Por lo que nos preguntamos qué proteínas que están en los compartimentos de replicación podrían formar IPPs. Utilizando la base de datos de UNIPROT y *R-studio* se identificaron proteínas que pueden formar IPPs y que están en los compartimentos de replicación en tres diferentes tiempos durante el ciclo de replicación viral; 16 hpi, un tiempo temprano (Fig. 9-10), 24 hpi un tiempo en el que se replica el DNA viral (Fig. 11-12) y 36 hpi un tiempo tardío en el que se alcanza el nivel máximo de expresión de los genes tardíos e inicia la producción de progenie viral (Fig. 13-14). La figura 9 son las IPPs de los RC a las 16 hpi de células infectadas con Had-5 WT. Se observa que se generan grupos entre proteínas que pertenecen a sub-unidades del proteosoma. En células infectadas con Had-5 E1B- hay un aumento en la cantidad de proteínas y se generan diferentes grupos de interacción (Fig 10). A las 24 hpi los RC son similares y pueden formar grupos de proteínas relacionadas a la replicación de DNA, entre ellas, proteínas tipo MCM y PCNA (Fig. 11-12). A las 36 hpi en Had-5 WT se forman grupos relacionados a la subunidad del proteosoma, proteínas relacionadas al splicing de mRNA y a la

16 hpi WT

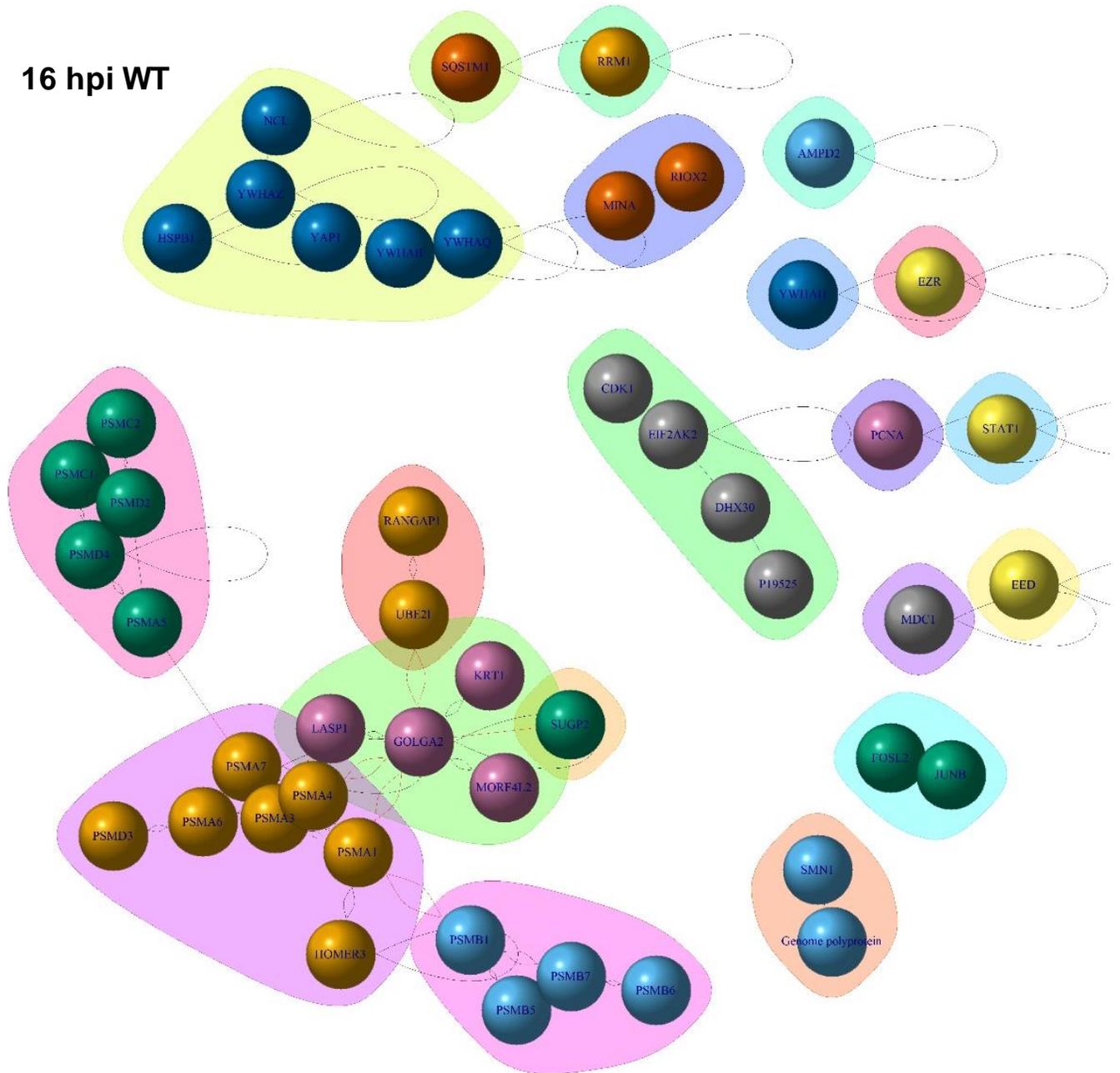


Fig 9. Interacción proteína-proteína de las fracciones de compartimentos de replicación (16 hpi WT). Proteínas que podrían formar interacciones en los compartimentos de replicación de células infectadas con Had-5 WT.

16 hpi E1B-

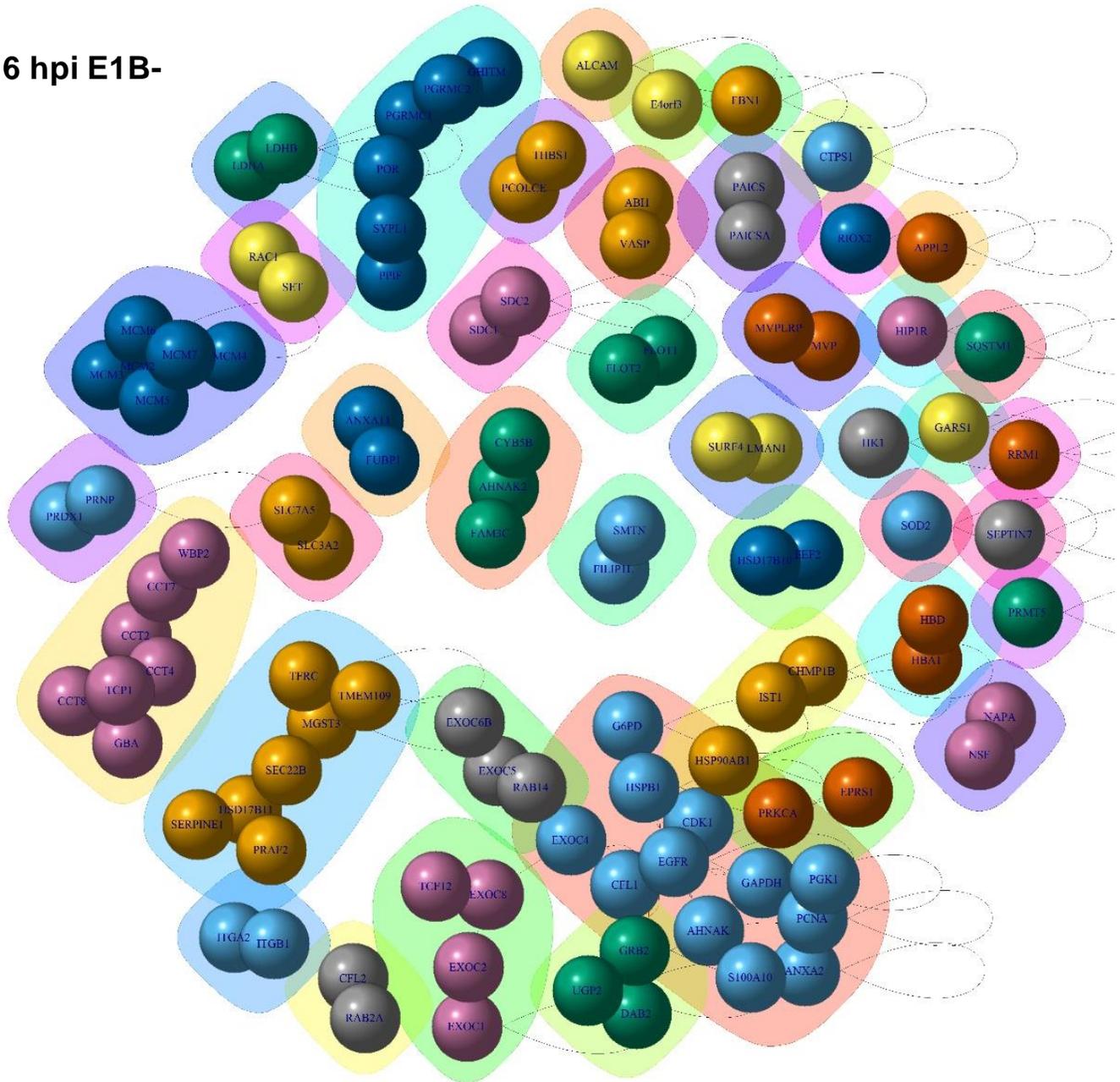


Fig 10. Interacción proteína-proteína de las fracciones de compartimentos de replicación (16 hpi E1B-). Proteínas que podrían formar interacciones en los compartimentos de replicación de células infectadas con Had-5 E1B-.

24 hpi WT

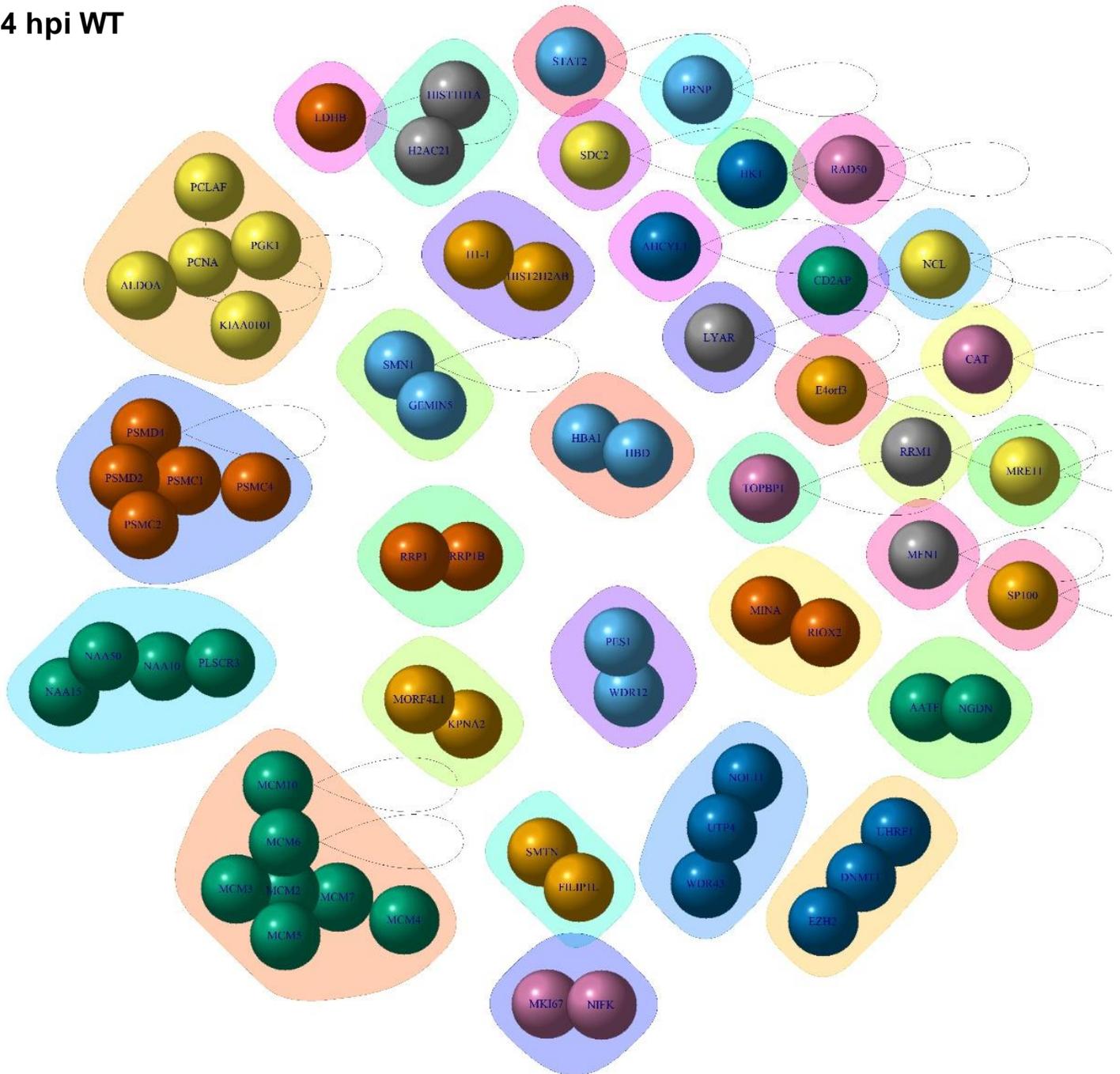


Fig 11. Interacción proteína-proteína de las fracciones de compartimentos de replicación (24 hpi WT). Proteínas que podrían formar interacciones en los compartimentos de replicación de células infectadas con Had-5 WT.

24 hpi E1B-

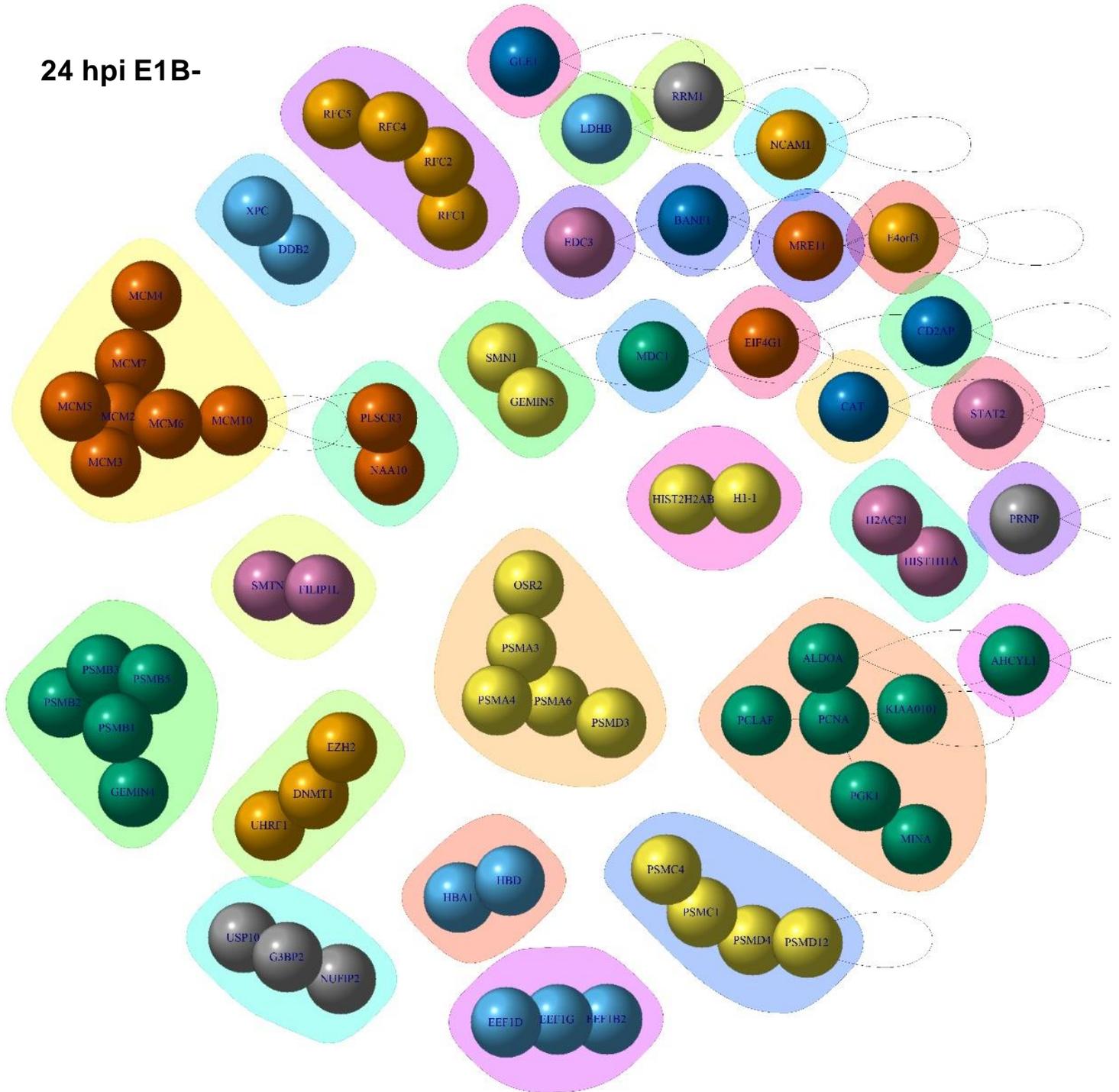


Fig 12. Interacción proteína-proteína de las fracciones de compartimentos de replicación (24 hpi E1B-). Proteínas que podrían formar interacciones en los compartimentos de replicación de células infectadas con Had-5 E1B-.

36 hpi WT

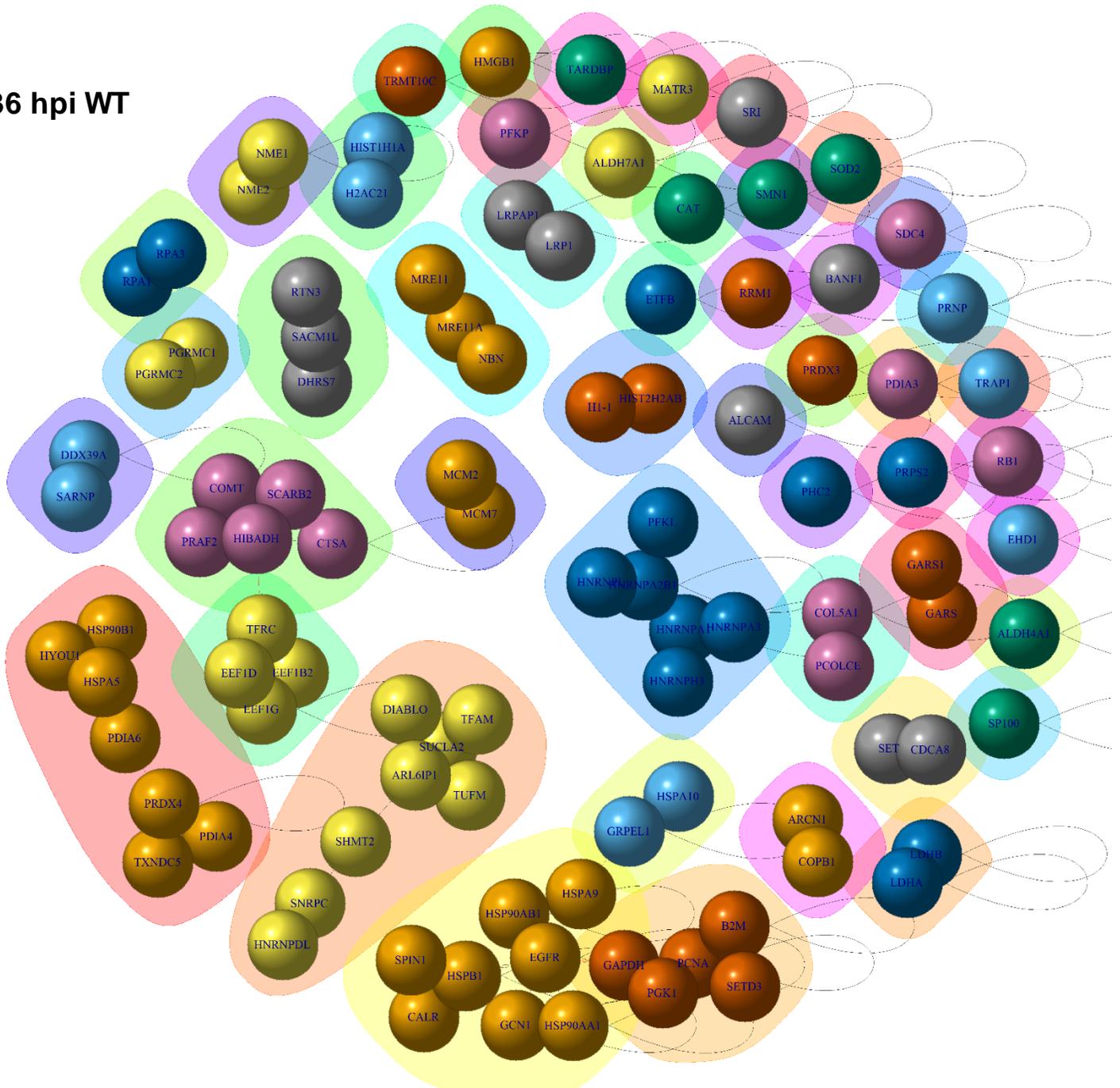


Fig 13. Interacción proteína-proteína de las fracciones de compartimentos de replicación (36 hpi WT). Proteínas que podrían formar interacciones en los compartimentos de replicación de células infectadas con Had-5 WT.

36 hpi E1B-

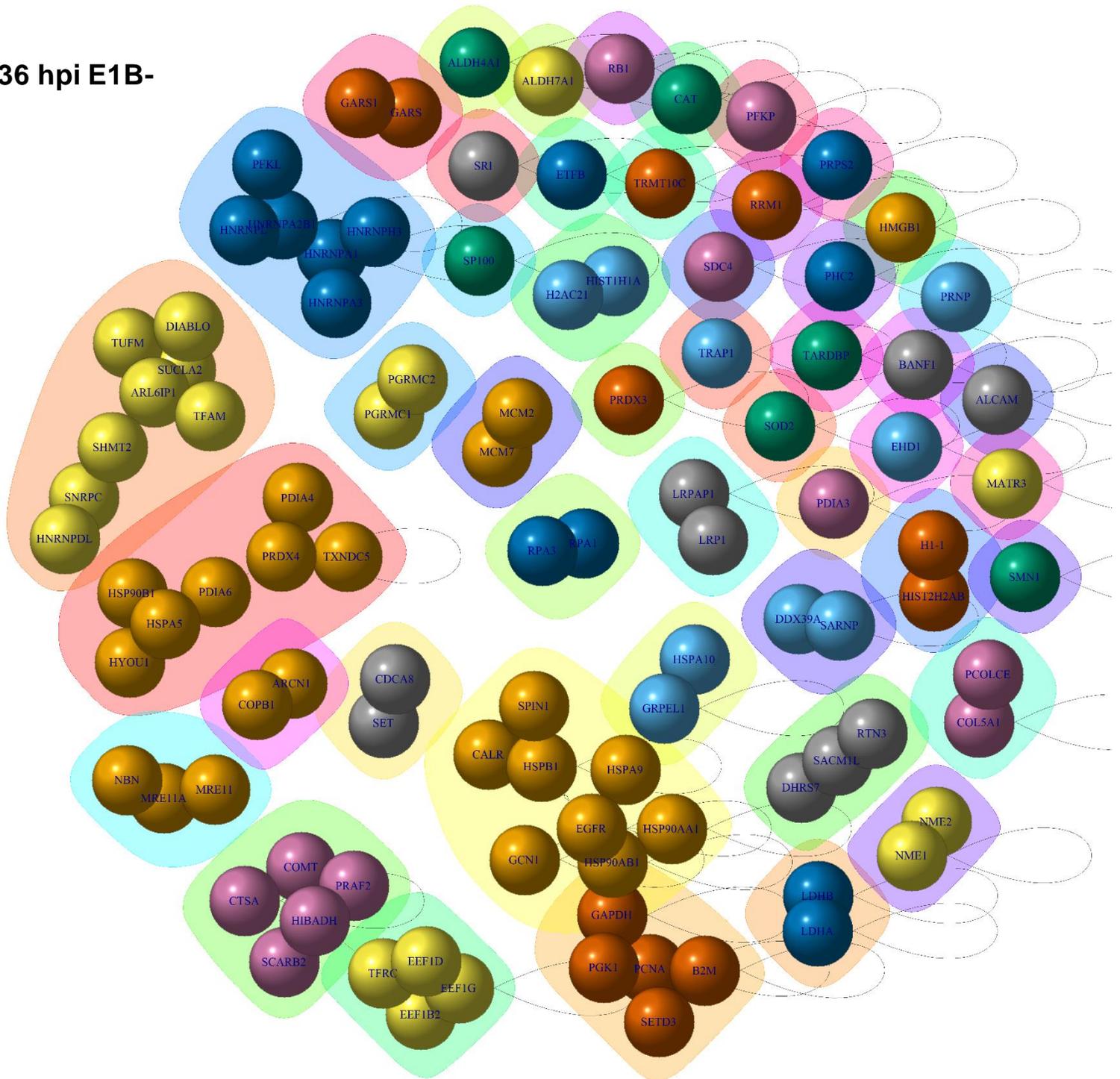


Fig 14. Interacción proteína-proteína de las fracciones de compartimentos de replicación (36 hpi E1B-). Proteínas que podrían formar interacciones en los compartimentos de replicación de células infectadas con Had-5 E1B-.

replicación de DNA (Fig. 13). En contraste, en células infectadas con Had-5 E1B- se forman diferentes grupos relacionados a subunidades del proteosoma (Fig. 14). Como se mencionó antes, los RC están compuestos por diferentes proteínas con diferentes actividades. Durante el ciclo de replicación viral la composición, tamaño y morfología de los RC cambia [15] [34]. Como se mostró las IPPs en los RC en células infectadas con Had-5 WT o Had-4 E1B- es diferente y se forman grupos de proteínas con diversas actividades. Para identificar el cambio en la composición de los RC, se compararon las proteínas que pueden formar IPPs en los RC en cada uno de los tiempos entre los virus Had-5 WT y Had-5 E1B- (fig 15). Además se compararon las proteínas de todos los tiempos para Had-5 WT y Had-5 E1B- (fig. 16). La composición de los RC a las 16 hpi es muy diferente; sólo se comparten 6 proteínas celulares en células infectadas con Had-5 WT y Had-5 E1B- (fig. 15 panel A). Además cuando no está la E1B hay más proteínas en los RC. A las 24 hpi los RC son más similares y comparten la mayoría de las proteínas, específicamente, proteínas relacionadas a la replicación de DNA (fig. 15 panel B). A las 36 hpi los RC aumentan su tamaño y coalescen. Su composición entre células infectadas con Had-5 WT o Had-5 E1B- son similares y comparten la mayoría de sus proteínas (fig. 15 panel C). Posteriormente se compararon las proteínas de los RC en todos los tiempos de células infectadas con Had-5 WT o Had-5 E1B- (fig. 16). Interesantemente la composición de las proteínas que pueden formar IPPs durante el ciclo de replicación viral cambia mucho. Sólo 3 proteínas celulares se comparten en todos los tiempos en células infectadas con Had-5 WT (fig. 16 panel A). En comparación de los RC inducidos por Had-5 E1B- hay más proteínas que se comparten en todos los tiempos (fig. 16 panel B).

Cambios en la composición de los compartimentos de replicación en presencia o ausencia de E1B.

Como se mostró antes, la composición, tamaño y forma de los compartimentos de replicación cambian durante el ciclo de replicación viral. Además las proteínas que pueden formar interacciones proteína-proteína es diferente en presencia y ausencia de la E1B. Por lo que nos preguntamos cuales eran las funciones generales de las proteínas que componen a los RC en presencia o ausencia de la E1B durante el ciclo de replicación viral. Utilizando la base de datos de eggNOG mapper, que utiliza grupos ortólogos de genes para determinar la función de las proteínas, se determinó las funciones generales de las proteínas que pueden formar IPPs en los RC (fig.17-19). Durante la fase temprana del ciclo de replicación viral, se establecen condiciones óptimas para la replicación del genoma y contender contra la respuesta innata celular. A las 16 hpi en células infectadas con Had-5 WT, las proteínas más abundantes son las del grupo O, que tienen actividades relacionadas a la modificaciones post-traduccionales, de la misma forma las proteínas relacionadas a la transcripción, grupo K y proteínas de citoesqueleto, grupo V son las más abundantes (fig.17 panel A). En contraste a las 16hpi en ausencia de la E1B, el porcentaje de proteínas del grupo O, K y Z disminuyen. Las proteínas más abundantes en los RC en ausencia de E1B son, proteínas relacionadas a mecanismos de defensa, grupo V, proteínas de transducción de señales, grupo T y el grupo S, que son proteínas que no se conocen suficiente para ser caracterizadas (fig 17. panel B). La transición de la fase temprana a la tardía inicia cuando el genoma se replica. A las 24 hpi en células infectadas con Had-WT, las proteínas más abundantes son del grupo L, proteínas con funciones relacionadas a la replicación y reparación del genoma; las proteínas del grupo K, con funciones relacionadas a la transcripción (fig. 18 panel A). Interesantemente las proteínas relacionadas a la replicación de DNA aumentan en ausencia de E1B, pero, las proteínas relacionadas a la transcripción disminuyen. Por otro lado las proteínas del grupo O, relacionadas a cambios post-traduccionales aumentan (fig. 18 panel B). Durante la fase tardía se sintetizan principalmente proteínas de la cápside viral para la producción de progenie y empaquetamiento del genoma. Las proteínas más

abundantes a las 36 hpi en células infectadas con Had-5 WT son proteínas relacionadas al procesamiento de mRNA, grupo A; proteínas relacionadas a la transcripción, grupo K; y replicación de DNA, grupo L (fig. 19 panel A). En ausencia de la proteína E1B el porcentaje de proteínas de procesamiento de mRNA disminuye 3 veces; las proteínas relacionadas a la transcripción y replicación del genoma también disminuyen. Interesantemente las proteínas del grupo O, relacionadas a los cambios post-traduccionales aumentan en ausencia de E1B (fig. 19 panel B).

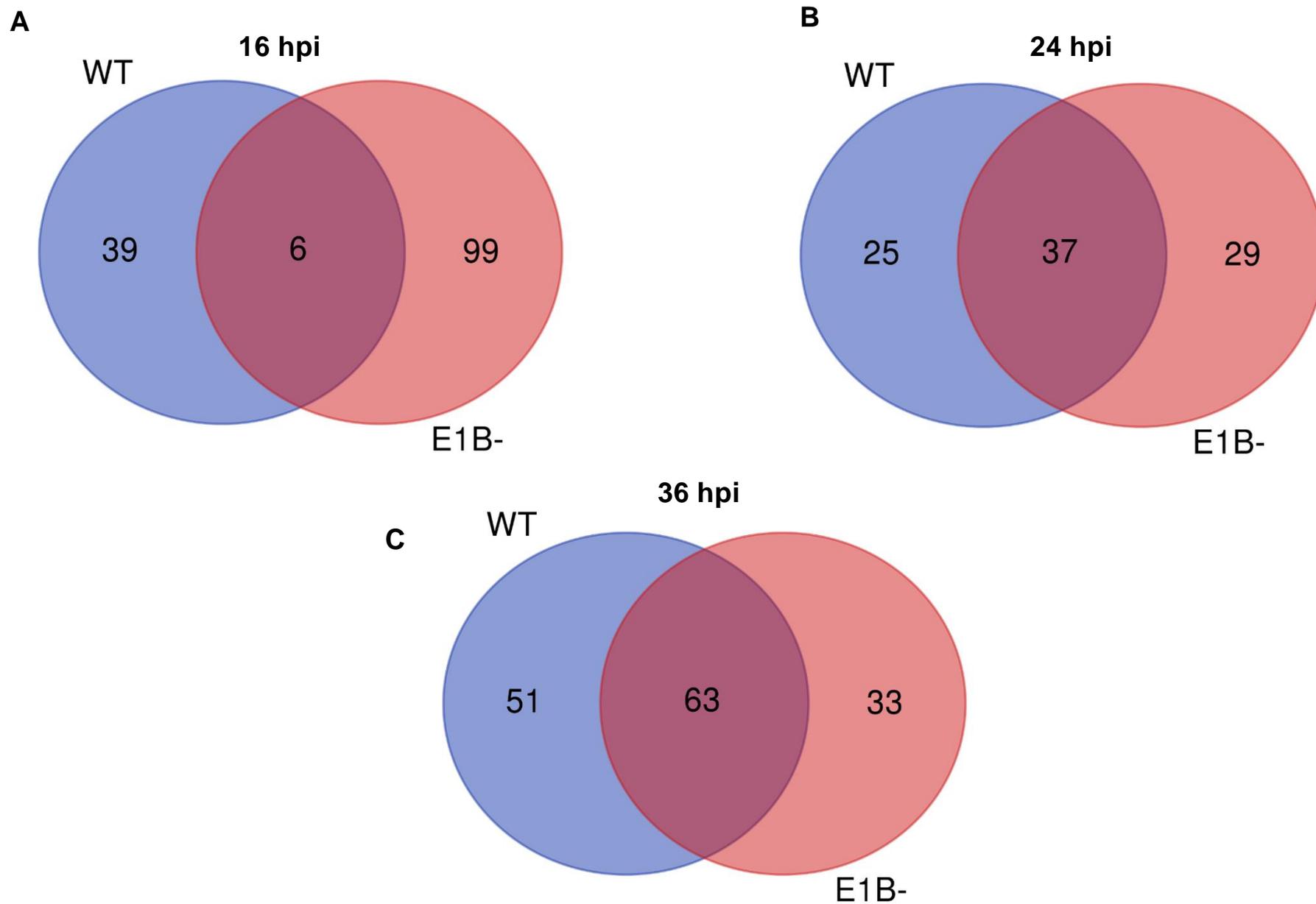


Figura 15. Comparación de proteínas en los compartimentos de replicación. **A)** Comparación de las proteínas que pueden formar IPPs en los compartimentos de replicación inducidos por Had-5 WT y E1B- a las 16 hpi **B)** Comparación de las proteínas que pueden formar IPPs en los compartimentos de replicación inducidos por Had-5 WT y Had-5 E1B- a las 24 hpi. **C)** Comparación de las proteínas que pueden formar IPPs en los compartimentos de replicación inducidos por Had-5 WT y Had-5 E1B- a las 36 hpi.

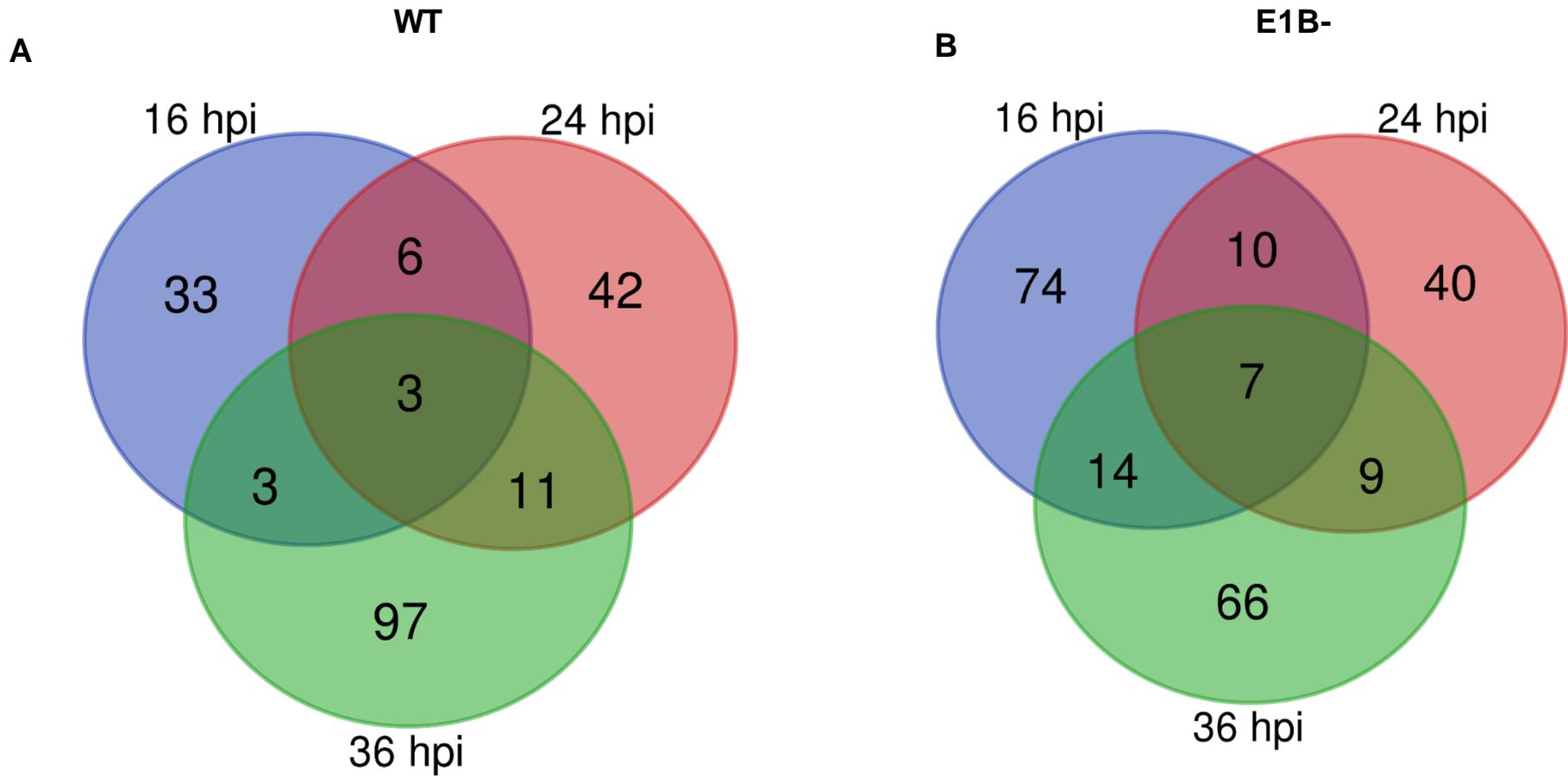


Figura 16. Comparación de proteínas en los compartimentos de replicación. A) Comparación de las proteínas que pueden formar IPPs en los compartimentos de replicación inducidos por Had-5 WT en todos los tiempos **B)** Comparación de las proteínas que pueden formar IPPs en los compartimentos de replicación inducidos por Had-5 E1B- en todos los tiempos.

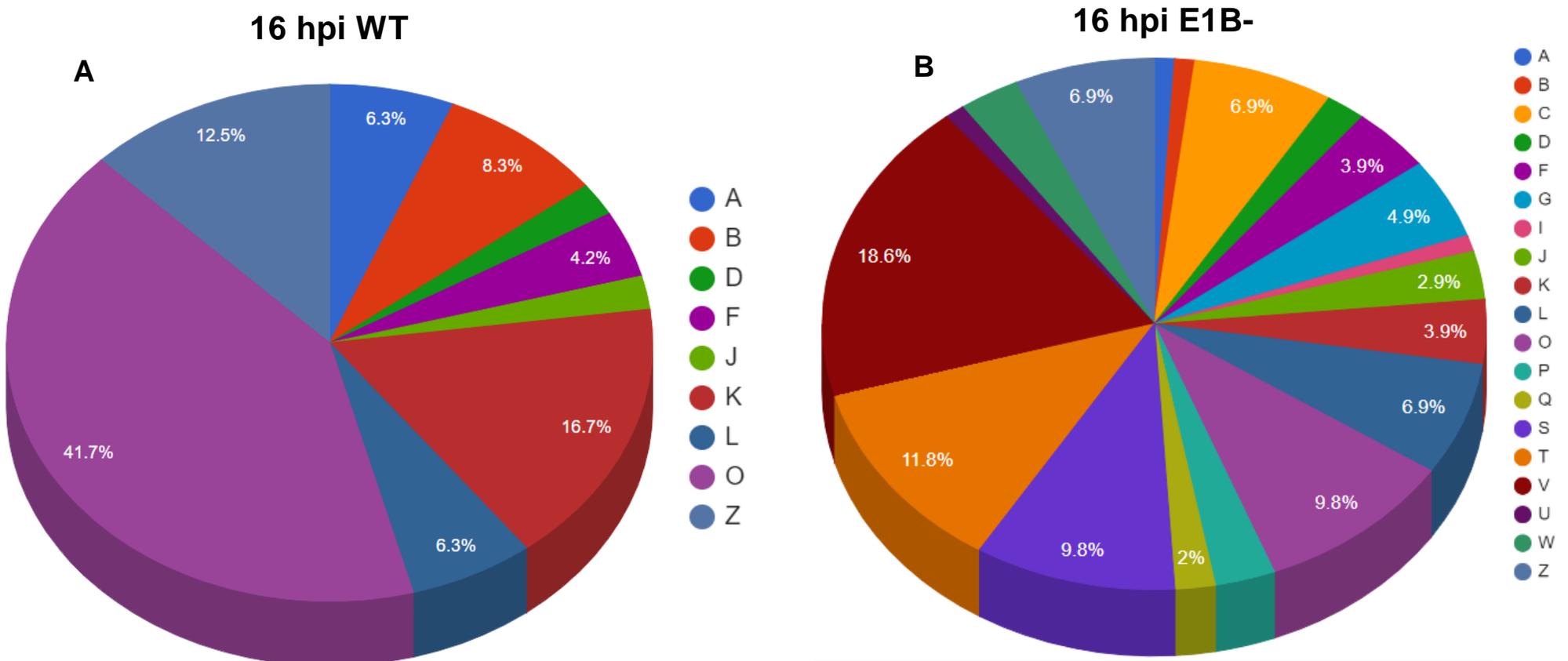
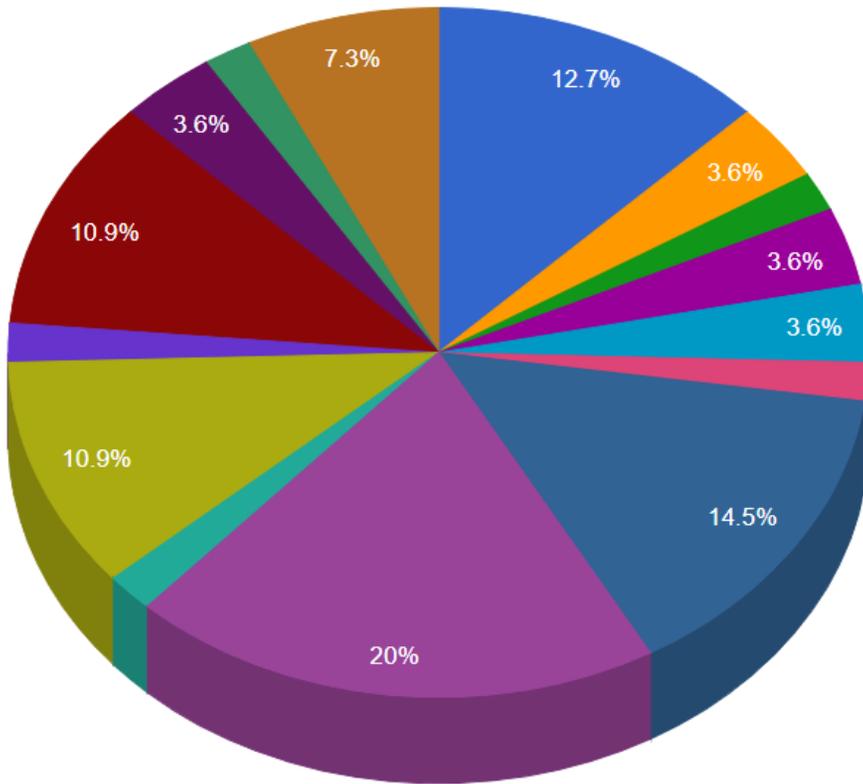


Figura 17. Cambio en las funciones de proteínas en los RC a las 16 hpi. Las letras indican la función de las proteínas en los RC en presencia o ausencia de E1B.

Señalización y procesamiento celular [D] Control de ciclo celular, división celular, separación de cromosomas [M] Membrana celular, biogénesis de envoltura [O] Modificaciones post-traduccionales, recambio proteico y chaperonas [T] Transducción de señales [U] Trafico intracelular, secreción y transporte de vesículas [V] Mecanismos de Defensa [W] Estructuras extracelulares [Z] Citoesqueleto **Metabolismo** [C] Producción de energía y conversión [G] Transporte de carbohidratos y metabolismo [H] Metabolismo y transporte de co-enzimas [I] Transporte de lípidos y metabolismo [P] Transporte de iones inorgánicos y metabolismo [Q] Metabolismos secundarios transporte y catabolismo **Información y procesamiento** [A] Procesamiento de RNA [B] Estructura de cromatina y dinámica [J] Traducción, estructura ribosomal y biogénesis [K] Transcripción [L] Replicación, reparación y recombinación **Sin caracterizar** [S] Función desconocida

A

24 hpi WT



B

24 hpi E1B-

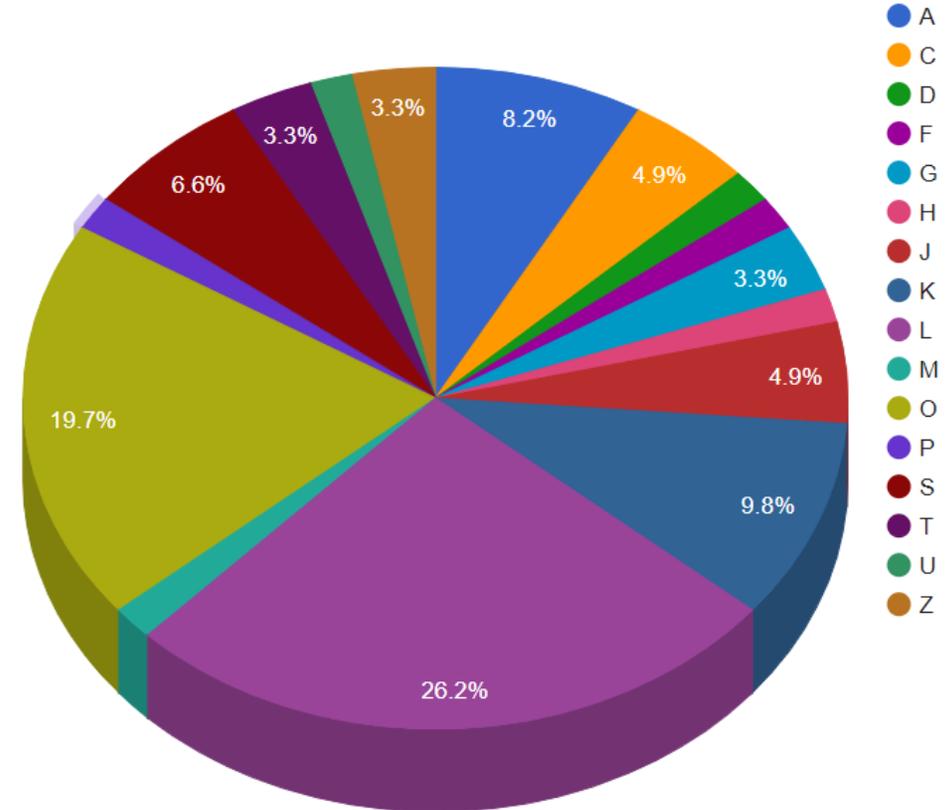


Figura 18. Cambio en las funciones de proteínas en los RC a las 24 hpi. Las letras indican la función de las proteínas en los RC en presencia o ausencia de E1B.
Señalización y procesamiento celular [D] Control de ciclo celular, división celular, separación de cromosomas [M] Membrana celular, biogénesis de envoltura [O] Modificaciones post-traduccionales, recambio proteico y chaperonas [T] Transducción de señales [U] Trafico intracelular, secreción y transporte de vesículas [V] Mecanismos de Defensa [W] Estructuras extracelulares [Z] Citoesqueleto **Metabolismo** [C] Producción de energía y conversión [G] Transporte de carbohidratos y metabolismo [H] Metabolismo y transporte de co-enzimas [I] Transporte de lípidos y metabolismo [P] Transporte de iones inorgánicos y metabolismo [Q] Metabolismos secundarios transporte y catabolismo **Información y procesamiento** [A] Procesamiento de RNA [B] Estructura de cromatina y dinámica [J] Traducción, estructura ribosomal y biogénesis [K] Transcripción [L] Replicación, reparación y recombinación **Sin caracterizar** [S] Función desconocida

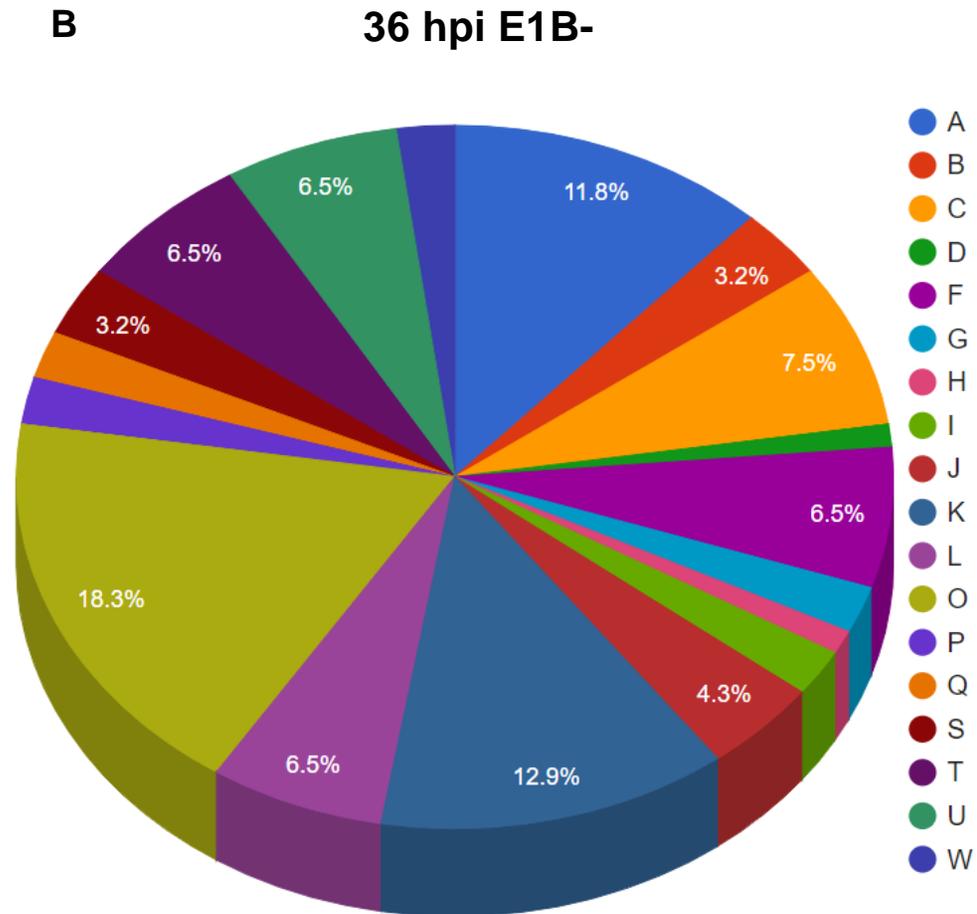
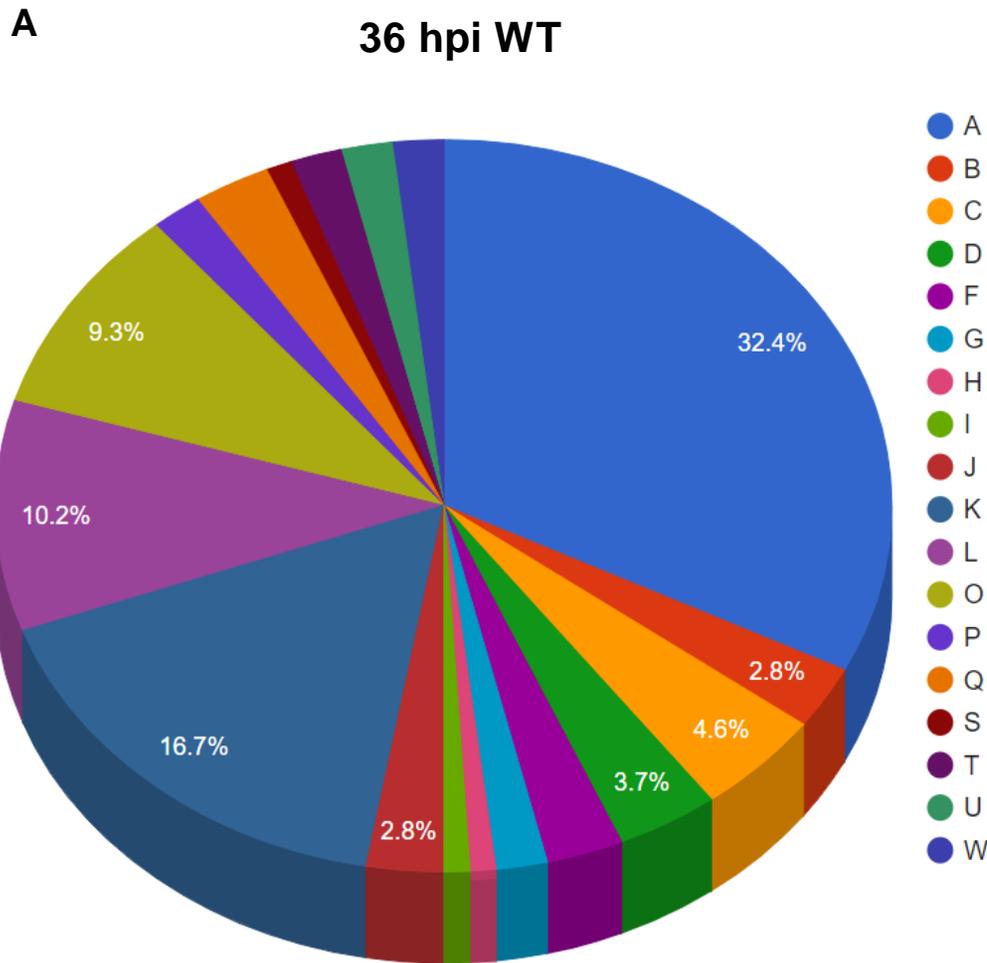


Figura 19. Cambio en las funciones de proteínas en los RC a las 36 hpi. Las letras indican la función de las proteínas en los RC en presencia o ausencia de E1B.
Señalización y procesamiento celular [D] Control de ciclo celular, división celular, separación de cromosomas [M] Membrana celular, biogénesis de envoltura
 [O] Modificaciones post-traduccionales, recambio proteico y chaperonas [T] Transducción de señales [U] Trafico intracelular, secreción y transporte
 de vesículas [V] Mecanismos de Defensa [W] Estructuras extracelulares [Z] Citoesqueleto **Metabolismo** [C] Producción de energía y conversión
 [G] Transporte de carbohidratos y metabolismo [H] Metabolismo y transporte de co-enzimas [I] Transporte de lípidos y metabolismo [P] Transporte de
 iones inorgánicos y metabolismo [Q] Metabolismos secundarios transporte y catabolismo **Información y procesamiento** [A] Procesamiento de RNA
 [B] Estructura de cromatina y dinámica [J] Traducción, estructura ribosomal y biogénesis [K] Transcripción [L] Replicación, reparación y recombinación **Sin
 caracterizar** [S] Función desconocida

Discusión

Como se describió en la introducción, la E1B es una proteína multifuncional que tiene diversas actividades durante el ciclo de replicación viral. La E1B es necesaria para la poliubiquitinación de factores antivirales, la composición, forma y tamaño de los compartimentos de replicación, la estabilización de p53 y la regulación de todos los promotores adenovirales. Se conoce que la E1B puede ser modificada por fosforilación en tres residuos y que esto modula su localización y actividades. Con estos nuevos resultados se demuestra que la fosforilación de la E1B tiene un efecto diferenciado dependiendo de qué amino ácido es fosforilado. Conocemos que la fosforilación de la T495 es necesaria para su relocalización eficiente a los RC y esto correlaciona con la eficiente replicación del genoma viral y producción de progenie. En este trabajo se evaluó el efecto que tiene la E1B sobre promotores intermedios, el efecto de la fosforilación sobre la T495 sobre tres promotores adenovirales; si la E1B puede asociarse e inmunoprecipitarse al promotor de E1A y el efecto que tiene la E1B sobre la composición de los RC.

Nuestros datos muestran que en células infectadas la E1B puede regular al promotor de IVa2 durante la fase temprana y que la fosforilación de la E1B es necesaria para la activación del promIVa2 durante la fase tardía. Interesantemente la E1B WT y la E1B-PM (S490D/S491D/T495D) pueden regular al promotor L4 durante la fase tardía. Estos datos muestran que la E1B puede regular a promotores intermedios, esto resulta en la producción de las proteínas IVa2, L4-22K y L4-33K que participan en la activación del promotor tardío MLP y la síntesis eficiente de proteínas estructurales que resultan en la producción eficiente de progenie viral. Además estos experimentos concluyen que la E1B regula la actividad de todos los promotores virales. Interesantemente al igual que las proteínas E1A, la E1B es un regulador general de la transcripción durante ciclo de replicación viral. Como se mencionó antes la fosforilación de la E1B sobre la T495 es necesaria para su relocalización eficiente a los RC. Trabajos recientes en el laboratorio demostraron que la fosforilación sobre la T495 favorece la fosforilación de las S490 y S495. Por lo que nos preguntamos qué efecto tiene la mutación sencilla sobre la T495D sobre la regulación del promotor E1A, E1B y MLP.

La fosforilación de la T495 resulta en la regulación de los promotores E1A, E1B y MLP. La E1B-T/D reprime al promotor de E1A pero activa al promotor de MLP y E1B. Cuando la E1B no puede ser fosforilada en la T495 esto resulta en la anulación de su actividad como regulador de la transcripción. Por lo anterior, pareciera que las modificaciones sobre la T495 son clave para la localización de la proteína y la regulación de los promotores E1A, E1B y MLP. Será de gran importancia evaluar el papel que juegan la fosforilación de las S490 y S491 sobre la actividad de regulador transcripcional de E1B. Trabajos en el laboratorio permitieron obtener mutantes en los sitios de fosforilación de la E1B. Evaluar la mutante S490D, S491D con T495 en donde la T495 es regulable; la mutante S490A, S491A con T495D donde se mimetiza el estado fosforilado solamente en la T495; y la mutante S490A, S491A con T495 donde la T495 es regulable. Estos experimentos nos permitirían determinar si la fosforilación de las Serinas es necesaria para que la E1B regula la actividad de los promotores virales.

Hasta el momento no se conocen los mecanismos moleculares por los cuales la E1B podría regular la actividad de los promotores. Las evidencias sugieren que la E1B podría regular la transcripción de genes a través de proteínas con las que interacciona y que tienen actividades relacionadas a la biogénesis de mRNA, sin embargo, también podría interaccionar con el DNA directamente a través de su posible dedo de Zn²⁺ o algún otro dominio que no ha sido descrito. Los experimentos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIPs) acoplados a PCR demostraron que la E1B puede asociarse e inmunoprecipitarse con el promotor de E1A, sin embargo, se necesitan hacer más experimentos para poder hacer más astringente el experimento y obtener señales más limpias de los productos de PCR en los controles negativos y positivos. Buscando en la literatura y utilizando la proteómica de los RC se encontró que la E1B puede asociarse a 7 proteínas que funcionan como remodeladores de histonas, factores de transcripción o co-factores. Este análisis nos permite proponer que la E1B podría asociarse a los promotores virales a través de factores de transcripción, cofactores o remodeladores de histonas para regular la transcripción.

Los RC son dominios nucleares inducidos por la infección en donde se replica, expresa el genoma viral y se procesan los mRNAs. Experimentos del laboratorio demostraron que la E1B regula el tamaño y forma de los RCs. Además por espectrometría de masas se identificaron proteínas que componen los RC en células infectadas con Had-5 WT o Had-5 E1B. En este trabajo se identificaron a las proteínas celulares y virales que podrían interaccionar dentro de los RC y se analizó su función. Interesantemente los RC a las 16 hpi son muy diferentes en presencia o ausencia de la E1B y cuando se analiza la función de estas proteínas resulta en la disminución de proteínas relacionadas a cambios post-traduccionales. A las 24 hpi los RC son similares en ausencia o presencia de la E1B, sin embargo, las proteínas relacionadas a la transcripción disminuyen en ausencia de la E1B. Interesantemente a las 36 hpi los RC comparten muchas proteínas en ausencia o presencia de la E1B, pero, las proteínas relacionadas al procesamiento de mRNA. Durante la fase tardía la activación de la MLTU resulta la producción de un pre-mRNA de 28 kb que es procesado por splicing y cada gen está definido por diferentes sitios de poliadenilación. Datos del laboratorio demuestran que en ausencia de la E1B el splicing alternativo de la TU MLTU es deficiente. Una posible explicación es que la E1B regule la composición de los RC que resultan en un eficiente procesamiento de mensajeros. Otra posibilidad es que la E1B participe directamente en el procesamiento de los mRNAs. Experimentos en el laboratorio demostraron que la E1B puede asociarse a RNA, sin embargo, se necesitan hacer otros experimentos para determinar los mecanismos moleculares por los cuales la E1B podría regular el procesamiento de mRNAs. En conclusión la E1B puede regular la actividad de los promotores virales, la fosforilación de la T495 es determinante para la regulación de los promotores virales, la E1B podría formar diferentes complejos proteicos para regular a los promotores virales y la E1B afecta la composición de los RCs.

Conclusiones

- La E1B regula a los promotores intermedios, que son necesarios para la activación de la MLTU.
- La E1B regula la actividad de todos los promotores adenovirales.
- La fosforilación de la E1B es determinante para la regulación de los promotores virales.
- La fosforilación de la T495 es determinante para la regulación de los promotores E1A, E1B y MLP.
- El promotor E1A puede ser inmunoprecipitado por la E1B.
- La presencia de E1B modifica la composición de los RC durante el ciclo de replicación viral.
- La E1B se asocia a factores de transcripción que están en los RC y tienen secuencias blanco en los promotores virales.

Perspectivas

- Es necesario modificar la técnica de ChIP para determinar si E1B puede asociarse a cada uno de los promotores virales en células infectadas y Transfectadas.
- Determinar si la fosforilación de las Serinas es necesaria para que la E1B regula la actividad de los promotores virales.
- Determinar si la E1B se asocia a los promotores virales en células infectadas y transfectadas.
- Determinar si la fosforilación de la E1B regula su interacción, directa o indirecta, con promotores virales.
- Determinar las secuencias con las que E1B interacciona.
- Determinar si la E1B se asocia directamente al DNA.
- Determinar el interactoma de E1B asociado a secuencias regulatorias durante el ciclo de replicación viral.

Materiales y Métodos

Células y Virus

Las células H1299 se mantuvieron en monocapa con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO) suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (Biowest). Se utilizó la mutante del virus Had-5 que no expresa a E1B-55KDa (H5pm4149) para infectar H1299 y cosechar a las 8hpi y 24 hpi en los ensayos reporteros de luciferasa.

Plásmidos

Los plásmidos utilizados para los ensayos reporteros de luciferasa fueron la construcción del pGL3-Basic de promega con número de catálogo **E1751**. Se utilizaron las enzimas de restricción XhoI y HindIII para hacer la construcción del promotor E1A, E1A, L4P y MLP que dirigen la expresión del gen reportero de luciferasa. La construcción del promotor IVa2 se llevó a cabo sintetizando el promotor completo en la unidad de secuenciación del IBT con los sitios de restricción de XhoI y HindIII. Los plásmidos utilizados para la expresión de proteínas fueron el pCDNA 3.0 dirigiendo la expresión de la proteína E1B Wt, la proteína E1B-PM, la E1B-T/D o la E1B-T/A. Se utilizó el plásmido que expresa a Renilla bajo el promotor de citomegalovirus como control de transfección en los ensayos reporteros de luciferasa

Ensayos reporteros de luciferasa

Los ensayos reporteros de luciferasa utilizaron células H1299 subconfluentes en placas de pozos de 12. Las células fueron co-transfectadas y/o infectadas con la combinación de plásmidos del promotor de interés y el plásmido que expresa a la E1B con el virus que no expresa a la proteína E1B 5Hpm4149. La actividad relativa de luciferasa se midió a partir del lisado total de células como se indica en Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay System (E1910) con algunas modificaciones. Se midió la actividad relativa de luciferasa en el Luminómetro Pharmingen Monolight 3010 por 10 s. Todas las muestras fueron normalizadas con la eficiencia de transfección de la actividad relativa de Renilla. Todos los experimentos se llevaron

a cabo por duplicado y se representan como valores promedios con su desviación estándar usando GraphPar Prisma.

Ensayos de Transfección de ChIP

Las células H1299 se crecieron hasta un 60% de confluencia en cajas de 100mm. Posteriormente fueron co-transfectadas con 3 µg del plásmido con el promotor de E1A y 3 µg del pCDNA 3.0/E1B55K que dirige la expresión de la E1B-55KDa utilizando el método de lipofección con el reactivo PEI. Se incluyó la co-transfección de 3ug de pCDNA 3.0/E1A que expresa a la proteína E1A 289R con 3ug del plásmido pGL3-basic que contiene el inserto del promotor E1A, como control. Las células H1299 se recolectaron a las 24 horas post-transfección (hpt).

Anticuerpos

Para los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se usó el anticuerpo monoclonal de ratón contra E1B-55KDa (2A6) que proviene de un sobrenadante de hibridoma de ratón, el anticuerpo monoclonal de ratón contra E1A 289 R (M73) y el anticuerpo anti alfa-tubulina (DM1A Invitrogen).

Inmunoprecipitación de Cromatina Viral (Vir-ChIP):

La inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) se llevó a cabo de acuerdo a [35] [36] con algunas modificaciones. A las 24 horas post-transfección (hpt) las células H1299 fueron tratadas con 1% de formaldehído como entrecruzador y fueron tratadas con buffer NP-40 (10mM Tris-HCL, Igepal 0.5mM) para la lisis de la membrana plasmática y extracción de núcleos. Los núcleos fueron centrifugados a 400G por 5 min a 4°C y fueron resuspendidos en buffer S2 (0.5M de sacarosa y 10mM de TrisHCL pH 8.0). Posteriormente los núcleos fueron lisados por sonicación usando el sonicador Branson Sonifier F250 con 15 pulsos de 5 s ON y 1 min OFF [29]. Los anticuerpos fueron adicionados a la muestra que contiene a la proteína E1A o la E1B y se incubaron por 16 h a 4°C; posteriormente se agregaron perlas de sefarosa bloqueadas con BSA para la precipitación de los complejos. Las muestras se lavaron con un buffer bajo en sales (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCL, 150mM NaCL), una vez con un buffer alto en sales (0.1% SDS, 1%

Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCL, 500mM NaCL), una vez con buffer LiCl (0.25M LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% Na-deoxicolato, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl) y dos veces con el buffer TE (pH 8) por 10 min. Posteriormente la muestra fue tratada con 5M de NaCl y proteinasa K e incubadas a 65°C para desnaturalizar y degradar a las proteínas. Para separar ácidos nucleicos de las proteínas se utilizaron tubos *Phaselock Tubes* agregando un volumen de fenol/cloroformo/ alcohol isoamílico con una relación 25:24:1 a las muestras. Se recuperó el sobrenadante en la que se encuentran los ácidos nucleicos, se precipitó el DNA añadiendo los siguientes reactivos en el siguiente orden: NaCl 5M, 5mg/ml de glucógeno, y 66% de etanol al 100% y se incubó a -80°C o/n. Posteriormente se centrifugó a **21952** G por 15 min a 4°C y el DNA se resuspendió en 10mM de TrisHCl pH 8.0.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

El DNA obtenido por ChIP se analizó por la técnica de PCR. Se utilizaron los mismos cebadores para cada una de las muestras de ChIP para amplificar el promotor de E1A. Los cebadores utilizados para la amplificación del promotor de E1A fueron pGL3_Forward 5'-CAA GTG CAG GTG CCAGAA CAT TTC-3' y pGL3_Reverse 5'-TGC TCT CCA GCG GTT CCA TCT TC-3'. El cebador pGL3_Forward se une al plásmido pGL3-basic 75 nucleótidos (nt) río arriba del promotor E1A y el cebador pGL3_Reverse se une al plásmido pGL3-basic 113 nt río abajo del promotor E1A. Se utilizaron las siguientes condiciones para la obtención del amplicón: 3 min a 95°C, 45 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C y 30 s a 72°C. Los productos fueron evaluados en un gel de agarosa al 1% por electroforesis durante 180 min a un voltaje de 90 V. El tamaño esperado para el amplicón del promotor de E1A es de 737 nt y el tamaño esperado del amplicón sin el inserto del plásmido de pGL3-Basic es de 170 nt.

Análisis bioinformático de promotores virales utilizando Genomatix

Se utilizó Genomatix, un software que permite predecir posibles sitios de unión para factores de transcripción en promotores. El software utiliza una biblioteca de Matrices de Peso por Posición (PWM) de los factores de transcripción que son utilizados para buscar entre las secuencias de interés y un agrupamiento de

matrices familiares de factores de transcripción que tienen secuencias de reconocimiento similares. El análisis bioinformático se hizo para los diez promotores de adenovirus que dependen de la RNA polimerasa II. Se utilizó el nivel similitud de 0.75 entre los PWM de los factores de transcripción y las secuencias de los promotores, para obtener todos los posibles factores de transcripción de humano que podrían interaccionar con los promotores adenovirales [37].

Redes de interacción proteína-proteína

Se utilizaron las siguientes librerías para trabajar en R studio para elaborar las redes de interacción de proteínas que interaccionan con una o más proteínas que están representadas en la base de datos de la proteómica de los compartimentos de replicación.

Bibliotecas utilizadas

- **require(igraph)**
- **require(dplyr)**

Para la elaboración de las redes de interacción se seleccionaron sólo aquellas proteínas que interaccionan con alguna proteína presente en la base de datos de la proteómica de los compartimentos de replicación. En la figura 20 se muestra cómo los datos fueron procesados. En la la tabla del interactoma de E1B en la primera columna se tienen los números de identificación de cada proteína, ej. AA. Esa columna se comparó con la última columna con nombre "Interacts with" y se identificaron y seleccionaron sólo aquellas proteínas con las que interacciona. Por ejemplo, la proteína AA interacciona con tres proteínas pero sólo AC está dentro del interactoma de E1B, es decir en la primera columna. .

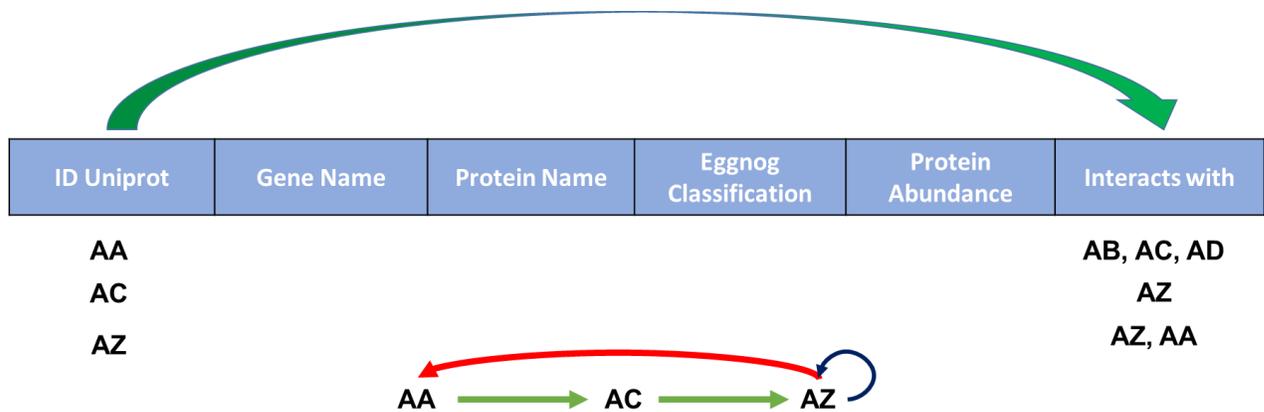


Figura. 20 Diagrama del análisis de interacciones proteína-proteína en los RC.

Análisis proteómico de la base de datos de las proteínas de los RC y Nucleoplasma

En el laboratorio se estableció una metodología para aislar fracciones nucleares enriquecidas con RC a partir de células infectadas [[33]]. Utilizando esta metodología se obtuvieron fracciones de células infectadas con HAd-5 WT y H5pm4149 (mutante que no expresa E1B) a 16, 24 y 36 hpi (horas post-infección). Posteriormente se determinó por espectrometría de masas qué proteínas están asociadas a las fracciones de RC y nucleoplasma (NP, que representa el resto del contenido del núcleo). La abundancia de las proteínas en los RC y NP se comparó con células que no fueron infectadas (MOCK) y se obtuvieron niveles de abundancia relativa con respecto a MOCK y un valor estadístico-p. En el análisis proteómico se filtraron las proteínas con un valor estadístico-p menor a 0.05.

Interactoma de E1B-55KDa

Se identificaron todas las proteínas celulares y adenovirales, reportadas en la literatura, que interactúan con E1B-55KDa [36, 42, 43, 44]. Esta base de datos se utilizó para compararla con el análisis bioinformático de los factores de transcripción que se predijo que podrían interactuar con los promotores adenovirales y con el análisis de la base de datos de la proteómica de RC y NP.

Bibliografía

- [1] L. D. Whigham, "Adipogenic potential of multiple human adenoviruses in vivo and in vitro in animals," *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 290, no. 1, pp. R190–R194, 2006.
- [2] A. J. Davison, M. Benko, and B. Harrach, "Genetic content and evolution of adenoviruses," *J. Gen. Virol.*, vol. 84, no. 11, pp. 2895–2908, 2003.
- [3] M. Benko *et al.*, "First Molecular Evidence for the Existence of Distinct Fish and Snake Adenoviruses First Molecular Evidence for the Existence of Distinct Fish and Snake Adenoviruses," *J. Virol.*, vol. 76, no. 19, pp. 10056–10059, 2002.
- [4] W. Wold and K. Toth, "Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy," *Curr. Gene Ther.*, vol. 13, no. 6, pp. 421–433, 2014.
- [5] C. Netherton, K. Moffat, E. Brooks, and T. Wileman, "A Guide to Viral Inclusions, Membrane Rearrangements, Factories, and Viroplasm Produced During Virus Replication," *Adv. Virus Res.*, vol. 70, no. 07, pp. 101–182, 2007.
- [6] E. Freed and M. Martin, *Fields Virology*. 2013.
- [7] M. Schmid, T. Speiseder, T. Dobner, and R. A. Gonzalez, "DNA Virus Replication Compartments," *J. Virol.*, vol. 88, no. 3, pp. 1404–1420, 2014.
- [8] R. F. C. MENA, ""Análisis del Desorden Estructural en el Proteoma de Adenovirus Humano"," 2019.
- [9] H. J. L. Lin and S. J. Flint, "Identification of a cellular repressor of transcription of the adenoviral late IVa2 gene that is unaltered in activity in infected cells," *Virology*, vol. 277, no. 2, pp. 397–410, 2000.
- [10] L. W. J. F. Enquist, *Principles of Virology*, 4 edition., no. c. .
- [11] M. sc. P. R. H. OCAMPO, "ROLE OF E1B-55K ONCOPROTEIN ON ADENOVIRUS GENOME REPLICATION AND EXPRESSION," p. 128, 2018.
- [12] S. P. Fessler and C. S. Young, "Control of adenovirus early gene expression during the late phase of infection.," *J. Virol.*, vol. 72, no. 5, pp. 4049–56, 1998.
- [13] K. K. Davison and L. L. Birch, "Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies," vol. 64, no. 12, pp. 2391–2404, 2008.
- [14] L. Y. Zhao, A. L. Colosimo, Y. Liu, Y. Wan, and D. Liao, "Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein binds to Daxx and eliminates enhancement of p53-dependent transcription by Daxx.," *J. Virol.*, vol. 77, no. 21, pp. 11809–21,

2003.

- [15] A. Goleman, Daniel; Boyatzis, Richard; Mckee, "Formation of Adenovirus DNA Replication Compartments," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, no. 9, pp. 1689–1699, 2019.
- [16] A. J. Berk, "Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus," *Oncogene*, vol. 24, no. 52, pp. 7673–7685, 2005.
- [17] R. JUŠKAITIS and T. WILSON, "Transcripts from the Adenovirus-2 Major Late Promoter Yield a Single Early Family of 3' Coterminal mRNAs and Five Late Families," *J. Microsc.*, vol. 176, no. 3, pp. 188–194, 1994.
- [18] L. Dai *et al.*, "Modulation of Protein-Interaction States through the Cell Cycle," *Cell*, vol. 173, no. 6, pp. 1481-1494.e13, 2018.
- [19] A. N. Blackford and R. J. A. Grand, "Adenovirus E1B 55-Kilodalton Protein: Multiple Roles in Viral Infection and Cell Transformation," *J. Virol.*, vol. 83, no. 9, pp. 4000–4012, 2009.
- [20] J. G. Teodoro 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.*, vol. 71, no. 5, pp. 3620–7, 1997.
- [21] R. Pronk and P. C. van der Vliet, "The adenovirus terminal protein influences binding of replication proteins and changes the origin structure," *Nucleic Acids Res.*, vol. 21, no. 10, pp. 2293–2300, 1993.
- [22] B. W. Stillman, "Adenovirus DNA replication in vitro: A protein linked to the 5' end of nascent DNA strands," *J. Virol.*, vol. 37, no. 1, pp. 139–147, 1981.
- [23] P. S. Holm *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.*, vol. 277, no. 12, pp. 10427–10434, 2002.
- [24] M. E. Spurgeon and D. a Ornelles, "The Adenovirus E1B 55-Kilodalton and E4 Open Reading Frame 6 Proteins Limit Phosphorylation of eIF2 α during the Late Phase of Infection," *J. Virol.*, vol. 83, no. 19, pp. 9970–9982, 2009.
- [25] S. J. Morris, G. E. Scott, and K. N. Leppard, "Adenovirus late-phase infection is controlled by a novel L4 promoter," *J. Virol.*, vol. 84, no. 14, pp. 7096–7104, 2010.
- [26] A. Pardo-Mateos and C. S. H. Young, "Adenovirus IVa2 protein plays an important role in transcription from the major late promoter in vivo," *Virology*, vol. 327, no. 1, pp. 50–59, 2004.
- [27] L. Crisostomo, A. M. Soriano, M. Mendez, D. Graves, and P. Pelka, "Temporal dynamics of adenovirus 5 gene expression in normal human cells," *PLoS One*, vol. 14, no. 1, pp. 1–18, 2019.

- [28] R. A. Gonzalez and S. J. Flint, "Effects of mutations in the adenoviral E1B 55-kilodalton protein coding sequence on viral late mRNA metabolism.," *J. Virol.*, vol. 76, no. 9, pp. 4507–19, 2002.
- [29] L. R. E. L. Antonio, "REGULACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE LA PROTEÍNA ADENOVIRAL E1B 55-kDa POR FOSFORILACIÓN," *PROGRAMA Maest. EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS (Instituto Biotecnol. UNAM) Regul.*, 2016.
- [30] L. Y. Zhao, A. Santiago, J. Liu, and D. Liao, "Repression of p53-mediated transcription by adenovirus E1B 55-kDa does not require corepressor mSin3A and histone deacetylases," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 10, pp. 7001–7010, 2007.
- [31] E. M. Nájera, "Determinación de la unión de la oncoproteína E1B-55KDa a promotores virales de adenovirus tipo 5."
- [32] G. Hung and S. J. Flint, "Normal human cell proteins that interact with the adenovirus type 5 E1B 55 kDa protein," *Virology*, vol. 504, no. January, pp. 12–24, 2017.
- [33] P. Hidalgo and R. A. Gonzalez, "Isolation of viral replication compartment-enriched sub-nuclear fractions from adenovirus-infected normal human cells," *J. Vis. Exp.*, vol. 2015, no. 105, pp. 1–8, 2015.
- [34] Y. Garcés *et al.*, "Automatic detection and measurement of viral replication compartments by ellipse adjustment," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. April, pp. 1–14, 2016.
- [35] T. Günther, J. M. Theiss, N. Fischer, and A. Grundhoff, "Investigation of viral and host chromatin by ChIP-PCR or ChIP-Seq analysis," *Curr. Protoc. Microbiol.*, vol. 2016, no. February, pp. 1E.10.1-1E.10.21, 2016.
- [36] P. Hidalgo and R. A. Gonzalez, "Isolation of Viral Replication Compartment-enriched Sub-nuclear Fractions from Adenovirus-infected Normal Human Cells 2 . Preparation of Sub-nuclear Fractions Enriched with Adenovirus RC," no. November, pp. 1–8, 2015.
- [37] T. L. Bailey *et al.*, "Timothy L. Bailey, Mikael Bodén, Fabian A. Buske, Martin Frith, Charles E. Grant, Luca Clementi, Jingyuan Ren, Wilfred W. Li, William S. Noble, 'MEME SUITE: tools for motif discovery and searching', *Nucleic Acids Research* , 37:W202-W208, 2009.," p. 2009, 2009.

