



**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

**“ADENOVIRUS HUMANO TIPO 5 MODIFICA LA
FUCOSILACIÓN CELULAR EN UN MODELO *IN VITRO* DE
EPITELIO PULMONAR HUMANO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Kathya Gutiérrez Huante

CO-DIRECTORES DE TESIS

Dr. Iván Martínez Duncker R.

Dr. Ramón A. Gonzalez García-Conde


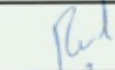
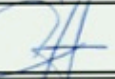
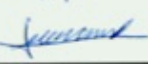
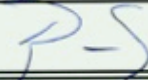
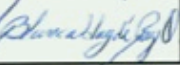
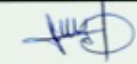
CUERNAVACA, MORELOS

mayo, 2019

DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "ADENOVIRUS HUMANO TIPO 5 MODIFICA LA FUCOSILACIÓN CELULAR EN UN MODELO IN VITRO DE EPITELIO PULMONAR HUMANO" que presenta la alumna **Kathya Gutiérrez Huante (5620110901)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Héctor Manuel Mora Montes UG	Aprobado	
Dr. Raúl Peralta Rodríguez UAEM	Aprobado	
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz UAEM	Aprobado	
Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama FM-UAEM	Aprobado	
Dr. Ramón Antonio Gonzalez García-Conde CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz UNAM	Aprobado	
Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez CIDC-UAEM	Aprobado	

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	5
2. RESUMEN.....	7
3. ABSTRACT.....	8
4. TABLAS Y FIGURAS.....	9
5. INTRODUCCIÓN.....	10
6. ANTECEDENTES.....	14
6.1 Adenovirus.....	14
6.1.1 Clasificación.....	14
6.1.2 Estructura y Genoma.....	15
6.1.3 Replicación viral.....	20
6.1.4 Expresión y regulación de genes tempranos.....	22
6.1.4.1 E1A y E3.....	23
6.1.4.1.1 Respuesta intrínseca de la célula.....	26
6.1.4.1.2 Apoptosis.....	27
6.1.4.1.3 Respuesta a interferón.....	28
6.2 Modificación de la glicosilación celular durante la infección viral.....	28
6.2.1 Virus linfotrópico de células T humanas 1.....	29
6.2.2 Virus de la inmunodeficiencia humana 1.....	30
6.2.3 Virus de la hepatitis	32
6.2.4 Familia de Herpesvirus.....	34
6.3 Fucosilación celular.....	36
6.4 Fucosiltransferasas.....	36
6.5 Metabolismo de Fucosa y biosíntesis de GDP-Fuc.....	42
6.6 Familia de antígenos Lewis.....	44
7. HIPÓTESIS.....	49
8. OBJETIVO GENERAL.....	49
8.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	49

9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
9.1 Cultivo celular y virus.....	50
9.2 Inactivación de adenovirus por psoralen y UV.....	51
9.3 Marcaje metabólico.....	51
9.4 Detección por citofluorometría.....	51
9.4.1 Tinción con lectinas.....	52
9.4.1.1 Inhibición de la lectina <i>Ulex europaeus agglutinin</i> (UEA-I)...	52
9.4.2 Tinción con anticuerpos.....	52
9.5 Detección del porcentaje de células infectadas.....	53
9.6 Extracción de RNA y PCR cuantitativa.....	53
9.7 Western Blot.....	54
9.8 Blot de lectinas.....	55
9.9 Transfección con plásmido en células A549.....	55
9.10 Análisis Estadístico.....	56
10. RESULTADOS.....	57
10.1 Viabilidad de células infectadas.....	57
10.2 La infección con HAd5 modifica la fucosilación de células A549.....	58
10.3 La Fucosa en enlace α 1-2 incrementa específicamente en la infección.....	61
10.4 Es necesaria la expresión de genes virales para el aumento de Fuc.....	63
10.5 Análisis de antígenos fucosilados.....	65
10.6 Fucosiltransferas responsables del incremento de Fucosa α 1-2.....	68
10.7 E1A incrementa la expresión de FUT1.....	70
10.8 La infección con HAd5 modifica el metabolismo de Fucosa.....	71
10.9 Participación de genes E3 en el incremento de Fucosa.....	73
11. CONCLUSIONES	75
12. DISCUSIÓN.....	77
13. PUBLICACIÓN.....	84
14. BIBLIOGRAFÍA.....	94

1. ABREVIATURAS

AAL	Lectina <i>Aleuria aurantia</i>
ADP	Adenovirus Death Protein
CAR	Coxsackie B virus and adenovirus receptor
CMP-Sia	Citidin-monofosfato-ácido siálico
CMV	Citomegalovirus
DBP	Proteína de unión a DNA
Fuc	Fucosa
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FucAk	Fucosa alkino modificada
FUTs	Fucosiltransferasas
Gal	Galactosa
GalNAc	<i>N</i> -acetil-galactosamina
GDP-Fuc	Guanosín-difosfato-Fucosa
Glc	Glucosa
GlcNAc	<i>N</i> -Acetil-glucosamina
HAd5	Adenovirus Humano serotipo 5
HCV	Virus de la hepatitis C
HSV-1	Virus herpes simple tipo 1
h p.i.	Horas post-infección
IMF	Intensidad media de fluorescencia
Le ^a	Antígeno Lewis a
Le ^b	Antígeno Lewis b
Le ^y	Antígeno Lewis y
LCA	Lectina <i>Lens culinaris</i>
Man	Manosa
ManNaz	Manosamina <i>N</i> -azido-acetil- tetra-acetilada
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad I
MK	Mock, células sin infectar
MLTU	Major late transcription unit

MLP	Major late promoter
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
Pol	Polimerasa viral
qPCR	PCR cuantitativo
PBS	Buffer salino de fosfatos
UFF	Unidad Formadora de Focos
Pre-TP	Precursor de la proteína terminal
RE	Retículo endoplásmico
sLe ^a	Antígeno sialilado Lewis a
sLe ^x	Antígeno sialilado Lewis x
Sia	Ácido siálico
SiaNaz	Ácido siálico azida
Ser	Serina
TBP	Proteína de unión a caja TATA
Thr	Treonina
UEA-I	Letina <i>Ulex europeaus</i> I
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana 1
VZV	Virus de varicela zoster

2. RESUMEN

Se ha reportado que la infección con CMV (citomegalovirus), HCV (virus de la hepatitis C), HSV-1 (herpes virus simple- 1) y VZV (virus de varicela Zoster) incrementan la expresión de antígenos fucosilados, incluyendo sLe^x (Sia α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R) y Le^y (Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R), lo cual es mediado por la sobreexpresión de distintas fucosiltransferasas (FUTs) celulares. La modificación del glicocálix con estos antígenos, podría favorecer la diseminación de progenie viral y alterar las distintas funciones biológicas asociadas a dichos antígenos.

El adenovirus humano tipo 5 (HAd5) es un conocido agente infeccioso y vector con distintas aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. No obstante que los adenovirus han sido ampliamente estudiados desde que fueron aislados en 1953, no existían reportes en la literatura que describieran algún efecto de la infección con HAd5 u otro adenovirus, sobre la glicosilación de las células infectadas y por lo tanto se desconocía la participación de la glicosilación celular en la patogénesis de esta infección. El objetivo del presente trabajo fue determinar si la infección con HAd5 provoca cambios en el perfil de glicosilación, particularmente la fucosilación y la sialilación, de la línea celular A549, la cual fue utilizada como modelo de epitelio pulmonar, blanco natural de la infección con HAd5. Los resultados obtenidos mediante marcaje metabólico y unión de lectinas mostraron que la infección con HAd5 causa un incremento significativo en la fucosilación *de novo* y particularmente del enlace Fuc α 1-2. Esto se respaldó por datos adicionales obtenidos por PCR tiempo real, que mostraron que la infección con HAd5 causa una sobreexpresión de los genes que codifican para las α 1-2 fucosiltransferasas FUT1 y FUT2. Debido a que se ha reportado que otras infecciones virales causan un aumento de la expresión del antígeno bi-fucosilado Le^y, se procedió a determinar mediante Western Blot si la infección con HAd5 modifica su expresión. Se mostró que la infección causa una modificación heterogénea en la expresión de este antígeno, indicando su participación potencial en el incremento de la proliferación celular e inhibición de apoptosis asociadas a la infección con HAd5.

3. ABSTRACT

It has been reported that the infection with CMV, HCV, HSV-1 or VZV, through the overexpression of host fucosyltransferases (FUT) increases the expression of fucosylated antigens in the host cell, including sLe^x (Sia α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R) and Le^y (Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R). The modifications of the glycocalyx with these antigens could favor viral dissemination, but also modulate biological functions associated to these antigens, including proliferation and apoptosis.

Human adenovirus type 5 (HAd5) is a known infectious agent and vector with different biomedical and biotechnological applications. Although adenoviruses have been widely studied since their first isolation in 1953, no reports are available regarding the effect of these viruses on the glycosylation of the host cell or the potential implications of glycosylation modulation in the pathogenesis of adenovirus infection.

The aim of this work was to determine whether HAd5 infection causes changes in the glycosylation profile of human infected cells, particularly sialylation and fucosylation. We used the A549 cell line as a model of respiratory epithelium, the natural target of Ad5. The results obtained using metabolic labeling and lectin binding showed that HAd5 infection causes a significative increment in the *de novo* fucosylation, particularly of Fuca1-2. This was further supported by the finding that HAd5 infection increases expression of the genes coding for the α 1-2 fucosyltransferases FUT1 and FUT2. In view of these findings and also that other viral infections have been reported to cause an increased expression of the bi-fucosylated antigen Le^y, we proceeded to determine through Western Blot whether HAd5 caused changes in the expression of this antigen in infected A549 cells. It was shown that HAd5 infection causes a heterogeneous change in Le^y expression, pointing out to a potential role of this antigen in viral mechanisms that favor proliferation and inhibit apoptosis.

4. TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la estructura general de la partícula viral de adenovirus.

Figura 2. Diagrama del genoma, transcritos y proteínas de adenovirus.

Figura 3. Representación del ciclo de replicación viral.

Figura 4. Productos de la unidad transcripcional E1A.

Figura 5. Diagrama de la activación de FUT7 por HTLV-1.

Figura 6. Diagrama de las vías del metabolismo de Fucosa.

Figura 7. Representación de las estructuras de la familia Lewis

Figura 8. Representación de la vía de activación de Lewis^y en cáncer de ovario.

Figura 9. Viabilidad de células A549.

Figura 10. La infección con HAd5 incrementa Fuc en membrana plasmática.

Figura 11. La infección con HAd5 incrementa residuos de Fuc α 1-2.

Figura 12. Inhibición de la unión a la lectina UEA-I en células MK e HAd5.

Figura 13. Inactivación viral.

Figura 14. La infección con HAd5 incrementa residuos de Fuc α 1-2 y la expresión de genes virales es necesaria.

Figura 15. Especificidad de la lectina *Ulex europaeus agglutinin I* (UEA-I).

Figura 16. El antígeno H no incrementa por la infección con HAd5.

Figura 17. La infección con HAd5 modifica la expresión del antígeno Le^y.

Figura 18. Análisis de expresión de *FUT1*, *FUT2* y *FUT4*.

Figura 19. Expresión de *FUT1* y E1A en células A549 transfectadas con los plásmidos E1A-13S y 12S.

Figura 20. Expresión de los genes *FX*, *FGPP* y *SLC35C*.

Figura 21. Comparación del efecto de HAd5 2250 vs dl309 sobre la incorporación de FucAk y unión de UEA-I.

Tabla 1. Virus que inducen cambios en la glicosilación celular.

Tabla 2. Familias de Fucosiltransferasas.

Tabla 3. Tabla de oligonucleótidos usados para PCR cuantitativo.

5. INTRODUCCIÓN

Los adenovirus son agentes infecciosos ubicuos que se han aislado de diferentes especies y que infectan diferentes tipos celulares, incluso células post-mitóticas; son agentes etiológicos de diversas enfermedades humanas, incluyendo queratoconjuntivitis, gastroenteritis infantil y enfermedades respiratorias. Además de su relevancia como agentes infecciosos, estos virus también han servido como modelo para estudiar procesos celulares, incluyendo la expresión génica en eucariontes y los mecanismos de la virología tumoral. Estudios realizados en células infectadas con adenovirus llevaron al descubrimiento del procesamiento por splicing de RNAs mensajeros y han permitido dilucidar distintos aspectos acerca de los procesos regulatorios del ciclo celular, genes supresores de tumores, apoptosis y otros procesos asociados con cáncer (Berk 2005). Además, los adenovirus poseen características que permiten utilizarlos como vectores en terapia génica, terapia anti-cáncer y en la generación de vacunas (Khare et al. 2011).

El serotipo 5 de adenovirus humano (HAd5) es uno de los más estudiados y ha permitido describir con detalle la actividad de los oncogenes virales capaces de transformar a la célula y los mecanismos por los que estos genes favorecen el ciclo de replicación viral, promoviendo que las células quiescentes en fase G0 ó G1 entren a la fase S del ciclo celular, que se inhiba la apoptosis y se favorezca la proliferación celular. En los últimos diez años se ha acumulado evidencia de que las infecciones virales pueden modificar el perfil de glicosilación de la célula infectada, contribuyendo a los mecanismos patogénicos. A pesar de que la glicosilación es una de las más importantes modificaciones post-traduccionales de la célula y es altamente susceptible a ser regulada, su modificación no ha sido estudiado en la infección con adenovirus.

En las infecciones virales causadas por diversos herpesvirus como citomegalovirus (CMV), varicela zoster virus (VZV) y virus herpes simple tipo 1 (HSV-1), así como virus de otras familias, incluyendo virus de la hepatitis C (HCV), virus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV-1), virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1), se han observado cambios en la expresión de genes responsables de la glicosilación; especialmente

asociados a un incremento en la expresión de fucosiltransferasas (FUTs), lo cual conduce a una sobreexpresión de antígenos fucosilados de tipo Lewis: sLe^x (Sia α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R) y Le^y (Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R) (Adachi et al. 1988; Hiraiwa et al. 2003; Giordanengo et al. 2004; Nystrom et al. 2007; Nystrom et al. 2009; Papic et al. 2012; Cebulla et al. 2000)

Los antígenos Lewis en tejidos sanos participan en procesos de adhesión celular, están involucrados en la comunicación de diferentes subtipos de células, tales como epitelio, células del sistema inmune y neuronas, todo esto en un microambiente definido durante el desarrollo normal (Schneider, Al-Shareffi, and Haltiwanger 2017). La expresión estricta de estos antígenos en la superficie de la célula es necesaria ya que las modificaciones a su expresión se asocian con alteraciones en el desarrollo y en la progresión del cáncer. Algunas de estas alteraciones son: incremento en proliferación y supervivencia de la célula, invasión de tejidos, transición epitelio-mesénquima, entre otros. Especialmente, el antígeno bi-fucosilado Le^y se ha descrito como un componente normal de la superficie de granulocitos y del epitelio, no obstante, el incremento en su expresión membranal ha sido asociado con diversos tipos de cáncer (ovárico, pancreático, pulmonar) a progresión tumoral (Schneider, Al-Shareffi, and Haltiwanger 2017).

Esta modificación de la glicosilación celular, inducida por las infecciones virales, puede favorecer la producción y liberación de progenie, alterando funciones biológicas que están mediadas por distintos antígenos glicosídicos (sLe^x y Le^y), a través de alteraciones en el ciclo celular y del reconocimiento por el sistema inmune. Sólo en el caso de HTLV-1 y HSV-1, se conoce el mecanismo molecular por el cual el virus promueve el incremento en la expresión de las FUTs y su posible efecto en el ciclo de replicación del virus; mientras que solo en el caso de la infección por HCV se sabe que la FUT1 es necesaria para la producción de progenie viral (Hiraiwa et al. 2003; Papic et al. 2012)

Consideramos que el estudio de la glicosilación en el contexto de las infecciones tiene una alta relevancia, no solo debido a que la glicosilación es uno de los procesos post-

traduccionales más relevantes, sino que está sujeto a una regulación temporo-espacial muy dinámica que forma parte de las respuestas celulares inmediatas. En el caso de la infección por HAd5, el interés de estudiar la glicosilación es doble, tanto por las enfermedades a las que HAd5 está asociado en el ser humano, así como por sus posibles efectos como vector en aplicaciones biotecnológicas y biomédicas.

En el trabajo presentado en esta tesis se evaluaron los posibles efectos de la infección con HAd5 sobre la glicosilación celular, principalmente sobre la expresión de carbohidratos terminales comunes a los glicoconjugados humanos: fucosa y ácido siálico. Para llevar a cabo este análisis se usó la línea celular A549 como modelo de estudio, una línea derivada de un adenocarcinoma de pulmón humano, descrita como epitelio pulmonar tipo II (Foster et al. 1998); no obstante, estas células son un modelo celular bien establecido para estudiar el epitelio alveolar respiratorio y utilizado para evaluar los efectos biológicos de distintas infecciones, como es el caso de bacterias, como *Staphylococcus aureus* (Tang et al. 2019), *Mycobacterium tuberculosis* (Fine-Coulson et al. 2015), *Mycoplasma pneumoniae* (Grimmer and Dumke 2019) *Acinetobacter baumannii* (Lin, Shu, and Lin 2018), *Streptococcus pneumoniae* (Lee et al. 2018), *Haemophilus influenzae* (Richter et al. 2018) e infecciones virales, como influenza A (Pauli et al. 2008), virus respiratorio sincitial (Munday, Hiscox, and Barr 2010), virus del Zika (Park et al. 2019), virus de varicela zoster (Shakya, O'Callaghan, and Kim 2019), adenovirus tipo 2 (Badr et al. 2019) y virus del Ébola (Flint et al. 2019).

Realizamos análisis por citometría de flujo (marcaje metabólico y perfil de lectinas) y PCR tiempo real de células A549 control e infectadas con HAd5, con la finalidad de caracterizar si la infección inducía cambios en la sialilación y fucosilación de la célula infectada y determinar el sustento genético de dichos cambios. Esto permitió identificar que la infección con HAd5 incrementa la fucosilación celular, particularmente en enlace $Fuc\alpha 1-2$, causado por un incremento en la expresión de *FUT1* y *FUT2*. Además, se identificó que la infección con HAd5 modifica la expresión del antígeno bifucosilado Le^y . En adición, para saber si este cambio en la fucosilación celular se debía a la entrada del virus o a la expresión de genes virales, se inactivó a HAd5 usando psoralen y luz UV;

permitiendo con ello evaluar si es necesaria la expresión de genes virales para que se modifique la fucosilación celular.

Se estableció, mediante estudios de transfección con plásmidos, que el gen viral E1A es capaz de inducir la sobreexpresión de *FUT1*. Esto es relevante ya que E1A es la primera unidad transcripcional en ser expresada durante la infección; las dos principales proteínas codificadas por esta unidad (289R y 243R), son generadas por splicing alternativo a partir de un solo RNA mensajero.

Estas proteínas tienen como función principal evitar apoptosis e inducir a la célula a fase S, la consecuencia inmediata de esta actividad mitogénica es la estimulación de la transcripción del promotor viral E2 a través de miembros de la familia de reguladores transcripcionales E2F, además se activan genes involucrados en el metabolismo de nucleótidos, replicación de DNA, entre otros, y esto debe directamente a la interacción con factores transcripcionales, como la proteína de unión a caja TATA (TBP, por sus siglas en inglés), p300/CBP y miembros de la familia ATF como Sp1 y c-Jun (King et al. 2018). Por otro lado, E1A también interactúa con moduladores de la transcripción como acetiltransferasas de histonas, desacetilasas de histonas y otros factores que remodelan la cromatina.

6. ANTECEDENTES

6.1. Adenovirus

Los adenovirus humanos tienen características que permiten usarlos como modelo de estudio, por ejemplo son agentes ubicuos, debido a que se han aislado de diferentes especies, pueden infectar diferentes tipos celulares y células post-mitóticas; se pueden producir títulos virales altos en células infectadas (Vorburger and Hunt 2002), así como insertarles segmentos relativamente grandes de DNA en su genoma (≈ 32 kb); esto último ha sido aprovechado ampliamente para el desarrollo de vectores en terapia génica, terapia anti-cáncer y para generar vacunas (Gallimore and Turnell 2001).

Los adenovirus fueron aislados en 1953 por Hilleman y Rowe (Rowe et al. 1953), a partir de tejido adenoides de pacientes con infecciones respiratorias agudas y unos años después se demostró que son capaces de inducir tumores en roedores de laboratorio (Wimmer et al. 2013). Múltiples estudios hechos desde entonces con estos virus han permitido descubrir procesos celulares como el procesamiento por splicing de RNAs mensajeros en eucariontes, genes supresores de tumores, procesos de regulación del ciclo celular, apoptosis y procesos asociados con cáncer (Fields, Knipe, and Howley 2007).

6.1.1. Clasificación

Los adenovirus que infectan a seres humanos son agentes etiológicos de enfermedades respiratorias agudas como bronquitis, faringitis y neumonía, así como de infecciones gastrointestinales, infecciones oculares e infecciones persistentes en amígdalas, o en linfocitos de sangre periférica y pulmones. La población más susceptible son niños menores de 5 años, así como personas inmunocomprometidas, sin embargo, presentan baja patogenicidad en humanos inmunocompetentes y la mayoría de los adultos han sido expuestos a los serotipos usados más comúnmente en terapia génica (HAd2 y HAd5) (Gallimore and Turnell 2001).

La familia *Adenoviridae* está comprendida por cinco géneros: Atadenovirus, Siadenovirus, Aviadenovirus, Mastadenovirus e Ictiadenovirus. El género Atadenovirus fue nombrado de esta forma debido al alto contenido de A+T en su genoma; infectan reptiles, aves, rumiantes, y una especie de marsupial. Los Siadenovirus se llaman así por la presencia de un gen que codifica para una sialidasa; se han aislado de aves y de una especie de rana. El quinto género, Ictiadenovirus, es un adenovirus que infecta peces (Davison, Benko, and Harrach 2003).

Los adenovirus que pertenecen al género Mastadenovirus, infectan a varias especies de vertebrados incluyendo humanos. Dentro de cada género, se clasifican en subgrupos y se nombran de acuerdo con el organismo hospedero que infectan y con las letras del alfabeto. Se han identificado 64 serotipos de adenovirus y se han clasificado en siete especies (Adenovirus humanos de A a G), de acuerdo con su capacidad de hemaglutinación, homología en secuencia y oncogenicidad en roedores inmunocomprometidos (Schreiner, Wimmer, and Dobner 2012). Principalmente la especie F participa en infecciones gastrointestinales; miembros de las especies B, C y E está relacionados con infecciones respiratorias, y las especies B, D y E en infecciones oculares.

Los serotipos se definen por su resistencia a la neutralización por suero contra otros adenovirus conocidos; esto se debe a la unión de anticuerpos a epítopes de las proteínas de la cápside como fibra y hexón; mientras que los subgrupos se definen por su capacidad de aglutinar eritrocitos debido a la unión de la región central de la proteína fibra con estas células.

6.1.2. Estructura y genoma

Los adenovirus son virus no envueltos, sin envoltura lipídica; están compuestos por una cápside de forma icosaédrica de 90 nanómetros de diámetro aproximadamente, que rodea a la nucleocápside o "core" de proteínas y DNA. El virión está compuesto por 7

proteínas estructurales, las proteínas mayoritarias que son pentón, hexón y fibra; mientras que las proteínas minoritarias o de andamiaje son las proteínas VI, IIIa, VIII y IX.

La proteína hexón se organiza en 240 trímeros (Nemerow et al. 2009). La proteína pentón se encuentra en cada vértice del icosaedro y está conformado por la base del pentón y una proteína fibra, que se proyecta desde la superficie en cada vértice. El core está formado por cuatro proteínas: TP (proteína terminal), Mu, VII y V. La proteína TP está unida covalentemente a ambos extremos 5' del genoma del virus, ayuda a la localización del genoma asociada a la matriz nuclear y funciona como iniciador de replicación del genoma viral; mientras las otras tres son proteínas ricas en argininas lo que les permite interactuar con el DNA; la proteína VII es la más abundante y sobre ella se empaqueta y enrolla el DNA, ver figura 1.

Dentro de la partícula viral se encuentran varias copias de la proteasa viral (L3 23K), esencial para el ciclo infeccioso del virus; por una parte ayuda a la maduración de las partículas virales recién sintetizadas por el corte proteolítico de los precursores (p) pIIIa, pVI, pVIII, pVII, pMu y pTP y por otro lado favorece la salida de la partícula viral del endosoma durante el desensamble de las partículas (Perez-Berna et al. 2009)

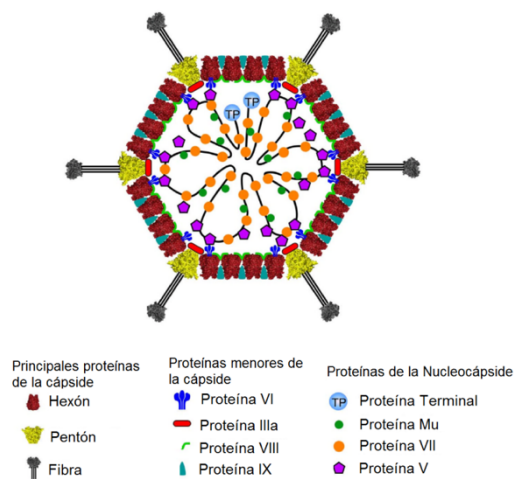


Figura 1. Diagrama de la estructura de la partícula viral de adenovirus. Se muestran las once proteínas estructurales del virión. Modificada de (Nemerow et al. 2009).

El genoma es de doble cadena de DNA lineal con un tamaño de 36 Kbp y se replica en el núcleo; tiene dos orígenes de replicación idénticos, uno en cada extremo, los cuales están flanqueados por secuencias terminales repetidas invertidas (ITR, por sus siglas en inglés) (Fields, Knipe, and Howley 2007).

El genoma está organizado en unidades transcripcionales tempranas y tardías, las cuales son transcritas por la RNA polimerasa II de la célula infectada (Fields, Knipe, and Howley 2007). Existen cinco unidades transcripcionales tempranas: E1A, E1B, E2, E3 y E4; y dos, IX y IVa2 que son consideradas tempranas retrasadas, debido a que su transcripción se induce por el aumento de la concentración de DNA viral. Además, tiene una unidad transcripcional tardía llamada unidad principal tardía o MLTU (Major late transcription unit, por sus siglas en inglés). Su expresión es regulada por el promotor ML (MLP Major late promoter, por sus siglas en inglés) que da lugar a cinco familias de mensajeros tardíos (L1- L5); todas estas unidades son transcritas por la RNA pol II y generan más de un RNA mensajero (mRNA), excepto IX (Fields, Knipe, and Howley 2007). Los genes codificados por la unidad transcripcional ML son expresados en la fase temprana del ciclo, pero a una baja tasa de transcripción. Los únicos dos genes transcritos por la RNA polimerasa III son los VA RNA (Virus Associated RNA, por sus siglas en inglés) I y II (Fields, Knipe, and Howley 2007).

Como se observa en la figura 2, las unidades transcripcionales del genoma de adenovirus codifican para diferentes proteínas con funciones relacionadas (Fields, Knipe, and Howley 2007). El genoma de estos virus codifica para la DNA polimerasa, y otras proteínas involucradas en la replicación de su genoma, sin embargo, es necesario que la célula entre a fase S para que se expresen los genes celulares involucrados en la biosíntesis de dNTPs (deoxinucleótidos trifosfato) y en otros aspectos de la síntesis de DNA (Fields, Knipe, and Howley 2007).

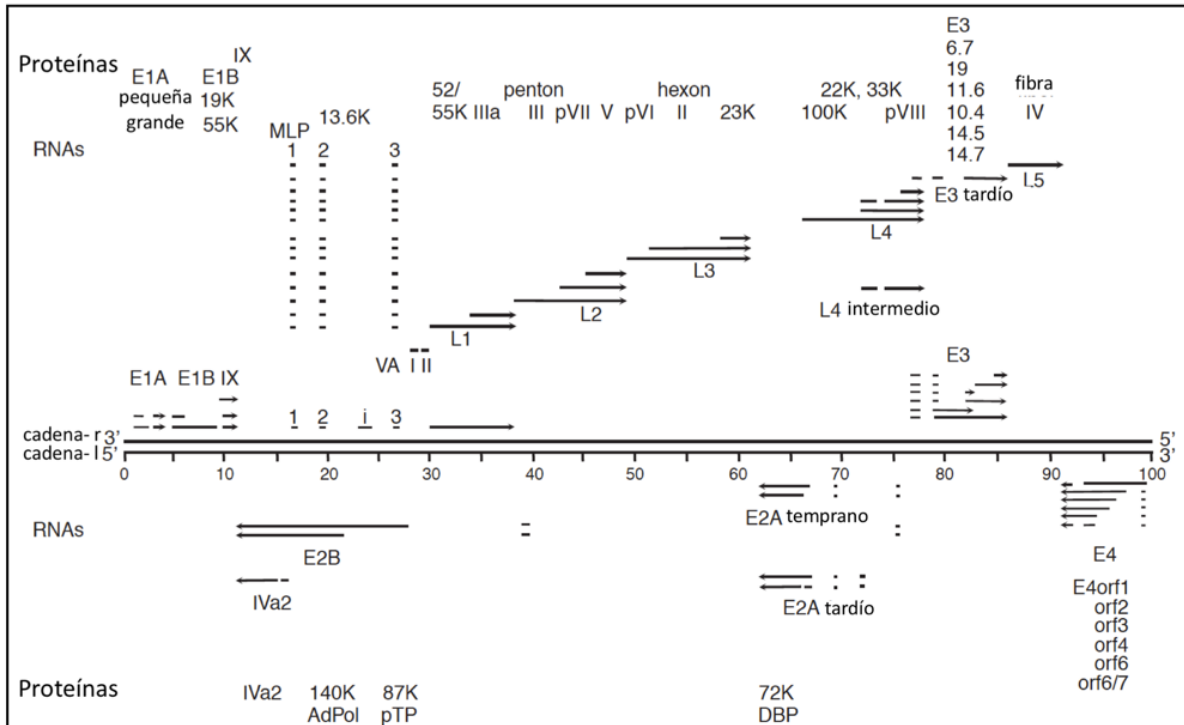


Figura 2. Diagrama del genoma, transcritos y proteínas de adenovirus. Se muestra un diagrama del genoma adenoviral, mostrando los mRNA por unidades transcripcionales y familias, así como las proteínas que codifican (Fields, Knipe, and Howley 2007).

Las proteínas de la unidad transcripcional E1A, son designadas por el coeficiente de sedimentación de su respectivo mRNA, por ejemplo, 13S y 12S. Son activadores transcripcionales y reguladores de los mecanismos de control del ciclo celular. Las proteínas codificadas en las unidades transcripcionales E1B y E3 se nombran por su peso molecular, por ejemplo, E1B-55K y E3-gp19K, respectivamente. E1B codifica para dos proteínas cuya función es bloquear apoptosis y en E3 se encuentran codificadas proteínas que modulan la respuesta inmune adaptativa de la célula para evitar la infección. Los productos de E2 participan directamente en la replicación del DNA viral y su nombre se designa de acuerdo con su función: pol (DNA polimerasa viral), DBP (proteína de unión a DNA de cadena sencilla) y TP (proteína terminal), la unidad transcripcional E2 puede ser transcrita a partir de dos promotores alternativos,

promotores temprano y tardío (Figura 2). Las proteínas de la región temprana E4 se designan dependiendo del ORF (open reading frame, por sus siglas en inglés), esta unidad transcripcional codifica para un grupo de proteínas con funciones no relacionadas: regulación de la transcripción, splicing y exportación de mRNA virales, así como en la modulación de la replicación del DNA y de la apoptosis. El producto de IVa2 es una proteína que participa en la activación del promotor tardío MLP; mientras que el producto de IX es una proteína minoritaria estructural que estabiliza las interacciones de la proteína hexón, además de ser un activador transcripcional con la capacidad de activar promotores con caja TATA tanto virales como celulares. Finalmente, las proteínas codificadas en la unidad transcripcional ML son nombradas por números romanos, de la II a la VIII, y principalmente son proteínas estructurales, o que son necesarias para el ensamble de nuevas partículas virales y expresión de los genes tardíos (Fields, Knipe, and Howley 2007).

La mayoría de los mRNA de HAd5 son procesados por splicing alternativo. Los transcritos de los genes tempranos son sintetizados a partir de diferentes promotores y generan varios mRNA; sólo el transcrito para la proteína IX no es procesado por splicing y el transcrito de IVa2 es el único producto de esa unidad transcripcional (Fields, Knipe, and Howley 2007).

El producto de la transcripción de MLTU consiste en un pre-mRNA de \approx 28 kb de longitud procesado por selección diferencial de sitios de poliadenilación; al menos son veinte los mRNAs generados, y se agrupan en cinco familias, llamadas L1 a L5, con base en el uso de un sitio común de adición de poliadenilación. Cada familia contienen un líder tripartita (TPL) no traducido de 201 nucleótidos en el extremo 5', generado a partir del splicing de tres exones cortos unidos a un exón de mayor tamaño que contiene un ORF que generalmente no se encuentra interrumpido por intrones (Fields, Knipe, and Howley 2007).

6.1.3 Replicación viral

El ciclo de replicación de adenovirus por convención se divide en una fase temprana y una tardía, las cuales están separadas por el inicio en la replicación del genoma. La fase temprana puede dividirse en inmediata temprana y temprana. Algunos de los genes virales tempranos continúan siendo expresados en la etapa tardía del ciclo (ej. E1B-55K). Además, el promotor que controla la expresión de todos los genes MLP se expresa con una baja tasa de transcripción durante la fase temprana. Los genes virales que codifican para las proteínas IVa2 y IX se expresan en un tiempo intermedio, por lo cual, como se describió antes, se clasifican como tempranos-retrasados (Fields, Knipe, and Howley 2007).

La fase temprana da lugar a las condiciones óptimas en las células para una eficiente replicación y expresión del genoma del virus. El primer evento en la fase inmediata temprana se da por dos interacciones entre proteínas de superficie y moléculas receptoras de la célula. En la mayoría de los serotipos de adenovirus, la primera interacción con la célula es iniciada por la formación de un complejo de alta afinidad entre la perilla de fibra del virus y la proteína celular CAR (Coxsackie B virus and adenovirus receptor, por sus siglas en inglés). CAR es un componente de las uniones estrechas de las células epiteliales. La segunda interacción da lugar a la internalización del virus por endocitosis mediada por clatrina y requiere de la unión de la base pentón con integrinas en la superficie celular; estas interacciones provocan la disociación de las fibras del virión y la subsecuente endocitosis (Nemerow et al. 2009).

Dentro del endosoma se lleva a cabo un desensamble parcial de la cápside debido a la disminución del pH que activa a la proteasa viral que se encuentra asociada al virión. Esto resulta en la liberación de las proteínas hexón, IIIa y pentón, además del corte del polipéptido VI que facilita la lisis del endosoma antes de que se fusione con el lisosoma; esto libera al virión en el citoplasma aún asociado a la proteína del *core* VII; posteriormente, el virión se une a microtúbulos para ser dirigido al núcleo. El genoma asociado a algunas proteínas virales, es internalizado al núcleo a través del complejo del

poro nuclear (Nemerow et al. 2009).

Una vez en el núcleo, la primera unidad en ser transcrita es E1A, debido a que tiene un promotor constitutivamente activo y resulta en la activación transcripcional de las otras unidades tempranas, así como en la activación de genes celulares involucrados en la entrada a la fase S del ciclo celular. Durante la fase temprana se inhiben mecanismos de la respuesta intrínseca y de defensa anti-viral, como NF κ B y apoptosis, entre otros.

Las proteínas de la unidad E1B, se encargan principalmente de la inhibición de apoptosis y varias otras funciones cruciales del ciclo de replicación viral. La unidad E3 está encargada de la inhibición de los mecanismos de respuesta inmune adaptativa. Dentro de sus principales funciones está evitar la presentación de antígenos por el MHC clase I. Las proteínas codificadas por la unidad E4, tienen diferentes funciones, desde replicación del DNA, control de la transcripción y transporte de mRNA.

Como se mencionó, la expresión de genes tardíos ocurre después del inicio de la replicación del DNA, los nuevos genomas sintetizados pueden ser utilizados para continuar con la replicación o para la transcripción de los genes tardíos y que se expresen las proteínas estructurales. La unidad transcripcional tardía contiene al MLP y a una secuencia 5' conocida como líder tripartita, el promotor aumenta su actividad más de 100 veces en la fase tardía, y esto ocurre con la acumulación de moléculas replicadas del genoma viral. La transcripción de genes virales tempranos se reduce, así como la exportación y traducción de los mensajeros celulares. Finalmente, los genomas recién sintetizados son encapsidados y liberados por lisis celular, ver figura 3.

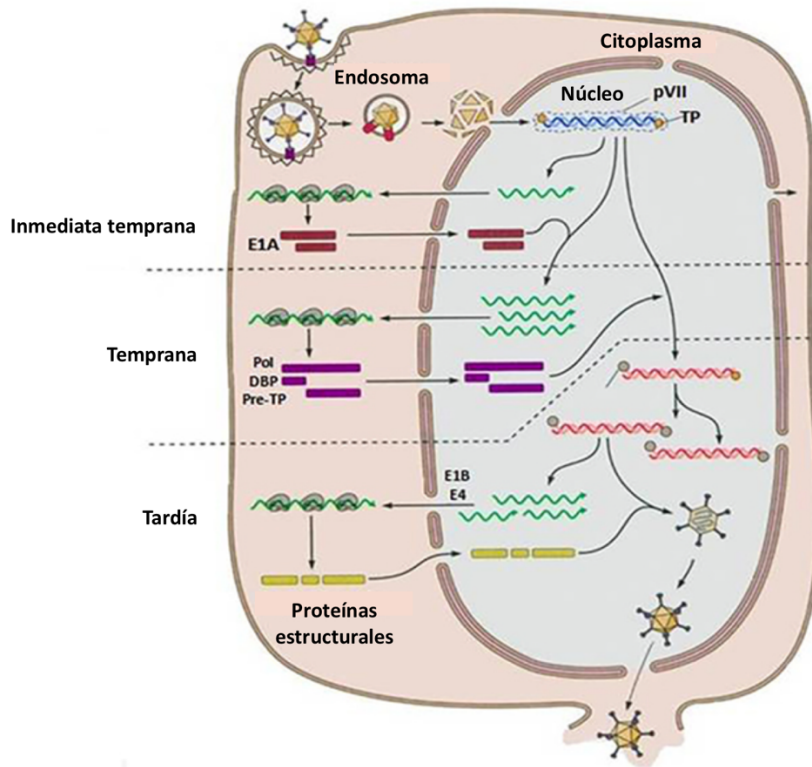


Figura 3. Representación del ciclo de replicación viral (Fields, Knipe, and Howley 2007).

6.1.4 Expresión y regulación de los genes tempranos

Como se describió previamente, la expresión de los genes tempranos promueven tres eventos principales que permiten la replicación exitosa del virus: i) se induce a la célula a entrar a fase S del ciclo celular, para establecer un ambiente adecuado para la replicación del genoma viral; ii) se inhiben las defensas de la célula como apoptosis, respuesta a ruptura de doble cadena de DNA (dsDNA) y la respuesta antiviral mediada por interferón; y iii) se sintetizan las proteínas necesarias para el inicio de la replicación del genoma del virus. Las proteínas encargadas de llevar a cabo estos procesos están codificadas en las unidades transcripcionales tempranas E1A, E1B, E3 y E4. Se describirán con detalle a E1A y E3 que son las más relevantes para este trabajo.

6.1.4.1 E1A y E3

Como se mencionó la unidad transcripcional E1A es la primera en transcribirse por tener un promotor constitutivamente activo, esto ocurre en las primeras horas de infección. Para la transcripción, el mRNA tiene un promotor típico con secuencia TATA, precedido por dos elementos potenciadores (enhancers I y II) que son necesarios para la expresión eficiente de los genes de E1A en las células infectadas. Los transcritos primarios están poliadenilados en un solo sitio, pero pueden ser procesados por splicing alternativo, generando cinco mRNAs que codifican para 5 proteínas diferentes, nombradas por su coeficiente de sedimentación: 13S (289R), 12S (243R), 11S (217R), 10S (171R) y 9S (55R), ver figura 4. Los dos productos más abundantes son 12S y 13S, los cuáles sólo difieren en 46 aa que se encuentran en la región intermedia de 13S (CR3), ambas proteínas son expresadas en la fase temprana, mientras que las 3 proteínas más pequeñas se expresan en la fase tardía y no han sido bien caracterizadas (King et al. 2018).

Dentro de las funciones de E1A está permitir el paso de G1 a S y esto ocurre en tres niveles: 1) inactiva a las proteínas de la familia pRB y libera al factor de transcripción E2F; 2) modula la función de los factores de remodelación de cromatina, como las histonas acetiltransferasas (HAT) p300/CBP y PCAF y una histona desacetilasa (HDAC); y 3) tiene blancos celulares como cdk2 y los factores de transcripción implicados en la regulación de genes que participan en el control del ciclo celular.

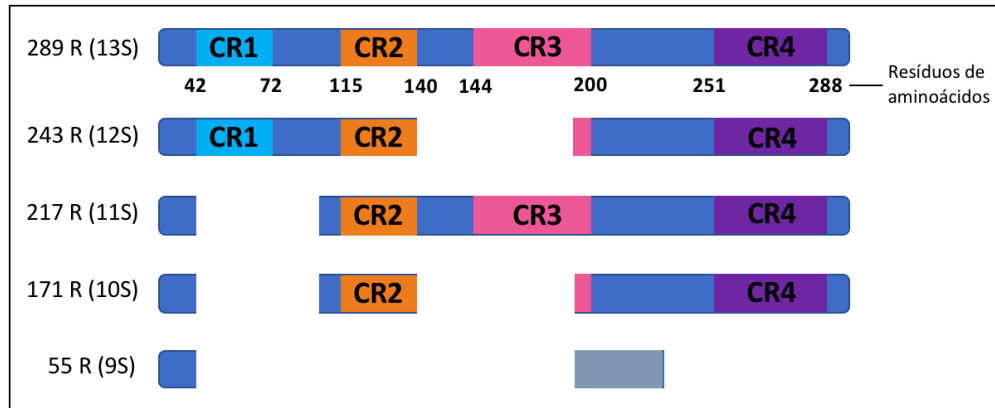


Figura 4. Productos de la unidad transcripcional E1A. Regiones conservadas (CR) de 1 a 4 están marcadas y denotadas en colores azul, naranja, rosa y morado, respectivamente. Se generan 5 proteínas 289R, 243R, 217R, 171R, y 55R, producidas por los mRNAs 13S, 12S, 11S, 10S y 9S, respectivamente; la secuencia de la quinta proteína está marcada en gris. R= residuos de aminoácidos.

La región E1A tiene cuatro regiones conservadas (CR), CR1 a CR4, cada una de estas regiones, así como el segmento N-terminal de la proteína, tiene secuencias que interactúan con diferentes y numerosas proteínas celulares; esta característica se le atribuye a la plasticidad intrínseca de ser proteína desordenada, favoreciendo por lo tanto la capacidad de plegarse de múltiples formas para interactuar con diferentes proteínas (Figura 4). Estas regiones están conservadas entre especies A-F (King et al. 2018).

CR3 está exclusivamente en 13S, y activa la transcripción de promotores virales (E1B, E2E promotor temprano, E3 y E4) tempranos interactuando con la subunidad del complejo mediador de la transcripción MED23, debido a que favorece el ensamblaje del complejo de inicio de transcripción; además, activa la transcripción de genes con promotor TATA debido a que se une directamente a la proteína de unión a TATA (TBP, por sus siglas en inglés) o uniéndose a represores como Dr1, o río arriba con miembros de la familia ATF, Sp1 y c-Jun.

La región CR2 activa el ciclo celular desplazando a la familia RB de los factores de transcripción E2F, esta región junto con CR1 son las reponsables de la transformación de la célula y de la actividad mitogénica. Por lo tanto CR2 libera la represión de genes necesarios para la replicación viral y de los genes celulares que son necesarios para la progresión del ciclo celular a fase S (ciclinas A y E, *cdc2*, *c-myc* y DNA pol α). E2F fue descubierto en células infectadas con adenovirus y fue llamado así porque se asocia y activa al promotor de la unidad E2 durante la infección por adenovirus (Fields, Knipe, and Howley 2007).

CR1 se une a HAT (histona) y a complejos que remodelan la cromatina por lo que puede participar en la transcripción de genes encargados de la regulación de ciclo celular. El carboxilo terminal corresponde a la región CR4, en esta región se encuentra la señal de localización nuclear y el sitio de unión para otras proteínas celulares que se identificaron debido a la asociación con esta proteína viral, denominada proteína de unión al C-terminal (CTBP1, por sus siglas en inglés).

Además de su papel como activador transcripcional, los productos de E1A causan un aumento en la concentración del p53 (supresor tumoral). E1A estimula la acumulación de p53 debido a la inducción de p19^{ARF}, la cual aumenta los niveles de p53 al inhibir a MDM2, E3 ubiquitina ligasa que induce la degradación de p53 (Fields, Knipe, and Howley 2007).

Mientras que E1A evita la respuesta de intrínseca de la célula, la unidad transcripcional E3 tiene como función principal evitar la respuesta inmune innata y adaptativa de la célula. Codifica para 7 proteínas inmuno-regulatorias que están involucradas en la respuesta de células T, B y NK (Sharma and Andersson 2009). La proteína E3-gp19K, es una glicoproteína transmembranal de tipo I, que incluye un dominio N-terminal hacia el lumen del RE y un C-terminal del lado citosólico (Lichtenstein et al. 2004). E3-gp19K se encuentra localizada principalmente en el RE, así como anclada a la membrana celular, y su función es inhibir el procesamiento de MHC clase I (MHC-I), limitando la eliminación de células infectadas mediante dos mecanismos para lograrlo. El primero es

reteniendo el MHC-I en RE y el segundo interfiere en varios pasos en la vía de su ensamblaje. Células que expresan esta proteína se ha mostrado que protege a la célula de lisis por los linfocitos T citotóxicos, y además de las células NK, debido a que secuestra a los ligandos de activación MICA y MICB (Sharma and Andersson 2009). Por otro lado, las proteínas E3-10.4K y E3-14.5K forman al complejo receptor de internalización y degradación de proteínas (RID, por sus siglas en inglés), α (RID α 3-10.4K) y β (RID β E3-14.5K). Este complejo induce la degradación de varios ligandos de muerte asociados a apoptosis, como el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), el ligando de Fas y ligando de inducción a apoptosis relacionado con TNF (TRAIL, por sus siglas en inglés) (Lichtenstein et al. 2004). La E3-6.7K, es una proteína pequeña transmembranal de tipo II, con tres sitios de glicosilación que pueden ser modificados exclusivamente con manosas, sugiriendo que su localización es principalmente en RE. Además, se sabe que forma parte del complejo RID β debido a que co-inmunoprecipitan, por lo que su localización también puede ser en la membrana plasmática (Lichtenstein et al. 2004). Por otra parte, independientemente del complejo, puede inhibir la apoptosis a través de las vías intrínseca y extrínseca, principalmente a través del mantenimiento en la homeostasis del Ca²⁺ citosólico. Particularmente la E3-14.7K, está localizada en citoplasma y núcleo, a diferencia de las anteriores que se localizan en la membrana citoplásmica o de RE, su función es proteger a la célula de la apoptosis extrínseca, a través de inhibir a TNF α . La E3-11.6K, ahora llamada Adenovirus Death Protein (ADP, por sus siglas en inglés), facilita la lisis celular permitiendo la liberación de la progenie viral y es la única proteína codificada por E3 que es principalmente tardía. Finalmente, la proteína E3-12.5K, cuya función se desconoce (Lichtenstein et al. 2004).

6.1.4.1.1 Respuesta intrínseca de la célula

La primera línea de defensa contra de la infección es proporcionada por los mecanismo intrínsecos (la respuesta de la célula) y por la respuesta inmune innata, las cuales se activan rápidamente en la infección, en algunos casos, incluso antes de que la partícula

viral ingrese a la célula o dentro de los primeros 30 minutos de la infección (Tamanini et al. 2003). El compromiso de esta primera respuesta a la infección permite la activación de la respuesta inmune adaptativa, así como la producción y reclutamiento a los sitios de infección de células T y anticuerpos específicos que reconozcan las partículas de adenovirus o a la célula infectada. Las células de mamífero tienen varios mecanismos que interfieren con la replicación viral, independientes de las señales extracelulares que activan y regulan las respuestas innata y adaptativa, varias de las proteínas tempranas de adenovirus interfieren con estos mecanismos (Miller et al. 2007).

6.1.4.1.2 Apoptosis

Los adenovirus, al igual que otros virus, tienen mecanismos de evasión del sistema inmune para establecer infecciones productivas que incluso pueden ser de largo plazo en el organismo. En el caso de los adenovirus la mayoría de las proteínas que modulan las defensas antivirales están codificadas en las unidades tempranas transcripcionales E1B, E3 y E4. De manera general, establecen el ambiente celular apropiado para la replicación del genoma viral e inhiben la apoptosis intrínseca (Flint and Nemerow 2017).

Las proteínas de E1B-55K, E1B-19K y E4 Orf6, son las principales responsables de la inhibición de apoptosis. E1B-19K es un homólogo de BCL-2 y se asocia a las proteínas pre-apoptóticas BAK y BAX inhibiendo su oligomerización y la formación de poros en la membrana de mitocondria. E1B-55K y E4 Orf6 forman un complejo que se asocia a p53; y además forma un complejo de E3 ubiquitin ligasa, que ubiquitina a p53 para ser degradada en proteosoma. Las proteínas de E3, complejo RID α y β , 6.7k y 14.7k, favorecen la internalización, degradación y remoción de receptores de membrana como TNF α R, TRAIL1R y FAS, como se mencionó (Lichtenstein et al. 2004). Las proteínas de E4, Orf3 y Orf6, inhiben la transcripción dependiente de p53, y ubiquitan a p53 dependiente de la degradación por proteosoma, respectivamente (Flint and Nemerow 2017).

6.1.4.1.3 Respuesta a Interferón

Una función adicional de las proteínas de E1A es la inhibición de la acción antiviral de interferón (IFN1) a través del N-terminal y CR1. A través de estas regiones, estas proteínas virales tempranas se unen directamente al transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT1, por sus siglas en inglés), el cual es un mediador de la transcripción estimulada por IFN. De esta forma, bloquea su unión a las acetilasas de histonas, p300 y CBP, y al factor transcripcional IRF1, requeridos para interactuar con “enhancers” de sus genes blanco (Fields, Knipe, and Howley 2007).

6.2 Modificación de la glicosilación celular durante la infección viral

Los glicanos determinan una gran variedad de procesos fisiológicos como patológicos en los organismos, incluyendo interacciones humano-patógeno. En el contexto de las interacciones célula-virus, los glicanos se han estudiado principalmente como componentes de los receptores de la célula que median la interacción con los virus (ej. hemaglutinina de influenza), así como de las glicoproteínas en las cápsides de los virus (ej. Gp120 en HIV). No obstante, los virus también son capaces de modificar la glicosilación de la célula infectada y este aspecto no ha sido ampliamente estudiado. Dicha modificación ocurre principalmente por dos mecanismos: 1) modificando la expresión de las glicosiltransferasas o enzimas de la célula infectada, relacionadas a la vía de biosíntesis de sustratos donadores, con o sin la modificación de antígenos glicosilados, los cuales se abordarán en este trabajo; y 2) codificando glicosiltransferasas virales, como es el caso de algunos bacteriófagos, phycodnaviruses o poxviruses, entre otros, donde también se modifica la glicosilación (Markine-Goriaynoff et al. 2004). El trabajo presentado en esta tesis se circunscribe al primer mecanismo.

A continuación, se describe la información que se conoce de los virus que modifican la expresión de enzimas involucradas en la glicosilación y del mecanismo en los casos que

se conoce, resumido en tabla 1.

6.2.1 Virus linfotrópico de células T humanas 1

El virus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV-1, por sus siglas en inglés), es un virus de la familia *Retroviridae* y género *Deltaretrovirus*. Tiene un genoma de RNA de cadena sencilla y posee actividad de retrotranscriptasa reversa. Fue el primer retrovirus en ser descubierto y la infección con este virus que tiene como blanco los linfocitos T CD4, provoca leucemia o linfoma de células T en adultos (Tagaya, Matsuoka, and Gallo 2019). Recientemente, se describió que las personas infectadas con este virus desde su nacimiento tienen hasta un 25% de probabilidad de desarrollar leucemia de adultos (Tagaya, Matsuoka, and Gallo 2019).

Una característica clínica frecuente de la leucemia causada por este virus, son laceraciones en la piel, que hasta un 38.9% de las personas infectadas las desarrollan. Se sabe que esta característica se debe a que la infección induce la sobre expresión del antígeno sialil Lewis x (sLe^x , $NeuAc\alpha 2-3Gal\beta 1-4[Fuc\alpha 1-3]GlcNAc$) en las células infectadas (Furukawa et al. 1994). El antígeno sLe^x es expresado de manera normal en diferentes células sanguíneas, principalmente leucocitos, y esto ocurre como respuesta a daño celular en el epitelio; la interacción del antígeno con las selectinas E- y P- expresadas en el epitelio, permiten que la célula pueda transvasar al epitelio dañado. La activación de la expresión de sLe^x se debe a su vez a la activación en la expresión de la fucosiltransferasa 7 (FUT7). La sobreexpresión de este antígeno en células infectadas se sugiere que promueve la diseminación de células infectadas por el cuerpo (Furukawa et al. 1994).

Para entender cómo ocurre la sobreexpresión de la enzima responsable de la síntesis del antígeno en células infectadas, Hiraiwa y colaboradores, describieron el mecanismo por el cual la proteína Tax, proteína viral transactivadora de genes celulares y virales, mantiene activa a la maquinaria de transcripción de la enzima FUT7 ($\alpha 1-3$

fucosiltransferasa). Se sabe que esta enzima es la responsable de la síntesis del antígeno sLe^x en estas células, este fenómeno de sobre expresión está relacionado directamente al grado de infiltración en la piel de células leucémicas (Hiraiwa et al. 2003).

El mecanismo normal descrito en linfocitos para la activación de *FUT7* en respuesta a daño, inicia con un estímulo externo como AMP cíclico (cAMP, por sus siglas en inglés), lo que desencadena el reclutamiento de factores de transcripción y coactivadores al promotor de la enzima. Se propone que en los linfocitos infectados con HTLV-1, la proteína Tax promueve la activación de *FUT7* debido a su interacción con CREB/ATF; esta interacción permite el reclutamiento del coactivador CBP/p300, sin que haya una fosforilación de CREB/ATF, ver figura 5.

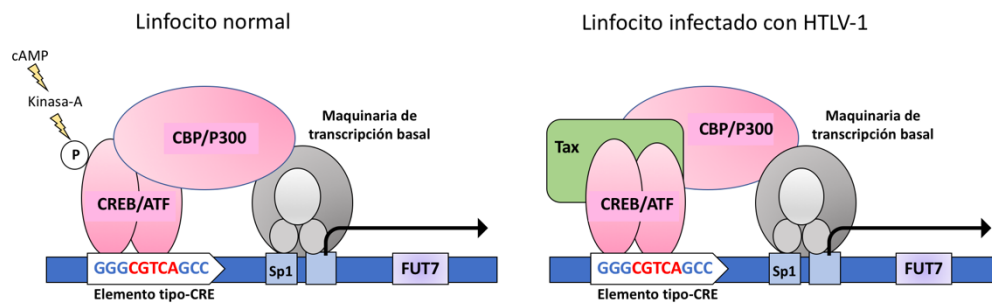


Figura 5. Diagrama de la activación de FUT7 por HTLV-1. En la izquierda se observa la activación de un linfocito normal por estímulo, cAMP (AMP cíclico), el cual fosforila a CREB/ATF, lo que permite el reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción; en la derecha, se observa un linfocito infectado, activado por la unión de Tax sin necesidad de un estímulo externo. Modificado de (Varki 2009).

6.2.2 Virus de la inmunodeficiencia humana

El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1, por sus siglas en inglés), pertenece a la familia *Retroviridae* y género *Lentivirus*. Es un virus con genoma de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva y posee actividad de retrotranscriptasa reversa; infecta

linfocitos T CD4⁺, macrófagos y células dendríticas (Fields, Knipe, and Howley 2007).

La infección con este virus provoca la pérdida progresiva de la función del sistema inmune debido a la reducción de los linfocitos T CD4⁺, por lo que con el tiempo se provoca síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), debido a que se pierde la capacidad de generar nuevos los linfocitos T CD4⁺, facilitando el desarrollo de infecciones oportunistas potencialmente mortales y de diferentes tipos de cáncer.

Debido a la importancia que tiene la glicosilación en estas células, y que en 1988 el diagnóstico de la enfermedad se obtenía por la detección directa de anticuerpos contra el virus, además de que el perfil de anticuerpos cambiaba dependiendo de la etapa en la enfermedad, Adachi y colaboradores observaron que la infección con este virus incrementa la expresión del antígeno bi-fucosilado Lewis y (Le^y, Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R) en la superficie de linfocitos T CD3⁺ maduros provenientes de pacientes o de líneas celulares comparados con linfocitos de pacientes sanos (Adachi et al. 1988). Es posible que Le^y sea expresado temprano en la infección, y se ha visto que esta expresión incrementa conforme avanzan las etapas específicamente en células CD4⁺, que son la población de células que disminuye debido a la infección.

Otro cambio que se observa en la infección por HIV, ocurre a nivel epigenético. El virus hipermetila el promotor de la enzima UDP- N- acetilglucosamina 2- epimerasa/N-acetilmanosamina cinasa (GNE, por sus siglas en inglés), responsable de la biosíntesis del ácido siálico en las células. Ello causa una disminución en la sialilación general y en la elongación del *core 2* de O-glicanos, así como una disminución de cadenas de poli-N-acetil-lactosamina (Giordanengo et al. 2004). Funcionalmente, esta hiposialilación provoca alteraciones en la señalización de distintas vías en las células infectadas dependientes de ácido siálico como CD43, CD7, CD45 o PSGL-1. Se desconoce el mecanismo por el que el virus provoca esta modificación, así como, si tiene algún efecto en el ciclo de replicación del virus. Esta pérdida de ácido siálico podría explicar el incremento de Le^y en la superficie de estas células.

Virus	Glicano	Gen blanco	Mecanismo	Referencia
HTLV-1	sLe ^x	FUT7	Tax Proteína viral	Hiraiwa et al. 2003
HSV-1	sLe ^x	FUT3/ 6	NC	Nyström et al, 2009
		FUT5	RNA inmediato temprano	Nordem et al. 2013
CMV	sLe ^x	FUT3/ 4/ 5/ 6/ 7/ 9	NC	Cebulla et al. 2000
	Le ^x	ST3GalIV		Nyström et al, 2007
	Le ^y	FUT1/ 2		
VZV	sLe ^x	FUT3/ 4/ 5/ 6	NC	Nyström et al, 2007
HIV-1	Le ^y (linfocitos T) e hiposialilación	NC y GNE	NC	Adachi et al 1988 Giordanengo et al. 2004
HCV	NC	FUT1	NC	Papic et al. 2012
	Fuc α 1-6 en ANXA2 y HSP90B1	FUT8	NC	Xiang et al. 2017

Tabla 1. Virus que inducen cambios en la glicosilación celular.

6.2.3 Virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (HCV, por sus siglas e inglés) es un virus pequeño de RNA con polaridad positiva y cadena sencilla; pertenece a la familia *Flaviviridae* y género *Hepacivirus*. La infección con este virus es una causa común de enfermedad hepática crónica y aguda, provoca cirrosis hepática y hepatocarcinoma celular (HCC) y es asociada a una mayor mortalidad en comparación a la infección con otros virus de hepatitis. La Organización Mundial de la Salud declara en 2018 que 399,000 personas mueren cada año por cirrosis y HCC. Esto se debe a que la mayoría de los pacientes no pueden eliminar al virus en el momento del contagio y debido a eso se desarrolla hepatitis crónica, la cual es generada por lesiones inducidas por inflamación persistente en el hígado, así como por la acumulación de grasa hepática, provocada por una disregulación del metabolismo de lípidos; y finalmente estos factores provocan que la infección pueda avanzar a fibrosis y después de 20 a 40 años, los pacientes pueden

desarrollar cirrosis o HCC, esto ocurre entre el 10-20% de los pacientes .

Para tener un mejor conocimiento de las interacciones entre el huésped - virus, y desarrollar mejores modelos de infección que permitan mejorar las terapias así como vacunas que ya existen, Papic y colaboradores hicieron un análisis que permite medir los cambios provocados por la infección en la expresión de todos los genes posibles, mediante el aislamiento y secuenciación de RNAs con cap 5' (RNAs procesados por la polimerasa II), incluyendo RNAs con cadena de poli-A pequeña, miRNAs primarios y RNAs no codificantes largos sin cadena de poli-A, en células Huh 7.5, línea de HCC. De los genes que se identificaron, hay varios asociados con la glicosilación, cuya expresión incrementa en la infección, incluyendo *FUT1*, *FUT5* y *FUT8*, y genes relacionados al metabolismo de Fucosa (*FUK* y *FX*). Sin embargo, *FUT1* es el que más incrementa su nivel (24-fold) con un máximo a 72 h p.i., este tiempo corresponde a un tiempo tardío en el ciclo de replicación. Para determinar la función de *FUT1* en la infección, se silenció el mRNA de *FUT1* usando un siRNA, observándose una disminución en la replicación del genoma de hasta un 80%, así como, la inhibición en la producción de viriones hasta por un 50%. Ello sugiere que el incremento de *FUT1* tiene un rol biológico importante durante la infección con HCV (Papic et al. 2012).

Recientemente en 2017, se identificó de manera general que la infección con HCV provocaba un incremento de estructuras sialiladas, fucosiladas, así como de *N*-glicanos complejos, y los mensajeros de anexina A2 (*ANXA2*) y de la proteína de shock térmico 90 beta 1 (*HSP90B1*). Esto se determinó mediante la precipitación de proteínas con unión a la lectina LCA que reconoce específicamente Fuc en enlace α 1-6, y este enlace es sintetizado por la enzima *FUT8*. Debido al aumento de residuos con este enlace, analizaron el mRNA de *FUT8* y encontraron que está sobre expresado en células infectadas con HCV (Xiang et al. 2017).

6.2.4 Familia de Herpesvirus

Los herpesvirus pertenecen a la familia *Herpesviridae*, son virus de doble cadena lineal de DNA, el tamaño del genoma varía de entre 125 hasta 240 kpb. Algunos virus de esta familia son: herpes virus simple 1 (HSV-1), varicela zoster virus (VZV) y citomegalovirus (CMV). Estos virus causan infecciones con manifestaciones subclínicas recurrentes, en el caso de HSV-1 es responsable del herpes labial, provoca aftas labiales que suelen aparecer alrededor de la boca; en el caso de VZV, provoca varicela, caracterizada por la aparición de pequeñas ampollas en la piel; citomegalovirus rara vez provoca síntomas, cuando se llegan a presentar son síntomas parecidos a la mononucleosis, que consisten en fiebre, dolor de garganta y ganglios linfáticos inflamados. Las infecciones con estos virus son especialmente críticas para personas inmunocomprometidas. Una característica importante de estos virus, es la capacidad de permanecer latente en las células, y esto ocurre debido a que tienen la capacidad de integrar su genoma al de la célula (Arvin and Abendroth 2007).

Debido a la importancia de estos virus y por lo que se sabía en la infección con HTLV-1, sobre el control que ejerce el virus en la maquinaria de fucosilación y que esto es usado como un factor en la patogénesis, Nyström y colaboradores analizaron si la infección con estos virus también induce sobreexpresión de antígenos glicosilados (Nystrom et al. 2007).

Se determinó en una línea celular humana de fibroblastos embrionarios de pulmón, que la infección con VZV y CMV, modifican la expresión de antígenos fucosilados, esto se lleva a cabo de manera específica según el virus, y correlaciona con cambios en la expresión de las fucosiltransferasas, enzimas encargadas de la síntesis de estos antígenos. Para VZV, se reportó que incrementa la expresión de las α 1-3 FUTs: 3, 5 y 6; mientras que para CMV, incrementa la expresión de las α 1-3 FUTs: 3, 4, 5, 6, 7 y 9, así como la α 1-2 FUT1 (Nystrom et al. 2007). En la infección con CMV se observó que la neo-expresión de FUT1 favorece la síntesis de antígeno bi-fucosilado Le^y, mientras que en la infección con VZV se observa la expresión de sLe^x pero no de Le^y; se sabe que la

expresión de FUT1 se favorece la síntesis eficiente de estructuras de tipo H2, y esta estructura compite con la estructura sialilada precursora de tipo 2 que da lugar al sLe^x, además se favorece la reducción de cadenas de poli-lactosamina (Zerfaoui et al. 2000).

Posteriormente, se determinó que en la infección con HSV-1 también hay una sobreexpresión de las α 1-3 FUTs 3, 5, 6 y 7, y que esto provoca la inducción del sLe^x en la superficie de fibroblastos infectados, sin embargo la inducción de FUT5 se usó como modelo para analizar el mecanismo de activación; por lo que se describió que el incremento de FUT5 es independiente de la transcripción de genes virales, se debe a un RNA inmediato temprano y no como resultado de la actividad de una proteína, se determinó que este incremento inicia en un tiempo temprano en el ciclo de replicación del virus (Nystrom et al. 2009).

Posteriormente, se analizó si la infección de HSV-1 en leucocitos, tanto normales como provenientes de línea celular, es capaz de incrementar la expresión de sLe^x a pesar de no ser células blanco del virus. Se observó que estas células son permisivas para la infección y que el virus puede incrementar la expresión del antígeno sLe^x, sin embargo, en estas células ocurre principalmente por la sobreexpresión de la FUT7 que incrementa desde tiempos tempranos, así como, FUT3 y 6; estos datos contrarrestan lo que ocurre en los fibroblastos, ya que en estas células las FUTs responsables del incremento de son FUT3, 5 y 6 y no FUT7 (Norden et al. 2013).

Como se he descrito en esta sección, común a todos los ejemplos citados es la modificación de la fucosilación, tanto de los genes involucrados en la síntesis de antígenos como de las estructuras glicosídicas. Estos antígenos son descritos en secciones posteriores (sección 6.6).

6.3 Fucosilación celular

La Fucosa (Fuc) es una 6-deoxi-L-galactosa que se encuentra incorporada en cadenas oligosacáridos, principalmente en posición terminal. Hay dos características que hacen único a este carbohidrato: i) tiene configuración en L- en contraste con la configuración D- que tienen otros monosacáridos y ii) carece de un grupo hidroxilo en el carbón 6 (C6) (Figura 6). Los glicanos que contienen Fuc, particularmente las estructuras que forman antígenos bien estudiados como Le^y, sLe^x, Le^b, entre otros (Figura 8), tienen funciones importantes en diversos mecanismos celulares o como parte de la patogénesis de infecciones o de diversas enfermedades. De manera normal en humanos participa en numerosos procesos como en adhesión leucocito-endotelio, en embriogénesis, en grupos sanguíneos, fertilización, por mencionar algunas; o en interacciones huésped-microbio, cáncer y artritis (Becker and Lowe 2003; Ma, Simala-Grant, and Taylor 2006; Schneider, Al-Shareffi, and Haltiwanger 2017). Otros procesos importantes donde la Fuc participa son la plasticidad sináptica, crecimiento de las neuronas y su morfología, además de ser responsable de otros procesos cognitivos, como el aprendizaje y memoria (Schneider, Al-Shareffi, and Haltiwanger 2017). Está presente en vertebrados, invertebrados, plantas y bacterias

En mamíferos este carbohidrato puede estar unido a *N*- y *O*- glicoproteínas, así como a estructuras lipídicas; se puede encontrar en posición terminal, unida directamente a la proteína sobre la serina (Ser) o treonina (Thr) o como parte del *core* de *N*-glicanos. Los enlaces en los que se encuentra sintetizada al carbohidrato adyacente son α 1-2, α 1-3/4 y α 1-6, o directo a la proteína.

6.4 Fucosiltransferasas

Las Fucosiltransferasas son enzimas que catalizan la reacción entre su azúcar activado, guanósil difosfato- Fucosa (GDP-Fuc) y una molécula aceptora, que pueden ser diversos glicoconjugados como: oligosacáridos libres, glicoproteínas o glicolípidos. Esta

reacción consiste en la transferencia de un residuo de Fuc en un enlace específico según la familia de FUT a un carbohidrato adyacente y la liberación de un fosfato por parte del nucleótido activado.

En humanos, las FUT se clasifican en familias dependiendo del enlace que sintetizan y representan un total de 13 enzimas: α 1-2 fucosiltransferasas, α 1-3/4 fucosiltransferasas, α 1-6 fucosiltransferasa y O-FUTs. En vertebrados, las primeras 3 familias son enzimas transmembranales de tipo II, se encuentran ancladas al aparato de Golgi con una cola *N*-terminal citoplásmica, un dominio transmembranal y un tallo extendido, seguido de un dominio globular catalítico en el carboxilo terminal dentro del lumen de Golgi. Sin embargo, las O-FUTs se encuentran en el retículo endoplásmico (RE) de manera soluble y son las enzimas encargadas de catalizar la O-fucosilación en RE.

La primera familia corresponde a las α 1-2 FUTs, está integrada por FUT1 (Transferasa H) y FUT2 (Transferasa secretora, Se). Estas son las dos únicas FUT capaces de añadir Fuc en enlace α 1-2 y por lo tanto de sintetizar el antígeno H y estructuras relacionadas que forman parte del sistema ABO y del sistema Lewis, como es el caso de Le^y. La FUT1 se expresa principalmente en células precursoras de eritrocitos (Reguigne-Arnould et al. 1995); mientras que la FUT2 se expresa en epitelio y en fluidos corporales (saliva), un individuo que no tiene ninguna de las dos copias de este gen se le considera no secretor y no produce al antígeno H de manera soluble. Mientras que personas que no tienen ninguna de las enzimas funcionales presentan lo que se conoce como fenotipo Bombay (0.01% de la población). Estas enzimas tienen diferentes especificidades por las estructuras aceptoras, la FUT1 prefiere estructuras de tipo I (Gal β 1-3GlcNAc) y II (Gal β 1-4GlcNAc, también llamada LacNAc, *N*-acetil-Lactosamina), mientras que la FUT2 prefiere las estructuras tipo I y III (Gal β 1-3GalNAc). (Ma, Simala-Grant, and Taylor 2006)

La expresión de glicanos con Fuc α 1-2 contribuye a establecer la flora microbiana normal en el desarrollo del intestino permitiendo un nicho favorable para organismos que pueden usar a la Fuc como fuente de carbono (Becker and Lowe 2003); en especial la actividad

de FUT2 promueve esta diversidad normal microbial en el intestino y su regulación positiva (up-regulation) sirve como protección durante enfermedades, aumentando la tolerancia y manteniendo la simbiosis (Schneider, Al-Shareffi, and Haltiwanger 2017).

Para analizar la importancia de la α 1-2 Fuc en el desarrollo, se crearon ratones nulos para las dos enzimas, estos ratones fueron viables y fértiles, en apariencia sanos y con desarrollo normal, sin embargo, eran susceptibles a diversas enfermedades como asma (Ma, Simala-Grant, and Taylor 2006). Otra función asociada a estas enzimas FUT1/FUT2, es la correcta fucosilación α 1-2 de nucleolina. La forma fucosilada de esta proteína ha sido asociada a su localización y funciones en: núcleo, promoviendo la organización y dinámica de cromatina, así como la formación eficiente de la maquinaria de mitosis; también puede encontrarse en citoplasma y membrana plasmática, su función aquí ha sido descrita como proteína ligando y está asociada a proliferación (Palumberi et al. 2010).

La sobreexpresión de estas enzimas esta asociada a la progresión de tumores, favoreciendo proliferación y migración celular, así como la inflamación asociada a artritis reumatoide (Isozaki et al. 2014). En cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés), se sabe que la sobre expresión de FUT1 está asociada a la resistencia de Taxol, así como a la inhibición de apoptosis y conduce a la sobreexpresión del antígeno Lewis y (Le^y) (Gan et al. 2017); mientras que en cáncer de ovario, la sobre expresión está asociada a diversos procesos como: aumento de la proliferación, que se sabe está regulado por el factor transcripcional c-Jun (Gao et al. 2014); resistencia a fármacos (Zhang et al. 2013; Gao et al. 2013); proliferación (Liu et al. 2012); invasión (Yan et al. 2010) y metástasis (Gao et al. 2011). En artritis reumatoide se conoce que FUT1 tiene un papel importante en la migración de células epiteliales, la expresión de esta enzima promueve su habilidad angiogénica, así como la producción de citocinas pro inflamatorias como MCP-1 (proteína quimio atrayente de monocitos, por sus siglas en inglés), también conocida como CCL2 (Isozaki et al. 2014). La FUT2 está asociada al igual que FUT1, a promover la migración, invasión y metástasis, así como la inhibición de apoptosis en adenocarcinoma de pulmón (Zhou et al. 2017).

La segunda familia corresponde a las α 1-3/4 FUTs. Las FUT3 a FUT7 y FUT9, sintetizan el enlace Fuc α 1-3/4 y también están involucradas en la síntesis de la familia de antígenos Lewis. De estas enzimas solo FUT3-6 y FUT9 sintetizan tanto sLe^x (NeuAc α 2-3Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc) como Le^x (Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc) y FUT7 solo puede sintetizar la estructura sLe^x. La FUT3 y 5 tienen actividad para sintetizar enlaces α 1-4 como los que ocurren en los antígenos Le^a (Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc), su forma sialilada sLe^a (NeuAc α 2-3Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc) y Le^b (Fuc α 1-2Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc), esta actividad adicional se da en el tallo extendido en la estructura de la enzima, debido a que es una región hipervariable; mientras que FUT9 es mayoritariamente responsable de la síntesis de Le^x en el cerebro (Nishihara et al. 2003). La expresión genética de las α 1-3/4 FUTs humanas está regulada por el desarrollo. Se ha demostrado que la FUT4 y 9 se expresan muy temprano en la embriogénesis humana, antes de la octava semana de gestación, mientras que la FUT6 y 3 se expresan de manera secuencial después de la semana ocho cuando el embrión se nombra feto; esto sugiere que Le^x, que se encuentra expresado en células no diferenciadas y en división celular, se expresa antes que la estructura sialilada sLe^x.

La síntesis de antígenos bi-fucosilados como Le^y o Le^b pueden ser sintetizados de dos formas: la fucosilación terminal en enlace α 1-2 seguido de la fucosilación sub-terminal en enlace α 1-3/4; o primero la fucosilación sub-terminal en enlace α 1-3/4, seguido de la fucosilación terminal en enlace α 1-2, en mamíferos predomina esta última. La FUT4 y FUT 7 son las únicas que se expresan en linfocitos, y son las responsables de sintetizar los ligandos para las selectinas, Le^x y sLe^x, respectivamente, que son reconocidos por las selectinas P-, E-, y L-; no sólo se encargan de medir la extravasación de los linfocitos, además median los eventos iniciales de la adhesión leucocito-endotelio en inflamación aguda y severa (Kannagi 2002). Mientras que FUT4 es responsable de la síntesis de α 1-3 en células A549 (Tian et al. 2016; Wang et al. 2017), así como en MCF-7 (Yang, Liu, and Yan 2013).

La sobreexpresión de FUT4 en células A549 está ligada al incremento en la expresión

del antígeno Le^y, en el proceso de transición epitelio-mesénquima (ETM, por sus siglas en inglés). La ETM es un proceso involucrado de manera normal en el desarrollo embrionario, pero ha sido descrito como evento clave en el proceso de invasión en tumores, aumentando la capacidad de las células de hacer metástasis. Consiste en la pérdida de las características de epitelio, como la pérdida de la polaridad, disminución en la adhesión, provocado por el remodelamiento del citoesqueleto; y esto resulta en la adquisición de un fenotipo de células mesenquimales, incrementando la expresión de marcadores de estroma como N-caderina, fibronectina, entre otros. Otro factor importante en el desarrollo de ETM es la infiltración de macrófagos asociados a tumores (TAMS, por sus siglas en inglés), los cuales tienen un fenotipo M2 y son las células más abundantes causantes de inflamación favoreciendo un adecuado microambiente en el tumor (Wang et al. 2017). Los TAMS son los responsables de promover el incremento de Le^y/FUT4, a través de la vía de señalización TGF- β 1/Smad2/3.

La FUT10 y FUT11, adicionan la Fuc en enlace α 1-3 a aceptores de lactosamina cortos y sobre el *core* de los *N*-glicanos, aunque estas estructuras no han sido evidenciadas biológicamente y su estructura es similar a las α 1-3 FUTs de *Drosophila* (Mollicone et al. 2009).

La tercera familia esta integrada por FUT8, una α 1-6 FUT que realiza el enlace Fuc α 1-6 sobre GlcNAc denominada fucosilación del *core*, característica común en estructuras de *N*-glicanos, este tipo de glicosilación es la más común.

Finalmente, la cuarta familia esta compuesta por las proteína O-fucosiltransferasas 1 y 2 (POFUT 1 y 2, respectivamente), las cuales transfieren un residuo de Fuc vía un enlace α a una serina o una treonina; en el caso de la enzima POFUT1, añade la Fuc al factor de crecimiento epidermal en una secuencia consenso (C²-X-[S/T]-C³) y POFUT2 sobre la trombospondina 1, en la secuencia consenso (C-X-X-[S/T]-C-X-X-G). Estas enzimas se expresan en vertebrados, invertebrados, bacterias y plantas, como se mencionó previamente. La falta de expresión de algunas de estas enzimas en ratón como por ejemplo FUT8, POFUT1 y POFUT2, es letal, en el caso de *Pofut1* y *2* se conoce que los

defectos ocurren en la etapa de gastrulación, sin embargo, los ratones que no expresan al gen de *Fut8*, tres días después de nacer el 70% muere, los demás desarrollan problemas en el crecimiento y tiene defectos respiratorios, lo que demuestra su importancia en el desarrollo (Schneider, Al-Shareffi, and Haltiwanger 2017).

Common Name(s)	Abbreviation	Representative Major Product(s)
H blood group α 2fucosyltransferase	^a FUT1	H antigen, type 2
Secretor (Se) blood group α 2fucosyltransferase	^a FUT2	H antigen, type 1
Fuc-TIIII α 3/4fucosyltransferase Lewis blood group fucosyltransferase	^a FUT3	Sialyl-Lewis ^x Sialyl-Lewis ^a Lewis ^b Lewis ^x Lewis ^a Lewis ^y
Fuc-TIV α 3fucosyltransferase ELAM-1 ligand fucosyl transferase	^a FUT4	
Fuc-TV α 3fucosyltransferase	^a FUT5	
Fuc-TVI α 3fucosyltransferase	^a FUT6	
Fuc-TVII α 3fucosyltransferase	^a FUT7	
Fuc-TVIII α 6fucosyltransferase	^b FUT8	
Fuc-TIX α 3fucosyltransferase	^a FUT9	
Fuc-TX α 3fucosyltransferase	^c FUT10	Unknown
Fuc-TXI α 3fucosyltransferase	^c FUT11	Unknown
Protein O-fucosyltransferase 1	^d POFUT1 / FUT12	
Protein O-fucosyltransferase 2	^a POFUT2 / FUT13	

Tabla 2. Familias de Fucosiltransferasas (Schneider, Al-Shareffi, and Haltiwanger 2017)

6.5 Metabolismo de fucosa y biosíntesis de GDP-Fuc

Se han descrito dos vías para la biosíntesis de GDP-Fuc en mamíferos, las cuales ocurren en el citosol, estas son: vía *de novo* y vía de salvamento (Figura 7). La vía *de novo* proporciona el mayor porcentaje de GDP-Fuc a la célula, aproximadamente el 90% es producido por esta vía. Inicia con GDP-manosa (GDP-Man) que es convertida en GDP-Fuc a través de tres reacciones enzimáticas realizadas por dos proteínas, la primera de ellas es la GDP-manosa 4-6-dehidratasa o GMD, la cual convierte GDP-Man a GDP-4-ceto-6-deoxymanosa; esta enzima necesita como cofactor a la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), es muy conservada en los diferentes reinos, se encuentra expresada en casi todos los tejidos en humano, aunque los niveles de transcrito varían entre los tejidos del organismo; el producto final de la vía, GDP-Fuc es un potente inhibidor. La segunda enzima de la vía es GDP-ceto-6-deoxymanosa 3,5-epimerasa, 4-reductasa o FX, cataliza dos reacciones: primero de epimerasa, convirtiendo GDP-4-ceto-6-deoxymanosa a GDP-4-ceto-6-deoxygalactosa, y segunda como reductasa, donde requiere como cofactor NADPH, para generar GDP-Fuc y NADP⁺.

La vía de salvamento es la responsable de sintetizar el 10% restante de GDP-Fuc, esta vía utiliza la Fuc que proviene de la dieta, o en el caso de cultivo del medio de cultivo, así como del reciclaje del catabolismo lisosomal de glicoproteínas o glicolípidos (Johnson and Alhadeff 1991). No se conoce con certeza el tránsito del lisosoma al citosol; la Fuc del medio extracelular es transportada al citosol a través de la membrana plasmática por difusión facilitada y este proceso es específico para Fuc (Wiese, Dunlap, and Yorek 1994). Una vez en el citosol, la Fuc es convertida a GDP-Fuc por dos reacciones: en la primera la enzima Fucosa-cinasa se encarga de adicionar un grupo fosfato para formar Fucosa-1P, posteriormente la GDP-fucosa pirofosforilasa o GFPP, cataliza la reacción reversible de Fucosa-1P a GDP-Fuc.

Debido a que la reacción de las FUTs se realiza en el lumen del aparato de Golgi, el GDP-Fuc debe transportarse del citosol al interior de dicho organelo. La proteína

responsable del transporte GDP-Fuc es el transportador SLC35C1 (Becker and Lowe 2003).

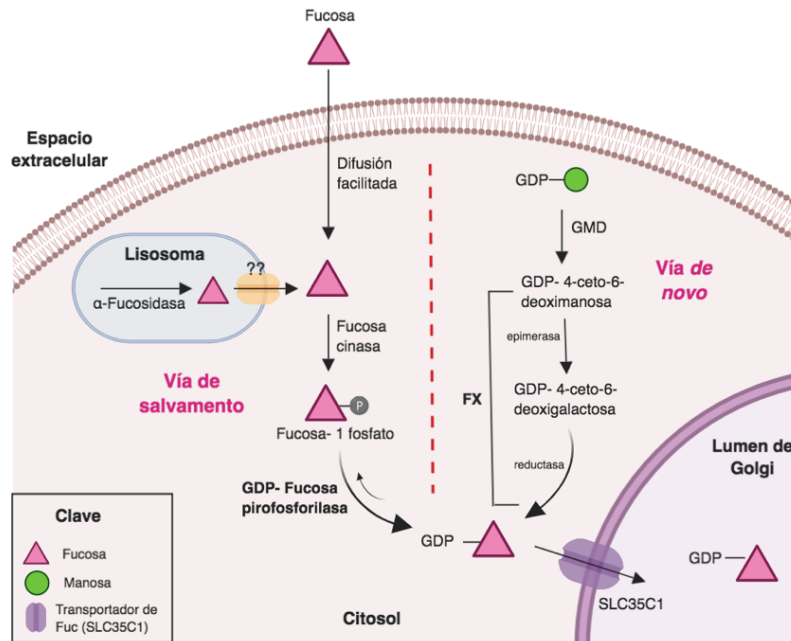


Figura 6. Diagrama de las vías del metabolismo de Fucosa. Se representan las dos vías de síntesis de Fucosa, *de novo* y vía de salvamento.

Se han descrito enfermedades causadas por la mutación de alguna de las enzimas relacionadas al metabolismo, como es el caso de la deficiencia de adhesión leucocitaria (LAD II, por sus siglas en inglés) o también conocido como desorden congénito de la glicosilación tipo IIc, esta enfermedad es causada por mutaciones en el transportador de Fuc, SLC35C1, esto se genera que la proteína no se sintetice correctamente o no sea localizada a Golgi, donde lleva a cabo su función (Figura 7), provocando deficiencia en el transporte del azúcar activado y por lo tanto una deficiente fucosilación celular (Ma, Simala-Grant, and Taylor 2006). También se conoce que la sobreexpresión de estas enzimas, SLC35C1 o FX ocurre en distintos tipos de cáncer, como hepatocarcinoma (Moriwaki et al. 2007; Noda et al. 2003), colorectal (Villar-Portela et al. 2013), páncreas (Terao et al. 2015). Esto es importante porque la modificación de la fucosilación celular, tanto en procesos fisiológicos y patológicos, no es exclusivo de la regulación en la expresión de las FUTs, sino también de enzimas y del transportador, involucrados en la

biosíntesis y disponibilidad de GDP-Fuc.

6.6 Familia de antígenos Lewis

Los antígenos Lewis son una familia de antígenos glicosídicos descubiertos originalmente sobre los eritrocitos, ahora se sabe que se encuentran en otros tejidos como en el epitelio (Sanders and Kerr 1999). El término de Lewis deriva de la familia en la que se encontró una incompatibilidad de células rojas y que ayudó a descubrir esta familia de antígenos (Varki 2009). Son glicanos que presentan los mismos tres monosacáridos, *N*-acetilglucosamina (GlcNac), galactosa (Gal) y Fucosa (Fuc), presentados en diferentes enlaces, dependiendo del precursor donde se sintetizan y que pueden estar o no sialilados.

Se pueden dividir en dos grupos dependiendo de su síntesis, en el caso de Lewis a (Le^a , Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-R), Lewis b (Le^b , Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-R) y sialil Lewis a (s Le^a , Sia α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-R) son sintetizados sobre el precursor de tipo 1 (Gal β 1-3GlcNAc) y la Fuc es añadida en enlace α 1-2 o α 1-4; mientras que Lewis x (Le^x , Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R), Lewis y (Le^y , Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R) y sialil-Lewis x (s Le^x , Sia α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R) son sintetizados a partir del precursor de tipo 2 (Gal β 1-4GlcNAc) y la Fuc es adicionada sobre el mismo oligosacárido, pero en posición α 1-3 (Figura 7). Estos antígenos son expresados sobre O y *N*- glicoproteínas, así como en glicolípidos.

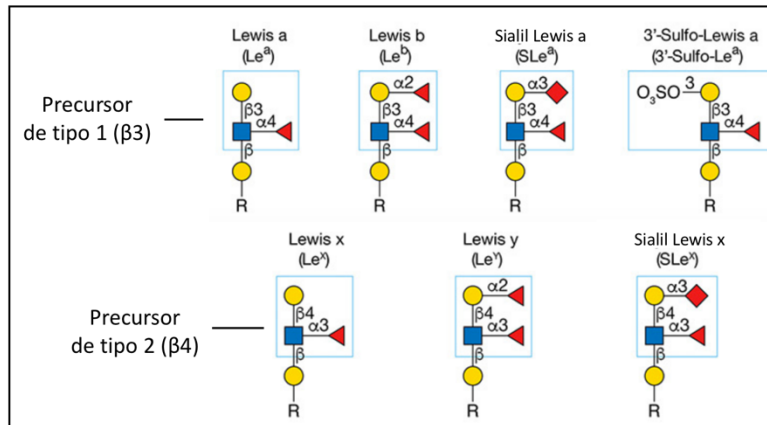


Figura 7. Representación de las estructuras de la familia Lewis. Se muestra las estructuras de los principales antígenos de la familia Lewis, así como el precursor. La R puede ser *N*- u *O*- glicoproteína o glicolípido. Modificado de (Varki 2009).

La expresión de estos antígenos ha sido extensamente estudiada en los procesos oncológicos donde su expresión modula la interacción de la célula que lo expresa con su entorno, particularmente favoreciendo procesos de proliferación, invasividad y migración, como se ha mencionado.

Uno de los antígenos más estudiado en los últimos años es el antígeno Le^y. Se expresa de manera normal en la embriogénesis, sin embargo su expresión en adultos está limitada a la superficie de eritrocitos, en fluidos del cuerpo y en distintos epitelios como epitelio del esófago, mucosa gástrica, intestino delgado proximal, células acinares del páncreas, epitelio ciliado de la tráquea, bronquios y neumocitos tipo II; la línea celular A549 proviene de neumocitos tipo II y son usadas como modelo de epitelio pulmonar (Foster et al. 1998) (ejemplos descritos en introducción). Una elevada asociación a la membrana plasmática de Le^y ha sido asociado al grado clínico y progresión de varios carcinomas como, carcinoma de ovario, pancreático, pulmón, gástrico, seno y colon, así como algunos melanomas (Liu et al. 2010). La gran mayoría de los datos que se tienen sobre este antígeno se debe a la expresión aberrante en los distintos tipos de cáncer, así como a las funciones asociadas de las proteínas que lo tienen en su estructura.

En el caso de cáncer de ovario, el aumento de Le^y se ha observado tanto en líneas celulares como en muestras de pacientes, en ambos casos asociado a diferentes proteínas de membrana plasmática. En el caso de la línea celular RMG-I, se transfectó el gen de *FUT1* y se observó un incremento significativo de este antígeno sobre el receptor de EGF (EGFR, por sus siglas en inglés), así como un incremento en la proliferación, debido a que se encontró mayormente fosforilado el EGFR (Liu et al. 2010); en la misma línea celular se describió que la sobreexpresión de *FUT1* aumenta la cantidad de proteína CD44 así como la cantidad de Le^y sobre su estructura, favoreciendo la adhesión celular y propagación de las células. Otras proteínas que se modifican en estas células son: las ciclinas A, D1 y E, aumenta tanto el mensajero que las codifica como la proteína, favoreciendo la fase S del ciclo celular (Liu et al. 2012); y el receptor del factor de crecimiento de tipo insulina-1 (IGF-1R), también se observa una mayor expresión del mensajero, así como de la proteína (Liu et al. 2011). En otras líneas celulares de cáncer de ovario (CAOV3 y SKOV3), en las que también se transfectó *FUT1*, se observa una mayor proliferación de las células, debido a que el porcentaje de células en fase S es mayor, esto por la reducción de la proteína cinasa dependiente de ciclina p27, a través de la vía de señalización PI3K (Cai et al. 2017). En 2017, Hao y colaboradores, publicaron que la expresión de *FUT1* y Le^y es regulada en cáncer de ovario a través de TGF- β 1, como se observa en la figura 8. TGF- β 1 activa a su receptor y través de la vía de MAPK cinasas, lo que permite la fosforilación JNK, p38 y ERK, para posteriormente mediante la unión de los factores de transcripción c-Fos y c-Jun al promotor de la enzima *FUT1*, sobre expresar la transcripción y por lo tanto el aumento de en la síntesis de Le^y (Hao et al. 2017).

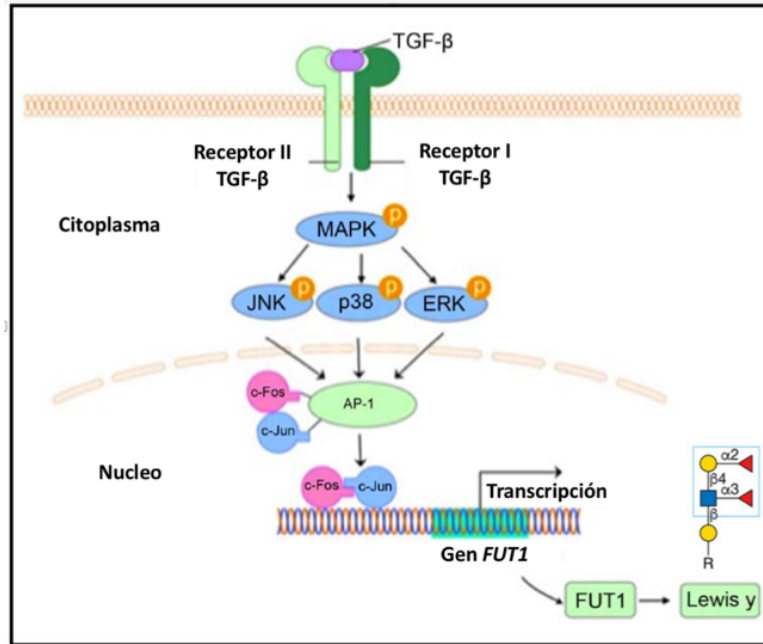


Figura 8. Representación de la vía de activación de Lewis^y en cáncer de ovario. Modificado de (Hao et al. 2017).

Mientras que en muestras de pacientes con cáncer de ovario la asociación es a través de las siguientes proteínas: integrinas $\alpha 5$ y $\beta 1$ (Li et al. 2010) y αv y $\beta 3$ (Gao et al. 2013), debido a la función de estas proteínas se asocia a promover la adhesión y proliferación celular; en el caso de la proteína MUC1, el incremento de este antígeno está asociado a la resistencia de fármacos y al pronóstico de los pacientes, además de las funciones relacionadas a MUC1 como adhesión y migración celular (Zhang et al. 2013).

La expresión de este antígeno en otros tipos de cáncer, como cáncer oral y cáncer gástrico, también está ligado a proliferación celular, a través del EGFR y HER2, respectivamente.

Como se mencionó previamente, las enzimas encargadas de sintetizar los enlaces de Fuc de este antígeno son las $\alpha 1-2$ FUT1 y FUT 2, así como $\alpha 1-3$ FUT4. Se sabe que la asociación de Le^y/FUT1, favorece diferentes tipos de cáncer como cáncer de mama, hepatocarcinoma, de células escamosas orales, y de colón, y sólo en este último se

conoce que el factor de transcripción c-Jun favorece la expresión de FUT1 en estas células (Gao et al. 2014).

7 HIPÓTESIS

El adenovirus humano tipo 5 (HAd5) induce cambios en la glicosilación celular, principalmente en carbohidratos terminales, dependientes de la expresión de genes virales.

8 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la fucosilación y sialilación celular en células A549 infectadas con HAd5.

8.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si la infección con HAd5 modifica la glicosilación celular, principalmente fucosilación y/o sialilación celular.
2. Determinar si es necesaria la expresión de genes virales o la replicación del genoma viral en las células infectadas para que se modifique la glicosilación celular.
3. Analizar si hay genes celulares que se modifican con la infección.
4. Determinar cuál es el o los genes virales responsables de la modificación en la glicosilación.

9 MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Cultivo celular y virus

La línea celular A549 (Adenocarcinoma alveolar humano, ATCC #CCL-185) se cultivó en monocapa con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-Invitrogen) complementado con 10% suero bovino fetal (SBF) (Gibco-Invitrogen), en condiciones de 5 % de CO₂ a 37°C, en cajas de cultivo según el experimento. La línea celular MCF7 se cultivó en las mismas condiciones que las células A549.

Las células A549 fueron infectadas con dos adenovirus humanos tipo 5, el primero (HAd5-2250), fue generado a partir de H5pg4100 (Kinds Muller et al. 2007) usado como virus parental, donde la unidad transcripcional E3 fue insertada en el H5pg4100 para generar el HAd5-2250 (HAd5) como virus WT (wild type con genoma completo); el segundo virus fue HAd5-dl309 (Jones and Shenk 1979) es equivalente al H5pg4100 con fenotipo silvestre, pero carece de cuatro genes de la región E3 que codifican para la proteínas: gp-19k; complejo RID, α 10.4 y β 14.5; y proteína de muerte ADP (11.6K).

En todos los experimentos se infectó con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 unidades formadoras de focos (UFF) por célula (UFF/célula). La adsorción del virus se llevó a cabo durante 1:30 a 37°C en medio sin suero. A las células MK (mock, sin infectar) sólo se les agregó medio sin suero; en periodos de 15 minutos, la placa se movió para que el inóculo se distribuyera de manera homogénea, al finalizar se adicionó DMEM suplementado con suero bovino fetal. Los virus fueron propagados con una MOI baja (0.1 UFF/ célula) y titulados mediante inmunofluorescencia en células A549.

9.2 Inactivación de adenovirus por psoralen y UV

Se llevó a cabo la inactivación del virus usando luz ultravioleta (UV) en onda corta (365 nm) y Psoralen a 20 µg/mL (Sigma-Aldrich) a una distancia de 25 cm entre la lámpara y la caja de cultivo de 35 mm, en un volumen final de 1 mL de DMEM sin suero, por 40 min a temperatura ambiente y evitando que se evapore, moviendo la caja cada 15 minutos. Posterior a la inactivación, la infección se llevó a cabo como se describió previamente. La eficiencia de inactivación se determinó por citometría de flujo usando anti-hexón MAb 9F6 (proporcionado por S. J. Flint), proteína de la cápside del virus, como se describe en las siguientes secciones. Para cada experimento la eficiencia de inactivación fue del 95%.

9.3 Marcaje metabólico

Células MK (Mock, células sin infectar) e infectadas con HAd5-2250 y dl309 se incubaron con medio suplementado 10% SBF y adicionado con 40 µM de ManNaz (*N*-Azidoacetil-*D*-manosamina tetra-acetilada) y 50 µM de Fucosa alkino (Thermo scientific), ambos carbohidratos previamente titulados en A549. Posterior al tiempo de adsorción, las células se incubaron por 8, 16 y 24 h p.i. (horas post infección). Se colectaron con tripsina y se fijaron con formaldehído 4% en PBS por 20 min a temperatura ambiente (TA); posteriormente las células fueron incubadas con Alexa flúor 647 conjugado con alkino o azida para analizar SiaNaz y FucAk respectivamente, mediante una reacción de cicloadición mediada por cobre. La incorporación *de novo* de estos carbohidratos en la membrana plasmática se evaluó por citometría.

9.4 Detección por citofluorometría

Las células se fijaron con formaldehído 4% en PBS por 20 minutos a TA. Se incubaron con las lectinas y anticuerpos, descritas a continuación, por 1 hora a 4°C, 50 µL por pozo. Antes y después de las incubaciones se realizaron dos lavados con PBS y se centrifugó por 4 minutos a 1,200 xg. El análisis se llevó a cabo en los citómetros FACSCanto-II (adquisición con el programa FACSDiva) y en el FACSCalibur (adquisición con el

programa CellQuest) (BD). Se adquirieron 10,000 eventos de la población de interés y los resultados se analizaron en el programa FlowJo versión 7.6.5. (Tree Star Inc.). Los datos se muestran como porcentaje de expresión o intensidad media de fluorescencia, según sea el caso.

9.4.1 Tinción con lectinas

Cada lectina se tituló y se determinaron las diluciones y condiciones de citofluorometría para establecer el perfil de fucosilación de las células A549. Las lectinas usadas fueron: AAL biotinilada (*Aleuria aurantia*, 1:1600; Vector Labs), reconoce Fuc α 1-3/2, posteriormente detectada con estreptavidina conjugada a Alexa 647 (Thermo scientific) (1:8000); LCA (*Lens culinaris*, 1:6000; Vector Labs) que reconoce Fuc α 1-6 en el core de N-glicanos; y UEA I (*Ulex europaeus agglutinin*, 1:75; Vector Labs) que reconoce Fuc α 1-2, estas últimas dos lectinas están acopladas a FITC.

9.4.1.1 Inhibición de la lectina *Ulex europaeus agglutinin* (UEA-I)

Previo a iniciar la tinción con la lectina UEA-I, se incubó UEA-I en una dilución 1:75 con una preparación de Fucosa 500 mM diluida en PBS por 30 minutos en agitación. Se continuó con la tinción, así como se describió en detección por citofluorometría.

9.4.2 Tinción con anticuerpos

Los anticuerpos usados para detectar los diferentes antígenos a evaluar fueron: anti-Lewis^y (Abcam, clona F3, 0.45 μ g/ml), estructura H (Thermo scientific, 1/100), se incubó a 4°C toda la noche, el resto de la tinción continúa según el protocolo. Anticuerpos secundarios IgM-Alexa flúor 647 (Abcam) en una dilución 1:2500 y IgM-PE (eBioscience) en dilución 1:300, respectivamente.

9.5 Detección del porcentaje de células infectadas

Las células se permeabilizaron usando Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) por 20 minutos a 4°C. El anticuerpo usado fue anti-Hexón MAb 9F6 diluido en PBS 1:30, el anticuerpo secundario IgG anti-ratón acoplado a Alexa 488 (Thermo scientific) en una dilución 1:1500.

9.6 Extracción de RNA y PCR cuantitativo

El RNA total de MK e HAd5-infectadas en cada tiempo post infección, se extrajo con Trizol (Thermo scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. El RNA se cuantificó usando un NanoDrop: el cociente 2860/280 nm de 2.0 ± 0.2 . Dos microgramos del RNA aislado se usó para sintetizar cDNA, usando oligo -dT y transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). La PCR tiempo real se llevó a cabo usando Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master mix (2x) (Thermo Scientific) en el equipo StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems). Todos los oligonucleótidos iniciadores usados fueron validados con una eficiencia de amplificación cercana a 100%. Los datos fueron analizados con el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando triplicados de 3 experimentos independientes. Los niveles relativos de RNA mensajero para cada dato graficado se muestran como el cambio de HAd5/MK, después de normalizar con actina como gen endógeno y comparado con MK 1 hora. En la tabla 2 se incluyen los oligonucleótidos que se usaron en estos experimentos.

Genes	Oligonucleótidos
FUT1	Fw: 5´- ggccttcctgctagtctgtg-3´ Rv: 5´- ggtctggacacaggatcgac -3´
FUT2	Fw: 5´- gcggagacaccatctacctg-3´ Rv: 5´- agtaagggggacaggctctgc-3´
FUT4	Fw: 5´- aagccgttgaggcggtt -3´ Rv: 5´- acagttgtgatgagatttgaagct -3´
SLC35C1	Fw: 5´- ctgcctcaagtacgtcgggtg-3´ Rv: 5´- gaagccccgatgatgataccg-3´
FX	Fw: 5´- catatactcgctggacctggcc -3´ Rv: 5´- gtatcaaaggtcacttccccatgg -3´
FGPT	Fw: 5´- cctccccgcacattctttg-3´ Rv: 5´- gtcttgcactccaaatgcca-3´
β Actin	Fw: 5´- ctccttctgggcatggagtcc-3´ Rv: 5´- gcaatgccagggtacatggtgg-3´
E1A	Fw: 5´- ttgaaccacctacccttcacg-3´ Rv: 5´- cctcctcgttgggatcttcg-3´

Tabla 3. Tabla de oligonucleótidos iniciadores usados para PCR cuantitativo.

9.7 Western blot

Lisados totales se separan en geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de PDVF (Millipore) por 2 horas a 400 mA. Se bloqueó en TBS-Tween (TBS-T) 0.1% con 3% leche a temperatura ambiente (TA) en agitación leve por 1 hora, se realizaron lavados con TBS-Tween 0.1% y 0.3% leche (Solución de lavado). Se incubó el anticuerpo primario, α Tubulina (eBioscience) en una dilución de 1:8000, en solución de lavado toda la noche a 4°C en agitación, el anticuerpo secundario α-ratón hrp (Jackson Immuno Research)

1:10000, se incubó en la misma solución de lavado por 2 hrs a TA en agitación leve. Se reveló con quimioluminiscencia siguiendo el protocolo del fabricante (Pierce, Thermo Fisher Scientific) y las bandas son visualizadas en filmes de rayos X (Kodak).

9.8 Blot de lectinas

Se bloqueó en TBS con 5% de PVP (Polivinilpirrolidona, SIGMA) a TA en agitación leve por 3 horas, se realizaron dos lavados con TBS - 0.3% y 0.1% PVP (Solución de lavado) de 15 minutos cada uno. Para el blot con UEA-I acoplada a hrp (horseradish peroxidase), se cargó 35 μ g de proteína, la lectina se usó en una dilución 1:25000, en TBS-T 0.2%, CaCl₂ [125 mM] y 0.3% PVP; para Le^y se cargó 100 μ g de proteína, y el anticuerpo se usó en dilución 1:1500, en TBS-T 0.2%, y 0.3% PVP; ambos se incubaron toda la noche a 4°C. El anticuerpo secundario IgM-hrp se usó 1:40,000 (Bethyl Laboratories), y se incubó 1 hora a TA agitación leve. Se hicieron seis lavados con la solución de lavado. Se reveló con quimioluminiscencia siguiendo el protocolo del fabricante (Pierce, Thermo Fisher Scientific) y las bandas son visualizadas en filmes de rayos X (Kodak).

9.9 Transfección con plásmidos en células A549

Los plásmidos utilizados en esta tesis se generaron a partir de los RNAs mensajeros de las proteínas 289R y 243R, nombrados 13S y 12S por su coeficiente de sedimentación, bajo el control de los promotores de CMV y SV40 derivados del vector pcDNA3 (Invitrogen), fueron donados por el Dr. Tomas Dobner. La transfección se llevó a cabo usando células subconfluentes, se les añadió una mezcla de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y DNA (0.5 μ g) por 4 horas, posteriormente se adicionó medio suplementado con SBF y se dejó por 4 horas más, el tiempo final de transfección fueron 8 horas. La extracción de RNA y análisis por PCR cuantitativo se realizó como en la sección 9.6.

9.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se calculó con el programa Prism Software (GraphPad 6), se realizó la prueba de Welch's, que es una variación a la prueba t-student con la posibilidad de varianzas diferentes y considerando muestras independientes. Los valores considerados significativos $P < 0.5$.

10 RESULTADOS

10.1 Viabilidad de células infectadas

Para analizar el efecto de la infección sobre la glicosilación de poblaciones homogéneas de células, se aseguró que en todos los experimentos se alcanzara un porcentaje de infección mayor a 95%. De acuerdo con trabajos previos, esto fue logrado utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 10. Otro dato ya establecido en células A549, son los tiempos post infección para analizar las diferentes fases del ciclo de replicación, por lo que se evaluaron las siguientes horas: 8 horas post infección (h p.i.) corresponde a un tiempo temprano en la infección, donde hay expresión principalmente de genes tempranos; un tiempo en la transición a la fase tardía (16 h p.i.), determinada por el inicio de la replicación del genoma viral; y finalmente un tiempo en la fase tardía (24 h p.i.) donde ya hay producción de progenie viral, y donde aún no hay lisis celular.

Para asegurar que las células están vivas en cada uno de los tiempos medidos, se analizó con azul de tripano, en células MK (no infectadas) e infectadas con HAd5-2250 (HAd5) usado como virus wt (wild type con genoma completo, ver materiales y métodos). El azul de tripano es un colorante que sólo puede teñir células muertas, debido a que la membrana plasmática pierde integridad y el colorante puede entrar a la célula. Como se observa en la figura 9, la viabilidad de las células en cada una de las horas post infección, es del 100%, todas las células están vivas en cada uno de los tiempos analizados.

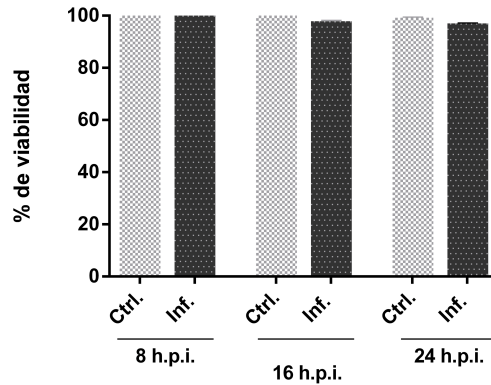


Figura 9. Viabilidad de células A549. Se muestra el porcentaje de Células Ctrl (MK) e infectadas con HAd5 viables. Las células se infectaron con una MOI de 10 UFP/célula, se cosecharon a 8, 16 y 24 h p.i. y se tiñeron con azul de tripano para su conteo.

10.2 La infección con HAd5 modifica la fucosilación de células A549

Debido a la importancia biológica de la glicosilación y su modificación durante ciertas infecciones virales, se analizó si la infección con HAd5 modifica la expresión de los carbohidratos fucosa y ácido siálico, los cuales se encuentran en los glicanos humanos. La detección se realizó usando marcaje metabólico, el cual consiste en suplementar carbohidratos marcados en el medio de cultivo. La marca que permite su detección consiste en la presencia de un grupo azida o alquil en los carbohidratos suplementados, la cual no interfiere en su incorporación a los glicanos. Mediante una reacción mediada por cobre, el carbohidrato marcado es reconocido por un fluoróforo unido a un grupo alquino o azida según sea el caso (Hsu et al. 2007); este experimento se llevó a cabo sin permeabilizar las células, por lo que nos permite hacer un análisis de la incorporación *de novo* de los carbohidratos marcados en la membrana plasmática.

Las células MK e infectadas con HAd5 se incubaron con ManNaz (Manosamina *N*-azidoacetil- tetra-acetilada) o FucAk (Fucosa alquino modificada), para medir la incorporación *de novo* de residuos totales de ácido siálico (Sia) en forma de *N*-azidoacetil ácido siálico (SiaNaz) y la incorporación *de novo* de residuos de Fuc como FucAk, respectivamente.

Es importante mencionar que en el caso de la detección de residuos de Sia, la molécula que se adiciona al medio de cultivo, Manosamina *N*-azido-acetil- tetra-acetilada, es una molécula precursora y está comprometida en la vía de biosíntesis de este carbohidrato; mientras que, en el caso de la Fuc, es la molécula de Fuc conjugada con un alquino la que se adiciona al medio de cultivo y es directamente utilizada en la biosíntesis de GDP-Fuc por la vía de salvamento (Hsu et al. 2007).

El análisis de la incorporación de los carbohidratos marcados, se llevo a cabo mediante citometría de flujo, esta técnica proporciona el porcentaje de células que incorporaron el carbohidrato, así como la intensidad media de fluorescencia (IMF). La IMF se define como el cambio en la intensidad en la fluorescencia de una población con un determinado fluoróforo, el cual se graficó porcentaje de expresión relativa, debido a que se usaron dos diferentes citómetros (ver materiales y métodos).

Se evaluó la incorporación de estos carbohidratos en las tres horas post infección antes descritas: 8, 16 y 24 h p.i. En la figura 10A y C, se observa que todas las células fueron positivas para el marcaje de ambos carbohidratos, FucAk y SiaNaz. Mientras que las células infectadas con HAd5, comparadas con las células MK, mostraron un incremento estadísticamente significativo de la IMF relativa a la incorporación de FucAk (Figura 10B), en cada uno de los tiempos analizados a lo largo del ciclo de replicación, mientras que en la incorporación de SiaNaz no se observó ningún cambio entre MK e HAd5-infectadas. (Figura 10D)

Esto permitió concluir que la infección con HAd5 modifica la glicosilación de células A549, específicamente la fucosilación en superficie, debido a que en el experimento las células no fueron permeabilizadas y no es posible concluir sobre las modificaciones intracelulares.

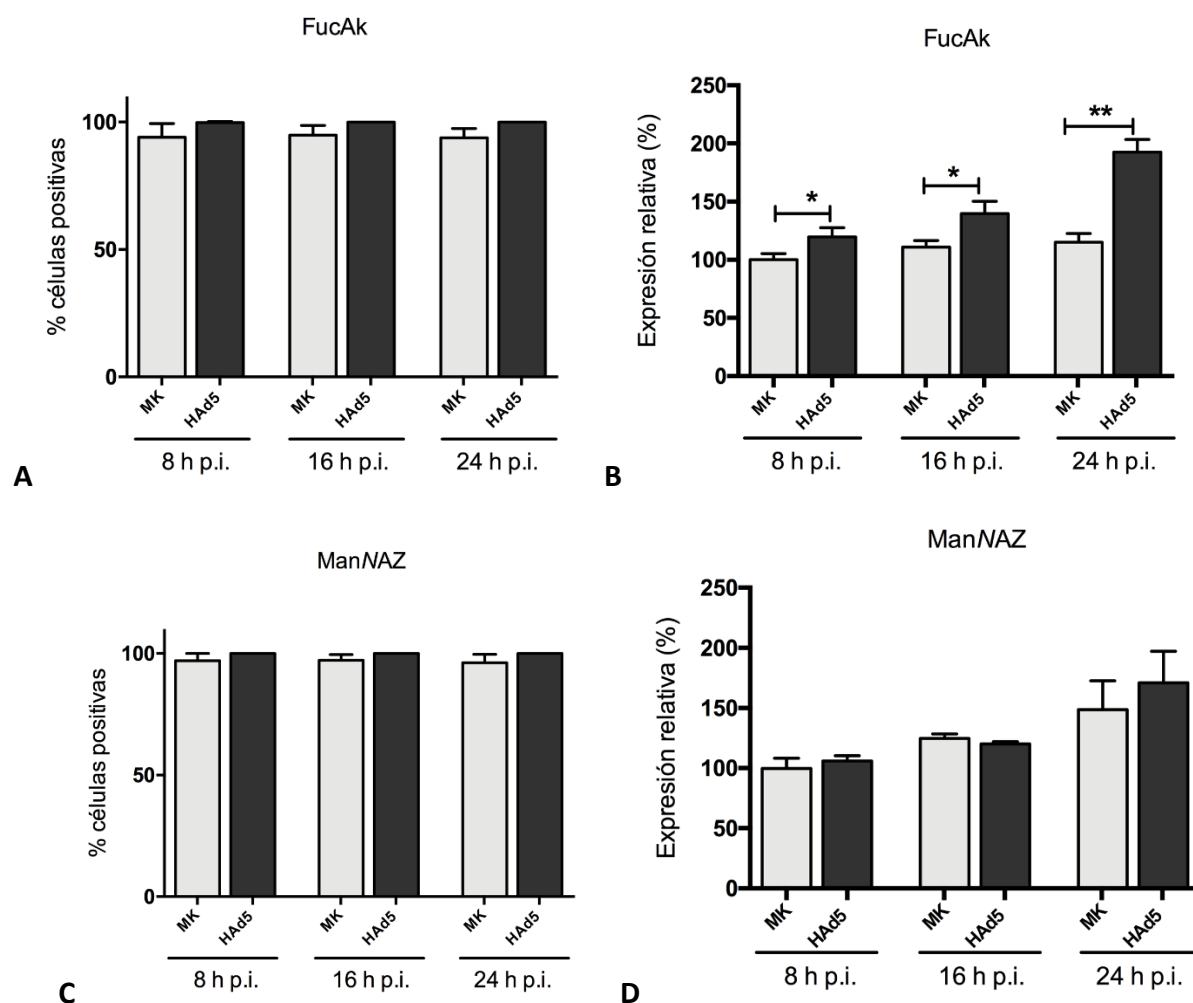


Figura 10. La infección con HAd5 incrementa Fuc en membrana plasmática. Análisis de carbohidratos usando marcaje metabólico por citometría de flujo. Células A549 MK e infectadas con HAd5 con MOI de 10 UFF/célula a 8, 16 y 24 h p.i. FucAk: porcentaje de células positivas para la incorporación *de novo* **A**, expresión relativa para la incorporación *de novo* **B**; SiaNAz: porcentaje de células positivas para la incorporación *de novo* **C**, expresión relativa para la incorporación *de novo* **D**. La intensidad media de fluorescencia se normalizó con MK 8 h p.i. y se reporta como expresión relativa. Figura representativa de 3 experimentos independientes con réplicas. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

10.3 La fucosa en enlace α 1-2 incrementa específicamente en la infección

El uso de carbohidratos marcados no permite distinguir entre los diferentes enlaces en los que se encuentran unido el carbohidrato detectado al azúcar adyacente, en este caso la incorporación de FucAk *de novo*. Para poder concluir sobre el tipo de enlace asociado a dicho incremento en la fucosilación, se procedió a utilizar un panel de lectinas con reconocimiento para este carbohidrato en los distintos enlaces (α 1-2, α 1-3/4 y α 1-6) y detectar su unión mediante citometría de flujo.

Las lectinas que se usaron para evaluar los diferentes enlaces son: AAL (*Aleuria aurantia*) que reconoce preferentemente α 1-3/6 (Debray and Montreuil 1989); LCA (*Lens culinaris*) que reconoce α 1-6 en el *core* de *N*-glicanos (Tateno, Nakamura-Tsuruta, and Hirabayashi 2009); y UEA-I (*Ulex europaeus agglutinin I*) que reconoce Fuc α 1-2 (Chang et al. 2011). La detección de este panel de lectinas se analizó a 24 h p.i. debido a que en este tiempo se observó un mayor incremento de IMF en la incorporación Fuc medida con FucAk. Lo que se observó fue que todas las células, MK e infectadas con HAd5 fueron positivas para la unión de las tres lectinas que se analizaron (Figura 11A), mientras que la unión de la lectina UEA-I (Fuc α 1-2), incrementó significativamente en las células infectadas comparadas con las MK (ver figura 11). Esto sugiere que el incremento en la fucosilación causado por HAd5 es a expensas de Fuc α 1-2.

Para asegurarse de que el cambio en la IMF en los tres tiempos analizados con el marcaje metabólico corresponde al incremento específico del enlace en Fuc α 1-2, se llevó a cabo la detección con la lectina UEA-I en cada una de las horas analizadas previamente. Nuevamente, se observó que las células MK e HAd5 infectadas son positivas para la unión de la lectina UEA-I, y que en cada tiempo analizado aumenta la IMF para UEA-I de las células HAd5 comparadas con células MK, lo que correlaciona con lo observado en el marcaje metabólico. Por lo tanto, concluimos que la infección con HAd5 incrementa la fucosilación celular de las células A549, aumentando particularmente la fucosilación de tipo α 1-2 (Figura 11).

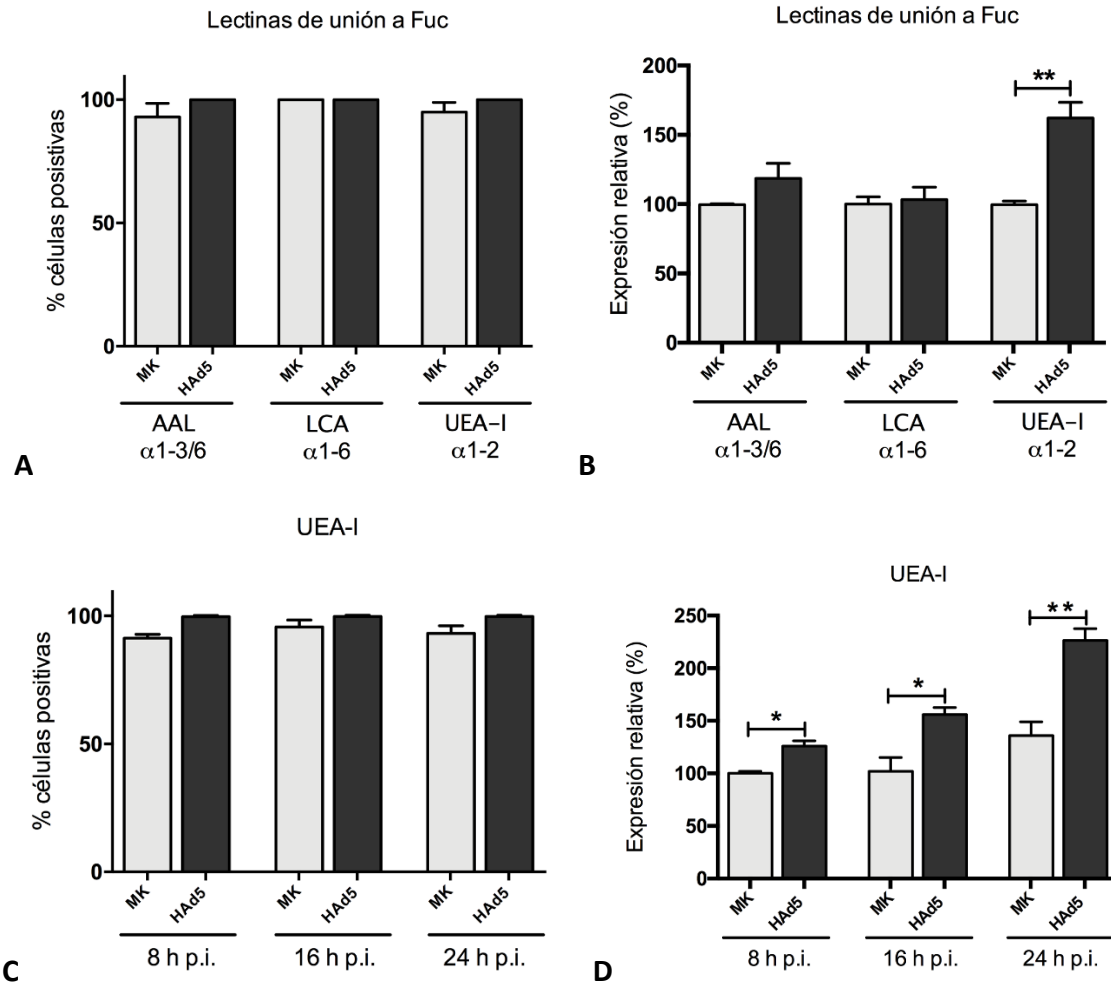


Figura 11. La infección con HAd5 incrementa residuos de Fuc α 1-2. Citometría de flujo en células A549, MK e infectadas con MOI de 10 UFP/célula. **A** Células infectadas a 24 h p.i. Panel de lectinas donde se detecta AAL-biotina (*Aleuria aurantia*, Fuc α 1-3/6), LCA-FITC (*Lens culinaris*, α 1-6) y UEA-I-FITC (*Ulex europaeos agglutinin I*, Fuc α 1-2). **B** Células infectadas a 8, 16 y 24 h p.i. teñidas con UEA-I-FITC. La intensidad media de fluorescencia se normalizó con MK 8 h p.i. y se reporta como expresión relativa. Datos de tres experimentos independientes con réplicas internas. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

Para corroborar que la lectina UEA-I se esté uniendo a estructuras con enlace Fuc α 1-2 a través de su dominio de unión a carbohidratos, se llevó a cabo la inhibición de la lectina con 500 mM de Fucosa, en células MK e HAd5-infectadas. Este ensayo de competencia consiste en saturar los sitios de unión al carbohidrato, liberando los epítopes unidos a la lectina, esto debido a que la lectina reconoce con mayor afinidad a moléculas de Fuc en

solución; como se observa en la figura 12, hay una reducción mayor del 50% de células positivas en la unión de la lectina.

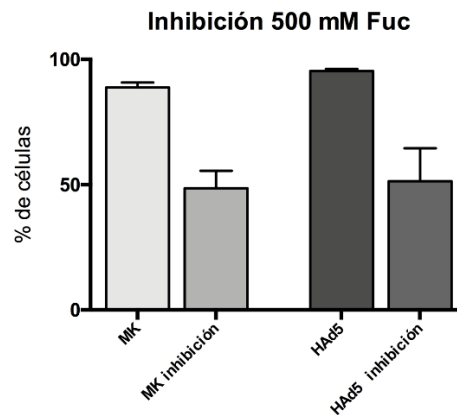


Figura 12. Inhibición de la unión a la lectina UEA-I en células MK e HAd5 infectadas. Citometría de flujo en células A549, MK e infectadas a 24 h p.i., con MOI de 10 UFF/célula. Células teñidas con UEA-I-FITC. Inhibición de 500 mM de Fucosa.

Con este resultado se puede concluir que el reconocimiento de la lectina por residuos de Fuc α 1-2 es específico debido a la disminución en el porcentaje de células.

10.4 Es necesaria la expresión de genes virales para el aumento de Fuc

Para determinar si el incremento observado en la fucosilación celular inducido por HAd5 era causada por la entrada del virus a la célula o se debía a la respuesta de la célula por la infección, el virus HAd5 fue inactivado (HAd-i) usando psoralen y luz UV (395 nm, longitud de onda corta), como se describió en materiales y métodos. El psoralen es una molécula tricíclica que provoca una fuerte absorción de ciertas longitudes de onda de luz UV, esta característica ha sido usada para el estudio de mutaciones en el DNA y reparación de mecanismos celulares. El producto de foto-cicloaddición se forma entre pirimidinas del DNA (principalmente en timidina) cuando el complejo psoralen-DNA absorbe la radiación UV, esto provoca concatamerización del genoma del virus

(Schneider et al. 2015). Este efecto no interfiere en la entrada ni en el transporte del genoma al núcleo, sin embargo, sí evita la transcripción de genes virales y por lo tanto la generación de progenie viral. Como se observa en la figura 13, el virus HAd5 sin tratamiento infecta el 94% de las células, mientras que el tratamiento de inactivación es eficiente, debido a que sólo el 5% del total de las células se infecta.

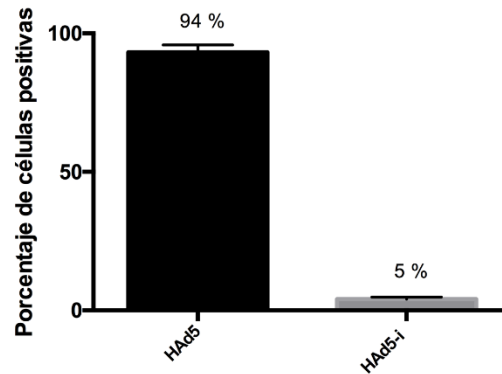


Figura 13. Inactivación viral. Porcentaje de células A549 infectadas a 24 h p.i. con HAd5-2250 y con virus inactivado (HAd5-i) usando psoralen y UV. Por citometría de flujo se detectó a la proteína viral hexón.

Se procedió a infectar células con HAd5 y virus inactivado (HAd5-i) para determinar el efecto de la inactivación en la incorporación de carbohidratos y de la unión a la lectina UEA-I, se analizó con marcaje metabólico la incorporación *de novo* de SiaNAz y FucAk, como se describió previamente para células MK e infectadas con cada uno de los virus (HAd5 y HAd5-i). Lo que se observó con el HAd5-i, es que la IMF no aumentaba en comparación con las células infectadas con el HAd5 y se observaron niveles de expresión similares a células MK, tanto en la incorporación de carbohidratos, como en la unión de lectina (Figura 14). Otro dato interesante que resalta de estos experimentos es que el incremento de este carbohidrato inicia en un tiempo temprano del ciclo de replicación del virus, indicando la posible participación de genes tempranos virales en este incremento de la fucosilación, como fue demostrado anteriormente.

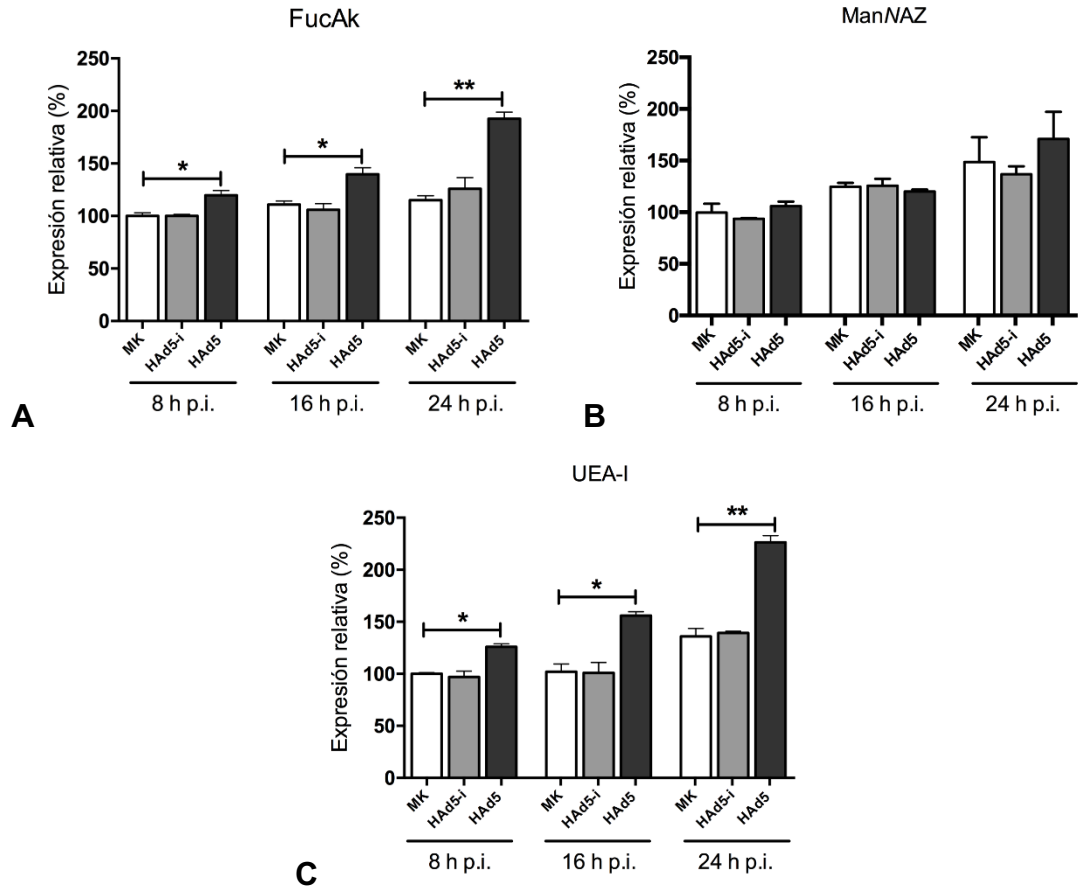


Figura 14. La infección con HAd5 incrementa residuos de Fuc α 1-2 y la expresión de genes virales es necesaria. Análisis de carbohidratos usando marcaje metabólico y detección de la lectina UEA-I por citometría de flujo. Células A549 MK e infectadas con HAd5 y HAd5-i (virus inactivado) con MOI de 10 UFF/célula a 8, 16 y 24 h p.i. Detección de la incorporación *de novo* **A** FucAk, **B** SiaNAz y **C** UEA-I-FITC (*Ulex europaeos agglutinin I*, Fuc α 1-2). La intensidad media de fluorescencia se normalizó con MK 8 h p.i. y se reporta como expresión relativa Imagen representativa de 3 experimentos independientes con réplicas. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

10.5 Análisis de antígenos fucosilados

Con el fin de explorar si el incremento de la α 1-2 fucosilación, resultaba en el incremento de antígenos α 1-2 fucosilados, de conocida relevancia biológica, se procedió a determinar la expresión del antígeno H y Le^y (figura 16). Se descartó evaluar la expresión

del antígeno Le^b, ya que, aunque tiene Fuc α 1-2 no es reconocido por la lectina como se observa en la figura 15.

Como se puede observar en la figura 16, las células A549 no expresan al antígeno H en membrana plasmática y tampoco las células infectadas con HAd5-2250 modifican la expresión, como control positivo se usó a la línea celular MCF-7 (células de epiteliales de cáncer de mama).

- Ácido siálico α 2-3
- Ácido siálico Terminal
- Neu5Gc
- Tn sialilado
- Sialil Lewis X
- Ácido siálico α 2-8
- Fuc Terminal α 1-4**
- Lewis A
- Man β Terminal
- 6-sulfo-sialil-Lewis X
- Antígeno Tn-sialilado
- Glc α Terminal
- Glc β Terminal
- GlcA Terminal (Ác. Glucorónico)
- Antígeno Pk
- Fuc Terminal α 1-3**
- Lewis X
- Lewis Y
- Fuc Terminal**
- Fuc Terminal α 1-2**
- Antígeno H**
- Lewis B

UEA-I

Figura 15. Especificidad de la lectina *Ulex europaeus agglutinin I* (UEA-I). En letras rojas se muestran glicanos o antígenos que son reconocidos con mayor afinidad por la lectina. Modificado de (Haab 2012).

En la línea celular A549 está reportado que alrededor de 40% de las células expresa al antígeno Le^y, esto fue determinado por la caracterización de subpoblaciones y la expresión diferencial de antígenos glicosilados que cada subpoblación expresa (Croce et al. 1999). No obstante, no pudimos detectar por citometría de flujo a este antígeno y procedimos a realizar la detección por SDS-PAGE y Western blot. La detección del antígeno Le^y se llevó a cabo usando lisados totales de células A549, MK e infectadas a 24 h p.i.

Se decidió evaluar a este tiempo para poder observar cambios más claros, ya que el incremento de Fuc α 1-2 es mayor a 24 h p.i. Se observa en la Figura 17A, una expresión diferente en la reactividad a la unión del anticuerpo contra Le^y, entre MK e infectadas.

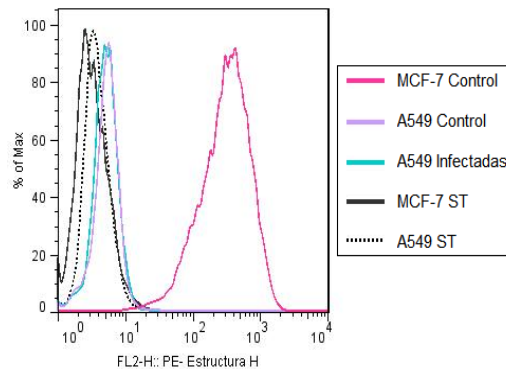


Figura 16. El antígeno H no incrementa por la infección con HAd5. Histograma representativo de la unión del antígeno H en células A549, MK e HAd5 infectadas a 24 h p.i. y células MCF-7 sin infectar MK como control positivo; infección a 24 h p.i.

Lo que podemos concluir es que, sí hay modificación de la expresión de este antígeno con la infección, ya que se observan un cambio en el patrón de bandas entre los lisados de células MK e infectadas, hay bandas con mayor intensidad en los lisados de células infectados que correlacionan con el blot (Figura 17B) de UEA-I, así como la citometría de UEA-I y marcaje metabólico, aunque también se observan bandas en las se disminuyen la intensidad o no aparecen.

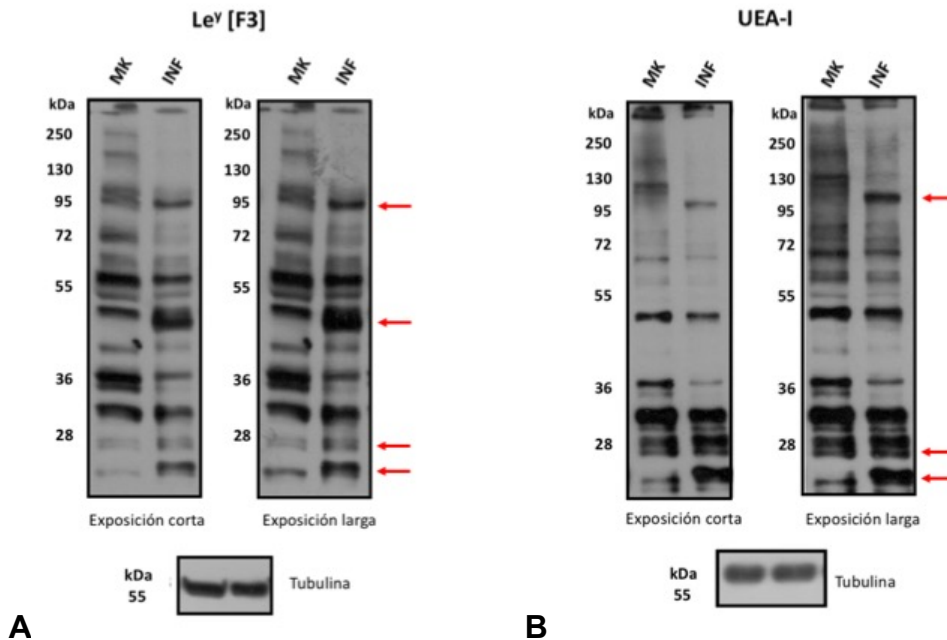


Figura 17. La infección con HAd5 modifica la expresión del antígeno Le^y. Detección del antígeno Le^y clona [F3]. A549 MK e HAd5 infectadas a 24 h p.i. con MOI de 10 UFF/célula. Western blot representativo de la unión del **A** antígeno Le^y y **B** UEA-I, en lisados totales. Las flechas rojas muestran bandas en lisados de células infectadas donde se observa incremento en intensidad comparadas con MK.

10.6 Fucosiltransferasas responsables del incremento de Fucosa α 1-2

Para determinar si la expresión de alguna de las FUTs responsables de sintetizar el enlace α 1-2 se modifica con la infección, se decidió analizar la expresión del mRNA de *FUT1* y *FUT2* por PCR cuantitativo, además, debido a que se observó una diferencia en la reactividad de algunas bandas observadas por western blot en la expresión del antígeno Le^y, se decidió analizar la expresión de la α 1-3 fucosiltransferasa *FUT4*, la cual también contribuye a su síntesis (Wang et al. 2017).

Como se observa en la figura 18, la infección con HAd5 provoca un incremento en la expresión de las tres FUTs desde las 4 h p.i., y un aumento máximo en la expresión de las tres enzimas a las 8 h p.i. La *FUT1* incrementa 9 veces, mientras que *FUT2* y 4

incrementan 2 veces. El aumento observado de FUT1 y 2 desde las 4 h p.i., sustenta el incremento observado en el marcaje metabólico de FucAk y en la unión a la lectina UEA-I desde las 8 h p.i. Como se demostró en los experimentos de inactivación (Figura 13), la expresión de genes virales es necesaria para incremento de residuos de Fuc y, debido a que se observa el incremento en la expresión de las FUTs desde las 4 h p.i., consideramos que la región E1A podría ser la principal responsable de inducir su sobreexpresión.

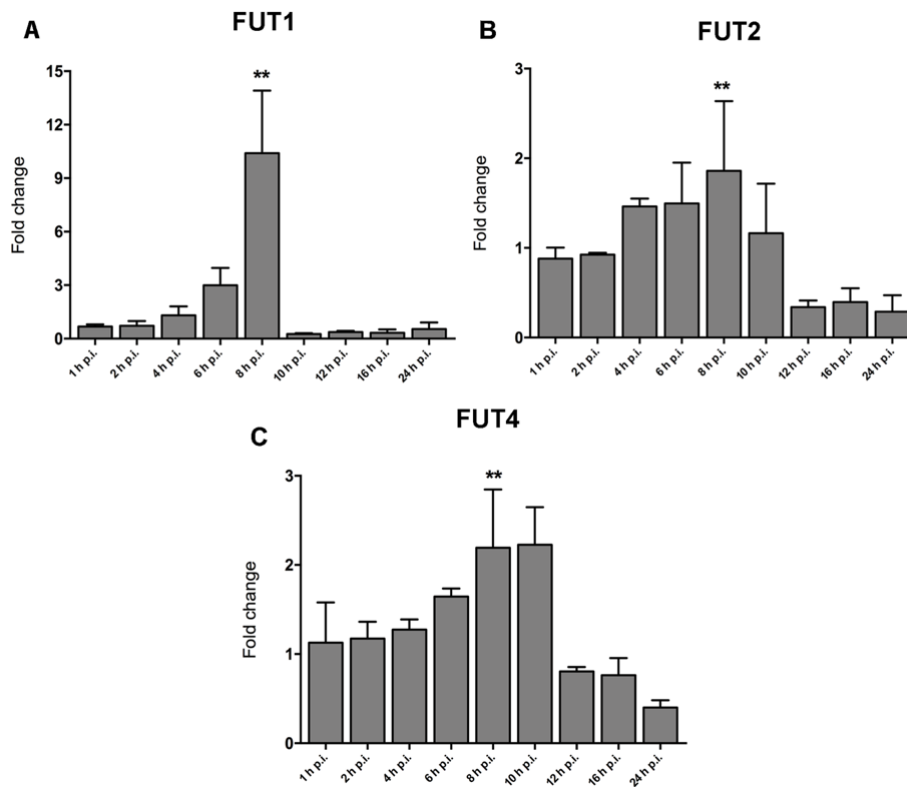


Figura 18. Análisis de expresión de *FUT1*, *FUT2* y *FUT4*. Células A549 infectadas con HAd5 a 10 UFF/célula. El mRNA de *FUT1* (A), *FUT2* (B) y *FUT4* (C) se analizó mediante PCR cuantitativo a 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 y 24 h p.i. Los niveles relativos de mRNA para cada dato graficado se muestran como el cambio de HAd5/MK, después de normalizar con actina como gen endógeno y comparado con MK 1 h p.i. Datos de tres experimentos independientes con réplicas. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

10.7 E1A incrementa la expresión de FUT1

Los genes tempranos de HAd5 (E1A, E1B, E2, E3 y E4) codifican proteínas que alteran la habilidad de la célula infectada de regular proliferación, inhibir los mecanismos de defensa celular, y establecer las condiciones óptimas para una eficiente expresión y replicación del genoma viral. De estos genes, E1A es el primero en ser expresado y es necesario para que se expresen los otros genes virales tempranos (E1B, E2, E3 y E4). Esta región temprana E1A, como se mencionó previamente codifica para cinco RNAs producidos por splicing alternativo (13S, 12S, 11S, 10S y 9). Los RNAs 13S y 12S, codifican para las proteínas 289R y 243R respectivamente, son expresadas en tiempos tempranos y tienen actividades pleiotrópicas reguladoras, las dos son capaces de activar y reprimir la transcripción de genes tanto celulares, así como promotores virales y potenciadores (Flint and Nemerow 2017); las otras tres proteínas E1A son expresadas en la fase tardía del ciclo de replicación (King et al. 2018).

Debido a que el mRNA de FUT1 está más expresado en células infectadas con HAd5, y además inicia a las 4 h p.i. con un nivel máximo de expresión a 8 h p.i. y estos tiempos son tiempos tempranos en el ciclo de replicación del virus, nos enfocamos en determinar si los principales productos de E1A (13S y 12S) están involucrados en el incremento del mRNA de FUT1.

Para determinar si estas proteínas son las responsables, células A549 fueron transfectadas con dos plásmidos, uno que codifica para 13S y otro para 12S. Se midió la expresión del mRNA de FUT1 por PCR cuantitativo después de 8 horas post transfección. Como se observa en la figura 19A, la expresión de FUT1 incrementa con la transfección de los plásmidos 12S ó 13S comparados con el plásmido vacío, y sólo con el plásmido que expresa 13S se observa un cambio estadísticamente significativo; en Figura 19B podemos observar la expresión de E1A con cada plásmido y se observa una mayor expresión con el plásmido 13S-E1A comparado con 12S y que correlaciona con lo observado en la expresión de FUT1.

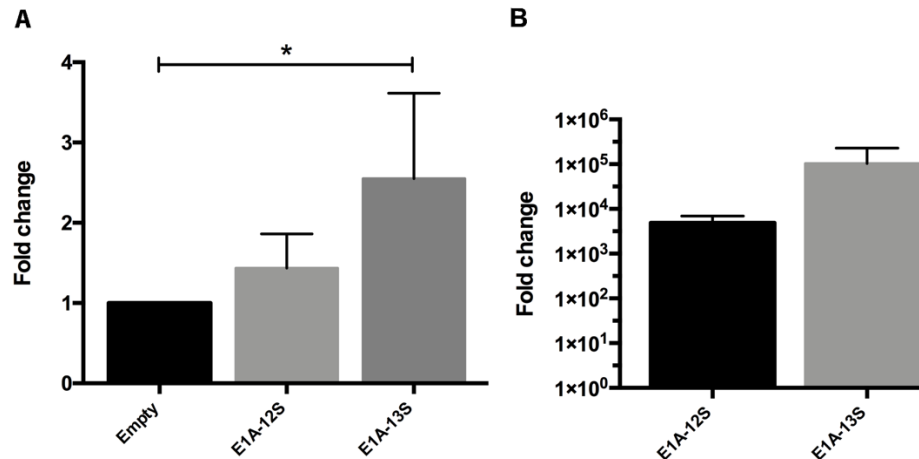


Figura 19. Expresión de FUT1 y E1A en células A549 transfectadas con los plásmidos E1A-13S y 12S. Células transfectadas 8 horas con plásmidos que codifican para vacío, E1A-12S y E1A-13S, se analizaron mediante PCR cuantitativo. En **A** Se observa la expresión de FUT1 con los tres plásmidos; y en **B** la expresión de E1A para cada plásmido. Los niveles relativos de mRNA para cada dato graficado se muestran después de normalizar con actina como gen endógeno. Datos de dos experimentos independientes con réplicas. * $P < 0.05$

Con esto se concluye que E1A es la principal responsable del aumento en la expresión de FUT1; debido a que los niveles en el incremento del mensajero de FUT1 no son los mismos que en el contexto de la infección, podemos sugerir que hay otros genes virales involucrados en el incremento de este gen.

10.8 La infección con HAd5 modifica el metabolismo de Fucosa

En adición, se decidió analizar al RNA mensajero de dos de las enzimas principales de las vías de biosíntesis de Fuc en la célula, y de la proteína responsable de transportar a la Fuc de citosol al lumen de Golgi. En el caso de la vía de salvamento, antes descrita y responsable de la incorporación de FucAk en el marcaje metabólico, se midió los niveles de FGPT (por sus siglas en inglés, GDP-fucosa pirofosforilasa) que cataliza la condensación reversible de Fucosa-1 fosfato con GTP para formar GDP-Fuc. Para la vía

de novo, se analizó la expresión de la enzima FX, que codifica para la GDP-ceto-6-deoxymanosa 3,5-epimerasa, 4-reductasa y convierte GDP-4-ceto-6-deoxi-manosa a GDP-Fuc, y la proteína encargada de transportar GDP-Fuc del citosol al lumen de Golgi y que es común a ambas vías, el transportador de Fuc SLC35C1. Como se observa en la figura 20, la expresión de las dos enzimas en las vías de biosíntesis aumenta dos veces, lo que cabe resaltar es que la FGPT incrementa a 8 h p.i. como las FUTs, la FX aumenta hasta las 24 h p.i., mientras que la expresión del transportador no se modificada. El incremento de la enzima FX sustenta que el punto mas alto de detección para el marcaje metabólico y para la lectina UEA-I sea a las 24 h p.i., esto debido a que la expresión de FUT1 después de 8 h p.i. decae, mientras que para FUT 2 y 4, su expresión también disminuye, aunque no a los mismos niveles de FUT1 y podría explicar que los niveles de Fuc α 1-2 se mantengan hasta un tiempo tardío en el ciclo de replicación.

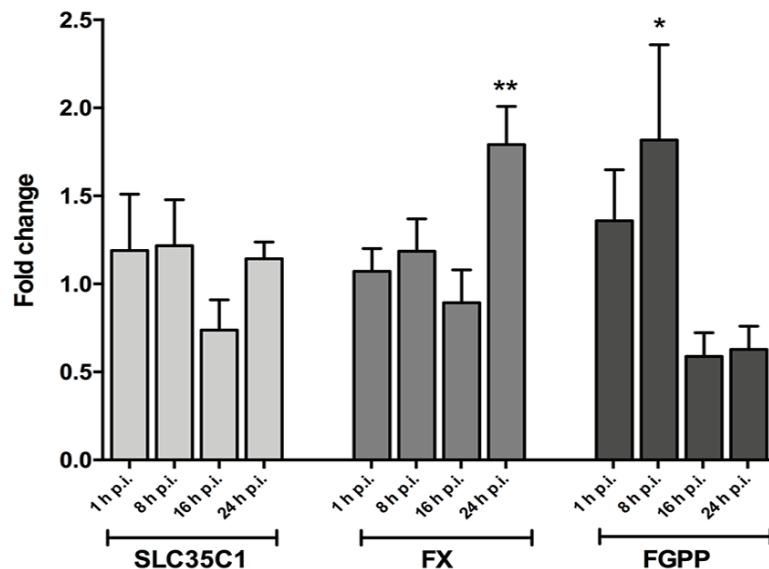


Figura 20. Expresión de los genes *FX*, *FGPP* y *SLC35C*. Células A549 infectadas con HAd5 a 10 UFF/célula y colectadas a 1, 8, 16 y 24 h p.i. Análisis del mRNA de cada gen por PCR cuantitativo. Los niveles relativos de mRNA para cada dato graficado se muestran como el cambio de HAd5/MK, después de normalizar con actina como gen endógeno y comparado con MK 1 h p.i. Datos de tres experimentos independientes con réplicas. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

10.9 Participación de genes E3 en el incremento de Fucosa

Como se mencionó, las proteínas de la región E3 tienen funciones asociadas a la regulación de la respuesta inmune para favorecer el ciclo de replicación y evitar la respuesta en contra de la infección viral, provocando la internalización de receptores y evitando apoptosis. Para analizar si algunas de las proteínas de esta región están involucradas, se comparó el efecto de la infección con el virus HAd5-2250 (genoma completo) con el virus HAd5-dl309 que no codifica para cuatro de las siete proteínas codificadas en la región E3, que son gp-19k, las dos proteínas del complejo RID (α 10.4 y β 14.5) y la proteína de muerte ADP (11.6). Es importante mencionar que este virus es usado como wild type en los laboratorios. Como se puede observar en la figura 21, el incremento en la IMF en la infección con el virus HAd5-dl309 comparada con HAd5-2250 es menor en los experimentos de incorporación *de novo* de FucAk así como en la detección de la lectina UEA-I, esto quiere decir que el incremento de Fuc α 1-2 es favorecida por las proteínas que no se encuentran en el virus HAd5-dl309, y lo que deja claro es que el principal incremento observado de este carbohidrato se debe a la expresión de E1A, como se mostró previamente (Figura 19), sin embargo, no podemos descartar que la región E3 participe en el incremento de α 1-2 Fuc hasta hacer un análisis en otros tiempos post infección, principalmente en tiempos tempranos.

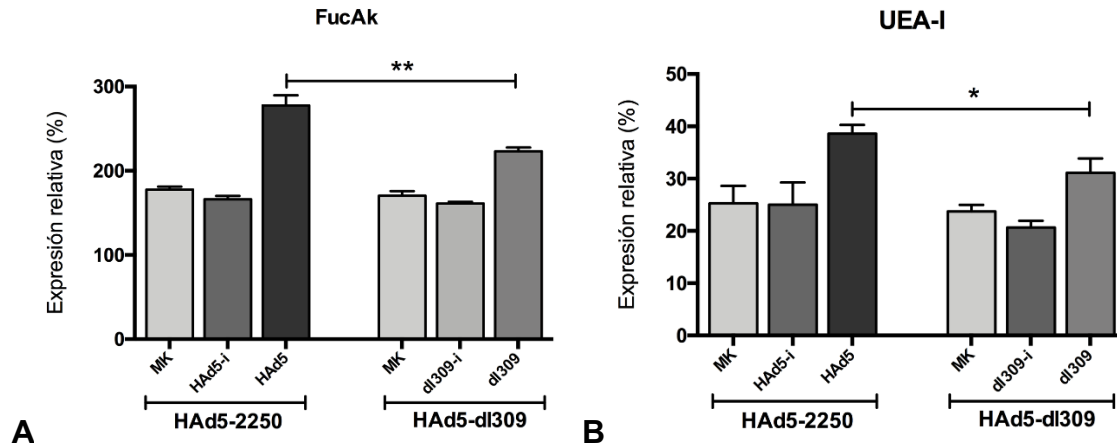


Figura 21. Comparación del efecto de HAd5 2250 vs dl309 sobre la incorporación de FucAk y unión de UEA-I. Células A549 MK e HAd5-2250 y HAd5-dl309 infectadas a 24 h p.i. con MOI de 10 UFF/célula. La intensidad media de fluorescencia se normalizó con MK y se reporta como expresión relativa. Datos de 1 experimento con réplicas. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

La glicosilación como parte esencial de todos los mecanismos celulares, está sujeta a cambios que ocurren en procesos fisiológicos y patológicos, para entender mejor el efecto de una infección y todos los procesos que se modifican, analizar a la glicosilación como parte metodológica es algo esencial.

Para el estudio de virus que son usados como vectores de terapia génica, terapia anti-cáncer o para vacunas, es necesario conocer todos los genes celulares que son modificados con la infección para hacer un análisis correcto de los genes que deben permanecer en los vectores generados de estos virus.

11 CONCLUSIONES

- La infección con HAd5-2250 modifica la glicosilación celular, específicamente la fucosilación (Figura 12), desde tiempos tempranos en el ciclo de replicación.
- Se determinó que la infección con HAd5-2250 específicamente incrementa el enlace α 1-2 detectado por la unión a la lectina UEA-I (Figura 13A) en cada uno de los tiempos analizados. Se determinó que la unión de la lectina por residuos α 1-2 fucosilados es específica (Figura 13B).
- El incremento de α 1-2 Fuc ocurre debido a la expresión de genes virales determinado con virus HAd5-2250 inactivado (Figura 16).
- La infección modifica la expresión del antígeno Le^y en células HAd5 infectadas (Figura 19A).
- La infección incrementa la expresión de las fucosiltransferasas 1, 2 y 4, desde las 4 h p.i. y con un máximo a 8 h p.i. (Figura 20); también incrementa genes relacionados con el metabolismo de Fuc, la enzima FX con un máximo a 24 h p.i. mientras que FGPP incrementa a 8 h p.i. (Figura 22).
- La proteína viral E1A-13S es la principal proteína responsable del incremento de la FUT1 (Figura 21).
- El aumento en la expresión de FUT1 debido a E1A en tiempos tempranos de la infección, sugiere que FUT1 podría ser importante para iniciar los mecanismos de proliferación de la célula infectada, a través del aumento en la síntesis del antígeno Le^y, en las diferentes proteínas a las que se ha asociado dicha función.

- Las proteínas gp19K, proteína de muerte (ADP) y el complejo RID (α y β), componentes de la región E3 del genoma podrían estar participando en el incremento de Fuc α 1-2, debido a que son proteínas que no se encuentran en HAd5-dl309, y como se observó la infección con este virus no incrementa a la Fuc en los mismos niveles que con la infección el virus de genoma completo (Figura 21). Es importante hacer notar que la medición HAd5-dl309, fue hecha a 24 h p.i., y para poder comparar el efecto entre los dos virus, será necesario hacer las mediciones a tiempos más tempranos.

12 DISCUSIÓN

Los glicoconjugados fucosilados están involucrados en muchos procesos biológicos y patológicos, incluyendo el desarrollo, fertilización, adhesión celular, aprendizaje, memoria, inflamación, angiogénesis, proliferación tumoral y metástasis (Ma, Simalal-Grant, and Taylor 2006); así como en las infecciones virales, como se ha descrito recientemente.

En este trabajo se describió que la infección con HAd5 afecta la glicosilación celular de células A549; esta línea celular es usada como modelo de epitelio pulmonar humano. Mediante la incorporación de carbohidratos marcados en proteínas de la membrana plasmática, se demostró que la infección incrementa la fucosilación celular (Figura 10 B), específicamente la Fucosa en enlace α 1-2, medida por la unión a la lectina UAE-I (Figura 11), en cada uno de los tiempos post infección que se analizó (8, 16 y 24 h p.i.); en contraste con el resultado obtenido en la incorporación de ManNaz, usado para la detección de ácido siálico, donde no hubo cambio, en ninguno de los tiempos analizados (10 D).

Otro dato importante fue saber si la expresión de genes virales son los responsables del incremento de Fuc o el efecto observado era respuesta de la célula a la infección, causado por el reconocimiento de la partícula viral o por la entrada del virus a la célula. Para medir el efecto de la expresión de genes virales en el incremento de Fuc, se infectaron células con virus inactivado (HAd5-i), usando psoralen y luz UV. Con este experimento se determinó que es necesaria la expresión de genes virales para que se observe el incremento de Fuc (Figura 14), y debido a que la medición es desde las 8 h p.i., concluimos que son genes tempranos los responsables del incremento.

Adicionalmente, se ha mostrado que en la infección con HAd5-i estimula la respuesta antiviral de la célula asociada a IRF3, así como la fosforilación de STAT1/2 en el mismo grado que el virus sin inactivar (Stein and Falck-Pedersen 2012). Otro dato importante

es que la sialilación celular y la activación de ácido siálico en CMP-Sia, reacción que se lleva a cabo en el núcleo (Kean, Munster-Kuhnel, and Gerardy-Schahn 2004), no fue afectada, lo que sugiere que la maquinaria de fucosilación es un blanco específico de la infección.

Estos resultados demostraron que el incremento de Fuc α 1-2 depende de la expresión de genes virales tempranos y no del reconocimiento de la partícula viral por la célula (Figura 14). Demostrando que la infección con HAd5 induce cambios en la glicosilación de la célula como parte de la estrategia de la replicación viral, lo cual podría impactar en la patogénesis.

Con el análisis por citometría de flujo y Western blot, de las estructuras que son reconocidas por la lectina UEA-I de manera específica (Figura 15), antígeno H y Lewis^y, se pudo concluir que la infección con HAd5 no modifica la expresión del antígeno H (Figura 16), sin embargo, si modifica la expresión del antígeno Lewis^y (Figura 17) en células infectadas. Debido a que se midió previamente los diferentes enlaces en los que puede unirse la Fuc, especialmente con AAL que reconoce preferentemente α 1-3, y no se detectó modificación en este enlace, sabemos que la modificación en la expresión y al reconocimiento de este antígeno es específico.

Por otra parte, se analizó la expresión de los genes FUT1 y FUT2, responsables de la síntesis del enlace α 1-2. Se observó que el incremento en el enlace de Fuc α 1-2, es sustentado por el aumento de los dos genes, FUT1 (9-fold) y FUT2 (2-fold); como se mencionó, está reportado que la enzima FUT4 es la responsable de la síntesis del enlace α 1-3 en las células A549 (Wang et al. 2017), por lo que se analizó su expresión y se observó que incrementa (2-fold). El aumento en la expresión de estos genes se observó desde las 4 h p.i., con un máximo en el nivel de expresión a 8 h p.i. (Figura 18). En el caso específico de FUT1, algo que llama la atención es la rápida disminución en su expresión, mientras que las otras dos FUTs 2 y 4, disminuyen de manera gradual hasta el final del ciclo de replicación.

En adición de que se haya medido el incremento en la expresión de las FUTs responsables de sintetizar los enlaces Fuc α 1-2 y α 1-3, se midió la expresión de dos genes que codifican para dos de las enzimas clave que participan en las vías de biosíntesis de la Fuc. La primera es la FGPP, que participa en la vía de salvamento y aumenta a 8 h p.i. (2-fold), en el mismo tiempo que las FUTs analizadas; sin embargo, la enzima FX, que participa en la vía *de novo*, incrementa a 24 h p.i. (2-fold), un tiempo tardío (Figura 20). Otro dato interesante es que el gen del transportador de GDP-Fuc, SLC35C1, no modifica su expresión, por lo que tampoco sería un efecto generalizado de la infección con HAd5 sobre el metabolismo de Fuc. Estos incrementos, así como los tiempos post infección medidos, explican el aumento de los residuos de Fuc α 1-2 a lo largo del ciclo de replicación. Hasta el momento no se ha descrito ninguna infección viral en el que además del cambio en la expresión de FUTs, estén modificadas las vías de biosíntesis de Fuc (en diferentes h p.i.), lo que sugiere que el incremento de Fuc es importante y necesario para el ciclo de replicación.

Como se mencionó previamente, el incremento de expresión de las FUTs debido a la infección se observa en tiempos tempranos en el ciclo de replicación. De las unidades transcripcionales tempranas codificadas por el virus, la primera en ser transcrita es E1A y por lo tanto podría ser la expresión de sus proteínas necesario para el incremento de las FUTs. Se demostró que la transfección con plásmidos que codifican para los mRNAs, 12S y 13S, que codifican para dos de las principales proteínas de esta región, son capaces de incrementar la expresión de FUT1, respecto a células transfectadas con plásmido vacío, sin embargo, sólo con el plásmido para 13S se observa un incremento estadísticamente significativo de 2.5 veces (Figura 19). Esto demuestra que dentro de los genes tempranos E1A 13S sería el principal responsable que incrementa la expresión de FUT1. Resta determinar si la transfección de estos plásmidos también incrementa la expresión de FUT2 y 4, así como los genes del metabolismo, FX, SCL35C1 y FGPP.

Las proteínas de E1A activan la transcripción de los demás genes tempranos, así como genes celulares que permiten un ciclo de replicación eficiente (Flint and Nemerow 2017). Se sabe que virus mutantes que no expresan E1A e infectan células, tienen muy

restringida la capacidad de expresar otros genes virales; excepto cuando las células están transformadas con E1A, como la línea celular transformada HEK-293, que la expresa de manera constitutiva (Kovesdi and Hedley 2010). Unos de los efectos a los que se ha ligado el aumento en la expresión de FUT1 es proliferación, (descrito con mayor detalle a continuación). Por lo que el incremento de la expresión del gen de FUT1 debido a la infección con HAd5 puede ser un mecanismo adicional del virus para promover la proliferación celular.

Está reportado que hay una relación entre el aumento de la expresión de FUT1 y el incremento en la síntesis del antígeno Le^y en diferentes tipos celulares (Moehler et al. 2008), esta relación FUT1/ Le^y promueve diversos procesos como: proliferación y desregulación del ciclo celular, a través del aumento en la expresión de las ciclinas A, D1 y E (Liu et al. 2012), migración e invasión (Lin et al. 2015), metástasis (Tan et al. 2015), y resistencia a fármacos, a través del incremento de la expresión de la mucina 1 (MUC1), detectada en pacientes con cáncer de ovario (Zhang et al. 2013); con el incremento en la expresión de las integrinas $\alpha 5$ y $\beta 1$ (Li et al. 2010) y αv y $\beta 3$ (Gao et al. 2013); y degradación por proteosoma de la proteína p27, cuya función es inhibir el ciclo celular (Cai et al. 2017).

Algunas de estas funciones ligadas a la relación FUT1/ Le^y se han descrito debido a las proteínas en las que se ha observado incremento del antígeno Le^y en su estructura, algunas de estas proteínas son: CD44 (Gao et al. 2011), MUC1 (Zhang et al. 2013), EGFR (Liu et al. 2010; Lin et al. 2015), HER2 (Kawai et al. 2013), CD47 (Tan et al. 2015), αv y $\beta 3$ (Gao et al. 2013), anexina II (Zhuang et al. 2015), IGF-1R (Liu et al. 2011).

Se conoce sobre la activación de la transcripción de FUT1 en células de colón de cáncer, que es activada por las vías de CREB/c-Rel, ELK-1 y NF κ B (Taniuchi et al. 2013); mientras que, en diferentes líneas celulares de cáncer de ovario, como en la línea MAS, se activa por a Sp1, Myc y Ap2 (Koda, Soejima, and Kimura 1997), mientras que en la línea SKOV3, los factores que activan la expresión de esta enzima son c-Jun/AP-1 (Gao et al. 2014). Recientemente, se determinó en células de cáncer de ovario que a través

de TGF β 1 se activa c-Fos por la vía de MAP cinasas induciendo la expresión de FUT1, como consecuencia incrementa la síntesis de Le^y y se observa aumento en proliferación de las células(Hao et al. 2017). Además, en células A549 se ha visto que FUT1 promueve la formación de colonias, tumorigénesis y resistencia a Taxol, cuya función es inhibir la despolimerización del uso mitótico, y evitar apoptosis (Gan et al. 2017). Gan y colaboradores, asocian el incremento en la expresión de FUT1 al incremento de del antígeno Le^y, sin embargo, el dato obtenido para establecer que hay un incremento del antígeno es limitado, debido a que sólo muestran una banda reactiva en un blot, cuando este antígeno está presente en diversas proteínas de la línea A549, como puede observarse en la figura 17A de nuestro trabajo.

Se conoce que la sobreexpresión de FUT2, regula positivamente la proliferación celular, migración e invasión, e inhibición de apoptosis en A549 (Zhou et al. 2017); también promueve la metástasis a través de favorecer la transición epitelio mesénquima activando la vía de TGF- β /Smad (Deng et al. 2018).

Es de notar que, el promotor de FUT1 posee secuencias que son reconocidas por factores de transcripción dependientes de las vías de MAPK o ERK, que también son usadas por el virus.

Se sabe que la infección con HAd5 promueve la activación de la vía de señalización mediada por Raf/MEK/ERK, inicialmente en tiempos tempranos (1 a 3 h p.i. en células H1299, adenocarcinoma de pulmón) de la infección. Esto se debe a que E1A promueve la translocación al núcleo de ERK fosforilado (Schumann and Dobbelstein 2006). Con lo anterior, la sobreexpresión de *FUT1*, así como de FUT2 en células infectadas debido a la expresión de E1A, podría tener un papel importante en favorecer el ambiente celular para que el ciclo de replicación sea favorable y eficiente.

Algunos virus de las familias *Herpesviridae*, *Flaviviridae* y *Retroviridae* han desarrollado mecanismos que modifican o alteran la expresión de carbohidratos, específicamente la expresión de antígenos fucosilados en la superficie celular. La modificación de la

fucosilación o de enzimas relacionadas en las infecciones virales tienen un papel importante en la replicación viral, así como en la posible diseminación del virus a otros tejidos, favoreciendo la permanencia del virus en el organismo, y esto podría tener un impacto en las enfermedades causadas por los virus.

La infección con HAd5 incrementa la expresión de FUTs, particularmente de FUT1 en un tiempo temprano en el ciclo de replicación. Otras infecciones reportadas que incrementan esta enzima (FUT1), incluyen al virus de la hepatitis C (HCV), donde se demostró que este incremento es importante para la producción de progenie viral, sin embargo, para este virus no se ha descrito si ocurre la modificación de algún antígeno fucosilado en la célula (Papic et al. 2012). Mientras que, citomegalovirus humano (CMV) neoexpresa en fibroblastos infectados a FUT1 y esto provoca la neoexpresión del antígeno Le^y en estas células (Nystrom et al. 2007).

Sin embargo, es importante mencionar que en estos dos casos la expresión de la enzima es gradual y la mayor expresión se observa en tiempos tardíos en los ciclos de replicación de cada uno de los virus; en contraste con lo que se observó en la infección con HAd5, donde la sobreexpresión de esta enzima ocurre desde un tiempo temprano en el ciclo de replicación. Esto puede sugerir diferentes roles biológicos para FUT1, debido a las funciones asociadas antes mencionadas; en el caso de CMV y HCV debido a que la mayor expresión ocurre en un tiempo tardío, podría estar participando en favorecer la producción de progenie viral y en el caso de HAd5, participar como parte de los mecanismos para favorecer la proliferación celular.

Sólo en algunos casos se ha descrito el mecanismo de activación de las glicosiltransferasas (Tabla 1). Para el virus HTLV-1, el transactivador Tax promueve la sobreexpresión de la FUT7 y, por lo tanto, la sobreexpresión del antígeno sLe^x. La expresión de este antígeno en células infectadas está directamente relacionada con el grado de infiltración de las células leucémicas al epitelio (Hiraiwa et al. 2003). En el caso del HSV-1, también se reportó que la infección en fibroblastos provoca el incremento de sLe^x pero inducido por la sobreexpresión de FUT5 a través de un RNA inmediato

temprano y no como resultado de la función de una proteína viral como en el caso de HTLV-1 (Nystrom et al. 2009). Sin embargo, la infección con HSV-1 en leucocitos también provoca incremento de sLe^x (Norden et al. 2013). Contrarrestando lo que se sabe con estos virus y adenovirus, aún falta saber si la modificación en la expresión del antígeno Le^y le proporciona alguna ventaja.

Cell Biology

Human adenovirus type 5 increases host cell fucosylation and modifies Le^Y antigen expression

Kathya Gutiérrez-Huante², Roberta Salinas-Marín²,
Héctor M Mora-Montes³, Ramón A Gonzalez⁴,
and Iván Martínez-Duncker^{1,2}

²Laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular; Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001, Cuernavaca 62209, México, ³Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Col. Noria Alta, Guanajuato 36050, México, and ⁴Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001, Cuernavaca 62209, México

¹To whom correspondence should be addressed: Tel: +52(777)3297000, ext.3364; e-mail: duncker@uaem.mx

Received 26 June 2018; Revised 28 February 2019; Editorial decision 1 March 2019; Accepted 2 March 2019

Abstract

Certain viral infections are known to modify the glycosylation profile of infected cells through the overexpression of specific host cell fucosyltransferases (FUTs). Infection with CMV (cytomegalovirus), HCV (hepatitis C virus), HSV-1 (herpes simplex virus type-1) and VZV (varicella-zoster virus) increase the expression of fucosylated epitopes, including antigens sLe^x (Siα2–3 Galβ1–4 (Fucα1–3)GlcNAcβ1-R) and Le^Y (Fucα1–2 Galβ1–4(Fucα1–3)GlcNAcβ1-R). The reorganization of the glycocalyx induced by viral infection may favor the spread of viral progeny, and alter diverse biological functions mediated by glycans, including recognition by the adaptive immune system. In this work, we aimed to establish whether infection with human adenovirus type 5 (HAd5), a well-known viral vector and infectious agent, causes changes in the glycosylation profile of A549 cells, used as a model of lung epithelium, a natural target of HAd5. We demonstrate for the first time that HAd5 infection causes a significant increase in the cell surface *de novo* fucosylation, as assessed by metabolic labeling, and that such modification is dependent on the expression of viral genes. The main type of increased fucosylation was determined to be in α1–2 linkage, as assessed by UEA-I lectin binding and supported by the overexpression of *FUT1* and *FUT2*. Also, HAd5-infected cells showed a heterogeneous change in the expression profile of the bi-fucosylated Le^Y antigen, an antigen associated with enhanced cell proliferation and inhibition of apoptosis.

Key words: adenovirus, fucose, fucosyltransferase, Le^Y, virus

Introduction

Adenoviruses are non-enveloped, double-stranded DNA viruses, known to cause human respiratory disease, epidemic

keratoconjunctivitis and gastroenteritis (Flint and Nemerow 2016). They are also an outstanding model for the study of gene expression, as well as common candidate vectors for use in gene therapy, anti-

cancer treatment and vaccine development (Khare et al. 2011). Of the human adenoviruses, serotypes 2 and 5 (HAd5) have been extensively studied to understand the viral biology, the host cellular processes and the virus-cell interaction (Saha and Parks 2017). HAd5 infection is characterized by a strict regulation of viral gene expression, where resulting viral proteins modify different aspects of the host cell biology to produce viral progeny, inhibiting the immune response and protecting infected cells by promoting proliferation and inhibiting apoptosis (Miller et al. 2007). Although several mechanisms have been reported to explain these effects, no reports have described the effect of HAd5 infection on the glycosylation of host cells, an enzyme-driven, fundamental post-translational modification that involves the covalent attachment of sugar moieties (glycans) to proteins and lipids.

Glycans determine a diverse array of physiological and pathological events in many organisms, including human-pathogen interactions. Glycoproteins from different viruses are known to have a fundamental role in viral replication and pathogenesis (Bagdonaitė and Wandall 2018). On the other hand, less is known about how viruses modify the glycosylation of the host cell, as occurs with some members of the *Herpesviridae* (Cebulla et al. 2000; Nystrom et al. 2007, 2009; Norden et al. 2013), *Retroviridae* (Adachi et al. 1988; Hiraiwa et al. 2003; Giordanengo et al. 2004) and *Flaviviridae* families (Papic et al. 2012). Most of these studies have stressed the importance of viral induced expression of important sialylated and fucosylated glycoantigens in the host cell, particularly belonging to the Lewis group of carbohydrate antigens, including sialyl Lewis x (sLe^x) [Sia α 2-3 Gal β 1-4 (Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R], Lewis y (Le^y) [Fuc α 1-2 Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R] and Lewis x (Le^x) [Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R]. These antigens are widely known to be involved in fundamental biological processes, such as embryogenesis, angiogenesis, microbe-host interactions, neural development, fertilization and tumor metastasis (Ma, Simala-Grant and Taylor 2006). The viruses that have been reported to cause modification of the cell host glycosylation profile as well as the mechanisms involved in activation of host cell glycosyltransferase transcription are summarized in Table I.

The modification of the glycosylation profile of HAd5-infected cells has not been previously described. In this work, by using the A549 cell line, a well-established model of lung alveolar epithelium and HAd5 infection, we demonstrate that HAd5 increases *de novo* fucosylation, particularly α 1-2 fucosylation, supported by increased expression of the genes coding for α 1-2 fucosyltransferases 1 and 2 (*FUT1* and *FUT2*). Additionally, we demonstrate that HAd5 infection causes a heterogeneous modification in the expression profile of

the bi-fucosylated Le^y antigen. We consider that these results are of biological relevance, not only to understand novel mechanisms of HAd5 pathogenesis, but also to advert the effects that adenovirus-based vectors could have, in both the laboratory and clinical settings.

Results

Expression of HAd5 viral genes causes increased cell fucosylation

To obtain homogeneous populations, all experiments were carried out ensuring >95% of infected cells (Figure S1). To determine whether the observed cellular effects are caused by viral entry, and therefore dependent on the expression of viral genes, HAd5 virus was inactivated (HAd5-i) by using psoralen and UV light, as described in material and methods, thus preventing viral gene expression due to genome cross-linking, but leaving viral cell entry unaffected.

The A549 cells were either mock-infected (MK), infected with HAd5 or with HAd5-i. The cells were then subject to metabolic labeling by incubating with ManNAz (tetraacetylated *N*-Azidoacetyl-*D*-Mannosamine) or FucAk (alkyne-modified fucose). The sugar labeling was used to assess cell surface incorporation of *de novo* sialic acid (Sia) residues as *N*-azidoacetyl sialic acid (SiaNAz) and also to determine *de novo* incorporation of fucose (Fuc) in the form of FucAk. Both labeled analogs are incorporated into glycoproteins and are detected by *Click-it* technology using a fluorophore-alkyne or azide, respectively (Thermo Scientific). To evaluate the incorporation of carbohydrates throughout the viral cycle of replication, we measured carbohydrate incorporation in the cell surface by flow cytometry at three different hours post infection (h p.i.): an early time point (8 h p.i.) that corresponds to the early phase of infection, when expression of early viral genes can be detected; a time of transition to the late phase (16 h p.i.), when viral genome replication begins; and a time point that corresponds to the late phase of viral replication (24 h p.i.) when viral particles are produced.

All cells were positive for FucAk and SiaNAz labeling. The HAd5-infected cells showed increased mean fluorescence intensity (MFI), represented as relative expression, in FucAk incorporation compared to MK and HAd5-i cells in each time measured (Figure 1A). It can be observed that viral inactivation prevented the increment of FucAk MFI since 8 h p.i., indicating that expression of viral genes is required, in contrast to the incorporation of SiaNAz that compared to MK and HAd5-i cells was not affected in HAd5-infected cells at any time (Figure 1B).

Table I. Viral induced modifications of the host cell glycosylation.

Virus	Modified glycoantigens	Activated host genes	Mechanism	Reference
HTLV-1	sLe ^x	<i>FUT7</i>	Viral Tax protein	Hiraiwa et al. (2003)
HSV-1	sLe ^x	<i>FUT3</i>	UNK	Nystrom et al. (2009); Norden et al. (2013)
		<i>FUT5</i>	Immediate early RNA transcript	
		<i>FUT6</i>	UNK	
CMV	sLe ^x	<i>FUT3/4/5/6/7/9</i>	UNK	Nystrom et al. (2007); Cebulla et al. (2000)
	Le ^x	<i>ST3GalIV</i>		
	Le ^y	<i>FUT1/2</i>		
VZV	sLe ^x	<i>FUT3/5/6/</i>	UNK	Nystrom et al. (2007)
HIV-1	Le ^y and hyposialylation	<i>GNE</i>	UNK	Adachi et al. (1988); Giordanengo et al. (2004)
HCV	UNK	<i>FUT1</i>	UNK	Papic et al. (2012)

FUT: fucosyltransferase gene; *ST3GalIV*: α 2-3 sialyltransferase IV gene; *GNE*: UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase gene; cytomegalovirus (CMV); hepatitis C virus (HCV); herpes simplex virus type 1 (HSV-1); human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1); human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1); varicella-zoster virus (VZV); UNK: unknown.

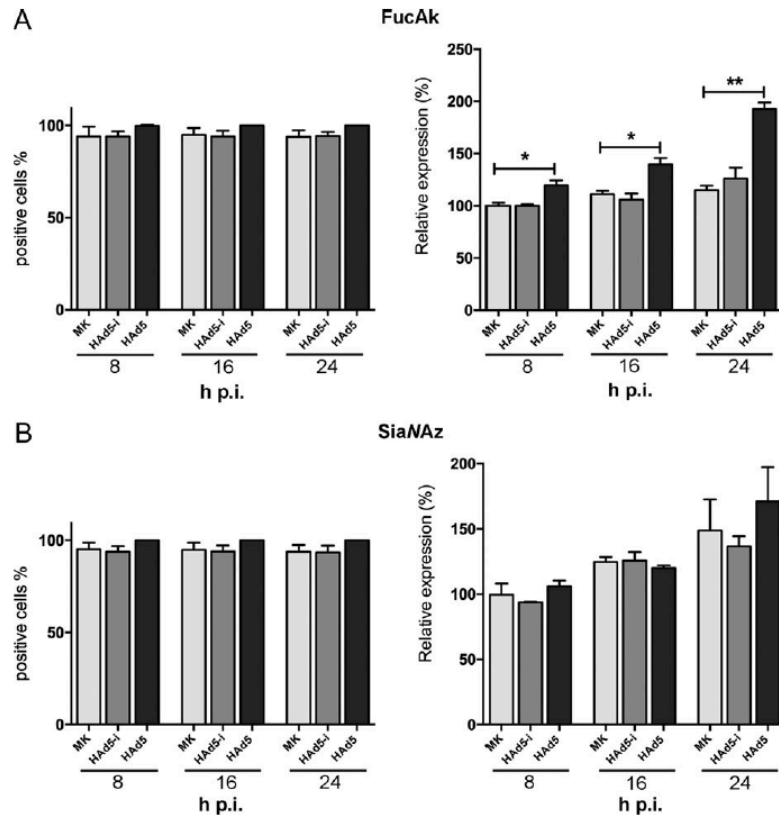


Fig. 1. Cell surface incorporation of *de novo* fucose and *de novo* sialic acid. Flow cytometry of A549 cells assessing (A) FucAk and (B) SiaNAz metabolic labeling at 8, 16 and 24 hours post infection (h p.i.) in either MK, or infected with HAd5 or HAd5-i at a MOI of 10 FFU/cell. The mean fluorescence was normalized and expressed as relative expression (%). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$. Data are the mean \pm S.E.M. measured in triplicate from three independent experiments. FucAk, fucose alkylne; HAd5-i, psoralen-inactivated virus; MK, mock infected; SiaNAz (*N*-azidoacetyl sialic acid).

Human glycans can present Fuc residues in different linkages: α 1-2, α 1-3/4 and α 1-6, as result of the action of different families of fucosyltransferases (FUTs). To determine if HAd5 infection caused increased expression of a particular Fuc linkage, HAd5-infected and MK cells were assessed by a Fuc detection lectin panel at 24 h p.i. This panel included AAL (*Aleuria aurantia* lectin) that preferentially recognizes α 1-3/6 Fuc (Debray and Montreuil 1989); LCA (*Lens culinaris*) that recognizes α 1-6 Fuc (Tateno, Nakamura-Tsuruta, and Hirabayashi 2009); and UEA-I (*Ulex europaeus agglutinin I*) that recognizes α 1-2 Fuc (Chang et al. 2011). All cells were positive for AAL, LCA and UEA-I, but only HAd5-infected cells showed increased surface binding of UEA-I compared to MK (Figure 2A). Because these data suggested that α 1-2 Fuc is particularly increased by HAd5 infection, we assessed UEA-I surface binding by flow cytometry at 8, 16 and 24 h p.i. (Figure 2B). The HAd5-infected cells showed a time-dependent pattern of increased UEA-I binding, similar to the one observed in FucAk metabolic labeling (Figure 1A).

To further determine the molecular basis for increased α 1-2 fucosylation, we proceeded to quantify the expression levels of *FUT1* and *FUT2*, coding for the human FUTs responsible for the synthesis of Fuc α 1-2 linkages. Total mRNA from HAd5-infected and MK-infected cells was extracted and analyzed by quantitative

RT-PCR (qRT-PCR). The HAd5-infected cells showed a maximum significant increase at 8 h p.i. of *FUT1* expression (9-fold) (Figure 3A), while *FUT2* only increased 2-fold at the same time point (Figure 3B).

HAd5 E1A causes increased expression of *FUT1*

The HAd5 early genes (E1A, E1B, E2, E3, and E4) encode proteins that alter the ability of the infected cell to regulate proliferation, inhibit cellular defense mechanisms, and establish optimal intracellular conditions for efficient replication and expression of the viral genome. Of these genes, E1A is the first viral gene to be expressed and is necessary for the expression of the other early viral genes (E1B, E2, E3 and E4). The E1A gene codes for five different mRNA produced through alternative splicing (13S, 12S, 11S, 10S and 9S). The 13S and 12S mRNA species encode the 289R and 243R proteins, respectively, which are expressed at early times and have been shown to possess pleiotropic regulatory activities, both in transcriptional activation as well as repression of a variety of cellular and viral promoters and enhancers (King et al. 2018). The other viral E1A proteins are expressed in the late phase of the viral replication cycle (Flint and Nemerow 2016).

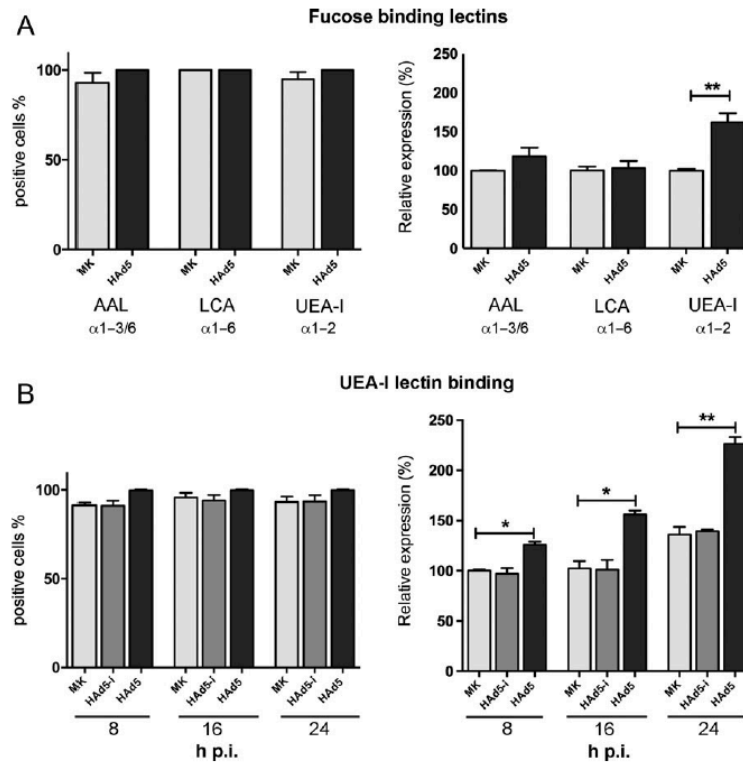


Fig. 2. Fucose specific lectin binding. (A) Flow cytometry of A549 cells assessing binding of fucose detecting lectins at 24 hours post infection (h p.i.) in either MK, or infected with HAd5 a MOI of 10 FFU/cell. Lectins used were: AAL (*Aleuria aurantia*, Fuc α 1-3/6); LCA (*Lens culinaris*, Fuc α 1-6), and UEA-I (*Ulex europaeus agglutinin I*, Fuc α 1-2) and (B) Flow cytometry of A549 cells assessing UEA-I binding in MK, HAd5-i and HAd5-infected A549 cells was further assessed at 8, 16 and 24 h p.i. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$. The mean fluorescence was normalized and expressed as relative expression (%). All infections were performed at a MOI of 10 FFU/cell. Data are the mean \pm S.E.M. measured in triplicate from three independent experiments. MK, mock infected; HAd5-i, psoralen-inactivated virus.

Because *FUT1* mRNA levels were the most highly expressed in HAd5-infected cells, since 4 h p.i. with maximal expression level at 8 h p.i. (Figure 3A), and because these times post-infection correspond to the early phase of the viral replication cycle we focused on the E1A early gene and proceeded to evaluate its effect on *FUT1* expression.

To determine if the E1A 289R and 243R HAd5 viral proteins are responsible for increased *FUT1* expression, A549 cells were transfected with plasmids encoding 13S or 12S. The *FUT1* mRNA expression was determined by qRT-PCR after 8 h post-transfection. A549 cells transfected with either plasmid resulted in higher levels of *FUT1*, although the observed increment was only statistically significant for the 13S encoding plasmid (Figure 4).

HAd5 infection modifies GDP-Fucose synthesis

Regulation of *FUT* expression as well as the activity of the enzymes involved in synthesis and transport of GDP-Fucose (GDP-Fuc) can have a direct effect on the cell's fucosylation profiles by increasing the pool of donor substrate available for FUT reactions that take place in the Golgi lumen (Moriwaki et al. 2007; Villar-Portela et al. 2013; Xu Ma and Liu 2013). The synthesis of GDP-Fuc, the donor substrate of FUTs, can be achieved through the *de novo* and the salvage pathways. Total mRNA from HAd5-infected and MK-infected cells was extracted and analyzed by qRT-PCR. In the

case of the salvage pathway, where metabolic labeling with FucAk is incorporated, we assessed the expression levels of *FGPT*, which encodes for the GDP-Fuc pyrophosphorylase that catalyzes the reversible condensation of Fucose-1-phosphate with GTP to form GDP-Fuc. In the case of the *de novo* pathway we assessed the expression of *FX*, which codes for the enzyme that converts GDP-4-keto-6-deoxy-mannose to GDP-Fuc. We also assessed the expression level of *SLC35C1*, that encodes for the GDP-Fuc Golgi transporter, involved in the transport of GDP-Fuc from the cytoplasm into the Golgi lumen. The *FGPT* (2-fold) and *FX* (2-fold) expression levels showed a slight increase at 8 h p.i. and 24 h p.i., respectively. No significant differences in the expression levels of *SLC35C1* were observed at any of the tested times (Figure 5).

HAd5 infection modifies the expression profile of the Le^y antigen

To further determine the biological relevance of the increased presence of the Fuc α 1-2 linkage in HAd5-infected cells, we assessed the expression of the bi-fucosylated Le^y antigen (Fuc α 1-2 Gal β 1-4 (Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R) in HAd5-infected and MK cells. The Le^y antigen is known to be involved in cell differentiation, cell-cell interactions, proliferation and apoptosis, in both physiological and pathological conditions (Kawai et al. 2013; Lin et al. 2015; Wang

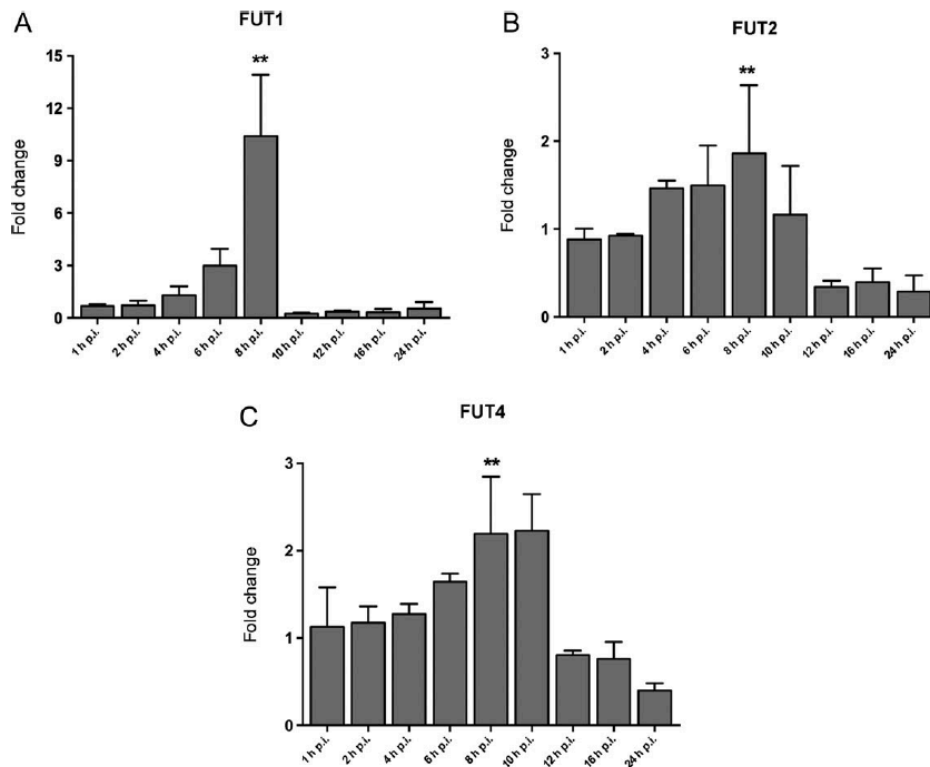


Fig. 3. Expression of *FUT1*, *FUT2* and *FUT4* in HAd5-infected cells. The mRNAs of (A) *FUT1*, (B) *FUT2* and (C) *FUT4* were quantified by qRT-PCR analysis in HAd5-infected cells, at a MOI of 10 FFU/cell, compared to MK-infected cells. The mRNA fold change was determined at 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 and 24 h p.i. Data show fold change compared to MK. Data are the mean \pm S.E.M. measured in triplicate from two independent experiments. ** $P < 0.001$.

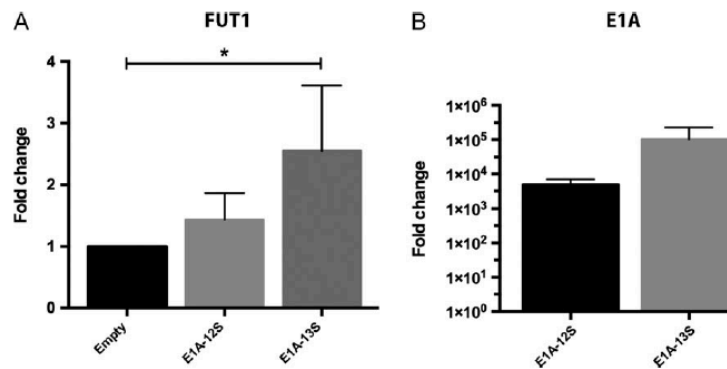


Fig. 4. Expression of *FUT1* in E1A-12S and E1A-13S transfected A549 cells. (A) The expression of *FUT1* mRNA was assessed by qRT-PCR in A549 cells transfected with empty plasmid, pCMV-12S or pCMV-13S plasmid. The mRNA fold change was determined at 8 hours post transfection. (B) The expression of HAd5 E1A mRNA was assessed by qRT-PCR in A549 cells transfected with empty plasmid, pCMV-12S or pCMV-13S plasmid and expressed as fold change compared to cells transfected with empty plasmid. Data mean \pm S.E.M. for triplicate samples from two independent experiments. * $P < 0.01$

et al. 2017). Therefore, total cell lysates obtained from HAd5-infected and MK A549 cells were assessed through western blot using anti-Le^y monoclonal antibody (clone F3). No evident overall increment was observed in the Le^y staining of HAd5-infected cells, when compared to MK; nonetheless, it is important to notice that a heterogenous change was observed in the expression profile of the

Le^y antigen in HAd5-infected cells compared to MK, with protein bands showing increased and decreased expression (Figure 6). Additionally, the expression of *FUT4* (α 1-3 fucosyltransferase), required for the synthesis of Le^y in A549 (Wang et al. 2017) was shown to be upregulated (2-fold) at 8 h p.i. (Figure 3C).

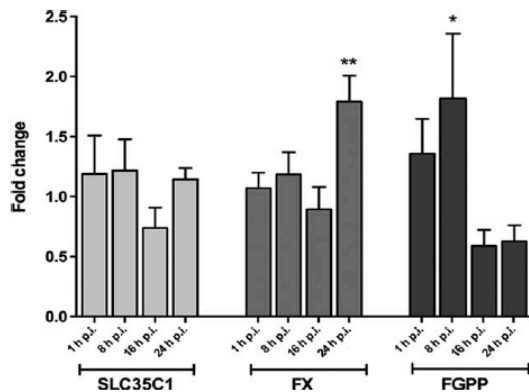


Fig. 5. Expression of *FX*, *FGPP* and *SLC35C1* in HAd5-infected cells. The mRNA of *FX*, *FGPP* and *SLC35C1* were quantified by qRT-PCR analysis in HAd5-infected cells, at a MOI of 10 FFU/cell, compared to MK-infected cells. The mRNAs fold change was determined at 1, 8, 16, and 24 h p.i. Data show fold change compared to MK. Data mean \pm S.E.M. for triplicate from two independent experiments. * $P < 0.05$ ** $P < 0.001$.

Discussion

Fucosylated carbohydrates are involved in a variety of biological and pathological processes including tissue development, fertilization, cell adhesion, inflammation, angiogenesis, tumor metastasis and infections (Ma, Simala-Grant and Taylor 2006). In this work, we report the effect of HAd5 infection in the glycosylation profile of A549 cells. For the first time, we demonstrate that HAd5 infection increases *de novo* fucosylation as assessed by metabolic labeling with FucAk (Figure 1A), particularly increasing α 1-2 fucosylation as determined by fucose lectin binding (Figure 2A and 2B). The observed increased α 1-2 fucosylation in HAd5-infected cells can be supported by the overexpression of the genes that code for the two human α 1-2 FUTs, *FUT1* (9-fold) and *FUT2* (2-fold), observed since 4 h p.i. and with a maximum increase at 8 h p.i. (Figure 3A and B). Additionally, increased fucosylation in HAd5 infected cells could be also supported by the increased expression at 8 h p.i. of *FGPP* (2-fold), that codes for a key enzyme involved in the salvage pathway of GDP-Fuc biosynthesis, in contrast to the increased expression of *FX*, coding for a key enzyme of the *de novo* pathway, observed until 24 h p.i. (Figure 5).

Viruses from a variety of different families have evolved mechanisms that alter carbohydrate antigen expression and play a role in tissue colonization and viral replication. Human herpesviruses, including varicella-zoster virus (VZV), cytomegalovirus (CMV) and herpes simplex virus type-1 (HSV-1) as well as some retroviruses, like the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1), induce expression of cell surface fucosylated carbohydrate antigens (Adachi et al. 1988; Cebulla et al. 2000; Hiraiwa et al. 2003; Nystrom et al. 2007; Norden et al. 2013) (Table I).

As previously mentioned, we show that HAd5 infection increases *FUT* expression, particularly *FUT1* (α 1-2 fucosyltransferase) expression with a maximal expression at 8 h p.i. (9-fold). Other viral infections reported to increase *FUT1* expression include hepatitis C virus (HCV), where it was shown to be essential for viral progeny production, although modification of carbohydrate antigen expression was not studied (Papic et al. 2012).

Also, CMV neoexpresses *FUT1*, supporting neo-synthesis of the Le^x antigen (Nystrom et al. 2007). Nonetheless, it is important to note that in both cases, *FUT1* is induced at later times of their respective viral replication cycles, in contrast to the early time where overexpression of *FUT1* is observed in HAd5 infection, suggesting different biological roles of *FUT1*.

Only in a few cases has the mechanism of glycosyltransferase activation been described in viral infections (Table I). The HTLV-1 transactivator Tax protein promotes overexpression of *FUT7* and consequently overexpression of the sLe^x antigen that is directly related to the degree of skin infiltration of leukemic cells (Hiraiwa et al. 2003). HSV-1 has also been shown to increase sLe^x antigen expression by inducing the overexpression of *FUT5* through the effect of immediate-early viral RNA and not as result of viral proteins (Nystrom et al. 2009). To assess the role of viral gene expression on the increased fucosylation of HAd5-infected cells, we infected cells with HAd5-i virus. The results show that increased FucAk and UEA-I binding are dependent on the expression of viral genes, and not a result of viral entry or recognition of the viral particle (Figure 1A and 2B), suggesting that HAd5 induces this glycosylation change as part of its replication strategy, which may impact viral pathogenesis. Additionally, it has been shown that HAd5-i stimulates the antiviral response associated IRF3, IRF3-inducible transcripts, and secondary phosphorylation of STAT1/2 to the same degree as untreated virus (Stein and Falck-Pedersen 2012). The fact that HAd5-i does not increase fucosylation suggests that this effect is not a result of an antiviral response and is probably dependent on the expression of early viral transcripts or proteins that could activate *FUT* transcription. Moreover, the fact that sialylation and the activation of sialic acid in the form of CMP-sialic acid, an enzymatic reaction that takes place in the cell nucleus (Munster-Kuhnel et al. 2004), are not affected (Figure 1B) suggests that the fucosylation machinery is a specific target of HAd5 infection.

The observed overexpression of *FUT1* and *FUT2* in HAd5 infected cells could play a role in establishing a favorable cellular environment for viral replication. Also, it should be noted that, similar to early HAd5 genes, *FUT1* promoters comprise several potential sequences for binding of MAPK-dependent or ERK nuclear transcription factors. *FUT1* responds to CREB/c-Rel, Elk-1 and NF κ B in colon cancer cells (Taniuchi et al. 2012); to Sp1, Myc and Ap2 in the MCAS ovarian cancer cell line (Koda, Soejima, and Kimura 1997) and to c-Jun/AP-1 in the SKOV3 ovarian cancer cell line (Gao et al. 2014).

Additionally, induced *FUT2* overexpression has been reported to positively regulate A549 cell proliferation, migration and invasion, and inhibit apoptosis (Zhou et al. 2017). *FUT1* in A549 cells has been shown to promote colony formation, tumorigenesis, avoid apoptosis and confer resistance to Taxol, a mitotic spindle depolymerization inhibitor (Gan et al. 2017). Gan et al. associated increased *FUT1* expression to increased Le^x antigen; however, the data used to establish an overall increased expression of this antigen is limited, as blot data only show a single reactive protein, when Le^x expression is present in several A549 proteins (Figure 6).

Previous works have reported the relationship between *FUT1* overexpression and increased synthesis of Le^x antigen in different cell types (Moehler et al. 2008), promoting enhanced proliferation and de-regulation of the cell cycle (Liu et al. 2012), leading to increased tumorigenesis (Gao et al. 2013), migration and invasion (Lin et al. 2015), metastasis (Tan et al. 2015) and drug resistance (Zhang et al. 2013). Proteins known to be modified with Le^x antigen and responsible for these effects include CD44 (Gao et al. 2011),

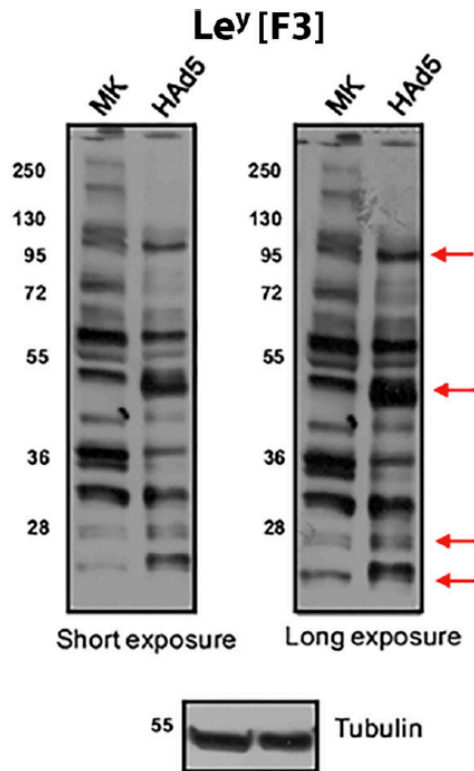


Fig. 6. Immunodetection by western blotting of Le^y bearing glycoproteins in HAd5-infected cells. MK- and HAd5-infected cells, at a MOI of 10 FFU/cell, were harvested at 24 h p.i. and whole cell lysates were prepared for blots. Aliquots containing 100 µg of protein were applied per lane in a 10% polyacrylamide gel. Detection was performed using anti-Le^y antibody (F3 clone). The image shows a representative blot from three independent experiments. Red arrows denote protein bands with an increased intensity between MK- and HAd5-infected A549 cells.

integrins $\alpha 5$ and $\beta 1$ (Li et al. 2010) or αv and $\beta 3$ (Gao et al. 2013), EGFR (Liu et al. 2010; Lin et al. 2015), IGF-1R (Liu et al. 2011), CD47 (Tan et al. 2015) and MUC1 (Zhang et al. 2013). As shown through anti-Le^y western blot, lysates obtained from HAd5 infected cells compared to MK, showed a heterogeneous modification in the expression profile of Le^y, without an overall increase or decrease (Figure 6). Nonetheless, it can be observed that several protein bands increased their reactivity to Le^y in HAd5-infected cells with respect to MK. Further studies are necessary to identify these proteins and characterize the activating or inhibiting role that the Le^y antigen could impose in their function (Ferreira et al. 2018). We suggest that, although *FUT1* and *FUT2* expression increased in HAd5-infected cells, particularly of *FUT1* (9-fold), there is only a small increase in the expression of *FUT4* (2-fold), possibly limiting increased synthesis of the Le^y antigen in A549 cells (Wang et al. 2017).

Increased expression of FUTs in HAd5-infected cells could be the result of activation by the early E1A proteins, because they are required for activation of transcription of all other viral genes, as well as activation of a variety of cellular genes implicated in cell cycle progression (Flint and Nemerow 2016). E1A-deleted viruses

express negligible levels of other viral genes in A549 cells (or any other cell line that does not express E1A, such as HEK-293) (Kovesdi and Hedley 2010). The E1A products that are expressed at early times during viral replication where increased *FUT1* expression was observed, include the 289R and 243R proteins (Flint and Nemerow 2016). In our experiments A549 cells transfected with E1A showed increased *FUT1* expression, suggesting that E1A, particularly 289R mediated *FUT1* expression could be an additional mechanism through which HAd5 enhances proliferation (Figure 4).

In addition to the potential effect of viral early proteins, such as E1A, in increased *FUT* gene transcription, processing or vesicular transit of glycosylated cellular membrane proteins could be altered by viral proteins encoded in the E3 transcription unit, as the latter are associated with the internalization and sequestration of surface cell receptors such as EGFR, Fas, TNFRs and TRAIL (Lichtenstein et al. 2004), a phenomenon that could also explain the heterogeneous change observed in Le^y expression, without ruling out that the infection could increase this antigen on one or several plasma membrane proteins.

Taken together, these data suggest that HAd5 infection could promote a favorable cellular environment for viral replication and progeny through the known biological effects caused by *FUT1* and *FUT2* expression, as well as those related to Le^y antigen expression. In view of the relevance of adenoviruses as pathogens, but also because of their present and future use in clinical applications, further studies are required to address the functional implications of altered fucosylation. These include the role that modified Le^y antigen expression has in the viral and host cell biology, not only in A549 cells, but also in relevant primary cells of the lung (bronchiolar and alveolar) and derived from other medically relevant tissues (corneal).

Materials and methods

Cells and virus

All experiments were performed using the Human Lung Adenocarcinoma cell line A549 obtained from ATCC (CCL-185). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-Invitrogen) supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco-Invitrogen) and 5% bovine serum (Bio West), in a 37°C incubator under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. All experiments were carried out using HAd5 [HAd5-2250] as the wt virus; briefly, the H5pg4100 (Kindsmuller et al. 2007) served as the HAd5 backbone in which the E3 transcription unit from HAd5 was inserted generating the HAd5 2250, which served as the HAd5 wt (wild type). For all experiments a Multiplicity of Infection (MOI) of 10 fluorescent-forming units (FFU)/cell was used, as it was determined to be sufficient for infection of at least 95% of cells. After adsorption of virus for 1 hour at 37°C, the inoculum was removed and replaced with fresh medium. Viruses were propagated by low MOI infection (0.1 FFU/cell) in A549 cells, and virus titers were determined as FFU/ml on A549 cells.

Cell lysate

A549 cells were harvested in ice-cold PBS (KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄ and H₂O) by cell scraper. The pellets were obtained after precipitation by centrifugation at 500 x g for 5 min at 4°C, cells were resuspended and incubated in lysis buffer (50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH8, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate, 2 mM EDTA, 0.5% NP40) containing a Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich), on ice for 30 minutes. Lysates were cleared by centrifugation at 12,000 x

g for 15 min at 4°C, after 20 min sonication in ice-cold water. Protein concentration was measured using the BCA assay kit (Sigma-Aldrich).

Western blot

Total protein (35 µg) was resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore). Membranes were blocked with 0.1% TBS-Tween 20 (TBS-T) containing 3% nonfat milk and incubated for 1 hour at room temperature. After three washes, the blocked membrane was incubated overnight with Tubulin primary antibody (eBioscience), diluted 1:8,000 in TBS-T 0.1% containing 0.3% nonfat milk at 1:8000 dilution. Bound antibody was detected with the secondary antibody anti-IgG coupled to HRP (Jackson Immuno Research Laboratories), diluted 1:10,000 in TBS-T 0.1% containing 0.3% nonfat milk (Jackson Immuno Research Laboratories). Membranes were developed by enhanced chemiluminescence as recommended by the manufacturer (Pierce, Thermo Fisher Scientific), and bands were visualized on X-ray film (Kodak).

Detection of Le^y glycoantigen

For Le^y antigen detection, 100 µg of total protein was resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore). Membranes were blocked with 0.1% TBS-T containing 5% PVP (Polyvinylpyrrolidone, Sigma-Aldrich), incubated for 2 hours at room temperature. After 3 washes the blocked membrane was incubated overnight with primary antibody Le^y (clone F3, Abcam) diluted 1:1,500 in 0.2% TBS-T containing 0.3% PVP. Bound antibody was detected with anti-IgM mouse coupled to HRP (Bethyl Laboratories) diluted 1:40,000 in TBS-T 0.2% containing 0.3% PVP. Membranes were developed by enhanced chemiluminescence as recommended by the manufacturer (Pierce, Thermo Fisher Scientific), and bands were visualized on X-ray film (Kodak).

SiaNAz and alkyne-modified fucose incorporation assay

The MK- and HAd5-infected cells were incubated in complete medium supplemented with 40 µM ManNAz (tetraacetylated *N*-Azidoacetyl-*D*-Mannosamine) and 50 µM Fucose-alkyne (Thermo scientific) for 8, 16 and 24 h p.i. After carbohydrate incorporation cells were incubated with 0.25% trypsin (Lonza), harvested in PBS containing 1 mM EDTA and fixed with 4% formaldehyde. After that, cells were incubated with Alexa Fluor 647 conjugated alkyne and azide (Thermo Scientific) to analyze SiaNAz and FucAk, respectively as a result of cycloaddition reaction. The *de novo* incorporation of carbohydrates in the cell surface was evaluated by flow cytometry.

Flow cytometry

Cells were incubated with 0.25% trypsin (Lonza) and harvested in PBS containing 1 mM EDTA. After centrifugation at 500 × g for 5 min at 4°C, supernatants were discarded and cells were fixed in 4% formaldehyde in PBS. MK- and HAd5-infected cells were incubated with the biotinylated lectin AAL (*Aleuria aurantia*, Fuc α1-3/6; Vector Labs) diluted 1:1,600 and further labeled with Alexa Fluor 647-conjugated streptavidin (Thermo scientific) diluted 1:8,000; LCA-FITC (*Lens culinaris*, α1-6; Vector Labs) diluted 1:6,000, and UEA-I-FITC (*Ulex europaeus agglutinin I*, Fuc α1-2; Vector Labs) dilution 1:75 in PBS for 30 min at 4°C. To measure the percentage of infected cells were permeabilized with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min at 4°C. After fixation cells were incubated with anti-hexon MAb 9F6 (a kind gift of

S.J. Flint) diluted 1:30 in PBS for 30 min at 4°C, and further labeled with Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (Thermo scientific), diluted 1:1,500 for 30 min at 4°C. All measurements obtained by flow cytometry were made after acquiring 10,000 events for five experiments in a FACSCalibur (CellQuest acquisition) or FACSCanto II (FACSDiva acquisition) flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed using FlowJo 7.6.5 software (Tree Star Inc.).

Viral inactivation

To determine if the observed cellular effects are caused by viral entry or if they are dependent on the expression of viral genes, UV-inactivated HAd5 virus (HAd5-i) was inactivated with 20 µg/ml psoralen (Sigma-Aldrich) and UV light in DMEM without serum for 45 minutes, preventing it from getting hot. After inactivation we proceeded to infect as previously described. This treatment prevents viral gene expression due to genome cross-linking, however the virus can enter the cell. To measure inactivation efficiency, cell infected with HAd5-i were analyzed by flow cytometry as described above using the anti-hexon MAb 9F6, determining >95% of viral inactivation (Supplementary data, Figure S1).

Isolation of RNA and real-time PCR

Total RNA was isolated from MK- and HAd5-infected A549 cells at each time point analyzed using Trizol reagent (Thermo scientific) according to the manufacturer's protocol. The RNA was checked and quantified using a NanoDrop instrument: obtaining a 260/280 nm ratio of 2.0 ± 0.2. Two micrograms of isolated RNA were reverse transcribed to cDNA using oligo-dT primer with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR was performed using a Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific) with the StepOnePlus Real-Time PCR equipment (Applied Biosystems). All primers were validated with an amplification efficiency close to 100%. The samples were analyzed by the 2^{-ΔΔCt} comparative method using triplicate samples from two independent experiments. The mRNA relative levels are expressed as the fold change of HAd5-infected/MK-infected (INF/MK) after they were normalized to actin as the housekeeping gene and all data were compared to MK-infected cells at 1 h p.i. (MK and HAd5-infected) at each time-point measured. Primer sequences are listed in Supplementary data, Table S1.

Plasmids

The plasmids pCMV-12S and pCMV-13S derived from the pcDNA3.1 vector (Invitrogen) were a kind gift from Thomas Dobner (Heinrich Pette Institute). For transient transfection, sub confluent A549 cells were treated for 4 hours with a transfection mixture of plasmids pCMV-12S, pCMV-13S or empty vector and Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Afterwards, fresh culture medium was added for 4 hours after which cells were collected and total mRNA extracted and quantified for *FUT1* mRNA and *E1A* mRNA levels, as described above.

Statistical analysis

The statistical significance was calculated with Prism software (GraphPad). The tests used were unpaired *t*-test, Welch's correction test. *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

Supplementary data

Supplementary data is available at *Glycobiology* online.

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [RT-279765 to I.M.D and K.G.H., Scholarship-253723 to K.G.H., PDCPN2014-247109 and FC 2015-02-834 to H.M.M.]; the Dirección General de Educación Superior-Secretaría de Educación Pública-Programa para el Desarrollo Profesional Docente [DSA/103.5/1.5/11069 to I.M.D, R.A. G. and K.G.H.], and the Universidad de Guanajuato [1025/2016 and CIIIC 95/2018 to H.M.M.].

Conflict of interest statement

None declared.

Abbreviations

Fuc, Fucose; FucAk, fucose alkyne; FUTs, fucosyltransferases; MOI, multiplicity of infection; UEA-I, *Ulex europaeus agglutinin I*; AAL, *Aleuria aurantia*; LCA, *Lens culinaris*; ManNAz, tetraacetylated N-Azidoacetyl-D-Mannosamine; Sia, sialic acid; SiaNAz, N-azidoacetyl sialic acid; MK, no infected cells; FFU/cell, forming focus units/cells; Sia, sialic acid; PVP, Polyvinylpyrrolidone; quantitative RT-PCR, qRT-PCR; wt, wild type; sialyl Lewis x, sLe^x; Lewis x, Le^x; Lewis y, Le^y

References

Adachi M, Hayami M, Kashiwagi N, Mizuta T, Ohta Y, Gill MJ, Matheson DS, Tamaoki T, Shiozawa C, Hakomori S. 1988. Expression of Ley antigen in human immunodeficiency virus-infected human T cell lines and in peripheral lymphocytes of patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex (ARC). *J Exp Med*. 167: 323–331.

Bagdonaite I, Wandall HH. 2018. Global aspects of viral glycosylation. *Glycobiology*. 28:443–467.

Cebulla CM, Miller DM, Knight DA, Briggs BR, McGaughy V, Sedmak DD. 2000. Cytomegalovirus induces sialyl Lewis(x) and Lewis(x) on human endothelial cells. *Transplantation*. 69:1202–1209.

Chang CF, Pan JF, Lin CN, Wu IL, Wong CH, Lin CH. 2011. Rapid characterization of sugar-binding specificity by in-solution proximity binding with photosensitizers. *Glycobiology*. 21:895–902.

Debray H, Montreuil J. 1989. *Aleuria aurantia* agglutinin. A new isolation procedure and further study of its specificity towards various glycopeptides and oligosaccharides. *Carbohydr Res*. 185:15–26.

Ferreira IG, Pucci M, Venturi G, Malagolini N, Chiricolo M, Dall'Olio F. 2018. Glycosylation as a main regulator of growth and death factor receptors signaling. *Int J Mol Sci*. 19:1–28.

Flint J, Nemerow GR. 2016. *Human Adenoviruses: From Villains to Vectors*. New Jersey: World Scientific Publishing Company.

Gan CZ, Li G, Luo QS, Li HM. 2017. miR-339-5p downregulation contributes to Taxol resistance in small-cell lung cancer by targeting alpha1,2-fucosyltransferase 1. *IUBMB Life*. 69:841–849.

Gao J, Hu Z, Liu D, Liu J, Liu C, Hou R, Gao S, Zhang D, Zhang S, Lin B. 2013. Expression of Lewis y antigen and integrin alpha v, beta 3 in ovarian cancer and their relationship with chemotherapeutic drug resistance. *J Exp Clin Cancer Res*. 32:36.

Gao N, Liu J, Liu D, Hao Y, Yan L, Ma Y, Zhuang H, Hu Z, Gao J, Yang Z et al. 2014. c-Jun transcriptionally regulates alpha 1, 2-fucosyltransferase 1 (FUT1) in ovarian cancer. *Biochimie*. 107(Pt B):286–292.

Gao L, Yan L, Lin B, Gao J, Liang X, Wang Y, Liu J, Zhang S, Iwamori M. 2011. Enhance effects of Lewis y antigen on CD44-mediated adhesion and spreading of human ovarian cancer cell line RMG-I. *J Exp Clin Cancer Res*. 30:15.

Giordanengo V, Ollier L, Lanteri M, Lesimple J, March D, Thyss S, Lefebvre JC. 2004. Epigenetic reprogramming of UDP-N-acetylglucosamine 2-

epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) in HIV-1-infected CEM T cells. *FASEB J*. 18:1961–1963.

Hiraiwa N, Yabuta T, Yoritomi K, Hiraiwa M, Tanaka Y, Suzuki T, Yoshida M, Kannagi R. 2003. Transactivation of the fucosyltransferase VII gene by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through a variant cAMP-responsive element. *Blood*. 101:3615–3621.

Kawai S, Kato S, Imai H, Okada Y, Ishioka C. 2013. Suppression of FUT1 attenuates cell proliferation in the HER2-overexpressing cancer cell line NCI-N87. *Oncol Rep*. 29:13–20.

Khare R, Chen CY, Weaver EA, Barry MA. 2011. Advances and future challenges in adenoviral vector pharmacology and targeting. *Curr Gene Ther*. 11:241–258.

Kindsmuller K, Groitl P, Hartl B, Blanchette P, Hauber J, Dobner T. 2007. Intracellular targeting and nuclear export of the adenovirus E1B-55K protein are regulated by SUMO1 conjugation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104: 6684–6689.

King CR, Zhang A, Tessier TM, Gameiro SF, Mymryk JS. 2018. Hacking the cell: Network intrusion and exploitation by adenovirus E1A. *mBio*, 9(3): e00390-18. doi:10.1128/mBio.00390-18.

Koda Y, Soejima M, Kimura H. 1997. Structure and expression of H-type GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase gene (FUT1). Two transcription start sites and alternative splicing generate several forms of FUT1 mRNA. *J Biol Chem*. 272:7501–7505.

Kovesdi I, Hedley SJ. 2010. Adenoviral producer cells. *Viruses*. 2:1681–1703.

Li Q, Liu S, Lin B, Yan L, Wang Y, Wang C, Zhang S. 2010. Expression and correlation of Lewis y antigen and integrins alpha5 and beta1 in ovarian serous and mucinous carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 20:1482–1489.

Lichtenstein DL, Toth K, Doronin K, Tollefson AE, Wold WS. 2004. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int Rev Immunol*. 23:75–111.

Lin WL, Lin YS, Shi GY, Chang CF, Wu HL. 2015. Lewisy promotes migration of oral cancer cells by glycosylation of epidermal growth factor receptor. *PLoS One*. 10:e0120162.

Liu JJ, Lin B, Hao YY, Li FF, Liu DW, Qi Y, Zhu LC, Zhang SL, Iwamori M. 2010. Lewis(y) antigen stimulates the growth of ovarian cancer cells via regulation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Oncol Rep*. 23:833–841.

Liu D, Liu J, Lin B, Liu S, Hou R, Hao Y, Liu Q, Zhang S, Iwamori M. 2012. Lewis y regulate cell cycle related factors in ovarian carcinoma cell RMG-I in vitro via ERK and Akt signaling pathways. *Int J Mol Sci*. 13: 828–839.

Liu D, Liu J, Wang C, Lin B, Liu Q, Hao Y, Zhang S, Iwamori M. 2011. The stimulation of IGF-1R expression by Lewis(y) antigen provides a powerful development mechanism of epithelial ovarian carcinoma. *Int J Mol Sci*. 12:6781–6795.

Ma B, Simala-Grant JL, Taylor DE. 2006. Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology*. 16:158R–184RR.

Miller DL, Myers CL, Rickards B, Collier HA, Flint SJ. 2007. Adenovirus type 5 exerts genome-wide control over cellular programs governing proliferation, quiescence, and survival. *Genome Biol*. 8:R58.

Moehler TM, Sauer S, Witzel M, Andrulis M, Garcia-Vallejo JJ, Grobholz R, Willhauck-Fleckenstein M, Greiner A, Goldschmidt H, Schwartz-Albiez R. 2008. Involvement of alpha 1-2-fucosyltransferase I (FUT1) and surface-expressed Lewis(y) (CD174) in first endothelial cell-cell contacts during angiogenesis. *J Cell Physiol*. 215:27–36.

Moriwaki K, Noda K, Nakagawa T, Asahi M, Yoshihara H, Taniguchi N, Hayashi N, Miyoshi E. 2007. A high expression of GDP-fucose transporter in hepatocellular carcinoma is a key factor for increases in fucosylation. *Glycobiology*. 17:1311–1320.

Munster-Kuhnel AK, Tiralongo J, Krapp S, Weinhold B, Ritz-Sedlacek V, Jacob U, Gerardy-Schahn R. 2004. Structure and function of vertebrate CMP-sialic acid synthetases. *Glycobiology*. 14:43R–51R.

Norden R, Nystrom K, Aurelius J, Brissler M, Olofsson S. 2013. Virus-induced appearance of the selectin ligand sLeX in herpes simplex virus type 1-infected T-cells: involvement of host and viral factors. *Glycobiology*. 23:310–321.

- Nystrom K, Grahn A, Lindh M, Brytting M, Mandel U, Larson G, Olofsson S. 2007. Virus-induced transcriptional activation of host FUT genes associated with neo-expression of Ley in cytomegalovirus-infected and sialyl-Lex in varicella-zoster virus-infected diploid human cells. *Glycobiology*. 17:355–366.
- Nystrom K, Norden R, Muylaert I, Elias P, Larson G, Olofsson S. 2009. Induction of sialyl-Lex expression by herpes simplex virus type 1 is dependent on viral immediate early RNA-activated transcription of host fucosyltransferase genes. *Glycobiology*. 19:847–859.
- Papic N, Maxwell CI, Delker DA, Liu S, Heale BS, Hagedorn CH. 2012. RNA-sequencing analysis of 5' capped RNAs identifies many new differentially expressed genes in acute hepatitis C virus infection. *Viruses*. 4:581–612.
- Saha B, Parks RJ. 2017. Human adenovirus type 5 vectors deleted of early region 1 (E1) undergo limited expression of early replicative E2 proteins and DNA replication in non-permissive cells. *PLoS One*. 12: e0181012.
- Stein SC, Falck-Pedersen E. 2012. Sensing adenovirus infection: activation of interferon regulatory factor 3 in RAW 264.7 cells. *J Virol*. 86:4527–4537.
- Tan M, Zhu L, Zhuang H, Hao Y, Gao S, Liu S, Liu Q, Liu D, Liu J, Lin B. 2015. Lewis Y antigen modified CD47 is an independent risk factor for poor prognosis and promotes early ovarian cancer metastasis. *Am J Cancer Res*. 5:2777–2787.
- Taniuchi F, Higai K, Tanaka T, Azuma Y, Matsumoto K. 2012. Transcriptional regulation of fucosyltransferase 1 gene expression in colon cancer cells. *ScientificWorldJournal*. 2013:9.
- Tateno H, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J. 2009. Comparative analysis of core-fucose-binding lectins from *Lens culinaris* and *Pisum sativum* using frontal affinity chromatography. *Glycobiology*. 19:527–536.
- Villar-Portela S, Muinelo-Romay L, Cuevas E, Gil-Martin E, Fernandez-Briera A. 2013. FX enzyme and GDP-L-Fuc transporter expression in colorectal cancer. *Histopathology*. 63:174–186.
- Wang A, Lu C, Ning Z, Gao W, Xie Y, Zhang N, Liang J, Abbasi FS, Yan Q, Liu J. 2017. Tumor-associated macrophages promote Ezrin phosphorylation-mediated epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma through FUT4/LeY up-regulation. *Oncotarget*. 8:28247–28259.
- Xu YX, Ma A, Liu L. 2013. Transforming growth factor beta signaling upregulates the expression of human GDP-fucose transporter by activating transcription factor Sp1. *PLoS One*. 8:e74424.
- Zhang D, Gao J, Zhu L, Hu Z, Hou R, Liu S, Tan M, Liu J, Lin B. 2013. Chemoresistance is associated with MUC1 and Lewis y antigen expression in ovarian epithelial cancers. *Int J Mol Sci*. 14:11024–11033.
- Zhou W, Ma H, Deng G, Tang L, Lu J, Chen X. 2017. Clinical significance and biological function of fucosyltransferase 2 in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 8:97246–97259.

14. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, M., M. Hayami, N. Kashiwagi, T. Mizuta, Y. Ohta, M. J. Gill, D. S. Matheson, T. Tamaoki, C. Shiozawa, and S. Hakomori. 1988. 'Expression of Ley antigen in human immunodeficiency virus-infected human T cell lines and in peripheral lymphocytes of patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex (ARC)', *J Exp Med*, 167: 323-31.
- Arvin, A., and A. Abendroth. 2007. 'VZV: immunobiology and host response.' in A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley and K. Yamanishi (eds.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* (Cambridge).
- Badr, K. R., J. A. Parente-Rocha, L. C. Baeza, F. S. Ficcadori, M. Souza, C. M. Soares, A. C. P. Guissoni, T. N. Almeida, and D. D. Cardoso. 2019. 'Quantitative proteomic analysis of A549 cells infected with human adenovirus type 2', *J Med Virol*.
- Becker, D. J., and J. B. Lowe. 2003. 'Fucose: biosynthesis and biological function in mammals', *Glycobiology*, 13: 41R-53R.
- Berk, A. J. 2005. 'Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus', *Oncogene*, 24: 7673-85.
- Cai, M., S. Jin, L. Deng, L. Zhu, Z. Hu, D. Liu, J. Liu, M. Tan, J. Gao, H. Wang, and B. Lin. 2017. 'Lewis y antigen promotes p27 degradation by regulating ubiquitin-proteasome activity', *Oncotarget*, 8: 110064-76.
- Cebulla, C. M., D. M. Miller, D. A. Knight, B. R. Briggs, V. McGaughy, and D. D. Sedmak. 2000. 'Cytomegalovirus induces sialyl Lewis(x) and Lewis(x) on human endothelial cells', *Transplantation*, 69: 1202-9.
- Chang, C. F., J. F. Pan, C. N. Lin, I. L. Wu, C. H. Wong, and C. H. Lin. 2011. 'Rapid characterization of sugar-binding specificity by in-solution proximity binding with photosensitizers', *Glycobiology*, 21: 895-902.
- Croce, M. V., A. G. Colussi, M. R. Price, and A. Segal-Eiras. 1999. 'Identification and characterization of different subpopulations in a human lung adenocarcinoma cell line (A549)', *Pathol Oncol Res*, 5: 197-204.
- Davison, A. J., M. Benko, and B. Harrach. 2003. 'Genetic content and evolution of adenoviruses', *J Gen Virol*, 84: 2895-908.
- Debray, H., and J. Montreuil. 1989. 'Aleuria aurantia agglutinin. A new isolation procedure and further study of its specificity towards various glycopeptides and oligosaccharides', *Carbohydr Res*, 185: 15-26.
- Deng, G., L. Chen, Y. Zhang, S. Fan, W. Li, J. Lu, and X. Chen. 2018. 'Fucosyltransferase 2 induced epithelial-mesenchymal transition via TGF-beta/Smad signaling pathway in lung adenocarcinoma', *Exp Cell Res*, 370: 613-22.
- Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley. 2007. *Fields Virology* (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).
- Fine-Coulson, K., S. Giguere, F. D. Quinn, and B. J. Reaves. 2015. 'Infection of A549 human type II epithelial cells with Mycobacterium tuberculosis induces changes in mitochondrial morphology, distribution and mass that are dependent on the

- early secreted antigen, ESAT-6', *Microbes Infect*, 17: 689-97.
- Flint, M., P. Chatterjee, D. L. Lin, L. K. McMullan, P. Shrivastava-Ranjan, E. Bergeron, M. K. Lo, S. R. Welch, S. T. Nichol, A. W. Tai, and C. F. Spiropoulou. 2019. 'A genome-wide CRISPR screen identifies N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase as a potential antiviral target for Ebola virus', *Nat Commun*, 10: 285.
- Flint, S. Jane, and Glen R. Nemerow. 2017. *Human adenoviruses : from villains to vectors* (World Scientific: New Jersey).
- Foster, K. A., C. G. Oster, M. M. Mayer, M. L. Avery, and K. L. Audus. 1998. 'Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism', *Exp Cell Res*, 243: 359-66.
- Furukawa, K., M. Mori, N. Ohta, H. Ikeda, H. Shida, K. Furukawa, and H. Shiku. 1994. 'Clonal expansion of CD8+ cytotoxic T lymphocytes against human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) genome products in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients', *J Clin Invest*, 94: 1830-9.
- Gallimore, P. H., and A. S. Turnell. 2001. 'Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience', *Oncogene*, 20: 7824-35.
- Gan, C. Z., G. Li, Q. S. Luo, and H. M. Li. 2017. 'miR-339-5p downregulation contributes to Taxol resistance in small-cell lung cancer by targeting alpha1,2-fucosyltransferase 1', *IUBMB Life*, 69: 841-49.
- Gao, J., Z. Hu, D. Liu, J. Liu, C. Liu, R. Hou, S. Gao, D. Zhang, S. Zhang, and B. Lin. 2013. 'Expression of Lewis y antigen and integrin alphav, beta3 in ovarian cancer and their relationship with chemotherapeutic drug resistance', *J Exp Clin Cancer Res*, 32: 36.
- Gao, L., L. Yan, B. Lin, J. Gao, X. Liang, Y. Wang, J. Liu, S. Zhang, and M. Iwamori. 2011. 'Enhancive effects of Lewis y antigen on CD44-mediated adhesion and spreading of human ovarian cancer cell line RMG-I', *J Exp Clin Cancer Res*, 30: 15.
- Gao, N., J. Liu, D. Liu, Y. Hao, L. Yan, Y. Ma, H. Zhuang, Z. Hu, J. Gao, Z. Yang, H. Shi, and B. Lin. 2014. 'c-Jun transcriptionally regulates alpha 1, 2-fucosyltransferase 1 (FUT1) in ovarian cancer', *Biochimie*, 107 Pt B: 286-92.
- Giordanengo, V., L. Ollier, M. Lanteri, J. Lesimple, D. March, S. Thyss, and J. C. Lefebvre. 2004. 'Epigenetic reprogramming of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) in HIV-1-infected CEM T cells', *FASEB J*, 18: 1961-3.
- Grimmer, J., and R. Dumke. 2019. 'Organization of multi-binding to host proteins: The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) of *Mycoplasma pneumoniae*', *Microbiol Res*, 218: 22-31.
- Haab, B. B. 2012. 'Using lectins in biomarker research: addressing the limitations of sensitivity and availability', *Proteomics Clin Appl*, 6: 346-50.
- Hao, Y., L. Zhu, L. Yan, J. Liu, D. Liu, N. Gao, M. Tan, S. Gao, and B. Lin. 2017. 'c-Fos mediates alpha1, 2-fucosyltransferase 1 and Lewis y expression in response to TGF-beta1 in ovarian cancer', *Oncol Rep*, 38: 3355-66.
- Hiraiwa, N., T. Yabuta, K. Yoritomi, M. Hiraiwa, Y. Tanaka, T. Suzuki, M. Yoshida, and R. Kannagi. 2003. 'Transactivation of the fucosyltransferase VII gene by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through a variant cAMP-responsive element', *Blood*, 101: 3615-21.

- Hsu, T. L., S. R. Hanson, K. Kishikawa, S. K. Wang, M. Sawa, and C. H. Wong. 2007. 'Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 2614-9.
- Isozaki, T., M. A. Amin, J. H. Ruth, P. L. Campbell, P. S. Tsou, C. M. Ha, W. A. Stinson, S. E. Domino, and A. E. Koch. 2014. 'Fucosyltransferase 1 mediates angiogenesis in rheumatoid arthritis', *Arthritis Rheumatol*, 66: 2047-58.
- Johnson, S. W., and J. A. Alhadeff. 1991. 'Mammalian alpha-L-fucosidases', *Comp Biochem Physiol B*, 99: 479-88.
- Jones, N., and T. Shenk. 1979. 'Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells', *Cell*, 17: 683-9.
- Kannagi, R. 2002. 'Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes', *Curr Opin Struct Biol*, 12: 599-608.
- Kawai, S., S. Kato, H. Imai, Y. Okada, and C. Ishioka. 2013. 'Suppression of FUT1 attenuates cell proliferation in the HER2-overexpressing cancer cell line NCI-N87', *Oncol Rep*, 29: 13-20.
- Kean, E. L., A. K. Munster-Kuhnel, and R. Gerardy-Schahn. 2004. 'CMP-sialic acid synthetase of the nucleus', *Biochim Biophys Acta*, 1673: 56-65.
- Khare, R., C. Y. Chen, E. A. Weaver, and M. A. Barry. 2011. 'Advances and future challenges in adenoviral vector pharmacology and targeting', *Curr Gene Ther*, 11: 241-58.
- Kindsmuller, K., P. Groitl, B. Hartl, P. Blanchette, J. Hauber, and T. Dobner. 2007. 'Intranuclear targeting and nuclear export of the adenovirus E1B-55K protein are regulated by SUMO1 conjugation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 6684-9.
- King, C. R., A. Zhang, T. M. Tessier, S. F. Gameiro, and J. S. Mymryk. 2018. 'Hacking the Cell: Network Intrusion and Exploitation by Adenovirus E1A', *MBio*, 9.
- Koda, Y., M. Soejima, and H. Kimura. 1997. 'Structure and expression of H-type GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase gene (FUT1). Two transcription start sites and alternative splicing generate several forms of FUT1 mRNA', *J Biol Chem*, 272: 7501-5.
- Kovesdi, I., and S. J. Hedley. 2010. 'Adenoviral producer cells', *Viruses*, 2: 1681-703.
- Lee, S., P. Ghosh, H. Kwon, S. S. Park, G. L. Kim, S. Y. Choi, E. H. Kim, T. D. Tran, S. H. Seon, N. T. Le, H. Iqbal, S. Lee, S. Pyo, and D. K. Rhee. 2018. 'Induction of the pneumococcal vncRS operon by lactoferrin is essential for pneumonia', *Virulence*, 9: 1562-75.
- Li, Q., S. Liu, B. Lin, L. Yan, Y. Wang, C. Wang, and S. Zhang. 2010. 'Expression and correlation of Lewis y antigen and integrins alpha5 and beta1 in ovarian serous and mucinous carcinoma', *Int J Gynecol Cancer*, 20: 1482-9.
- Lichtenstein, D. L., K. Toth, K. Doronin, A. E. Tollefson, and W. S. Wold. 2004. 'Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins', *Int Rev Immunol*, 23: 75-111.
- Lin, H. R., H. Y. Shu, and G. H. Lin. 2018. 'Biological roles of indole-3-acetic acid in *Acinetobacter baumannii*', *Microbiol Res*, 216: 30-39.
- Lin, W. L., Y. S. Lin, G. Y. Shi, C. F. Chang, and H. L. Wu. 2015. 'Lewisy promotes migration of oral cancer cells by glycosylation of epidermal growth factor receptor', *PLoS One*, 10: e0120162.
- Liu, D., J. Liu, B. Lin, S. Liu, R. Hou, Y. Hao, Q. Liu, S. Zhang, and M. Iwamori. 2012.

- 'Lewis y regulate cell cycle related factors in ovarian carcinoma cell RMG-I in vitro via ERK and Akt signaling pathways', *Int J Mol Sci*, 13: 828-39.
- Liu, D., J. Liu, C. Wang, B. Lin, Q. Liu, Y. Hao, S. Zhang, and M. Iwamori. 2011. 'The stimulation of IGF-1R expression by Lewis(y) antigen provides a powerful development mechanism of epithelial ovarian carcinoma', *Int J Mol Sci*, 12: 6781-95.
- Liu, J. J., B. Lin, Y. Y. Hao, F. F. Li, D. W. Liu, Y. Qi, L. C. Zhu, S. L. Zhang, and M. Iwamori. 2010. 'Lewis(y) antigen stimulates the growth of ovarian cancer cells via regulation of the epidermal growth factor receptor pathway', *Oncol Rep*, 23: 833-41.
- Ma, B., J. L. Simala-Grant, and D. E. Taylor. 2006. 'Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes', *Glycobiology*, 16: 158R-84R.
- Markine-Goriaynoff, N., L. Gillet, J. L. Van Etten, H. Korres, N. Verma, and A. Vanderplasschen. 2004. 'Glycosyltransferases encoded by viruses', *J Gen Virol*, 85: 2741-54.
- Miller, D. L., C. L. Myers, B. Rickards, H. A. Coller, and S. J. Flint. 2007. 'Adenovirus type 5 exerts genome-wide control over cellular programs governing proliferation, quiescence, and survival', *Genome Biol*, 8: R58.
- Moehler, T. M., S. Sauer, M. Witzel, M. Andrusis, J. J. Garcia-Vallejo, R. Grobholz, M. Willhauck-Fleckenstein, A. Greiner, H. Goldschmidt, and R. Schwartz-Albiez. 2008. 'Involvement of alpha 1-2-fucosyltransferase I (FUT1) and surface-expressed Lewis(y) (CD174) in first endothelial cell-cell contacts during angiogenesis', *J Cell Physiol*, 215: 27-36.
- Mollicone, R., S. E. Moore, N. Bovin, M. Garcia-Rosasco, J. J. Candelier, I. Martinez-Duncker, and R. Oriol. 2009. 'Activity, splice variants, conserved peptide motifs, and phylogeny of two new alpha1,3-fucosyltransferase families (FUT10 and FUT11)', *J Biol Chem*, 284: 4723-38.
- Moriwaki, K., K. Noda, T. Nakagawa, M. Asahi, H. Yoshihara, N. Taniguchi, N. Hayashi, and E. Miyoshi. 2007. 'A high expression of GDP-fucose transporter in hepatocellular carcinoma is a key factor for increases in fucosylation', *Glycobiology*, 17: 1311-20.
- Munday, D. C., J. A. Hiscox, and J. N. Barr. 2010. 'Quantitative proteomic analysis of A549 cells infected with human respiratory syncytial virus subgroup B using SILAC coupled to LC-MS/MS', *Proteomics*, 10: 4320-34.
- Nemerow, G. R., L. Pache, V. Reddy, and P. L. Stewart. 2009. 'Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies', *Virology*, 384: 380-8.
- Nishihara, S., H. Iwasaki, K. Nakajima, A. Togayachi, Y. Ikehara, T. Kudo, Y. Kushi, A. Furuya, K. Shitara, and H. Narimatsu. 2003. 'Alpha1,3-fucosyltransferase IX (Fut9) determines Lewis X expression in brain', *Glycobiology*, 13: 445-55.
- Noda, K., E. Miyoshi, J. Gu, C. X. Gao, S. Nakahara, T. Kitada, K. Honke, K. Suzuki, H. Yoshihara, K. Yoshikawa, K. Kawano, M. Tonetti, A. Kasahara, M. Hori, N. Hayashi, and N. Taniguchi. 2003. 'Relationship between elevated FX expression and increased production of GDP-L-fucose, a common donor substrate for fucosylation in human hepatocellular carcinoma and hepatoma cell lines', *Cancer Res*, 63: 6282-9.
- Norden, R., K. Nystrom, J. Aurelius, M. Brisslert, and S. Olofsson. 2013. 'Virus-induced

- appearance of the selectin ligand sLeX in herpes simplex virus type 1-infected T-cells: involvement of host and viral factors', *Glycobiology*, 23: 310-21.
- Nystrom, K., A. Grahn, M. Lindh, M. Brytting, U. Mandel, G. Larson, and S. Olofsson. 2007. 'Virus-induced transcriptional activation of host FUT genes associated with neo-expression of Ley in cytomegalovirus-infected and sialyl-Lex in varicella-zoster virus-infected diploid human cells', *Glycobiology*, 17: 355-66.
- Nystrom, K., R. Norden, I. Muylaert, P. Elias, G. Larson, and S. Olofsson. 2009. 'Induction of sialyl-Lex expression by herpes simplex virus type 1 is dependent on viral immediate early RNA-activated transcription of host fucosyltransferase genes', *Glycobiology*, 19: 847-59.
- Palumberi, D., S. Aldi, L. Ermini, M. Ziche, F. Finetti, S. Donnini, and F. Rosati. 2010. 'RNA-mediated gene silencing of FUT1 and FUT2 influences expression and activities of bovine and human fucosylated nucleolin and inhibits cell adhesion and proliferation', *J Cell Biochem*, 111: 229-38.
- Papic, N., C. I. Maxwell, D. A. Delker, S. Liu, B. S. Heale, and C. H. Hagedorn. 2012. 'RNA-sequencing analysis of 5' capped RNAs identifies many new differentially expressed genes in acute hepatitis C virus infection', *Viruses*, 4: 581-612.
- Park, J. G., G. Avila-Perez, F. Madere, T. A. Hilimire, A. Nogales, F. Almazan, and L. Martinez-Sobrido. 2019. 'Potent Inhibition of Zika Virus Replication by Aurintricarboxylic Acid', *Front Microbiol*, 10: 718.
- Perez-Berna, A. J., R. Marabini, S. H. Scheres, R. Menendez-Conejero, I. P. Dmitriev, D. T. Curiel, W. F. Mangel, S. J. Flint, and C. San Martin. 2009. 'Structure and uncoating of immature adenovirus', *J Mol Biol*, 392: 547-57.
- Reguigne-Arnould, I., P. Couillin, R. Mollicone, S. Faure, A. Fletcher, R. J. Kelly, J. B. Lowe, and R. Oriol. 1995. 'Relative positions of two clusters of human alpha-L-fucosyltransferases in 19q (FUT1-FUT2) and 19p (FUT6-FUT3-FUT5) within the microsatellite genetic map of chromosome 19', *Cytogenet Cell Genet*, 71: 158-62.
- Richter, K., C. Koch, A. Perniss, P. M. Wolf, E. K. H. Schweda, S. Wichmann, S. Wilker, I. Magel, M. Sander, J. M. McIntosh, W. Padberg, and V. Grau. 2018. 'Phosphocholine-Modified Lipooligosaccharides of Haemophilus influenzae Inhibit ATP-Induced IL-1beta Release by Pulmonary Epithelial Cells', *Molecules*, 23.
- Rowe, W. P., R. J. Huebner, L. K. Gilmore, R. H. Parrott, and T. G. Ward. 1953. 'Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture', *Proc Soc Exp Biol Med*, 84: 570-3.
- Sanders, D. S., and M. A. Kerr. 1999. 'Lewis blood group and CEA related antigens; coexpressed cell-cell adhesion molecules with roles in the biological progression and dissemination of tumours', *Mol Pathol*, 52: 174-8.
- Schneider, K., L. Wronka-Edwards, M. Leggett-Embrey, E. Walker, P. Sun, B. Ondov, T. H. Wyman, M. J. Rosovitz, S. S. Bohn, J. Burans, and T. Kochel. 2015. 'Psoralen Inactivation of Viruses: A Process for the Safe Manipulation of Viral Antigen and Nucleic Acid', *Viruses*, 7: 5875-88.
- Schneider, M., E. Al-Shareffi, and R. S. Haltiwanger. 2017. 'Biological functions of fucose in mammals', *Glycobiology*, 27: 601-18.
- Schreiner, S., P. Wimmer, and T. Dobner. 2012. 'Adenovirus degradation of cellular

- proteins', *Future Microbiol*, 7: 211-25.
- Schumann, M., and M. Dobbstein. 2006. 'Adenovirus-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylation during the late phase of infection enhances viral protein levels and virus progeny', *Cancer Res*, 66: 1282-8.
- Shakya, A. K., D. J. O'Callaghan, and S. K. Kim. 2019. 'Interferon Gamma Inhibits Varicella-Zoster Virus Replication in a Cell Line-Dependent Manner', *J Virol*.
- Sharma, S., and A. Andersson. 2009. 'Adenovirus E3 proteins help tumors to evade innate and adaptive immune responses', *Cancer Biol Ther*, 8: 1133-5.
- Stein, S. C., and E. Falck-Pedersen. 2012. 'Sensing adenovirus infection: activation of interferon regulatory factor 3 in RAW 264.7 cells', *J Virol*, 86: 4527-37.
- Tagaya, Y., M. Matsuoka, and R. Gallo. 2019. '40 years of the human T-cell leukemia virus: past, present, and future', *F1000Res*, 8.
- Tamanini, A., R. Rolfini, E. Nicolis, P. Melotti, and G. Cabrini. 2003. 'MAP kinases and NF-kappaB collaborate to induce ICAM-1 gene expression in the early phase of adenovirus infection', *Virology*, 307: 228-42.
- Tan, M., L. Zhu, H. Zhuang, Y. Hao, S. Gao, S. Liu, Q. Liu, D. Liu, J. Liu, and B. Lin. 2015. 'Lewis Y antigen modified CD47 is an independent risk factor for poor prognosis and promotes early ovarian cancer metastasis', *Am J Cancer Res*, 5: 2777-87.
- Tang, F., L. Li, X. M. Meng, B. Li, C. Q. Wang, S. Q. Wang, T. L. Wang, and Y. M. Tian. 2019. 'Inhibition of alpha-hemolysin expression by resveratrol attenuates Staphylococcus aureus virulence', *Microb Pathog*, 127: 85-90.
- Taniuchi, F., K. Higai, T. Tanaka, Y. Azuma, and K. Matsumoto. 2013. 'Transcriptional regulation of fucosyltransferase 1 gene expression in colon cancer cells', *ScientificWorldJournal*, 2013: 105464.
- Tateno, H., S. Nakamura-Tsuruta, and J. Hirabayashi. 2009. 'Comparative analysis of core-fucose-binding lectins from Lens culinaris and Pisum sativum using frontal affinity chromatography', *Glycobiology*, 19: 527-36.
- Terao, N., S. Takamatsu, T. Minehira, T. Sobajima, K. Nakayama, Y. Kamada, and E. Miyoshi. 2015. 'Fucosylation is a common glycosylation type in pancreatic cancer stem cell-like phenotypes', *World J Gastroenterol*, 21: 3876-87.
- Tian, L., D. Shen, X. Li, X. Shan, X. Wang, Q. Yan, and J. Liu. 2016. 'Ginsenoside Rg3 inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion of lung cancer by down-regulating FUT4', *Oncotarget*, 7: 1619-32.
- Varki, Ajit. 2009. *Essentials of glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y.).
- Villar-Portela, S., L. Muinelo-Romay, E. Cuevas, E. Gil-Martin, and A. Fernandez-Briera. 2013. 'FX enzyme and GDP-L-Fuc transporter expression in colorectal cancer', *Histopathology*, 63: 174-86.
- Vorburger, S. A., and K. K. Hunt. 2002. 'Adenoviral gene therapy', *Oncologist*, 7: 46-59.
- Wang, A., C. Lu, Z. Ning, W. Gao, Y. Xie, N. Zhang, J. Liang, F. S. Abbasi, Q. Yan, and J. Liu. 2017. 'Tumor-associated macrophages promote Ezrin phosphorylation-mediated epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma through FUT4/LeY up-regulation', *Oncotarget*, 8: 28247-59.
- Wiese, T. J., J. A. Dunlap, and M. A. Yorek. 1994. 'L-fucose is accumulated via a specific transport system in eukaryotic cells', *J Biol Chem*, 269: 22705-11.

- Wimmer, P., P. Blanchette, S. Schreiner, W. Ching, P. Groitl, J. Berscheminski, P. E. Branton, H. Will, and T. Dobner. 2013. 'Cross-talk between phosphorylation and SUMOylation regulates transforming activities of an adenoviral oncoprotein', *Oncogene*, 32: 1626-37.
- Xiang, T., G. Yang, X. Liu, Y. Zhou, Z. Fu, F. Lu, J. Gu, N. Taniguchi, Z. Tan, X. Chen, Y. Xie, F. Guan, and X. L. Zhang. 2017. 'Alteration of N-glycan expression profile and glycan pattern of glycoproteins in human hepatoma cells after HCV infection', *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1861: 1036-45.
- Yan, L., B. Lin, L. Gao, S. Gao, C. Liu, C. Wang, Y. Wang, S. Zhang, and M. Iwamori. 2010. 'Lewis (y) antigen overexpression increases the expression of MMP-2 and MMP-9 and invasion of human ovarian cancer cells', *Int J Mol Sci*, 11: 4441-52.
- Yang, X., S. Liu, and Q. Yan. 2013. 'Role of fucosyltransferase IV in epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells', *Cell Death Dis*, 4: e735.
- Zerfaoui, M., M. Fukuda, V. Sbarra, D. Lombardo, and A. El-Battari. 2000. 'alpha(1,2)-fucosylation prevents sialyl Lewis x expression and E-selectin-mediated adhesion of fucosyltransferase VII-transfected cells', *Eur J Biochem*, 267: 53-61.
- Zhang, D., J. Gao, L. Zhu, Z. Hu, R. Hou, S. Liu, M. Tan, J. Liu, and B. Lin. 2013. 'Chemoresistance is associated with MUC1 and Lewis y antigen expression in ovarian epithelial cancers', *Int J Mol Sci*, 14: 11024-33.
- Zhou, W., H. Ma, G. Deng, L. Tang, J. Lu, and X. Chen. 2017. 'Clinical significance and biological function of fucosyltransferase 2 in lung adenocarcinoma', *Oncotarget*, 8: 97246-59.
- Zhuang, H., M. Tan, J. Liu, X. Li, J. Gao, Z. Hu, L. Deng, L. Zhu, and B. Lin. 2015. 'The expression of annexin II and Lewis y antigen in ovarian epithelial tumors and the correlation between them', *Tumour Biol*, 36: 2343-9.