



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Análisis de la capacidad de las proteínas E1B-55K y DBP de adenovirus de inducir separación de fases líquido-líquido.”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Carla Alejandra Zúñiga Enríquez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ramón A. González García-Conde

[CIDC/UAEM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Alejandra Covarrubias Robles

[IBT/UNAM](#)

Dr. Carlos Amero Tello

[CIQ/UAEM](#)

Ciudad de México. Mayo, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS .....</b>	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
<i>Generalidades de los Adenovirus.....</i>	<i>8</i>
<i>Estructura y genoma.....</i>	<i>9</i>
<i>Ciclo de replicación y productos de los genes virales .....</i>	<i>11</i>
<i>Replicación del genoma viral.....</i>	<i>16</i>
<i>Compartimentos de replicación.....</i>	<i>18</i>
<i>Dominios Nucleares y LLPS.....</i>	<i>18</i>
<i>LLPS in vitro .....</i>	<i>21</i>
<i>La proteína E1B-55K .....</i>	<i>24</i>
<i>La proteína DBP .....</i>	<i>27</i>
<i>Dinámica de DBP en RC .....</i>	<i>29</i>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>33</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<i>Construcciones para expresión de E1B-55K en bacterias.....</i>	<i>33</i>
<i>Células competentes .....</i>	<i>33</i>
<i>Cepas y plásmidos.....</i>	<i>34</i>
<i>Sistema de plásmidos pET .....</i>	<i>34</i>
<i>Extracción de DNA plasmídico y cortes con enzimas de restricción .....</i>	<i>35</i>
<i>Mini Preps.....</i>	<i>35</i>

<i>Linearización y digestión</i> .....	36
<i>Transformación de bacterias</i> .....	36
<i>Gliceroles</i> .....	36
<i>Pruebas de viabilidad y resistencia</i> .....	36
<i>Análisis de expresión y enriquecimiento</i> .....	37
<i>SDS-PAGE</i> .....	37
<i>Inmunotransferencia</i> .....	38
<i>Cromatografía de intercambio catiónico</i> .....	39
<i>Enriquecimiento de DBP</i> .....	39
<i>Células infectadas</i> .....	39
<i>Cromatografía de afinidad</i> .....	39
<i>Ensayos LLPS</i> .....	41
<i>Predicción de LLPS</i> .....	41
<i>Ensayos de LLPS in vitro con la proteína DBP</i> .....	41
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
<i>Expresión y enriquecimiento de la E1B-55K</i> .....	43
<i>La E1B-55K no se predice como candidata de LLPS</i> .....	50
<i>Expresión y enriquecimiento de la proteína DBP</i> .....	51
<i>Expresión de DBP en E. coli</i> .....	51
<i>Expresión de DBP en células infectadas con AdV</i> .....	54
<i>Ensayos de LLPS in vitro</i> .....	58
<i>Lisado de células infectadas con AdV mCh-DBP</i> .....	58
<i>Proteína DBP enriquecida por cromatografía de afinidad</i> .....	58
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>64</b>
<b>RESUMEN DE RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>68</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>68</b>
<b>FIGURAS SUPLEMENTARIAS</b> .....	<b>69</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>72</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <b>Estructura y componentes del virión</b> .....	10
Figura 2 <b>Organización del genoma</b> .....	11
Figura 3 <b>Ciclo de replicación de Adenovirus</b> .....	15
Figura 4 <b>Replicación del genoma de Adenovirus</b> .....	17
Figura 5 <b>Experimentos LLPS <i>in vitro</i> con la región de baja complejidad de la proteína FUS</b> .....	23
Figura 6 <b>Cinética de formación de los RC</b> .....	25
Figura 7 <b>Posibles características estructurales de E1B-55K</b> .....	26
Figura 8 <b>Predicción del desorden de DBP</b> .....	27
Figura 9 <b>Esquema de la proteína DBP</b> .....	28
Figura 10 <b>Resultados de predicción de DBP y sus dominios para LLPS usando PSPredictor</b> .....	29
Figura 11 <b>Distribución de DBP a lo largo del ciclo de replicación de AdV</b> .....	30
Figura 12 <b>Características de los RC analizados mediante mCherry-DBP</b> .....	32
Figura 13 <b>Construcción del plásmido pET-27b(+)<math>\Delta</math></b> .....	44
Figura 14 <b>Transformación de C43 con el plásmido pET-27b(+)<math>\Delta</math></b> .....	45
Figura 15 <b>Prueba de viabilidad C43</b> .....	46
Figura 16 <b>Prueba de permanencia de plásmidos pET 27-b(+)</b> .....	47
Figura 17 <b>Pruebas de inducción de expresión de los dominios de E1B con el sistema de plásmidos pET-27b(+)</b> .....	49
Figura 18 <b>Predicción de LLPS para la E1B-55K con PSPredictor</b> .....	50
Figura 19 <b>Prueba de inducción con el plásmido 2744 E2A-pCMX3</b> .....	52
Figura 20 <b>Paso de la muestra compleja de E. coli BL21(DE3)-2744 E2A-pCMX3 por cromatografía de intercambio catiónico</b> .....	54
Figura 21 <b>Detección de mCh-DBP en lisados de células infectadas con AdV mCh-DBP</b> .....	55
Figura 22 <b>Enriquecimiento de la proteína mCh-DBP por cromatografía de afinidad</b> ...	57
Figura 23 <b>Condición 200 mM NaCl de la prueba de LLPS <i>in vitro</i> con mCh-DBP enriquecida 1</b> .....	60
Figura 24 <b>Condición 200 mM NaCl de la prueba de LLPS <i>in vitro</i> con mCh-DBP enriquecida 2</b> .....	62
Figura 25 <b>Resumen de estructuras predominantes encontradas en los ensayos de formación de gotas <i>in vitro</i></b> .....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura Suplementaria 1 <b>Prueba LLPS <i>in vitro</i> con lisado de células infectadas con mCh-DBP</b> .....	69
Figura Suplementaria 2 <b>Prueba LLPS <i>in vitro</i> con muestra enriquecida de mCh-DBP 1</b> .....	70
Figura Suplementaria 3 <b>Prueba LLPS <i>in vitro</i> con muestra enriquecida de mCh-DBP 2.</b> .....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <b>Condiciones probadas para ensayos de LLPS <i>in vitro</i></b> .....	42
Tabla 2 <b>Condiciones probadas en pruebas de inducción para las proteínas correspondientes a los dominios de E1B.</b> .....	48

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

a.a		Amino ácido
AdV		Adenovirus
AdV mCh-DBP		Adenovirus que expresa la proteína de fusión mCherry-DBP
ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis	Esclerosis lateral amiotrófica
BMCs	Bio Molecular Condensates	Condensados biomoleculares
CMV		Citomegalovirus
CTLs	Citotoxic T Lymphocytes	Linfocitos T Citotóxicos
DBP	DNA Binding Protein	Proteína de unión a DNA
DIC	Differential Interference Contrast	Contraste de interferencia diferencial
DO		Densidad Óptica
dsDNA	double stranded DNA	DNA de doble cadena
E1B		Proteína Adenoviral E1B-55 K
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching	Recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueo
FT	Flow Through	
FTD	FrontoTemporal Dementia	Demencia fronto temporal
FUS	Fused in Sarcoma	
hpi		horas post infección
h.p.i		horas post inducción
HAdV	Human Adenovirus	Adenovirus humano
IDPs	Intrinsically Disordered Proteins	Proteínas intrínsecamente desordenadas
IDRs	Intrinsically Disordered Regions	Regiones intrínsecamente desordenadas
IPTG		deisopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
ITRs	Inverted Terminal Repeats	Repeticiones terminales invertidas
L4P	L4 Promoter	Promotor L4
LCR	Low Complexity Region	Región de baja complejidad
LLPS	Liquid-Liquid Phase Separation	Separación de fases líquido líquido
mCh-DBP		Proteína mCherry fusionada al N-terminal de DBP
MHC-1	Major Histocompatibility Complex 1	Complejo mayor de histocompatibilidad 1
MLP	Major Late Promoter	Promotor principal tardío
MLTU	Major Late Transcription Unit	Unidad transcripcional tardía principal
MTOC	Microtubule Organizing Center	Centro organizador de microtúbulos
NK	Natural Killers	
NPC	Nuclear Pore Complex	Complejo del poro nuclear
O/N	Over Night	
ORF	Open Reading Frame	Marco abierto de lectura
pI		punto isoeléctrico
pol		polimerasa viral
PRZ	Periferial Replication Zone	Zona periférica de replicación
pTP	pre Terminal Protein	pre Proteína terminal
RC	Replication Compartments	Compartimentos de replicación
RID		Receptor de internalización y degradación
RNP		Motivo de unión a RNA
ROI	Region Of Interest	Región de interés
ssDNA	single stranded DNA	DNA de cadena sencilla
TNF	Tumor Necrosis Factor	Factor de Necrosis Tumoral
TU	Transcription Unit	Unidad transcripcional
VA-RNA	Virus Associated RNA	RNA asociado a virus
VC		Volumen de Columna
vDNA	viral DNA	DNA viral
VSV	Vesicular Stomatitis Virus	Virus de la estomatitis vesicular

## ABSTRACT

The replication compartments (RC) are nuclear domains induced during adenoviral infection. In these membrane-less sites are located the viral genome and the viral and cellular proteins involved in the viral genome replication and transcription. Although the mechanism of the RCs formation is unknown, these condensates have characteristics previously reported for membrane-less macromolecular condensates (BMCs) whose formation is driven through the liquid-liquid phase separation (LLPS) mechanism.

LLPS is characterized by the condensation of some components in a dense phase with liquid properties. The BMCs display droplet-like structures that can fuse and divide, also they dynamically interchange components with their surroundings. The condensation of these components is favoured due multivalent interactions between protein-protein and protein-nucleic acids in a particular concentration where these interactions are favoured upon the interactions with the milieu. The proteins that undergo LLPS are commonly intrinsically disordered proteins (IDPs) or proteins with intrinsically disordered regions (IDRs) or low complexity domains (LCR).

One protein that seems to play a role in the efficient formation of Ad-RCs is the E1B-55K. The N-terminal and C-terminal regions of this protein have been predicted as IDRs and the central region has an RNA interaction motif. On the other hand, one of the most abundant proteins of the Ad-RCs is the ssDNA binding protein (DBP). The N-terminal region of DBP has also been predicted as IDR with a LCR rich in prolines and this protein is involved directly in the viral genome replication so it is known that it interacts with nucleic acids. Recently DBP was predicted as a scaffold protein that can drive LLPS and in our research group, we recently found that DBP is part of the assembly of BMCs in infected and transfected cells. In the present work, we wished to determine whether E1B-55K and DBP can form droplet-like structures *in vitro*.



## RESUMEN

Los compartimentos de replicación (RC) son dominios nucleares inducidos durante la infección de adenovirus, en los que se encuentra el genoma y las proteínas virales y celulares que se encargan de la replicación del DNA y la transcripción y procesamiento postranscripcional de los RNAs virales. Aunque se desconoce el mecanismo por el que inicia la formación de los RC, estos dominios presentan características previamente reportadas para organelos no delimitados por membrana cuya formación inicia mediante un mecanismo denominado, separación de fases líquido-líquido (LLPS). El fenómeno de separación de fases se caracteriza por la condensación de componentes en una fase densa que asemeja gotas líquidas. La condensación se favorece por interacciones multivalentes entre ácidos nucleicos y proteínas, a una concentración en la que los componentes son mejores solventes para sí mismos que el medio circundante. En estas condiciones las moléculas que los constituyen forman coacervados que se separan en compartimentos, pero puede haber intercambio de sus componentes con el medio. Las interacciones multivalentes responsables de la LLPS ocurren entre proteína-proteína y proteína-ácidos nucleicos. Las proteínas que participan en estas interacciones son comúnmente proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) o proteínas con regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs). Adicionalmente, al sobrepasar el umbral de concentración que favorece la LLPS se ha reportado un fenómeno de envejecimiento en el cual la fase separada se vuelve aún más densa y pierde sus propiedades líquidas, describiéndose mejor como una estructura con propiedades de gel que es menos dinámica. Dos de las proteínas que se encuentran en los RC de adenovirus son la DBP y E1B-55K. Las regiones amino y carboxilo de E1B-55K están predichas como IDRs y en la región central, la proteína tiene un motivo de interacción con RNA y un motivo putativo de dedo de Zinc; la proteína se asocia y es necesaria para la adecuada formación de los RC. Por su parte, DBP es una de las proteínas virales de mayor abundancia en los RC, su dominio C-terminal interacciona con ácidos nucleicos (ssDNA, dsDNA y RNA) y se ha predicho recientemente que su dominio N-terminal es una IDR y que es candidata para separar fases. Además, datos del laboratorio muestran que los RC en los que se encuentra DBP en células infectadas tienen morfología esférica, y se fusionan y fisiónan. Por otra parte, datos obtenidos con experimentos de FRAP siguiendo la señal de fluorescencia de una fusión de mCherry al N-terminal de DBP mostraron que el coeficiente de difusión de DBP en los RC corresponden

a valores que han sido descritos para otras proteínas que participan en LLPS. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó si las proteínas E1B-55K y DBP inducen LLPS.

## INTRODUCCIÓN

### *Generalidades de los Adenovirus*

Los adenovirus (AdV) son agentes etiológicos de distintas enfermedades, infectan epitelios de las vías respiratorias, gastrointestinales y de la conjuntiva [1]. Estos agentes infecciosos son responsables del 5-10% de las enfermedades respiratorias agudas, aproximadamente el 20% de las gastroenteritis virales infantiles y pueden llegar a ser fatales en pacientes inmunocomprometidos [2], [3]. En el caso de adenovirus humano 36 (HAdV36) se ha propuesto como agente etiológico de obesidad ya que puede promover adipogénesis [4].

El estudio detallado de los AdV ha contribuido a la comprensión de varios procesos celulares, entre los que están, el control del ciclo celular, la expresión y regulación de genes y el procesamiento de los mRNA por *splicing*, entre otros [5].

Además, gracias al estudio detallado de la biología de estos virus, que su genoma es fácil de modificar, que pueden producir títulos virales altos, que infectan múltiples tipos celulares y presentan baja patogenicidad, los AdV se han usado para desarrollar terapias génica y anticáncer [6], y se han utilizado como plataformas para vacunas, las más recientes contra el SARS-CoV2 [7].

Los AdV pertenecen a la familia Adenoviridae, infectan vertebrados y se clasifican en cinco géneros [8]. Los Aviadenovirus, que infectan aves; los Siadenovirus, denominados así porque su genoma codifica para una sialidasa, e infectan reptiles y aves; los Atadenovirus nombrados así por su alto contenido de Adenina y Timina, infectan aves, marsupiales y reptiles; los Ichtadenovirus, que infectan peces; y los Mastadenovirus, que infectan mamíferos, e incluyen los 104 tipos de AdV que infectan humanos (HAdV). Los HAdV se clasifican en siete especies de la A-G [8]. Los tipos más estudiados son HAdV2 y HAdV5 de la especie C (HAdV-C2 y HAdV-C5), que fueron de los primeros tipos aislados y no son oncogénicos, por lo que se han usado como plataformas para las terapias arriba mencionadas.

## ***Estructura y genoma***

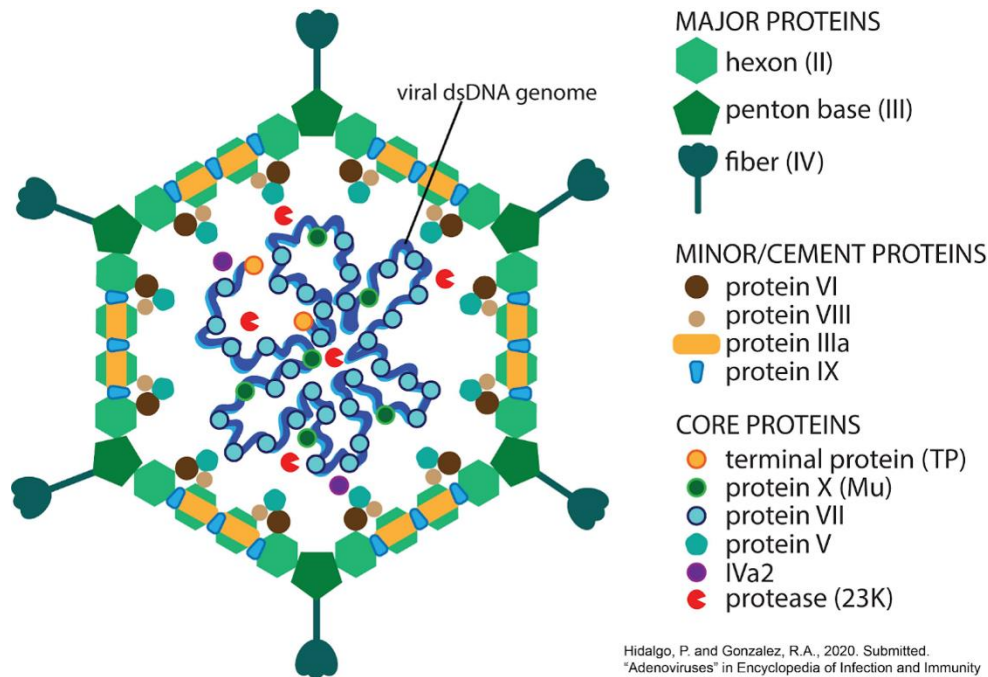
Las partículas virales tienen estructura icosaédrica y no se encuentran envueltas por membrana lipídica, el tamaño de la partícula viral es de 60-90 nm de diámetro (Figura 1). Su genoma es una molécula de DNA de doble cadena lineal (dsDNA) con un tamaño de aproximadamente 36 kb para HAdV-C5 que es el virus con el que se trabajó durante este proyecto [1].

La partícula viral está conformada por las siguientes proteínas estructurales. La proteína II (967 aminoácidos (a.a)) conocida como hexón es la más abundante y se encuentra organizada en 240 trímeros. La proteína III, conocida como pentón (571 a.a), se asocia con la proteína IV (528 a.a) conocida como fibra; la proteína fibra forma las espículas que protruyen de cada uno de los 12 vértices de la partícula. La proteína fibra está conformada por tres dominios y su dominio globular C-terminal interacciona con el receptor de la célula hospedera [9].

En la superficie interna de la cápside se encuentran asociadas las proteínas IX (139 a.a), IIIa (585 a.a), VI (217 a.a) y VIII (134 a.a) que estabilizan la cápside y se asocian con el *core*. El *core* interno se compone de las proteínas V (368 a.a), VII (174 a.a), Mu (36 a.a) y la TP (671 a.a) (proteína terminal por sus siglas en inglés). Las proteínas del *core*, excepto TP, tienen alto contenido de Argininas, lo cual les confiere carga positiva y la propiedad de interactuar con las cargas negativas del genoma viral. La TP se encuentra covalentemente unida a los extremos 5' del genoma viral y funciona como *primer* durante la replicación del genoma viral que se describirá más adelante.

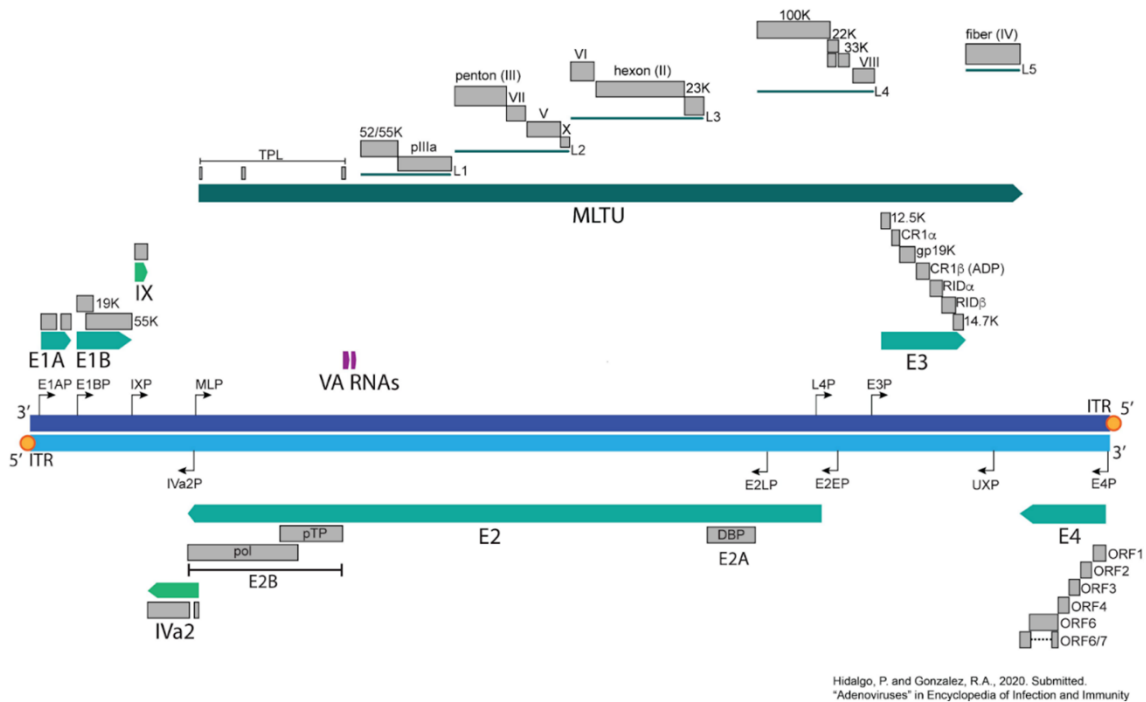
Además, la proteasa viral L3 23K se encuentra dentro de la partícula viral; esta interviene en la maduración de la partícula viral al cortar los precursores (p) de las proteínas pIIIa, pVI, pVII, pVIII, pMu y pTP. La L3 23K también promueve el desensamble y liberación de la partícula viral en el endosoma durante la entrada de la partícula viral a la célula infectada. Finalmente, la proteína IVa2 que participa en

el empaquetamiento del DNA viral y como factor transcripcional también se encuentra dentro de la partícula [9] (Figura 1).



**Figura 1 Estructura y componentes del virión.** Esquema de la estructura de la partícula de adenovirus y los componentes que conforman la cápside y nucleocápside. Imagen tomada de Hidalgo P. & Gonzalez R.A., 2020

El genoma del virus se divide en 5 unidades transcripcionales (TU) cuya regulación es cronológica, las TU tempranas (E1A, E1B, E2, E3 y E4), cuatro TU intermedias (IX, IVa2, L4 intermedio y E2 tardío) y una unidad transcripcional principal tardía (MLTU por sus siglas en inglés) que se agrupa en cinco familias de mRNA (L1-L5) definidas por distintos sitios de poliadenilación, lo que resulta en mRNAs que son todos procesados por *splicing* alternativo. Todas estas TU son transcritas por la RNA polimerasa II. Adicionalmente, hay dos genes denominados VA-RNAI y VA-RNAII transcritos por la RNA polimerasa III, que producen dos RNAs Asociados a Virus (VA por sus siglas en inglés); la función de estos RNAs es regular la síntesis eficiente de proteínas virales por inhibición de PKR [1] (Figura 2).



**Figura 2 Organización del genoma.** Esquema que muestra las TUs que conforman al genoma de adenovirus, en azul aqua, verde y verde azulado se muestran las TUs transcritas por la RNA pol II, que son las TU tempranas, tempranas tardías y la MLTU respectivamente. En morado se muestran los genes transcritos por la RNA pol III. Las barras grises muestran las proteínas codificadas en cada TU. Las flechas indican el sentido de la transcripción. En los extremos del genoma se representan los ITR y el círculo naranja unido a los extremos 5' representa a la proteína TP. Hidalgo P. & González R.A., 2020.

## Ciclo de replicación y productos de los genes virales

Por convención, el ciclo de replicación de los virus de DNA se divide en una fase temprana y una fase tardía. Éstas se separan por el inicio de la replicación del DNA viral.

El ciclo de replicación de Ad inicia con la interacción de la proteína fibra de la partícula viral y el receptor CAR (Receptor Coxsackie y Adenovirus por sus siglas en inglés), que es una proteína transmembranal, componente de las uniones

estrechas de la célula. Una vez unida la partícula viral a la superficie celular, la proteína pentón de la cápside viral interacciona con las integrinas  $\alpha\beta3$  y  $\alpha\beta5$ , lo que resulta en la endocitosis mediada por clatrina de la partícula viral. Las proteínas fibra se disocian completamente de la proteína pentón en los endosomas tempranos. Posteriormente, se disocian los trímeros de hexón y los vértices de pentón, liberando a las proteínas IIIa, VI y VIII. En la disociación de la cápside y la desestabilización de la membrana del endosoma, participan la proteasa 23K y la proteína VI; la 23K se activa por la acidificación del endosoma y su activación resulta en el desensamble de la cápside viral. Por su parte, la proteína VI facilita la lisis del endosoma liberando la nucleocápside hacia el citosol.

Una vez en el citosol, la nucleocápside es transportada por dineína hacia el centro organizador de microtúbulos (MTOC) y posteriormente, al complejo del poro nuclear (NPC). En el NPC, la nucleocápside se asocia con la nucleoporina NUP214/CAN y el genoma viral unido a la proteína VII y TP ingresa al núcleo por medio de las importinas Imp7 y Transportina [1], [10].

Una vez que el genoma viral entra al núcleo, se establecen las condiciones para favorecer la expresión de los genes virales y la replicación del genoma viral. Inicia la transcripción de la TU E1A que tiene un promotor constitutivamente activo. De esta TU se transcriben dos mRNAs que son procesados por *splicing* alternativo y diferenciados por su coeficiente de sedimentación como 12S y 13S, que codifican para las proteínas E1A 248R y E1A 289R, respectivamente. Las proteínas E1A tienen múltiples funciones. Por una parte, activan la transcripción del resto de las TUs, además, E1A interacciona con MED23 que es parte del complejo mediador de la transcripción. Esta interacción incrementa el ensamble de complejos de pre-inicio de la transcripción y estimula la elongación de la transcripción [11]. E1A induce la entrada a fase S del ciclo celular al asociarse a la proteína de retinoblastoma resultando en la liberación del factor transcripcional E2F. E2F activa los genes celulares de fase S requeridos para la síntesis de DNA y duplicación del contenido celular [1], [11].

Como respuesta al efecto genotóxico provocado por E1A, se activan defensas celulares como la estabilización del supresor tumoral p53 y la subsecuente activación de la apoptosis. Para contrarrestar estas respuestas celulares las proteínas codificadas en la TU viral E1B inhiben esta respuesta. E1B-19 kDa se une a proteínas celulares proapoptóticas como BAK y BAX, inhibe su oligomerización y por tanto evita que se formen poros en la membrana externa de la mitocondria, la liberación de citocromo C y por consiguiente se evita la activación de la vía intrínseca de las caspasas [11].

Por otro lado, E1B-55K contrarresta el efecto antiviral del hospedero mediante dos mecanismos distintos. El primer mecanismo es la inhibición de la expresión de los genes celulares de la respuesta a interferón. El segundo es la formación de un complejo E3-ubiquitina ligasa, conformado por E1B-55K, el producto E4Orf6 de la TU viral E4 y las proteínas celulares Culina 5, Rbx1 y las Elonginas B y C. Esto resulta en la poliubiquitinación y subsecuente degradación de distintos factores antivirales como el complejo MRN y p53. Por otro lado, E1B-55K también funciona como una E3-SUMO ligasa de p53 y Mre11, lo que promueve su asociación a los cuerpos nucleares de PML y su posterior relocalización a los compartimentos de replicación (RC) virales de los que se hablará más adelante.

En conjunto la expresión de E1A y E1B establecen las condiciones para que la célula infectada entre a un estado proliferativo y no pueda morir por apoptosis, lo que permite que aumente la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos que resulta en la producción eficiente de progenie viral.

La unidad transcripcional E2 codifica para las proteínas virales necesarias para la replicación del genoma viral. Esta unidad transcripcional tiene dos promotores que son activos en la fase temprana (E2E) o tardía (E2L). Se sintetizan dos transcritos procesados por *splicing*, definidos por distintos sitios de poliadenilación (E2A y E2B). La proteína de unión a DNA de cadena sencilla (DBP) está codificada en el transcrito E2A y la polimerasa (pol) y la pre-proteína terminal (pTP) están codificadas en E2B. Más adelante se describirá la función de cada una de estas proteínas durante la replicación del genoma viral [1].

Las proteínas codificadas en la TU E3 modulan la respuesta inmune del hospedero. La TU E3 codifica para proteínas nombradas por su masa molecular (E3-10.4K, E3-14.5K y E3 gp19K). La E3 gp19K es una glicoproteína que se une a la cadena pesada del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1 (MHC-1) e inhibe su transporte y traslocación a la membrana celular y por tanto, el reconocimiento de la célula infectada por los linfocitos T citotóxicos (CTLs) y *Natural Killers* (NK) [12]. El complejo protéico E3-10.4K/14.5K, conocido como receptor de internalización y degradación (RID), inhibe la apoptosis inducida por Fas [13] y la proteína 14.7K inhibe la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF) [14].

Las proteínas de E4 se denominan dependiendo del marco abierto de lectura (ORF) del mRNA y su procesamiento por *splicing*, son denominadas E4Orf 1, 3, 4, 6 y 6/7. Cada proteína tiene actividades distintas, E4Orf1 y E4Orf4 activan a la cinasa mTOR y esto resulta en el aumento de la síntesis proteica. La proteína E4Orf3 relocaliza a componentes de los cuerpos nucleares de PML y el complejo MRN, lo que resulta en la inhibición de la respuesta a daño en dsDNA. La E4Orf6 junto con la E1B-55K ensambla el complejo ubiquitina ligasa antes descrito, resultando en la degradación de proteínas celulares por el proteosoma. El producto de E4Orf6/7 dimeriza al factor E2F incrementando su afinidad por el promotor viral E2E, lo que promueve su transcripción [1].

La fase tardía del ciclo de replicación viral inicia con la replicación del genoma viral y con esto se activa la transcripción de los genes de la MLTU. Esta TU tiene dos promotores: el promotor L4 (L4P) y el promotor principal tardío (MLP). El L4P es estimulado por la expresión y acumulación de los productos tempranos E1A, E4 Orf3 y los tempranos retrasados, IVa2 y IX. Este promotor dirige la expresión de los genes L4-22K y L4-23K [15] que activan al MLP, la actividad de este promotor aumenta y se producen los transcritos de las familias tardías L1-L5 que codifican principalmente para proteínas estructurales y proteínas que se requieren para el ensamblaje de las cápsidas virales. Posteriormente, se encapsida al genoma y la progenie viral es liberada mediante lisis celular, resultando en la producción de hasta  $10^5$  partículas virales por célula [1] (Figura 3).



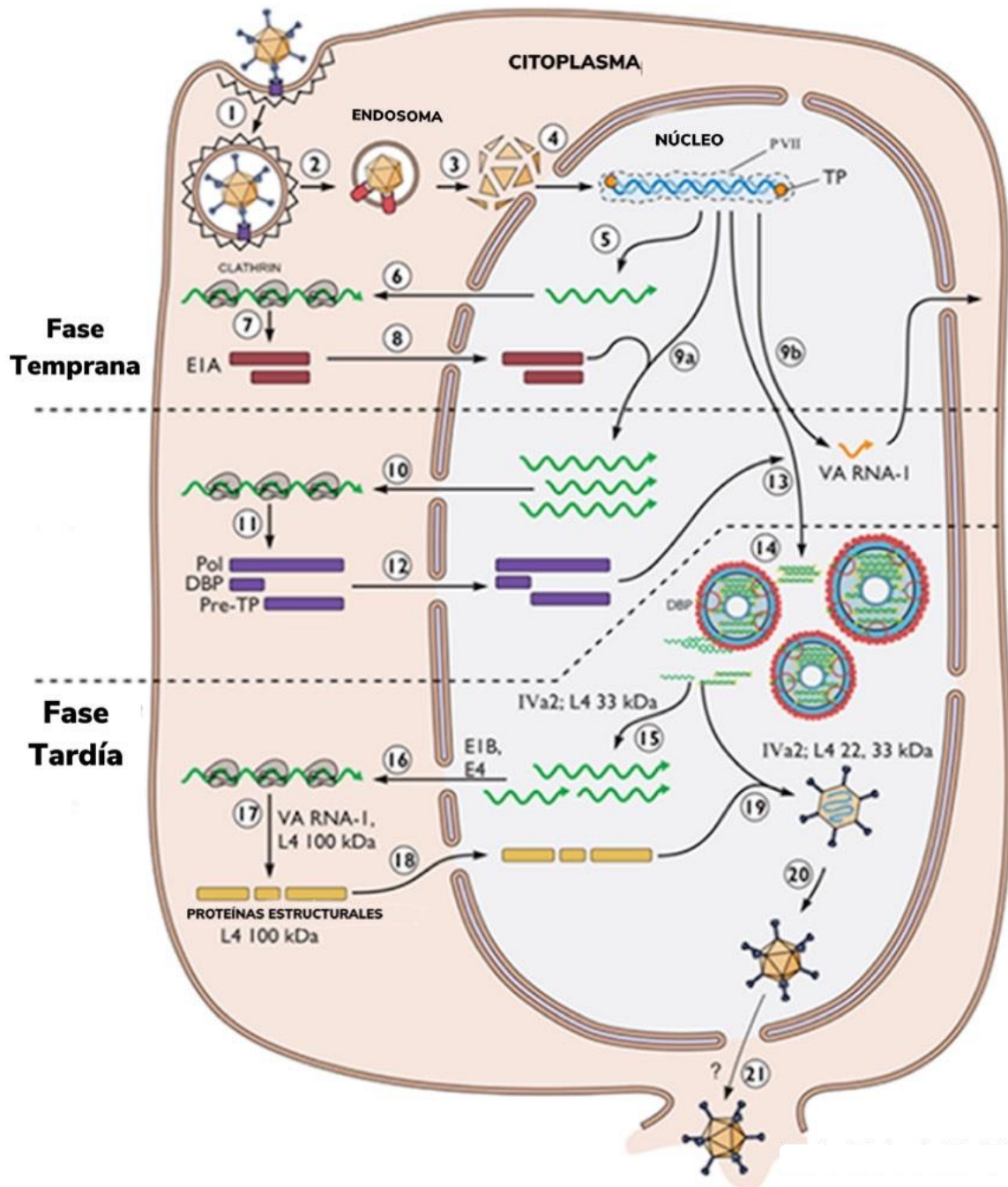
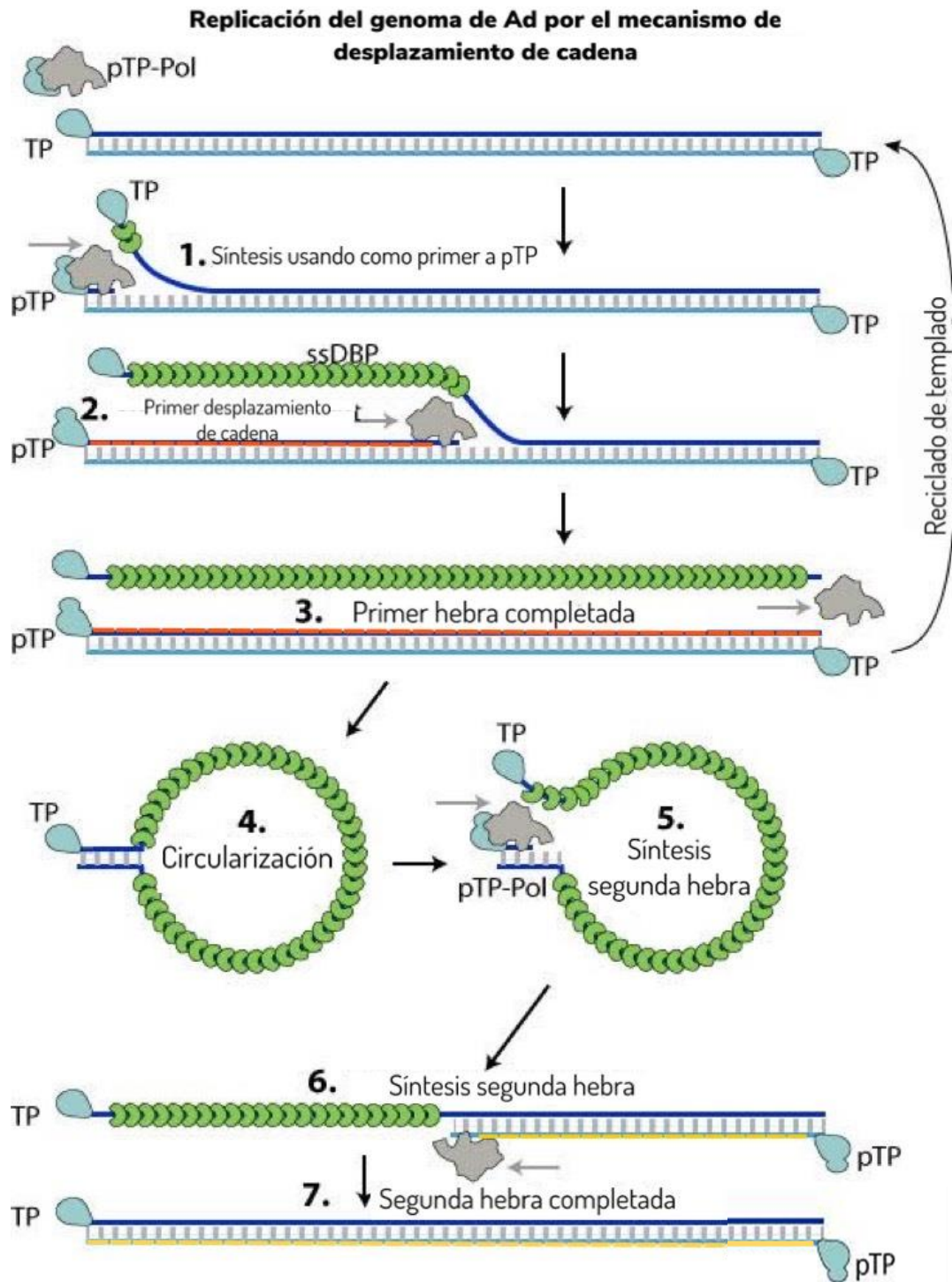


Figura 3 **Ciclo de replicación de Adenovirus**. Se muestran el ciclo completo, desde la unión de la partícula viral (1), hasta la liberación de las partículas virales por lisis celular (21). Las líneas punteadas indican la fase temprana y tardía del ciclo viral y los círculos en (14) representan la formación de los compartimentos de replicación (RC) de los que se hablará más adelante. Modificado de Flint, 2019.

### ***Replicación del genoma viral***

La replicación del genoma de AdV se lleva a cabo mediante el mecanismo de desplazamiento de cadena, una hebra del genoma de dsDNA es copiada mientras la otra es desplazada (Figura 4). Los ITRs (*Internal Terminal Repeats* por sus siglas en inglés) son secuencias en los extremos del genoma que funcionan como orígenes de replicación del DNA y permiten la circularización del genoma por complementariedad de bases del DNA de cadena sencilla. A una de las cadenas se une el complejo de pre-inicio de la replicación que incluye a la pTP y a la polimerasa virales (#1 en Figura 4). Una vez formado el complejo de pre-inicio, la polimerasa adiciona un dCMP a la serina 580 de la proteína pTP y esa citosina es complementaria al primer residuo de guanina en el extremo del ITR [16]. La formación de este complejo pTP-dCMP expone hidroxilo libre que funciona como cebador y se replica una cadena parental completa (#2-3). Por su parte, la proteína de unión a DNA de cadena sencilla (DBP) tiene propiedades desestabilizadoras de la doble hélice [17], es necesaria para la elongación [18] y se une de manera cooperativa a la cadena desplazada y la protege de degradación por nucleasas. Los ITRs permiten la circularización de la cadena desplazada (#4) y la formación de una estructura secundaria conocida como *Panhandle*, que crea un extremo que es reconocido por la maquinaria de replicación y se sintetiza la segunda copia del genoma (#5-7) [5]. La replicación del genoma viral se lleva a cabo en sitios intranucleares, cuya formación se induce durante la infección, denominados compartimentos de replicación (RC).



*Figura 4 Replicación del genoma de Adenovirus. Esquema representativo de la replicación de Adenovirus por el mecanismo de desplazamiento de cadena. DBP representado en verde. Las cadenas parentales representadas en escala de azul y las cadenas hijas representadas en escala de rojo. Modificado de Viral Zone, 2019.*

## ***Compartimentos de replicación***

Como se mencionó antes, la replicación del genoma viral se lleva a cabo en los RC. La formación de estos sitios es inducida durante la infección, resultado de la reorganización de componentes del núcleo de la célula infectada. Los RC no están delimitados por membrana y en estos dominios nucleares se encuentran las proteínas virales y celulares necesarias para la síntesis de DNA viral, así como la transcripción y procesamiento postranscripcional de los RNAs virales. Además, en estos sitios se concentran factores de la respuesta antiviral de la célula, por lo que se sugiere que funcionan como centros de control para las interacciones virus-célula que promueven la replicación viral eficiente y simultáneamente contrarrestan respuestas antivirales [19]–[21].

Los RC están a su vez compartimentalizados. Por microscopía electrónica y de fluorescencia se determinó que en el centro se localiza el dsDNA que no está siendo transcrito ni replicado, alrededor se encuentra una zona rica en ssDNA y la proteína DBP, y rodeando esta zona se identifica la zona periférica de replicación (PRZ por sus siglas en inglés) en donde hay sitios de replicación y transcripción activos. Dicha compartimentalización de los RC se ha descrito en distintos tipos celulares [22], [23], y más adelante se describirán distintas morfologías de los RC cuando se analiza la distribución de las proteínas DBP y E1B-55K.

Sin embargo, a pesar de la importancia de estos sitios como centros reguladores de las interacciones virus-célula, aún no se establece cuáles son los mecanismos que llevan a su formación.

## ***Dominios Nucleares y LLPS***

En el núcleo celular se encuentran organelos no delimitados por membrana, como el nucleolo, los cuerpos de Cajal, los gránulos intercromatina, entre otros. Estos dominios se caracterizan por no estar delimitados por una membrana y tener una composición dinámica, ya que sus componentes pueden transitar activamente entre

su interior y el nucleoplasma que los rodea. Algunos de estos compartimentos se forman en condiciones particulares de la célula como los gránulos de estrés, otros como el nucleolo se encuentran en el núcleo durante varias fases del ciclo celular.

Durante la infección con AdV se ha observado la redistribución de componentes de distintos organelos no delimitados por membrana hacia los RC. Algunos ejemplos son los componentes de los cuerpos nucleares de PML (proteína PML), del nucleolo (nucleolína), de los cuerpos de Cajal (fibrilarina) y de los gránulos de intercromatina (U2AF35), entre otros [21]. Los componentes nucleares reclutados a los RC tienen múltiples funciones en sus respectivos compartimentos y resulta interesante que durante una infección estos se redistribuyan hacia un condensado funcional cuya formación se induce en la célula infectada.

Recientemente, se ha reportado que la formación de los organelos no delimitados por membrana, también conocidos como condensados biomoleculares (BMCs por sus siglas en inglés) ocurre por separación de fases líquido-líquido (LLPS), que es un mecanismo que se caracteriza por formar estructuras con propiedades físicas parecidas a las de un líquido [24]. Las estructuras formadas por LLPS comúnmente tienen forma de gotas esféricas cuando se analizan por microscopía de contraste diferencial (DIC) *in vitro* o estructuras que asemejan gotas cuando se visualizan en la célula mediante microscopía de fluorescencia; estas estructuras tipo gota tienen la capacidad de fusionarse y fisionarse manteniendo su morfología esférica. Los compartimentos formados por LLPS intercambian componentes con el medio que los rodea y se reorganizan rápidamente, los valores de coeficientes de difusión se reportan entre  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$ . La técnica más común para calcular coeficientes de difusión en BMCs es la de recuperación de la fluorescencia después de foto blanqueo (FRAP por sus siglas en inglés) [25]–[27].

Si bien los coeficientes de difusión que han sido asociados a BMCs son más lentos comparados con coeficientes de difusión de moléculas libres, por ejemplo, para la proteína EGFP en el citoplasma ( $36 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) o el núcleo ( $34 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) [28],[29]; se ha propuesto que esto es debido a que los componentes de los BMCs están interactuando entre ellos o con otros componentes de su entorno [30]. Debido a

esto no solo se toma en cuenta el coeficiente de difusión en los experimentos de FRAP, si se trata de un condensado con propiedades líquidas la fracción de recuperación de fluorescencia, que es la fracción de moléculas que contribuyen a la recuperación de la fluorescencia de la región blanqueada, suele ser superior al 70% [31]–[33], mientras que, si se trata de una estructura con características sólidas o tipo gel, la recuperación de fluorescencia disminuye considerablemente o es nula [31]–[33]. También, el tiempo medio de recuperación ( $\tau_{1/2}$ ), que es el tiempo requerido para que la zona que fue blanqueada llegue a la mitad de la curva de recuperación de la fluorescencia, suele encontrarse en intervalos de segundos hasta minutos para estructuras con características líquidas, mientras que, para estructuras con características sólidas, incluso dejando los experimentos horas el  $\tau_{1/2}$  no se puede calcular ya que no hay recuperación de fluorescencia [31]–[33].

La formación de estos condensados se establece al alcanzar un umbral de concentración en el que se propician interacciones multivalentes de los componentes, lo que resulta en que las moléculas son mejores solventes para sí mismas que el medio circundante y se induce LLPS [34]. Los organelos sin membrana que se han descrito están formados por ácidos nucleicos y proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) o proteínas con regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) y se ha reportado que las IDRs con regiones de baja complejidad (LCR) en su secuencia favorecen la LLPS [35].

Los componentes de compartimentos formados por LLPS inicialmente aumentan en concentración hasta alcanzar un umbral que provoca la separación o el *demix* de fases con el medio circundante. En algunos casos, el intercambio de las moléculas con su entorno conduce a la sub-compartimentalización de distintos componentes y también se ha reportado un proceso de transición, en el que estos compartimentos dejan de tener propiedades de líquidos y adquieren propiedades de tipo sólido o gel en el que ya no hay un intercambio de componentes con el medio circundante, a este proceso se le conoce como envejecimiento [36].

Existen tres tipos de moléculas que conforman a los BMCs: Las moléculas tipo *scaffold* son los componentes mínimos necesarios para formar condensados. El

resto de las moléculas se denominan *clientes* o *reguladores* y son reclutados a los condensados por interacciones con los componentes tipo *scaffold*, por lo que estos son necesarios porque potencian la formación de los condensados a través de interacciones multivalentes. Los *clientes* y *reguladores* definen la función, la morfología y el tamaño del condensado [36].

Existe evidencia de LLPS en la formación de fábricas virales, las cuales son microambientes celulares especializados inducidos durante las infecciones virales, en donde se lleva a cabo la expresión y replicación de los genomas virales y en algunos casos el ensamblaje de las partículas virales. Para AdV estas fábricas son los RC descritos arriba. La formación de estos microambientes por LLPS está documentada tanto para virus que se replican en citoplasma, como el virus de la rabia [26], el virus de la estomatitis vesicular (VSV) [37] y rotavirus [38], como para virus que se replican en el núcleo como el caso del virus de la influenza [39]. Recientemente, en nuestro grupo de trabajo, las evidencias que se describen más adelante sugieren que los RC de AdV también tienen características líquidas [31]. Por otro lado, se han reportado proteínas de virus con genoma de DNA como la proteína UL11 de Herpes Simplex Virus 1 que separan fases *in vitro* [40]. Esta evidencia sugiere que la LLPS tiene un papel determinante en la interacción virus-célula.

### ***LLPS in vitro***

Si bien al evaluar un sistema se busca recopilar información experimental acerca del comportamiento del condensado y así proponerlo como un BMC con todos los componentes que lo conforman en el contexto celular, es común que se realicen ensayos *in vitro* para simplificar el sistema e identificar si el componente que está siendo evaluado es candidato para separar fases, es decir si es un candidato tipo *scaffold* y así confirmar su papel en el BMC [41], [42].

Una de las proteínas que más ha sido estudiada en el contexto de la LLPS es la proteína FUS (Fused in Sarcoma por sus siglas en ingles). Esta proteína interacciona con RNA y se asocia a procesos como la regulación transcripcional y estabilidad y transporte de mRNAs. El dominio N terminal de esta proteína es un

dominio de baja complejidad y los aminoácidos predominantes en este dominio son repeticiones de QGSY seguidos de tres residuos de Q o P . A altas concentraciones o con mutantes en el dominio N terminal de Fus, la proteína tiende a agregarse y formar inclusiones citoplásmicas asociadas a enfermedades neurodegenerativas como ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis por sus siglas en ingles) y FTD (FrontoTemporal Dementia por sus siglas en inglés) [42].

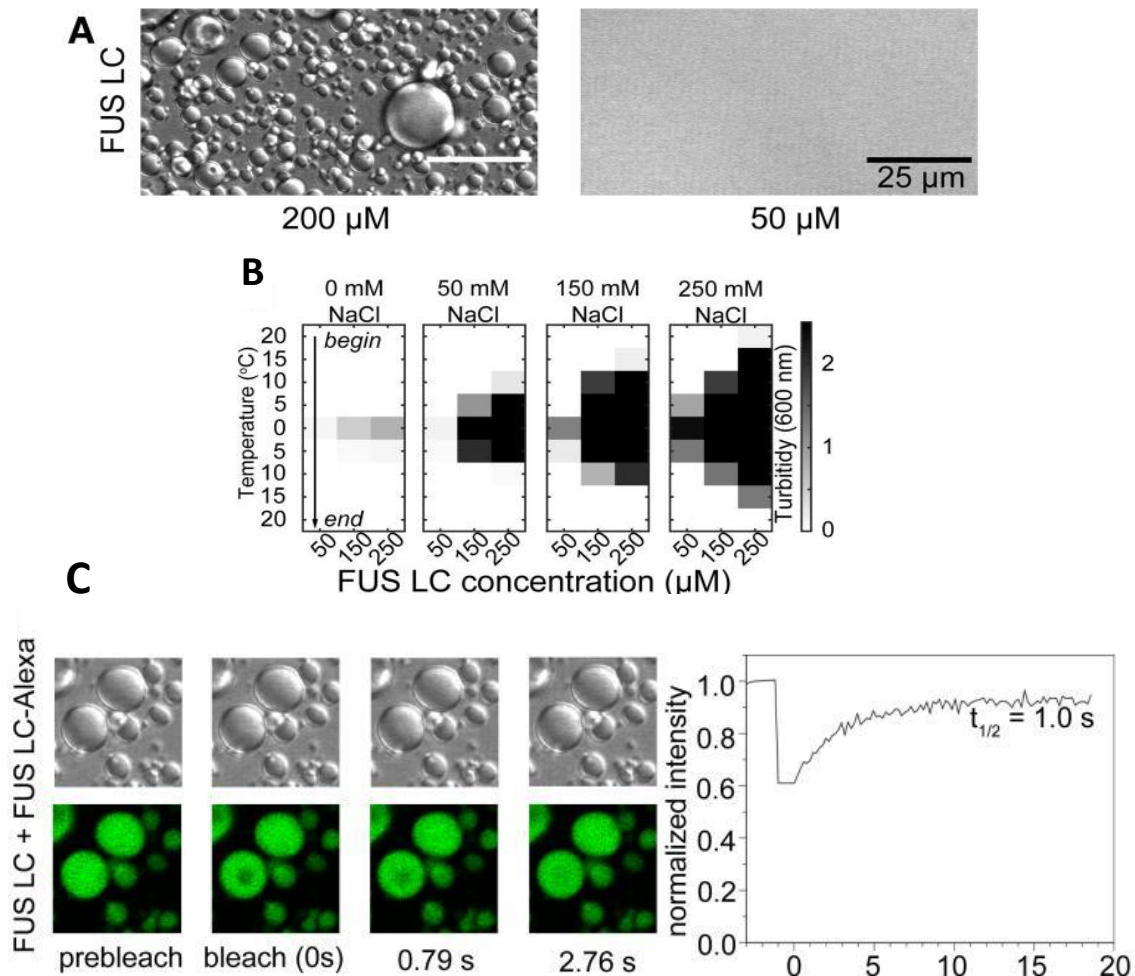
FUS y otras proteínas candidatas a ser componentes scaffold, se han analizado *in vitro* mediante distintas técnicas, entre ellas las más utilizadas son las técnicas de microscopía DIC y de epifluorescencia. En este tipo de experimentos se evalúan las condiciones de concentración del componente propuesto como scaffold, adición de agentes de crowding; que son moléculas como el PEG o dextrano que no participan en las interacciones multivalentes, pero si las favorecen aumentando la probabilidad de que las macromoléculas que participan en la LLPS se encuentren entre sí, cambios de temperatura, pH y concentración de sales, con el fin de identificar aquellas condiciones del medio favorables en las que si el candidato es scaffold separe fases.

Se muestra como ejemplo la Figura 5 en donde mediante DIC a pH 5.5, 150mM NaCl y 200  $\mu$ M de la región de baja complejidad (LC) de FUS se observan estructuras tipo gota mientras que a 50  $\mu$ M de la FUS-LC con las mismas condiciones de NaCl y pH, no se observan dichas estructuras con forma de gota [42].

En este mismo ejemplo, para determinar las condiciones del medio en las que se favorecía la formación de BMCs de FUS se realizaron ensayos de cambio de turbidez a distintas concentraciones de NaCl, temperaturas y pH (Figura 5, panel B) pero dado que con cambios de turbidez no se puede distinguir morfología, se confirmó con microscopía DIC y/o con microscopía de fluorescencia si se forman estructuras tipo gota. Cabe destacar que los experimentos de microscopía de fluorescencia son útiles al tener una proteína de fusión o un diseño de proteína a la que se le pueda seguir con un fluoróforo, ya que confirman que la proteína de interés se encuentre dentro de las estructuras tipo gota y una vez se tienen las condiciones



en las que se favorece la formación de condensados se realizan ensayos de microscopía en tiempo real para seguir eventos de fusión, fisión y disrupción de las estructuras tipo gota y experimentos de FRAP (Figura, panel C) con el fin de recopilar toda la información y confirmar que el componente evaluado reúne las características de un *scaffold* que separa fases con propiedades líquidas [42].

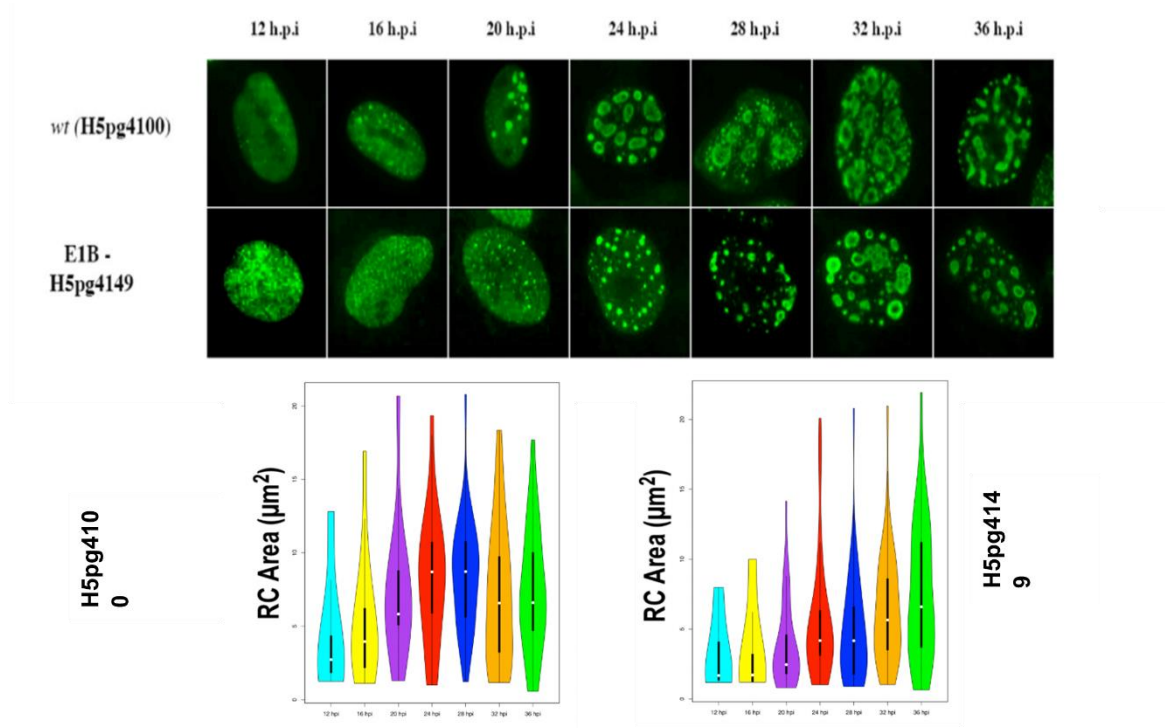


**Figura 5 Experimentos LLPS *in vitro* con la región de baja complejidad de la proteína FUS** Se muestran paneles representativos de experimentos de LLPS *in vitro* con la región de baja complejidad (LC) de la proteína FUS. En el panel A se muestran adquisiciones mediante microscopía DIC a 50 mM buffer MES pH 5.5 y 150 mM de NaCl, y dos concentraciones distintas de la FUS LC, 200  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  respectivamente. En el panel B se muestra un gráfico para resumir las condiciones en las que se probó el cambio de turbidez como posible indicador de LLPS. Las variables fueron; concentración de FUS LC (50-250 mM), temperatura (20 a 0 y 0 a 20 grados centígrados) y concentración de NaCl (0-250 mM). Los recuadros en escala de grises indican cambio de turbidez a 600 nm en la condición probada, posteriormente, la presencia de estructuras tipo gota en estas condiciones fue confirmada por microscopía (datos no mostrados). En el panel C se muestra la presencia de estructuras tipo gota mediante DIC a 150 mM NaCl, 50 mM buffer MES pH 5.5 y 200 mM FUS LC a las que se les agregó 0.01 % de FUS LC- S86C-Alexa 488 y se realizaron experimentos de FRAP blanqueando una región de 2.5  $\mu\text{M}$ . en los que el tiempo medio de recuperación de fluorescencia fue de 1.1  $\pm$  0.1 segundos. Tomado de Burke, K. A., et al, 2015.

### ***La proteína E1B-55K***

Una de las proteínas virales que se localiza en los RC es la E1B-55K (E1B) que, como se describió antes, tiene múltiples actividades durante el ciclo de replicación viral. Entre ellas se ha reportado que en ausencia de esta proteína los RC no se forman adecuadamente ya que el diámetro y área de estos dominios disminuye [43], [44] (Figura 5). Además, en ausencia de la E1B también disminuye la síntesis de DNA viral, la transcripción de los genes virales y el procesamiento por *splicing* de los mRNA virales [45]. No se sabe si la proteína participa directamente en cada uno de estos procesos o si su papel en el control de estas actividades podría estar relacionado a la formación adecuada de los RC.

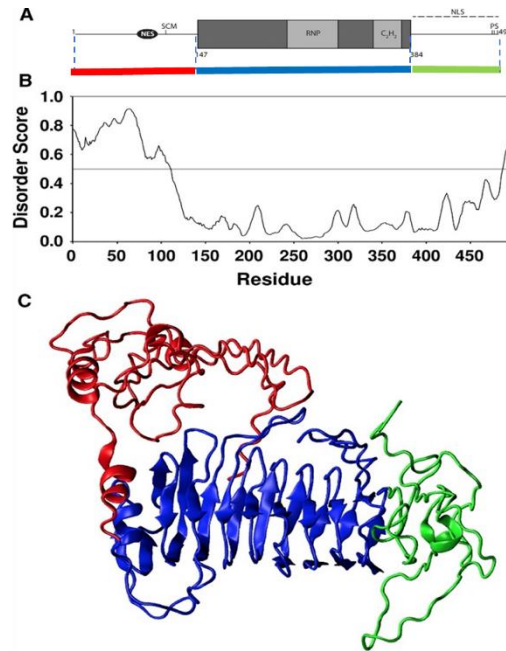
La estructura tridimensional de la proteína E1B no ha sido determinada, debido al menos en parte, a que no se ha logrado producir en cantidades suficientes para el análisis de su estructura por cristalografía o resonancia magnética nuclear; por lo tanto, la mayoría de la información disponible sobre posibles motivos o dominios estructurales de E1B se ha obtenido por mutagénesis y análisis de los fenotipos resultantes o por análisis por modelos por homología y su comportamiento mediante cálculos de dinámica molecular. Estos estudios sugieren que en su secuencia la proteína tiene un motivo de unión a RNA (RNP) y uno de dedo de Zinc [46]. En nuestro grupo de estudio se demostró recientemente que la proteína puede unir RNA en la célula infectada y que un péptido que corresponde a la región predicha como RNP (a.a 215-345) puede unir RNA *in vitro* [47], [48].



**Figura 6 Cinética de formación de los RC.** Micrografías de células HFF infectadas con virus silvestre (H5pg4100) y mutante de E1B- (H5pg4149) tomadas a las 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 horas post infección (hpi) . Siguiendo la señal de fluorescencia (AlexaFluor 488) para DBP como marcador de RC. A tiempos tempranos se observa una señal difusa, conforme progresa el ciclo de replicación se detectan foci y luego estructuras tipo anillo y coacervados complejos. Las gráficas de violín muestran el área de los RC para cada condición y tiempo sugiriendo que la cinética de formación de los RC es menos eficiente en ausencia de la E1B. Modificado de López R., 2016.

El análisis de un modelo por homología basado en una proteína estructural de adenovirus de serpiente, denominada LH3, cuya secuencia coincide en ubicación en el genoma del virus de serpiente con el gen que codifica para E1B de HAdV y tiene el 24% de identidad del residuo 164 al 349, sugieren que la región central de la proteína podría adoptar un plegamiento tipo solenoide  $\beta$  [49]. Además, usando diferentes predictores de desorden se ha encontrado que las regiones que corresponden al amino terminal (aminoácidos 1-146) y la región del carboxilo terminal (aminoácidos 460-496) de la proteína, podrían ser IDRs [50]. También se sabe que el carboxilo terminal tiene 3 sitios de fosforilación en la Serina 490, la Serina 491 y la Treonina 495 y que estos sitios y su fosforilación son importantes para la formación eficiente de los RC [44]. La predicción de desorden en la región correspondiente al amino terminal de la proteína se ha confirmado usando dicroísmo

circular y resonancia magnética nuclear con un polipéptido de 93 aminoácidos, llamado 93R, que comparte 79 residuos del amino terminal con la E1B [41]. En conjunto estos experimentos sugieren que la proteína podría consistir en tres dominios funcional y estructuralmente definidos, que podrían adoptar plegamientos independientes (Figura 6).



**Figura 7 Posibles características estructurales de E1B-55K.** En el panel A se muestra una representación esquemática de E1B mostrando los dominios propuestos. El dominio N-terminal (N) que va del aminoácido (a.a) 1-174 representado en rojo, este dominio tiene el NES (región de exportación nuclear (a.a 83-93)) y el SCM (Motivo de conjugación de Sumo (Lys 104)). El dominio Central (X) en azul, del a.a 175-384 con los dominios putativos RNP (motivo de reconocimiento de RNA) y dedo de zinc (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) y el dominio C-terminal (C) en verde con el NLS (señal de localización nuclear) predicho y representado en líneas punteadas y los PS (Sitios de fosforilación en las Ser490, Ser491 y Thr495). El panel B muestra la predicción de desorden de E1B con IDRs predichas en los dominios N (1-146) y C (385-496). En el panel C se muestra la estructura predicha para E1B usando el código de colores descrito arriba, se aprecian las dos IDRs y el dominio X con la estructura de solenoide  $\beta$ . Modificado de Tejera B. et al. 2019.

## La proteína DBP

La DBP es una proteína de 529 a.a codificada en la región E2 del genoma de HAdV. DBP está conformada por dos dominios funcionales que en un inicio se distinguieron al ser obtenidos por tratamiento con quimiotripsina.

El dominio N-terminal (44-46 kDa) cuya secuencia es poco conservada entre AdV y corresponde a los a.a 1-173, tiene varios sitios de fosforilación (11 para HAdV-C5) [51]. La DBP es una fosfoproteína de 59 kDa, pero su migración en SDS-PAGE es de 72 kDa; esta migración se relaciona a su estado de fosforilación que aumenta su masa aparente [52]. El dominio N-terminal no se ha podido cristalizar y, de hecho, el uso de distintos predictores [50] sugiere que este dominio es una IDR, lo que explicaría la ausencia de estructuras cristalográficas (Figura 7).

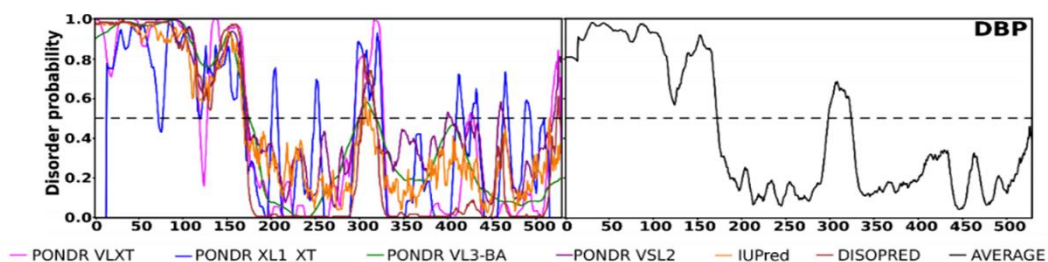
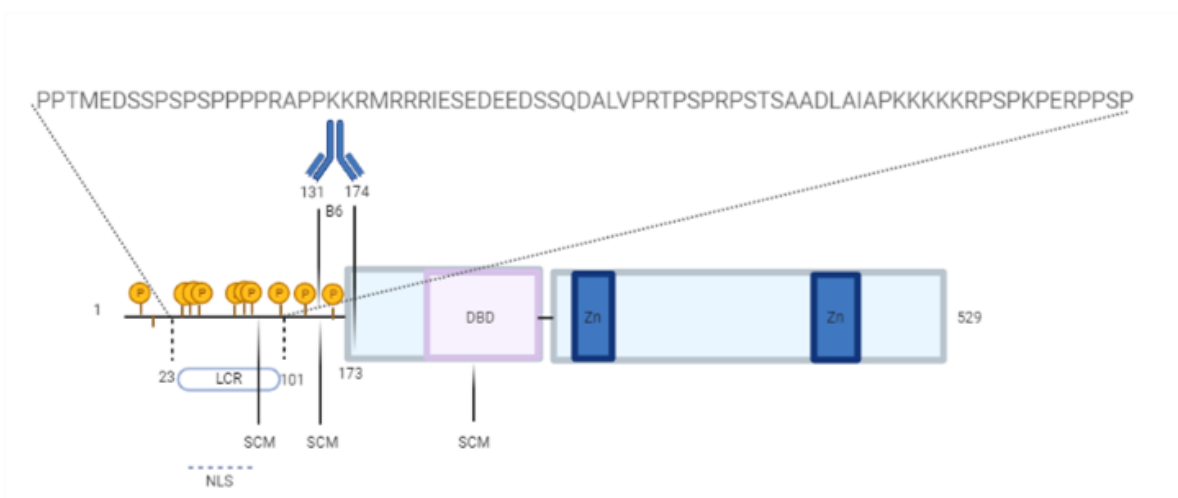


Figura 8 **Predicción del desorden de DBP.** A la izquierda se muestra el resultado de cada predictor en un color distinto y a la derecha el promedio de los 6 predictores, valores por encima de 0.5 indican desorden. Modificado de Cardenas R, 2019.

El dominio C-terminal (24-26 kDa) es altamente conservado en diferentes HAdV, comprende del a.a 174 al 529 y en este dominio se encuentra la región que interacciona con ácidos nucleicos, ssDNA [48], dsDNA [48] y RNA [53]. La unión de DBP con ácidos nucleicos es independiente de la secuencia de la molécula de DNA o RNA. La estructura del dominio C-terminal de DBP fue determinada por cristalografía de rayos X. Tiene una estructura de tipo globular (siete  $\alpha$ -hélices, tres hojas  $\beta$  y dos regiones de unión a  $Zn^{2+}$ ) [54]. La proteína se cristalizó con 2 unidades de DBP y se determinó que la interacción proteína-proteína ocurre entre los últimos 17 a.a (512-529) del dominio C-terminal [55] (Figura 8). El análisis por cristalografía de rayos X del dominio C-terminal identificó una región con pérdida de densidad

electrónica en el centro de la proteína del a.a 300-350 [56] y esta región se predice también como IDR (Figura 7).

Como se mencionó antes, se desconoce la estructura del dominio N-terminal de DBP, pero se predijo como una IDR y datos recientes de nuestro laboratorio [31], [57] sugieren que el dominio N-terminal de DBP es candidato para separar fases (LLPS), específicamente una LCR con alto contenido de prolinas entre los aminoácidos 23 al 101 (Figura 8 y Figura 9).



**Figura 9 Esquema de la proteína DBP.** El esquema representa los dos dominios de DBP. Representado con líneas negras se muestran las IDRs predichas; el dominio N terminal completo del a.a 1-173 y la región en el dominio C-terminal del a.a 300-350. El dominio N-terminal tiene 11 sitios identificados de fosforilación en DBP HAdV-C5 (a.a T12, S31, S33, S35, S70, T75, S76, S92, S100, S107 y S161) representados con círculos amarillos, la LCR rica en prolinas (a.a 23-101) y el epítipo para la unión del anticuerpo B6 (entre los a.a 131-174). El dominio C-terminal del a.a 174-529 representado las regiones estructuradas como cajas azules. En color lila el DBD (Dominio de unión a DNA) del a.a 176-264 y en las cajas azul marino los motivos de unión a zinc (a.a 273-286 y 394-519). También se presentan los SCM o motivos de conjugación con Sumo (L94, L132 y L202) y con la línea azul punteada las NLS (secuencias de localización nuclear a.a 42-46 y 84-89). Reproducido y modificado de Hidalgo, P. et al. 2021.

Las predicciones de separación de fases para DBP se hicieron utilizando el servidor PSPredictor (Figura 9), un predictor que fue desarrollado mediante *machine learning* que se rige por un algoritmo de árboles de decisión del tipo *gradient boosting* esta herramienta fue entrenada por sus desarrolladores con proteínas de la base de datos LLPSDB en donde se reportan proteínas que separan fases líquido-líquido

experimentalmente, las proteínas que los desarrolladores utilizaron para entrenar al predictor fueron sin modificaciones post-traduccionales y de tipo *scaffold* [58].

Prediction task 3		
Seq ID	PSP Score	PSP (Yes/No)
DBP C-terminal domain	0.108	No

Prediction task 2		
Seq ID	PSP Score	PSP (Yes/No)
DBP N-terminal domain	0.9821	Yes

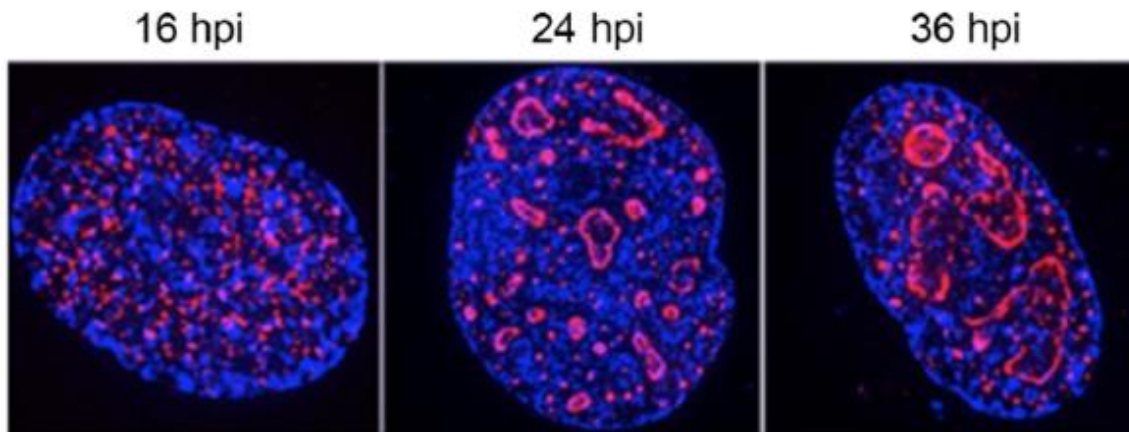
Prediction task 1		
Seq ID	PSP Score	PSP (Yes/No)
DBP Complete	0.9456	Yes

**Figura 10 Resultados de predicción de DBP y sus dominios para LLPS usando PSPredictor.** Se muestran los valores obtenidos tras evaluar a DBP completa y sus dominios N y C terminal en el PSPredictor. Valores por encima de 0.5 son indicativos de un candidato para inducir LLPS. Replicado de Hidalgo, P. et al. 2021

### **Dinámica de DBP en RC**

Como se describió antes, la proteína DBP es codificada por la unidad transcripcional E2 cuyos productos proteicos son responsables de la replicación del genoma viral. Esta proteína se une al DNA de cadena sencilla que se produce durante la replicación del genoma viral por el mecanismo de desplazamiento de cadena. Al ser una proteína abundante y necesaria para la replicación, ha sido ampliamente utilizada como marcador de los RC virales. El análisis de la distribución de DBP por microscopía de inmunofluorescencia en células infectadas a distintos tiempos del ciclo de replicación viral ha mostrado que en la fase temprana (16 hpi) la proteína se distribuye en puntos (*foci*) dispersos en el núcleo celular. Conforme progresa el

tiempo post-infección a la fase tardía (24 hpi) la distribución de DBP se observa en estructuras predominantes de tipo anillo o esferas que presentan eventos de fusión y fisión. Para tiempos post-infección, en los que inicia la producción de progenie viral y ensamblaje de las partículas virales (36 hpi), las estructuras coalescen formando estructuras amorfas y más complejas [59] (Figura 10).



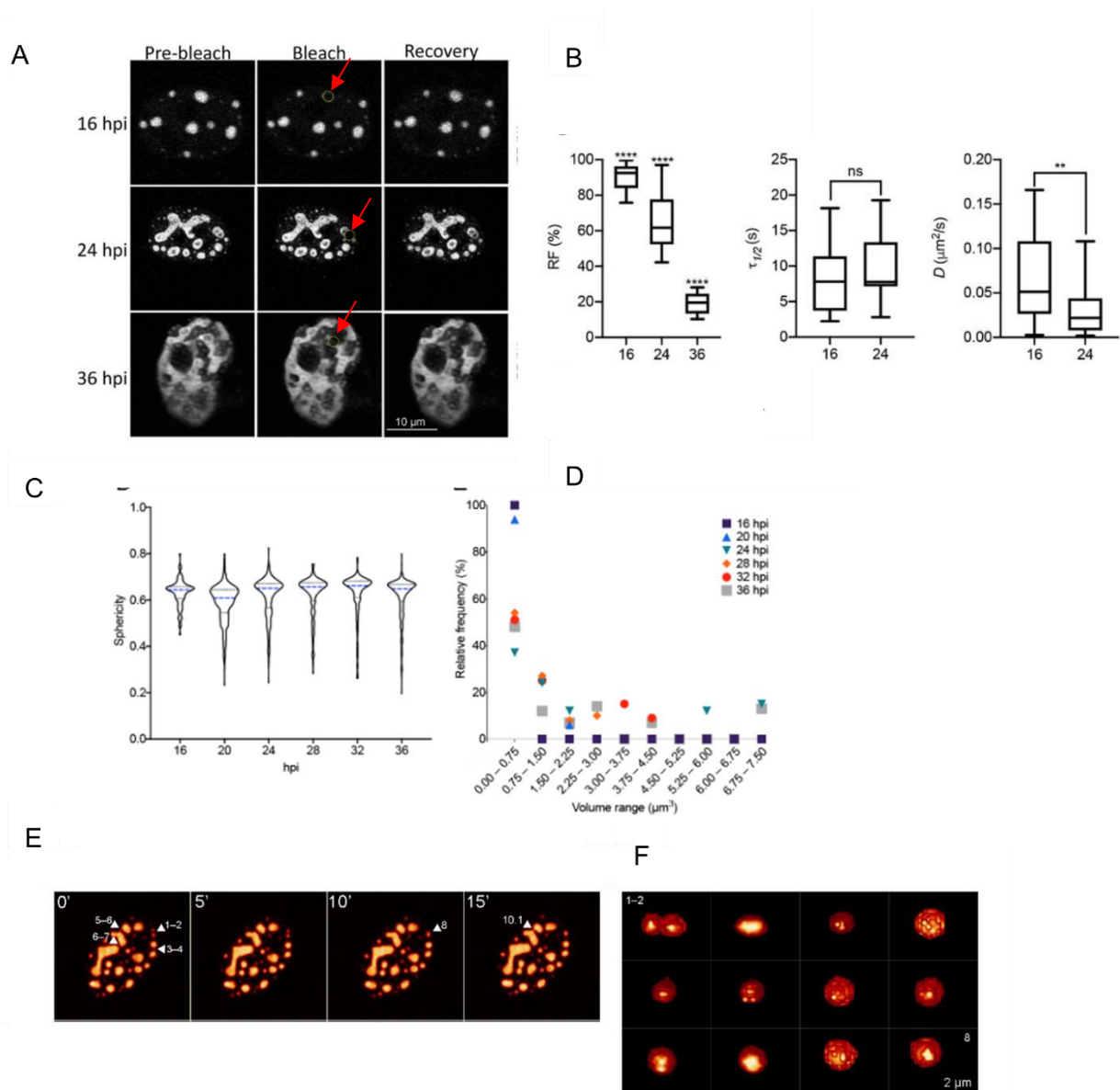
*Figura 11 Distribución de DBP a lo largo del ciclo de replicación de AdV. Distribución de DPB a las 16, 24 y 36 hpi en una célula HFF infectada con HAdV-C5. En color azul se observa el núcleo visto por DAPI y en color rojo se observa la señal de la proteína DBP. Hidalgo P, et al., 2019*

Como se mencionó anteriormente, una de las técnicas de microscopía más utilizada para evaluar la difusión de componentes de BMCs con el medio circundante es la de técnica de FRAP, ya que permite obtener el coeficiente de difusión de una molécula de interés fusionada a un fluoróforo. Se blanquea irreversiblemente una región definida (ROI) y se monitorea la recuperación de la fluorescencia debido al intercambio de las moléculas a la ROI. El coeficiente de difusión de la molécula se obtiene de la comparación entre la fase condensada, que es la fase que contiene a la molécula problema en mayor concentración y la fase diluida, que es el medio circundante. El coeficiente de difusión se obtiene a partir de la relación del área blanqueada y la tasa de recuperación de fluorescencia que depende de la movilidad de la molécula fluorescente. Como se mencionó antes, la tasa de recuperación de fluorescencia de condensados con características líquidas es alta, el tiempo medio de recuperación se encuentra en la escala de segundos a minutos y los coeficientes de difusión que se han reportado para moléculas que se separan por LLPS tienen valores entre  $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$  [25], [34].



Datos de nuestro grupo obtenidos mediante el uso de la técnica de FRAP (Figura 11), para medir la recuperación de fluorescencia de la proteína mCherry fusionada al extremo N-terminal de DBP (mCh-DBP) ubicada en los RC de AdV, muestran que, para estructuras con morfología esférica, el promedio de mediciones de 15 células distintas a las 16 y 24 hpi resulta en coeficientes de difusión de  $8.0 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$  y  $3.5 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ , respectivamente. Aunque ambos valores están dentro del rango reportado para moléculas que participan en LLPS, es importante destacar que la fracción de recuperación de fluorescencia y el  $\tau_{1/2}$ , muestran que conforme progresa el tiempo post infección y conforme la morfología del condensado se torna más compleja la recuperación es menor y el  $\tau_{1/2}$  más largo, a las 16 hpi la recuperación de fluorescencia promedio fue del 93.65% y el  $\tau_{1/2}$  de 7.54 s, a las 24 hpi la recuperación de fluorescencia fue de 71% y el  $\tau_{1/2}$  de 16.89 s, a las 36 hpi la recuperación de fluorescencia fue nula en la ventana de tiempo probada por lo que no se calculó ni la  $\tau_{1/2}$ , ni el coeficiente de difusión. En conjunto esto sugiere que a tiempos tempranos la DBP en los RCs tiene propiedades líquidas y que conforme avanza el ciclo de replicación de AdV y los RCs se tornan más complejos, disminuyen dichas propiedades líquidas y se tornan estructuras con características más sólidas, lo que coincide con procesos de envejecimiento reportados previamente para algunos BMCs [31], [57], [32](Figura 11, panel A y B).

Por otro lado, por medio de reconstrucción de imágenes en 3D obtenidas por microscopía confocal, se observó que los *foci* de DBP arriba descritos tienen morfología esférica y esta morfología, que es la reportada para condensados líquidos, predomina a las 16 hpi (Fig 11, panel C y D). Además, el análisis de la distribución de mCherry-DBP por microscopía en células vivas y las reconstrucciones en 3D mostraron que los RC pueden fusionarse y fisiónarse (Fig 11, panel E y F).



**Figura 12 Características de los RC analizados mediante mCherry-DBP.** El panel A muestra imágenes representativas de la señal nuclear de mCh-DBP infectadas con un virus que expresa la proteína de fusión a distintos tiempos post infección. Los experimentos de FRAP se hicieron a las 16, 24 y 36 hpi y se destaca la ROI en cada caso con un círculo punteado señalado con una flecha roja. En el panel B se muestra los gráficos de caja comparando, la fracción de recuperación, el  $\tau_{1/2}$  de recuperación y los coeficientes de difusión promedio de las 15 células medidas a las 16 y 24 h. En el panel C los gráficos de violín muestran la distribución de esfericidad de distintos tiempos post-infección, a las 16 h la mayoría de las estructuras son esféricas. En el panel D se muestra la frecuencia relativa de cada intervalo de volumen de las estructuras. En el panel E se muestran intervalos de 5 minutos de proyecciones de máxima intensidad, las estructuras que se fusionaron a lo largo del experimento de live cell imaging tienen asignados números, en el panel F se muestra la reconstrucción en 3D de los focos 1-2 que al terminar de fusionarse se les asignó el número 8 y mantienen la estructura esférica. Modificado Hidalgo, P., Pimentel, A., 2021.

## HIPÓTESIS

Las proteínas E1B y DBP inducen separación de fases líquido-líquido.

## OBJETIVO GENERAL

- Determinar si E1B y/o DBP inducen LLPS.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtención y enriquecimiento de las proteínas E1B-55K y DBP.
- Determinar si E1B o DBP inducen LLPS *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Construcciones para expresión de E1B-55K en bacterias*

#### *Células competentes*

Para la expresión de la E1B en *E. coli* se utilizaron las cepas de expresión C41, C43, BL21 (DE3). Se picó una colonia de cada cepa sin transformar y se creció en LB Agar sin antibiótico durante 16 horas a 37°C, se transfirió una colonia a 5 ml de medio LB y se incubó a 37°C overnight (O/N) con agitación (200 rpm). Posteriormente, se inoculó 100 ml de medio LB con 1 ml de cultivo en un matraz de 500 ml y se incubó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.5 a 600 nm. El cultivo se transfirió a tubos de 50 ml estériles y se incubó en hielo durante 10 minutos. Se centrifugó a 1,800 g por 10 min a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 30 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío y se incubó 15 min en hielo. Se centrifugó a 1,800 g por 10 min a 4°C y el *pellet* se resuspendió en 2 ml (1.6 ml CaCl<sub>2</sub> frío + 0.4 ml de glicerol) para su posterior almacenamiento a -80°C en alícuotas de 100 µl.

## ***Cepas y plásmidos***

### ***Sistema de plásmidos pET***

El plásmido pET27-(b)+ fue utilizado para hacer las construcciones amino (pET-27b(+):E1B-N), central (pET-27b(+):E1B-X) y carboxilo (pET-27b(+):E1B-C), respectivamente, que codifican para cada uno de las regiones de E1B. Estas construcciones se sintetizaron por la compañía GenScript, en donde las secuencias que codifican para cada dominio de E1B fueron optimizadas para el uso de codones en *E. coli*. La secuencia de cada construcción fue verificada anteriormente [66].

Los plásmidos del sistema pET se usan para clonar y expresar proteínas recombinantes en *E. coli*. El gen clonado en el vector se encuentra bajo el control del promotor del fago T7 que favorece la expresión de la proteína de interés llegando a comprender más del 50% de la proteína celular total tras la inducción [60].

Las cepas de expresión de vectores tipo pET tienen una copia cromosomal que codifica para la polimerasa T7, este gen se encuentra bajo el control de lacUV5 y su expresión es inducida por la adición de deisopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). La transcripción del gen de interés utiliza la polimerasa de T7 cuya producción se induce por la adición de IPTG, por lo tanto, la expresión del gen de interés (que puede ser tóxica para la célula) ocurre casi únicamente cuando el cultivo es inducido [60].

El plásmido pET27b (+) cuenta con resistencia a Kanamicina para seleccionar a las clonas transformadas y tiene una secuencia señal N-terminal denominada pelB, que es una secuencia de localización a periplasma. Esta localización confiere la ventaja de purificación proteica mediante choque osmótico. Adicionalmente, el plásmido tiene la secuencia del operador rio abajo del promotor T7 y la secuencia que codifica para el represor lac-I. El represor se une al operador lac y se disminuye de esta forma la expresión de fuga tanto en el promotor lacUV5 en el hospedero, como en el promotor T7-lac en el vector [60].

El plásmido 2744 E2A-pCMX3 que codifica a la DBP con el *Flag Tag* DYKDDDDK en su N-terminal tiene tanto el promotor de citomegalovirus (CMV) como el promotor T7, por lo que puede usarse para expresión tanto en células de mamíferos como en bacterias, y en este caso el método de selección de las colonias transformadas es por resistencia a Ampicilina.

Las cepas de expresión utilizadas fueron la cepa parental BL21 (DE3) y sus cepas derivadas C41 y C43, estas cepas se complementan con el sistema para evitar la expresión de fuga del vector pET27-b(+) descrito en el párrafo anterior. Adicionalmente, las cepas C41 y C43 han sido utilizadas para expresión de proteínas que resultan tóxicas para la cepa parental BL21 (DE3) [61].

La cepa DH5 $\alpha$  se utilizó debido a que tiene alta eficiencia de transformación y a que se obtienen buenos rendimientos de producción de plásmidos, por lo que se emplea frecuentemente para clonar y mantener plásmidos [60].

### ***Extracción de DNA plasmídico y cortes con enzimas de restricción***

#### ***Mini Preps***

Se centrifugó 1.5 ml de cultivo bacteriano de C43 sin transformar o transformado con los plásmidos pET-27b(+) con los insertos de los dominios de E1B a 22,000 x g durante 5 min a 4°C. Posteriormente, se resuspendió en solución I (50 mM Dextrosa, 2 5mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA) y se incubó por 5 minutos a TA, se agregó la solución II (0.2 M NaOH, 1% SDS) a temperatura ambiente (TA), se mezcló por inversión y se incubó por 5 min. Se adicionó la solución III fría (Acetato de K<sup>+</sup> 1.8 M, 11.5% ácido acético pH 4.8), se mezcló por inversión y se incubó 5 min a T.A. Se centrifugó a 22,000 x g a 4°C durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se adicionó etanol absoluto (2 volúmenes). Se centrifugó a 22,000 x g a 4°C durante 10 min, se retiró el sobrenadante y se agregó etanol al 70% (1.5 volúmenes), se mezcló por inversión hasta desprender el pellet, se centrifugó a 22,000 x g a 4°C durante 10 min, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Por último, el pellet se resuspendió en 10 mM Tris HCl pH 7.4. Para confirmar la presencia de DNA plasmídico se cargó 1/10 del volumen obtenido en geles de

agarosa 1% que se corrieron a 90 volts por 1 hora, el resto de la muestra se guardó a -20°C.

Una vez confirmada la extracción de DNA plasmídico, se trató con RNAsa A para eliminar el RNA, se inactivó la RNAsa a 65°C por 10 min y se cortó el DNA con XbaI/EcoRI o HindIII dependiendo del caso durante 1 h a 37°C. Finalmente, se corrió un gel de agarosa 1% y se evaluó el patrón de bandeo obtenido.

### ***Linearización y digestión***

Para obtener el plásmido pET-27b(+) $\Delta$  (sin inserto) a partir del plásmido pET-27b(+):E1B-N se cortó el DNA con XbaI+EcoRI. Para tener extremos romos en el plásmido, se utilizó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa (Thermo) siguiendo el protocolo del fabricante y finalmente, se religó con DNA ligasa T4 (Thermo) siguiendo el protocolo del fabricante.

### ***Transformación de bacterias***

Se mezcló 0.1  $\mu$ g de DNA plasmídico con 0.1 ml de células competentes, se mantuvo en hielo durante 10 minutos y posteriormente, se dio un choque térmico a 42°C durante 2 minutos. Se agregó 1 ml de medio LB y el cultivo se incubó una hora a 200 rpm a 37°C. Se centrifugó para obtener el pellet (16 segundos a 22,000 x g). El pellet fue resuspendido en 200  $\mu$ l de medio LB y se platearon 180  $\mu$ l y 20  $\mu$ l en cajas Petri con LB+ Kanamicina (60  $\mu$ g/ml) o Ampicilina (100  $\mu$ g/ml) dependiendo del caso y se incubó 16 h a 37°C.

### ***Gliceroles***

Para mantener el plásmido en las células transformadas y tener *stocks* para análisis posteriores se prepararon gliceroles. Para esto se usó una solución 50% glicerol, 50% LB. De un cultivo se tomó 1 ml, se centrifugó a 22,000 x g, 4°C, 5 min, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de la solución glicerol/LB en hielo e inmediatamente se almacenó a -80°C.

### ***Pruebas de viabilidad y resistencia***

Para cada cultivo de C43 transformado con los plásmidos pET27(b)+ que codifican a las regiones amino (pET-27b(+):E1B-N) , central (pET-27b(+):E1B-X) o carboxilo

(pET-27b(+):E1B-C) de E1B, se obtuvo el inóculo introduciendo un asa previamente esterilizada dentro del glicerol correspondiente e inoculando 5 ml de medio LB sin antibiótico, LB + Kanamicina (60 µg/ml) o LB+ Ampicilina (100 µg/ml) según lo requerido para cada caso. Los cultivos se crecieron durante 12 horas a 37° C. Posteriormente, se inocularon 20 ml de medio LB con 20 µl del cultivo previo de 12 horas y se midió DO a 600 nm cada cuatro horas durante 16 horas. Adicionalmente se tomó 1 ml para extraer DNA y 1 ml para platear.

Se realizaron diluciones seriadas 1:1X10<sup>-4</sup>, 1:1X10<sup>-5</sup>, 1:1X10<sup>-6</sup> en un volumen total de 1 ml. Para las diluciones se tomó 10 µl de cultivo y se diluyó en 990 µl de medio LB, en cada caso se platearon 50 µl de las diluciones 1:1X10<sup>-5</sup> y 1:1X10<sup>-6</sup>, se incubaron a 37°C durante 16 hrs y se contaron las colonias para cada caso.

### ***Análisis de expresión y enriquecimiento***

#### ***SDS-PAGE***

Se obtuvo el volumen deseado de cultivo bacteriano o de lisado de células HFF humanas infectadas para obtener la proteína en cada caso. Las condiciones de cultivo, cosecha y procesamiento del lisado se describen en cada caso particular más adelante en la sección de resultados.

Cada muestra se resuspendió en *buffer* Laemmli 6X o 2X (4% SDS, 20% glicerol, 0.004% azul de bromofenol, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8). Posteriormente, se agregó 10% de β-mercaptoetanol y se calentaron a 95 °C durante 5 min. Después se centrifugó a 22,000 x g por 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo.

Los geles de acrilamida se prepararon según el porcentaje de acrilamida requerido, para los geles separadores se usó 10 y 15% de Acrilamida:Bis-acrilamida (30%:2.7%) y para el gel concentrador 5% Acrilamida:Bis-acrilamida. Una vez polymerizados se cargaron hasta 20 µl de muestra por pozo dependiendo el caso y 5 µl de marcador de peso molecular (Page-Ruler Plus, Thermo). Se corrió a amperaje constante de 10 mA durante 30 min hasta el límite del gel concentrador seguido de 20 mA durante 90 min.

### ***Inmunotransferencia***

Los lisados bacterianos provenientes de las pruebas de inducción se resuspendieron en 10 ml de PBS, se sonicaron durante 12 ciclos de 10 segundos *on* y 30 segundos *off* con una amplitud de onda de 30%, cuidando en todo momento que la muestra no se calentara ni se generaran burbujas, posteriormente, se centrifugó a 3,500 rpm 15 min, el sobrenadante (1) se almacenó a -80°C y el pellet se resuspendió en otros 500 µl de PBS. Se centrifugó nuevamente a 22,000 x g, 4°C x 5 min, el sobrenadante del pellet (2) se almacenó a -80°C y únicamente el pellet (3) se resuspendió directamente en 100 µl de *buffer* Laemmli 2X y se almacenó a -20°C. Para cada experimento se descongelaron alícuotas de sobrenadantes 1 y 2 en hielo, se tomaron 20 µl de sobrenadante 1, 10 µl del sobrenadante 2 y ambos se re-suspendieron en *buffer* Laemmli 6x para posteriormente, cargarlos en el gel junto con el pellet (3) previamente resuspendido en *buffer* Laemmli.

Los sobrenadantes y el pellet se calentaron a 95 °C durante 5 min y posteriormente, se centrifugaron 5 minutos a 22,000 x g, se cargaron 20 µl en un gel de acrilamida 10% (véase SDS-Page) y luego, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (Millipore).

La membrana se bloqueó en solución de bloqueo (3% leche semidescremada/ 0.5% Tween 20), se lavó con PBS, se incubó con el anticuerpo primario a una dilución 1:500 (B6/anti DBP) y se incubó ON a 4°C. Se hicieron 3 lavados de la membrana con buffer de lavado (0. 3% leche semidescremada/0.05% Tween 20) y se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario (IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano) a una dilución 1:10,000.

Para revelar se utilizó un sustrato luminiscente (Thermo Scientific™ Pierce™ ECL Western Blotting Substrate), se incubó durante 5 min, se montó sobre el dispositivo C digit (Li-cor biosciences) y se escaneó usando las condiciones estándar del programa Image Studio Digits.



### ***Cromatografía de intercambio catiónico***

El lisado bacteriano fue obtenido de un cultivo de 10 ml. A las 16 h postinducción se concentró con un centrífugo 10kDa, 30 minutos, 4°C y se centrifugó por 30 min, 13,000 g a 4°C para clarificar y pasar por una columna de intercambio catiónico HiTrap SP HP (1ml) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (Thermo). Se filtraron los *buffers* y se purgó el equipo de FPLC utilizado. Posteriormente, se equilibró la columna utilizando un buffer fosfatos sin NaCl (Buffer A) (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> /pH 6.5) usando 10 volúmenes de columna (VC) y un flujo de 1 ml/min. A continuación, se aplicó el lisado, se recolectó el *Flow-trough* (FT) (2 VC por cada fracción colectada) y se aplicó un gradiente lineal de NaCl usando *buffer* fosfatos con 5M NaCl (Buffer B) recolectando 20 VC mientras se incrementaba la fuerza iónica hasta 2.5 M NaCl (50% buffer B). Posteriormente, se aumentó la fuerza iónica a 5M NaCl (100% buffer B), se colectaron 5 VC y finalmente se re-equilibró la columna con 10 VC del buffer inicial.

### ***Enriquecimiento de DBP***

#### ***Células infectadas***

Se cosechó un cultivo de  $4.0 \times 10^7$  células HFF infectadas con el virus Ad mCh-DBP a las 40 hpi. Se centrifugó a 3,000 x g, 5min y el pellet se resuspendió en 12 ml de PBS frío. Se centrifugó a 400 x g, se descartó el PBS y se resuspendió en 2 ml de Buffer Fosfatos pH 6.5 + inhibidores de proteasas, PMSF/Aprotinina/Leupeptina 20 µg/ml de c/u. Para lisar las células y núcleos se utilizó el sonicador de pulso durante 30 ciclos de 5 segundos *on* 30 segundos *off* a una amplitud del 15%. Para verificar que la disrupción fuera completa se montaron 2 µl de lisado en cubreobjetos y se observaron al microscopio. El resto del lisado se almacenó a -80 °C hasta su uso.

#### ***Cromatografía de afinidad***

Para enriquecer a la proteína DBP se preparó una columna de afinidad acoplado a una resina de Sefarosa-Proteína A el anticuerpo B6, que como se mencionó antes,

reconoce un epítipo entre los a.a 131-174 [51] de DBP. Para preparar la columna se tomó 1 ml de la resina resuspendida (50% resina / 50% EtOH-20%) y se adicionaron 10 ml de sobrenadante de hibridoma de B6. Se incubó O/N en agitación y se centrifugó a 300 g/ 4°C/ 5 min para recuperar el sobrenadante y almacenarlo. Para entrecruzar el anticuerpo B6 con la resina, se adicionaron 5 ml PBS + 2% paraformaldehído y posterior a incubar durante 30 min a TA, se centrifugó a 300 g, 4°C, 5 min. Se colectó el PBS + 2% paraformaldehído y se lavó la resina dos veces con 5 ml de PBS. A los 500 µl de resina se les adicionó 1 VC de buffer fosfatos pH 6.5 y se almacenó a 4°C. Para confirmar la asociación del anticuerpo a la resina, se tomaron 20 µl de la resina resuspendida en buffer fosfatos y se desentrecruzó el anticuerpo con un tratamiento de 65°C O/N con movimiento constante en un horno de hibridación, para este paso se usó un tubo Eppendorf con seguro para evitar la evaporación del sobrenadante y dicho sobrenadante posteriormente se cargó en un gel de 15% acrilamida junto con 20 µl de los sobrenadantes de los pasos previos.

A la resina de Sefarosa A + B6 se le adicionaron 1.5 ml de lisado de células infectadas y se incubó en agitación 4°C durante 48 h. Posteriormente, se centrifugó a 300 g, 4°C, 5 min, se colectó el lisado y se adicionó 1 VC de *buffer* fosfatos pH 6.5, la resina resuspendida en *buffer* fosfatos se cargó en una columna Poly-Prep (Bio-rad).

Para la elución se utilizaron varias condiciones: aumento de temperatura (56 °C, 15 min-1 h); aumento de la concentración de NaCl (2 M NaCl); y cambio de pH (HCl 2mM y 5mM). En cada caso, se recolectaron fracciones correspondientes a 1 VC y para el caso de las condiciones de cambio de pH, se recibió cada VC de la elución en 50 µl de 1M Tris-HCl pH 8.5 para neutralizar el pH. En cada caso se adicionó 1 VC (500 µl) dos veces y se recolectó en dos fracciones separadas, posteriormente, se recolectó una fracción de 2 VC de HCl y finalmente, se lavó con un VC de PBS pH 7.4 dos veces colectando dos fracciones más. Todas las fracciones se guardaron a -20 °C.

## ***Ensayos LLPS***

### ***Predicción de LLPS***

Para obtener la predicción de LLPS para la proteína E1B y sus dominios, se utilizó la herramienta PSPredictor descrito anteriormente [58]. Valores por encima de 0.5 en el *score* de este predictor predicen a un candidato para inducir LLPS.

### ***Ensayos de LLPS in vitro con la proteína DBP***

A partir de un lisado total de células infectadas con el AdV-mCh-DBP o de la fracción enriquecida por cromatografía de afinidad de mCh-DBP, se realizaron pruebas de LLPS *in vitro* como las descritas anteriormente para la proteína FUS, que consistieron en la detección de gotas por microscopía DIC y microscopía de epifluorescencia en las diferentes condiciones experimentales de la Tabla 1 en donde la concentración de NaCl fue aumentando en cada condición, además de agregar el Peg-8000 como un agente de crowding. Las pruebas se realizaron a pH 6.5 y pH 8.5 con el fin de mantener el pH en el cual se encontraba el lisado total y la fracción enriquecida de mCh-DBP después de su paso por columna de intercambio catiónico y columna de afinidad respectivamente.

Lisado Total mCh-DBP						
Mix	[NaCl] (mM)	Peg-8000 (μL)	Buffer Fosfatos pH 6.5 (μL)	Stock NaCl (μL)	Lisado (μL)	Volumen Total (μL)
1	0	0	5	0	10	15
2	0	1.5	3.5	0	10	15
3	100	1.5	3.2	0.3*	10	15
4	200	1.5	2.9	0.6*	10	15
5	400	1.5	2.3	1.2*	10	15
6	800	1.5	1.1	2.4*	10	15
7	2000	2	0	8*	10	20
mCh-DBP Enriquecido						
Mix	[NaCl] (mM)	Peg-8000 (μL)	Tris pH 8.5 (μL)	Stock NaCl (μL)	Lisado (μL)	Volumen Total (μL)
1	0	0	2.5	0	2.5	5
2	0	1	1.5	0	2.5	5
3	100	1	1.3	0.2**	2.5	5
4	200	1	1.1	0.4**	2.5	5
5	400	1	0.7	0.8**	2.5	5
6	800	1	0.7	0.8*	2.5	5
7	1000	1	0.5	1*	2.5	5
*	Stock NaCl 5M					
**	Stock NaCl 2.5M					

**Tabla 1 Condiciones probadas para ensayos de LLPS in vitro.** En la segunda columna de cada tabla se muestra la concentración final de NaCl de cada mezcla, en las columnas subsecuentes se muestran los volúmenes utilizados de cada solución para preparar cada mezcla y finalmente el volumen final. Cada mezcla se preparó de manera independiente y se dejó incubar a TA durante 15 min (“Enriquecido”) o 30 min (“Lisado total”).

En las Figuras Suplementarias 1 y 2 se muestran dos sets de adquisiciones representativas de tres experimentos independientes y en la Figura 23 se muestran los controles y la condición a 200 mM NaCl +10% PEG-8000, para cada condición se tomaron cinco campos distintos usando una cámara de 12 megapíxeles de un teléfono inteligente. Estas adquisiciones tienen la desventaja que la cámara hace un ajuste automático de contraste y brillo, sin embargo, para homogeneizar lo más posible las adquisiciones se realizaron ajustes de contraste y brillo a cada imagen usando el programa Image J. Para cada condición se montó 1 μl de cada mezcla con “Lisado total” en un portaobjetos y se observó que a los 30 min se comenzaban a detectar estructuras tipo gota por DIC utilizando un objetivo 63X con aceite de inmersión en un microscopio Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc.) y se usó el filtro CY3 para observar la señal de fluorescencia de mCherry.

Por otra parte, en la Figura Suplementaria 3, se muestran adquisiciones representativas de dos experimentos independientes y en la Figura 24 se muestran los controles y la condición a 200 mM NaCl +10% PEG-8000, para cada condición se tomaron 5 campos distintos. Se utilizó el microscopio Axioscope Upright (Carl Zeiss Inc). Las adquisiciones se realizaron con una cámara CCD Photometrics Cool Snapcf Monocromática y el software de adquisición de imagen Cool snap BW camera software. Se estableció un tiempo de exposición de 200 ms para todas las adquisiciones de DIC y epifluorescencia y se usó el objetivo 63x con inmersión en agua. Para cada condición se montó 1  $\mu$ l de la mezcla en un portaobjetos y las adquisiciones se tomaron a los 15 min posteriores a la preparación de la mezcla para cada condición de “Enriquecido” de la Tabla 1 ya que a este tiempo se comenzaban a detectar estructuras tipo gota. Se incluyó una barra de escala usando la utilería de Image J, en donde 53.75 pixeles corresponden a 10  $\mu$ m.

## **RESULTADOS**

### ***Expresión y enriquecimiento de la E1B-55K***

Para obtener las proteínas de cada dominio de E1B se usaron las construcciones en el plásmido pET27-b (+) descritas en la sección de materiales y métodos [50]. Debido a que desde mi trabajo realizado en licenciatura [62] se había tenido problemas para inducir la expresión de las construcciones de los dominios de la E1B, se decidió realizar las pruebas de viabilidad y permanencia del plásmido a lo largo del cultivo de las cepas transformadas.

Las cepas de expresión utilizadas fueron la cepa parental BL21 (DE3) y sus cepas derivadas C41 y C43. Las cepas C41 y C43 han sido utilizadas para expresión de proteínas que resultan tóxicas para la cepa parental BL21 (DE3) [63]. Posterior al análisis de tamaño y número de colonias obtenidas (Datos no mostrados), se concluyó que la cepa C43 era la mejor opción para expresar los dominios de E1B.

Por otra parte, como control se obtuvo el plásmido sin inserto (pET-27b (+) $\Delta$ ) a partir del plásmido con la construcción del dominio N-terminal de E1B (pET-27b(+):E1B-

N), según lo descrito en la sección de linearización y digestión de materiales y métodos.

Como se muestra en la Figura 12 panel A, posterior al procedimiento de digestión, se analizó el DNA y en el gel se observaron las bandas de alrededor de 5,306 pb correspondiente al plásmido linearizado y 544 pb correspondiente al inserto. En el panel B se muestra la presencia de DNA en 3 colonias grandes (Cg 1-3) y 3 colonias pequeñas (Cp 1-3) picadas 16 horas posteriores a la transformación con el DNA obtenido en el panel A. En el panel C se muestra la confirmación de la identidad del plásmido pET-27b(+) $\Delta$  al observar una banda de alrededor de 5,306 pb.

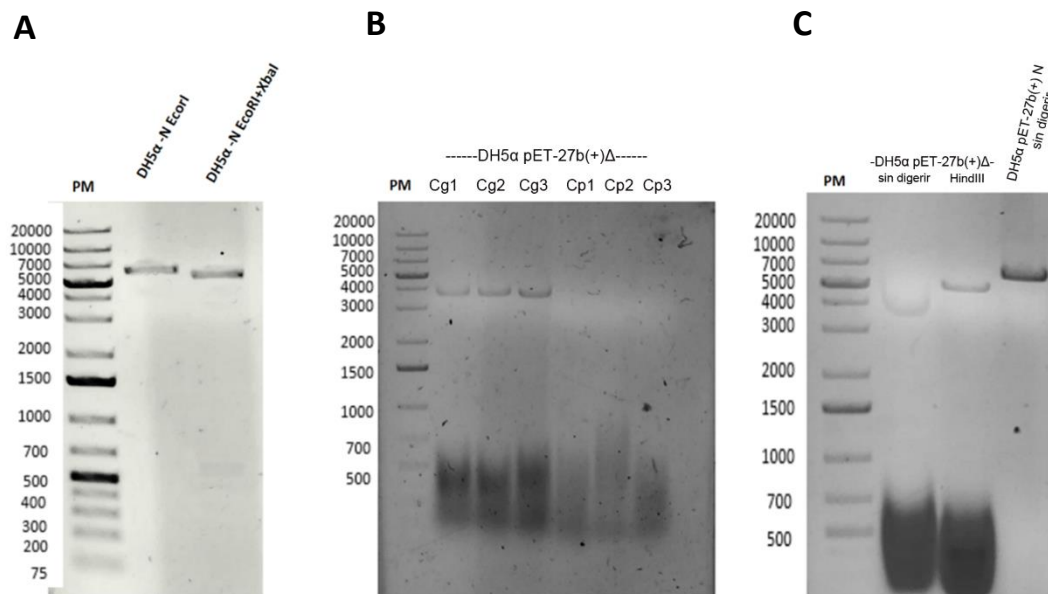
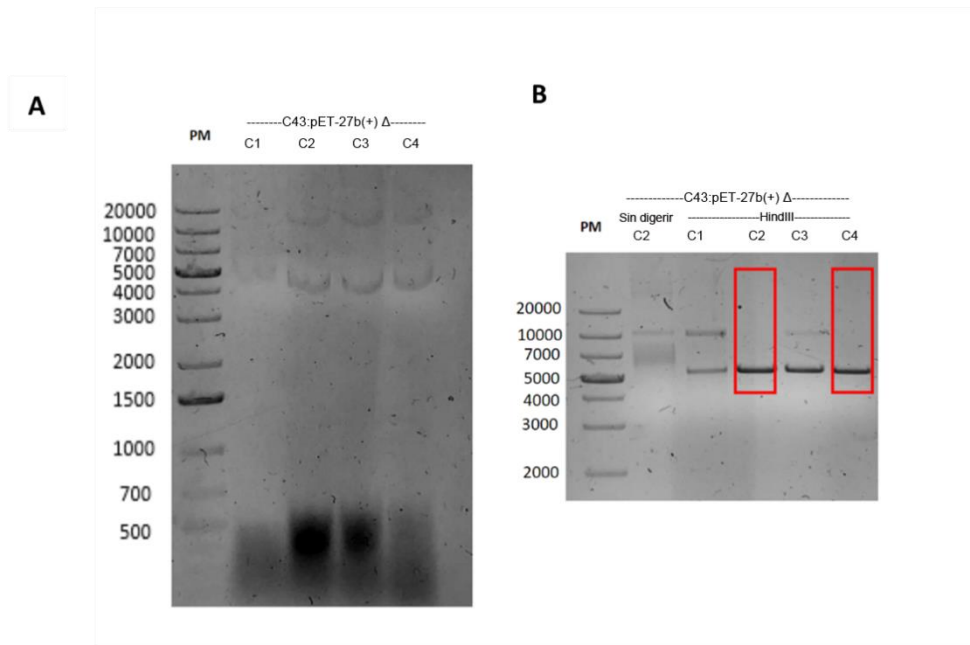


Figura 13 **Construcción del plásmido pET-27b(+) $\Delta$** . El panel A muestra la linearización del plásmido pET-27b(+)-N con un tamaño esperado de 5850 pb (carril 2) del cual se obtuvo pET-27b(+) $\Delta$  con un tamaño esperado de 5306 pb y la banda alrededor de 544 pb correspondiente al inserto liberado (carril 3). En el panel B se muestra la obtención de DNA de colonias de DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido obtenido en el panel A. En el panel C se muestra la verificación de la identidad del DNA obtenido en el panel B por digestión con HindIII cuyo sitio de restricción se mantiene en el plásmido pET-27b(+) $\Delta$ .

Posteriormente, se transformó la cepa C43 con el plásmido pET27-b(+) $\Delta$  (Figura 13), se extrajo DNA de cuatro colonias (panel A) y finalmente, se confirmó mediante la digestión con HindIII, la identidad del plásmido pET-27b(+) $\Delta$  (panel B).



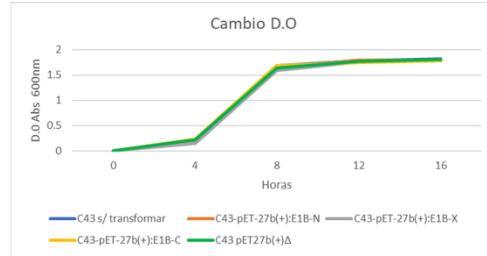
*Figura 14 Transformación de C43 con el plásmido pET-27b(+) $\Delta$ . El panel A muestra el DNA obtenido de 4 colonias de C43 transformada con pET-27b(+) $\Delta$  (C1-C4). Panel B muestra la digestión del DNA obtenido de las 4 colonias del panel A. Se seleccionaron y realizaron glicerolos de las colonias 2 y 4 (rectángulos rojos) ya que la digestión fue completa y se obtuvo una banda única de alrededor de 5,386 pb correspondiente al tamaño esperado del pET-27b(+) $\Delta$ .*

Posteriormente, se realizó una prueba de resistencia a kanamicina a lo largo de 16 horas para C43 sin transformar. Se descartó el crecimiento de la cepa en presencia de antibióticos y simultáneamente se realizó una prueba de viabilidad tanto de C43 sin transformar como transformada con cada una de las construcciones de E1B (Fig 14).

En la Figura 14 panel B y C se graficaron los datos del número de colonias para cada tiempo de la prueba. Los datos mostraron que, aunque para las C43 transformadas con cualquiera de los plásmidos la tasa de crecimiento es menor, los cultivos se mantuvieron viables a lo largo de las 16 horas del ensayo.

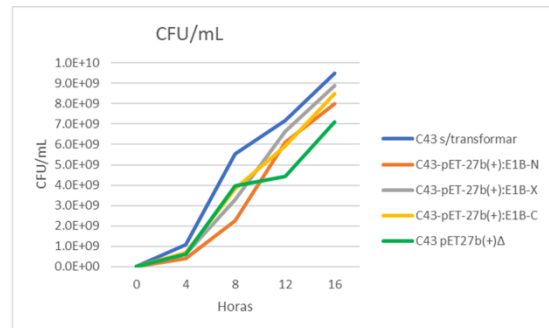
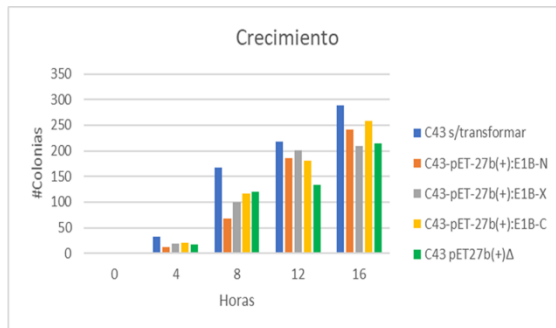
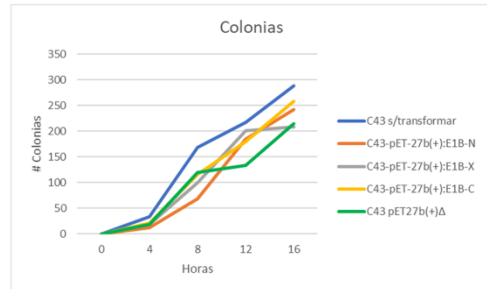
A

Horas/ D.O	C43 s/ transformar	C43-pET-27b(+):E1B-N	C43-pET-27b(+):E1B-X	C43-pET-27b(+):E1B-C	C43 pET27b(+) $\Delta$
0	0	0	0	0	0
4	0.204	0.183	0.152	0.235	0.215
8	1.691	1.646	1.595	1.684	1.64
12	1.784	1.799	1.766	1.751	1.777
16	1.823	1.803	1.815	1.781	1.81



B

Colonias horas	C43 s/transformar	C43-pET-27b(+):E1B-N	C43-pET-27b(+):E1B-X	C43-pET-27b(+):E1B-C	C43 pET27b(+) $\Delta$
0	0	0	0	0	0
4	33	12	19	21	18
8	168	68	100	116	120
12	217	185	201	180	134
16	288	242	209	258	215



CFU/mL horas	C43 s/transformar	C43-pET-27b(+):E1B-N	C43-pET-27b(+):E1B-X	C43-pET-27b(+):E1B-C	C43 pET27b(+) $\Delta$
0	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
4	1.1E+09	4.0E+08	6.3E+08	6.9E+08	5.9E+08
8	5.5E+09	2.2E+09	3.3E+09	3.8E+09	4.0E+09
12	7.2E+09	6.1E+09	6.6E+09	5.9E+09	4.4E+09
16	9.5E+09	8.0E+09	8.9E+09	8.5E+09	7.1E+09

**Figura 15 Prueba de viabilidad C43.** Panel A se muestran los valores de DO 600 nm obtenidos a lo largo del cultivo y en el gráfico dichos valores graficados contra el tiempo, en donde se pueden observar las fases de crecimiento bacteriano. En el panel B se muestra el conteo de colonias viables de una dilución  $1:1 \times 10^{-6}$  de cada tiempo durante el cultivo de 16 horas. El panel C muestra el gráfico en barras del número de colonias por cada tiempo y el panel D junto con la tabla inferior muestran los valores de CFU/ml obtenidos para cada condición. Las muestras se tomaron a las 0, 4, 8, 12 y 16 horas de un cultivo de 25 ml.

Para determinar si los plásmidos se mantenían, se aisló DNA cada 4 horas de un cultivo de 16 horas, éste se digirió (Figura 15) obteniendo bandas alrededor de los tamaños esperados para la región amino (N) de E1B con un tamaño de 544 pb, la región central (X) de 820 pb, la región carboxilo terminal (C) de 445 pb y de 5,280 pb para el plásmido pET-27b(+) $\Delta$ , confirmando la identidad y permanencia de cada construcción a lo largo del cultivo de 16 horas.



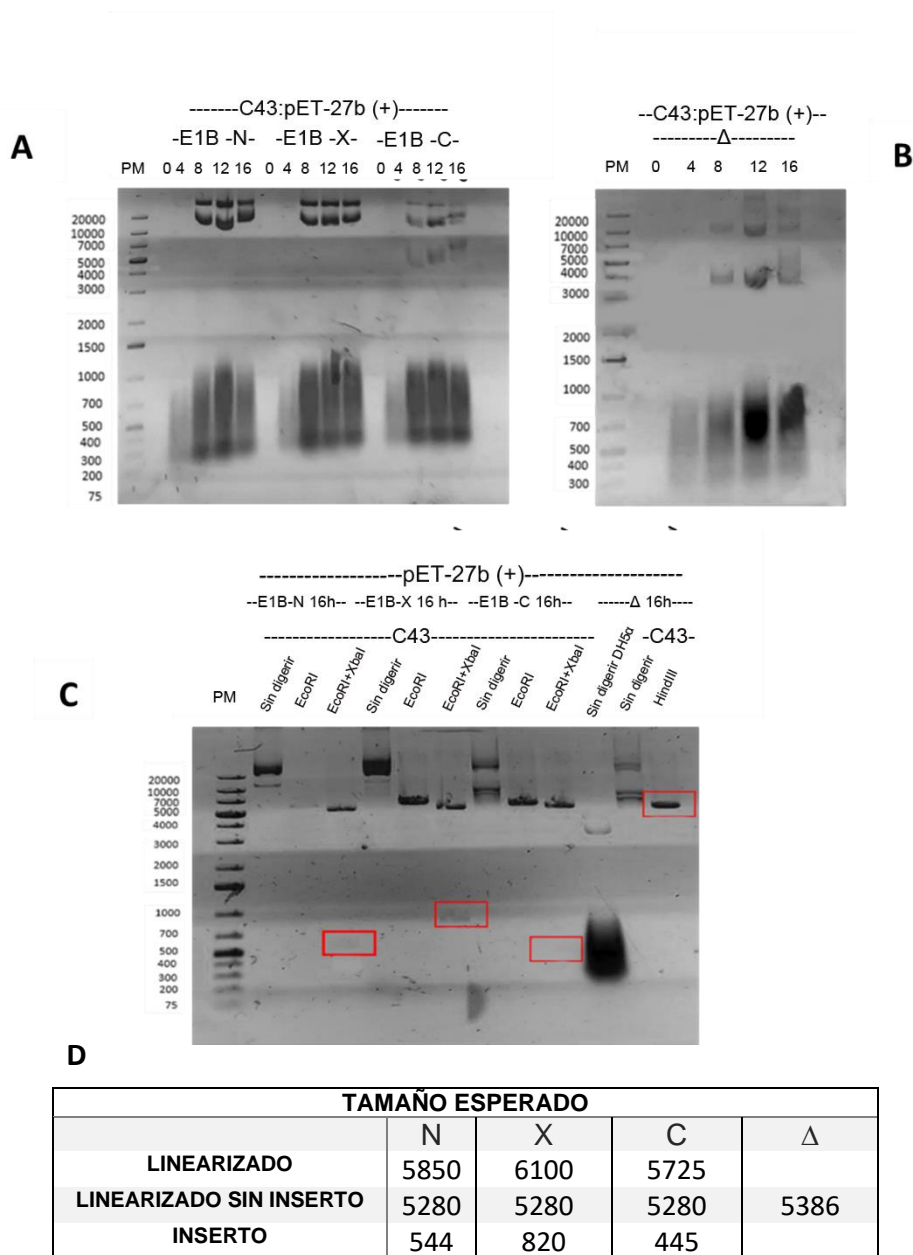


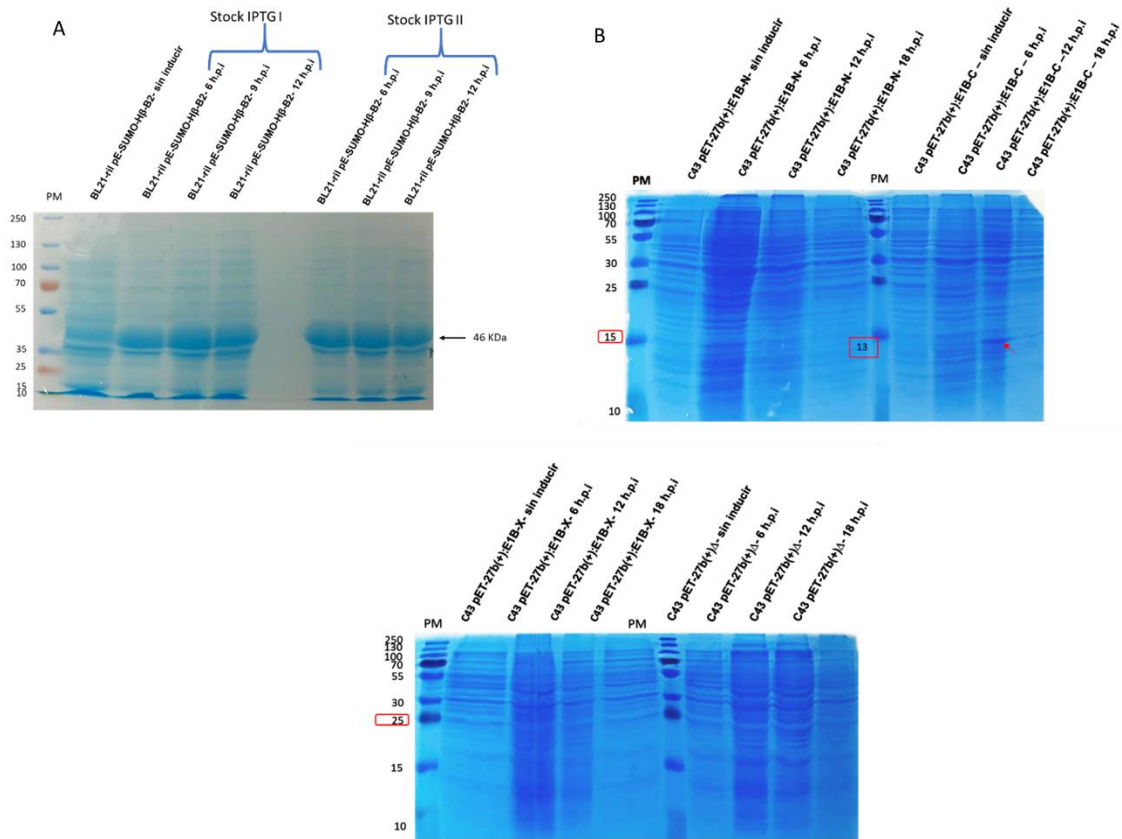
Figura 16 Prueba de permanencia de plásmidos pET 27-b(+). Panel A y B se muestra el DNA obtenido del cultivo de C43 transformado con cada construcción del plásmido pET27-b(+) (+/N/X/C/Δ) a las 0, 4, 8, 12 y 16 horas de cultivo. En el panel C se muestra el DNA digerido con EcoRI o la combinación de EcoRI+XbaI de las muestras de DNA (16 h) del panel A y HindIII del panel B. Las bandas con el tamaño esperado para el inserto de cada construcción se señalan en rectángulos rojos y los tamaños esperados en la tabla del panel D.

En la Tabla 2 se resumen las condiciones probadas para las pruebas de inducción y procesamiento de las muestras, en ningún caso se detectaron bandas esperadas por SDS-PAGE teñido con Azul de Comassie, ni diferencias claras con respecto a los controles de la cepa sin transformar o transformada con pET-27b(+) $\Delta$ . En la

Figura 16 panel A, se muestran los geles correspondientes a un control de funcionamiento de los *stocks* de IPTG, se hizo la prueba de inducción a 0.33 mM IPTG 25°C, se usaron 2 *stocks* de IPTG 1M y en ambos casos se observó el enriquecimiento de una banda con el peso molecular esperado de aproximadamente 46 kDa que corresponden a la cristalina H $\beta$ -B2 que ha sido obtenida anteriormente [64]. También en la Figura 16 se muestran los geles teñidos con Azul de Comassie para las pruebas de hasta 18 horas post inducción de C43 transformada con los plásmidos que expresan los dominios de E1B; pET-27b(+):E1B-N, 27b(+):E1B-X y 27b(+):E1B-C , estos se muestran en los paneles C y D. Adicionalmente se muestra como control a la cepa C43 sin transformar (Panel B) y transformada con el plásmido sin inserto (pET-27b(+) $\Delta$ ) (Panel C). Para los dominios amino (N) y central (X) no se observó el enriquecimiento de las bandas esperadas de 15 kDa y 25 kDa, respectivamente. En el caso del dominio carboxilo (C) se observó un aparente enriquecimiento de una banda alrededor de los 13 kDa a las 12 h.p.i (panel C, flecha roja); sin embargo, este resultado no fue reproducible. Los datos mostraron que no se obtienen niveles detectables de ninguno de los dominios de E1B en las condiciones que se probaron utilizando el sistema pET27(b) – E. coli-C43.

Cepa/Construcción	Tiempo de cultivo	[IPTG]	Volumen de cultivo	Temperatura de inducción	Condiciones de sonicación	Volumen cargado	Banda esperada	% Acrilamida	Inducción
C43	18 hrs.	1 mM	25 mL	25°C	5 mlutos en baño	30 $\mu$ L de 25 mL	N/A	15%	N/A
	54 hrs.	1 mM	25 mL	25°C	3 pulsos 10 seg ON/30 OFF A=15%	30 $\mu$ L de 25 mL	N/A	15%	N/A
C43 pET-27b(+) $\Delta$	18 hrs.	1 mM	25 mL	25°C	5 mlutos en baño	30 $\mu$ L de 25 mL	N/A	15%	N/A
	54 hrs.	1 mM	25 mL	25°C	3 pulsos 10 seg ON/30 OFF A=15%	30 $\mu$ L de 25 mL	N/A	15%	N/A
C43 pET-27b(+):E1B-N	18 hrs.	1 mM	25 mL	25°C	5 mlutos en baño	30 $\mu$ L de 25 mL	15 KDa	15%	No
	54 hrs.	1 mM	25 mL	25°C	3 pulsos 10 seg ON/30 OFF A=15%	30 $\mu$ L de 25 mL	15 KDa	15%	No
C43 pET-27b(+):E1B-X	18 hrs.	1 mM	25 mL	25°C	5 mlutos en baño	30 $\mu$ L de 25 mL	25 KDa	15%	No
	54 hrs.	1 mM	25 mL	25°C	3 pulsos 10 seg ON/30 OFF A=15%	30 $\mu$ L de 25 mL	25 KDa	15%	No
C43 pET-27b(+):E1B-C	18 hrs.	1 mM	25 mL	25°C	5 mlutos en baño	30 $\mu$ L de 25 mL	13 KDa	15%	No
	54 hrs.	1 mM	25 mL	25°C	3 pulsos 10 seg ON/30 OFF A=15%	30 $\mu$ L de 25 mL	13 KDa	15%	No

**Tabla 2 Condiciones probadas en pruebas de inducción para las proteínas correspondientes a los dominios de E1B.** Se muestran las condiciones probadas tanto en tiempo de cultivo como en condiciones de sonicación. El resto de las condiciones se mantuvieron constantes.



**Figura 17 Pruebas de inducción de expresión de los dominios de E1B con el sistema de plásmidos pET-27b(+)**. En el panel A se muestra el control de funcionamiento de IPTG usado para inducir la expresión de la cristalina Hβ-B2. En los paneles B y C se muestran los geles de poliacrilamida 15% y 10%, respectivamente. Estos geles fueron para identificar la inducción de la expresión de los dominios N, X y C de E1B a lo largo de cultivos inducidos con el IPTG usado en el panel A, la duración de las pruebas de inducción fue de 18 horas y se tomó muestra a las 6, 12 y 18 h.p.i. El recuadro rojo indica el tamaño esperado de la banda correspondiente a cada uno de los dominios de E1B.

## La E1B-55K no se predice como candidata de LLPS

Se utilizó el programa PSPredictor, descrito antes, para predecir si E1B (496 a.a) o alguno de sus dominios N (1-150), X (151- 389), C (390-496) o combinaciones de dominios eran candidatos para inducir LLPS. Se consideraron como candidatos sobre todo a los dominios N y la región del a.a 385 al 496 del dominio C dado que se predicen como IDRs [50]. Los resultados se muestran en la Figura 17 e indicaron que ninguno de los dominios de E1B (Panel A), ni la proteína completa (Panel A), ni combinaciones de los dominios (Panel B) fueron predichos como candidatos para inducir LLPS ya que los valores obtenidos fueron menores a 0.5.

Seq ID	PSP Score	PSP (Yes/No)
E1B 55K Carboxilo	0.0032	No

Seq ID	PSP Score	PSP (Yes/No)
E1B-55K-Central	0.0722	No

Prediction task 2

Seq ID	PSP Score	PSP (Yes/No)
E1B 55K Amino	0.0242	No

Prediction task 1

Seq ID	PSP Score	PSP (Yes/No)
E1B55K	0.0485	No

Seq ID	PSP Score	PSP (Yes/No)
E1B-55K-Amino Carboxilo	0.3733	No

Prediction task 7

Seq ID	PSP Score	PSP (Yes/No)
E1B-55K-Central Carboxilo	0.2505	No

Prediction task 6

Seq ID	PSP Score	PSP (Yes/No)
E1B-55K-Amino Central	0.0436	No

Prediction task 5

Figura 18 **Predicción de LLPS para la E1B-55K con PSPredictor**. Se muestran los resultados de la herramienta PSPredictor para cada una de las secuencias. PSP scores mayores de 0.5 indican a un candidato para LLPS (PSP(Yes)). En el panel A se muestran los scores obtenidos para E1B-55K completa (recuadro amarillo) y cada uno de sus dominios; amino N (recuadro rojo), central X (recuadro azul) y carboxilo C (recuadro verde). En el panel B se muestran combinaciones de los dominios, con el mismo código de colores.

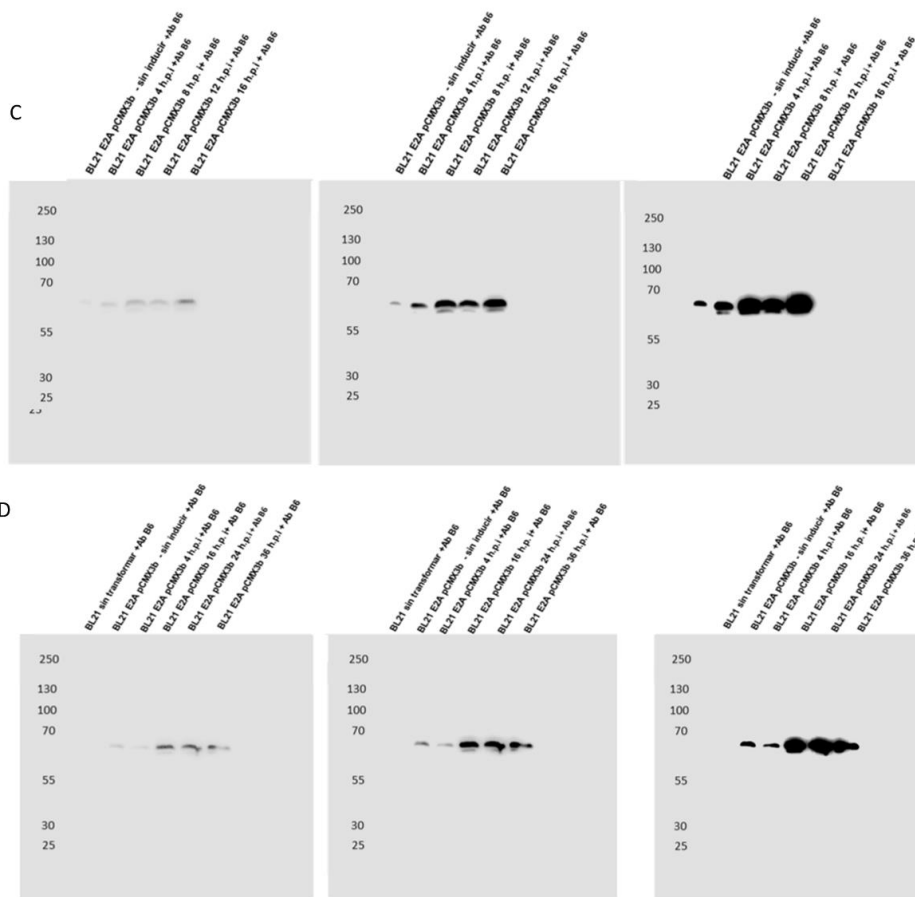
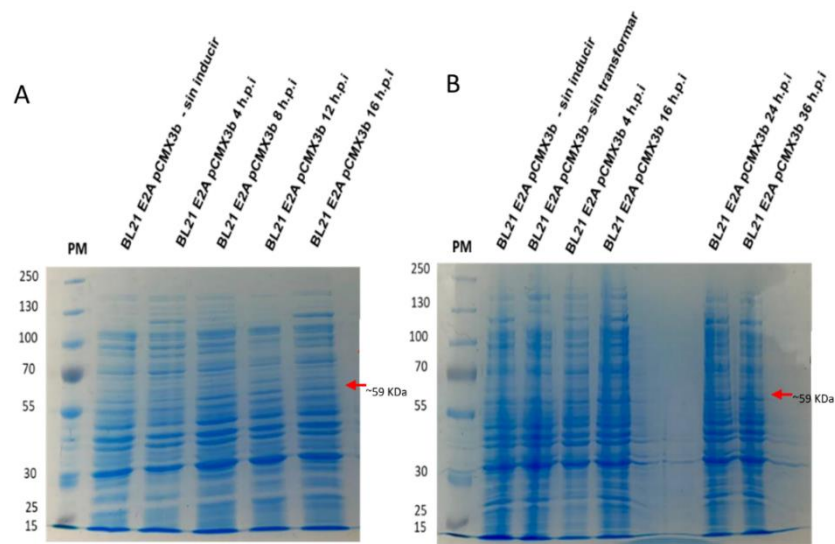
## **Expresión y enriquecimiento de la proteína DBP**

### **Expresión de DBP en *E. coli***

Para la expresión de DBP se transformó la cepa BL21 (DE3) con el plásmido 2744 E2A-pCMX3 que codifica para la DBP con un *Flag-tag* (DYKDDDDK) en el extremo amino terminal de la proteína, se hizo una prueba de inducción con 1mM de IPTG a 25 °C tomando muestra cada 4 horas durante 16 horas. En cada tiempo se tomó 1 ml de cultivo, el pellet se resuspendió en 500 µL de PBS, se tomaron 20 µl, se resuspendieron con 5 µl de *buffer* Laemmli 6x y los 25 µl de volumen de cada muestra se analizaron por SDS-PAGE.

Como se muestra en el panel A de la Figura 18, si bien no se observó el enriquecimiento de una banda de alrededor de los 59 kDa, que es la migración esperada para DBP no fosforilada producida en *E. coli*, sí se observaron bandas distintas con respecto al cultivo sin inducir. En el panel B se muestra una repetición del experimento en el que se incluyó BL21 (DE3) sin transformar y la prueba se hizo a tiempos más largos de inducción (4, 16, 24, 36 horas), obteniendo resultados similares.

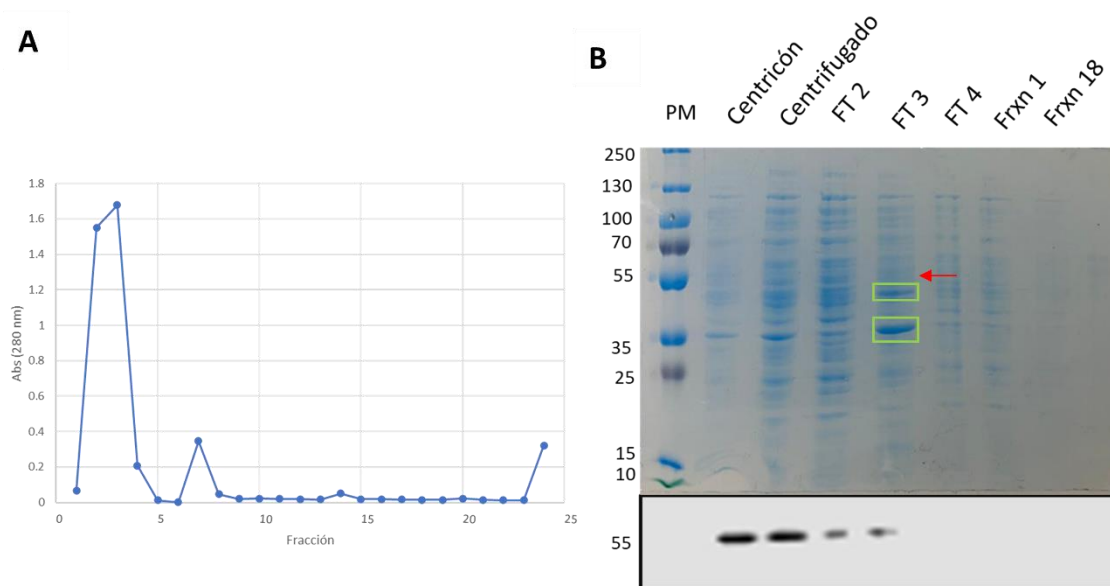
Se hicieron inmunotransferencias con estas muestras usando el anticuerpo monoclonal B6 dirigido contra DBP. Los resultados se muestran en el panel C y D de la Figura 18, en donde se observó una señal clara alrededor de los 50 kDa DBP y la señal aumentó conforme transcurrió el tiempo al que se tomó la muestra, siendo el mayor nivel de señal entre las 16 y 24 horas. Si bien, este aumento debe confirmarse con un control de carga, los geles de acrilamida teñidos con Azul de Comassie mostraron cantidades similares de proteína en cada carril. Con estos resultados se decidió establecer las 16 h post-inducción como tiempo de cultivo para obtener a la proteína DBP.



**Figura 19 Prueba de inducción con el plásmido 2744 E2A-pCMX3.** En el panel A se muestran las proteínas de los lisados de BL21 (DE3) transformada con el plásmido 2744 E2A-pCMX3 con inducción a las 4, 8, 12 y 16 h.p.i. En el panel B se muestran los lisados de BL21 (DE3) transformada con el plásmido 2744 E2ApCMX3 con inducción a las 4, 16, 24 y 36 h.p.i. En ambos casos la flecha roja indica el tamaño esperado para la banda de DBP (59 kDa). En el panel C se muestran inmunotransferencias usando anti DBP con las muestras del panel A y en el panel D con las muestras del panel B. En cada caso se muestran tres exposiciones obtenidas con el scanner Ci-Licor.

Con la intención de aumentar el rendimiento de DBP, se escaló el cultivo y las bacterias se lisaron por sonicación, sin embargo, el rendimiento en cultivos de menor volumen tratados directamente con *buffer* Laemmli fue mejor (datos no mostrados) por lo que estos últimos se utilizaron para los experimentos subsecuentes.

Después de confirmar por inmunotransferencia la expresión de DBP en *E. coli* BL21(DE3) y decidir el método de lisis, dado que no contábamos con una columna de afinidad para utilizar el *Flag-tag* de la construcción, se decidió intentar purificar la proteína por cromatografía de intercambio catiónico, como se describe en materiales y métodos. Como se mencionó anteriormente, la construcción del plásmido 2744 E2A-pCMX3 expresa a DBP con el *FlagTag* DYKDDDDK en su N-terminal, por lo que el punto isoeléctrico teórico (pI) de la proteína se calculó con el *Flag* y fue de 6.78. Como se muestra en el cromatograma de la Figura 19 el pico de absorbancia más alto a 280 nm se obtuvo en el *Flow-through* (FT) indicando que la proteína no se adhirió a la columna. Esto se confirmó mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. En el SDS-PAGE se observó en el FT3 un aparente enriquecimiento de una banda por debajo de 55 kDa. Posteriormente, las muestras se analizaron por inmunotransferencia y se detectó a DBP en las FT2 y FT3. En la inmunotransferencia también se observó esta banda de DBP en los pasos previos a la cromatografía. Dichos pasos fueron, concentrar el lisado total mediante un centrífugo con corte de 10 kDa y posteriormente, centrifugar para clarificar el sobrenadante y evitar que la columna se tapara, estos pasos se realizaron como se describe en “cromatografía de intercambio catiónico” en la sección de materiales y métodos. En el inmunotransferencia se confirmó que no se perdió DBP en dichos pasos previos. Con las condiciones de cromatografía usadas DBP no se adsorbió a la columna y por tanto se detecta en las fracciones correspondientes al FT 2 y 3 en la inmunotransferencia.



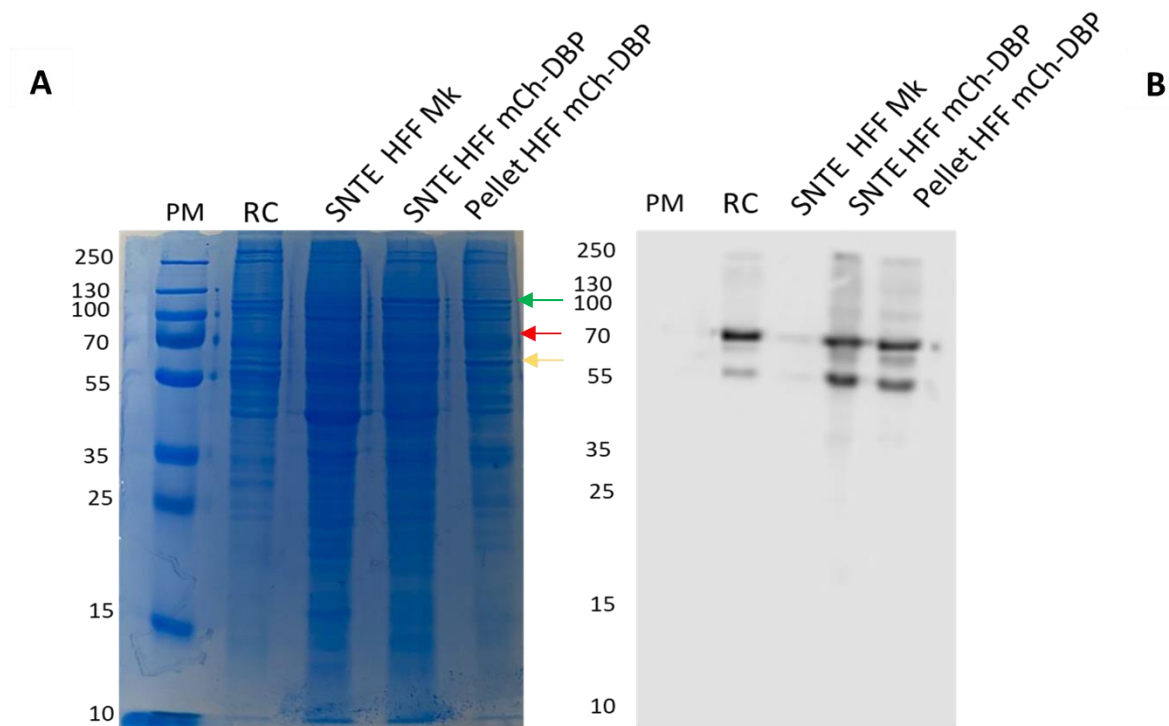
**Figura 20 Paso de la muestra compleja de *E. coli* BL21(DE3)-2744 E2A-pCMX3 por cromatografía de intercambio catiónico.** En el panel A se muestra el cromatograma obtenido después de medir la absorbancia a 280 nm. Las primeras 5 fracciones corresponden al FT, a partir de la fracción 5 se comenzó a adicionar un gradiente creciente de NaCl hasta llegar a una concentración de 5M NaCl. En el panel B se muestra el gel de acrilamida teñido con Azul de Comassie en donde se cargaron las fracciones con absorbancia del panel A y debajo la inmunotransferencia usando el mAb B6 para detectar DBP. La flecha roja indica la región donde se espera enriquecimiento de banda y los recuadros verdes bandas de proteínas enriquecidas.

### Expresión de DBP en células infectadas con AdV

Como alternativa para obtener a la proteína DBP se usaron células HFF infectadas con un HAdV recombinante que expresa a la DBP como fusión con la proteína fluorescente mCherry (AdV mCh-DBP), esta fusión tiene la ventaja de que se puede seguir la señal de mCherry mediante microscopía de epifluorescencia para los ensayos de LLPS *in vitro*. El procedimiento de infección se realizó como se describe en materiales y métodos. La figura 20 muestra el análisis del lisado de células infectadas. En el panel A se muestra un gel de acrilamida teñido con Azul de Comassie en donde se pueden ver las bandas reportadas anteriormente alrededor de los 70 kDa (flecha roja) y otra por encima de 55 kDa (flecha naranja) y el enriquecimiento de otra banda por encima de 100 kDa (flecha verde) que parecen ser más abundantes que en las células no infectadas. Se sugiere que estas bandas corresponden a la DBP no fosforilada (55kDa), la DBP fosforilada (70kDa) y si bien



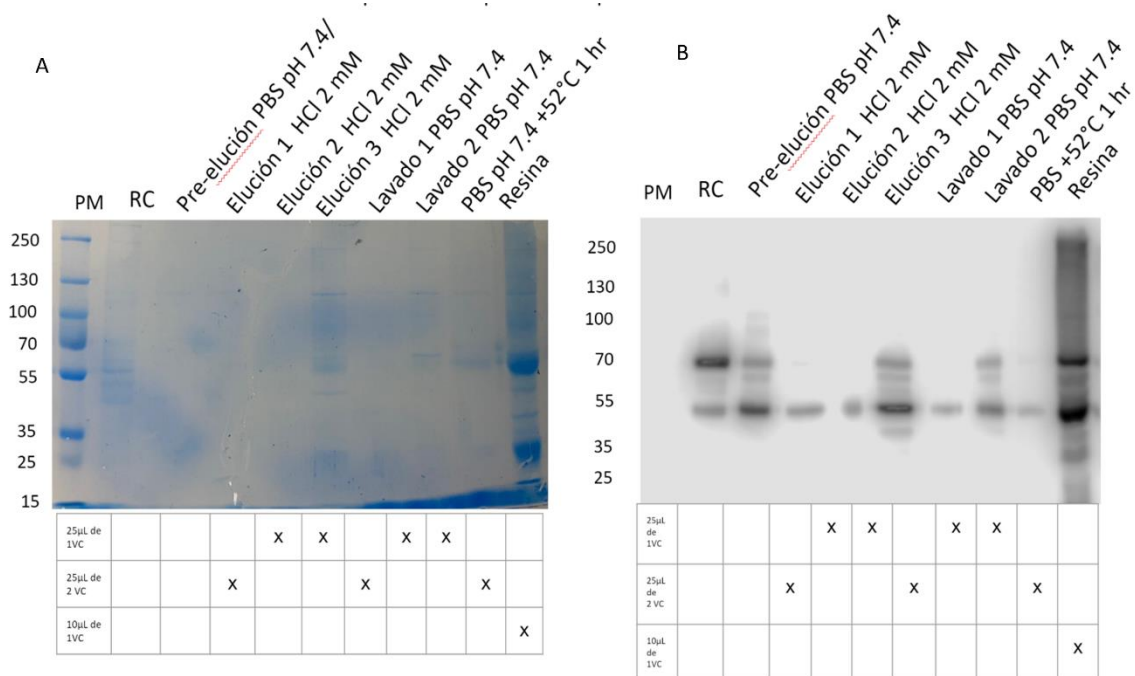
se reportó previamente que la fusión mCherry-DBP migra por encima de los 100 kDa, sugerimos que esta fusión sería fosforilada y que la fusión no fosforilada por su peso calculado (26 kDa mCherry + 59 kDa DBP = 85 kDa) podría ser parte de la banda alrededor de los 70 kDa. Las muestras se analizaron por inmunotransferencia y en el panel B se confirmó la presencia de ambas formas esperadas y previamente reportadas de DBP que coinciden con las formas de DBP encontradas en la fracción de RC aislados que se usó como control y adicionalmente una banda tenue alrededor de los 100 kDa que correspondería a la fusión mCh-DBP fosforilada.



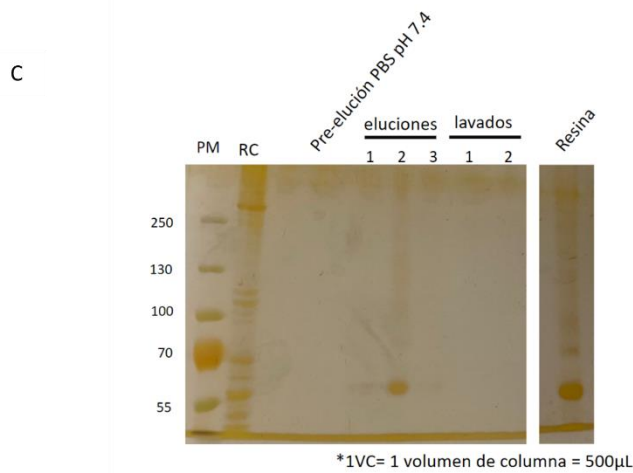
**Figura 21 Detección de mCh-DBP en lisados de células infectadas con AdV mCh-DBP.** En el panel A se muestra como control (RC) que es una fracción de compartimentos de replicación aislados a las 36 hpi, el lisado obtenido de células no infectadas (Mk) y el sobrenadante y pellet obtenido de células HFF infectadas con AdV mCh-DBP. En el panel B se muestra la inmunotransferencia usando el mAb B6 para detectar DBP. Con las flechas se señalan las tres bandas de DBP enriquecidas que se ven en el gel teñido con Azul de Comassie que también se observan en la inmunotransferencia.

Para obtener una muestra enriquecida con la proteína DBP a partir de lisados de células infectadas con el virus AdV mCh-DBP, se utilizó cromatografía de afinidad como se describe en la sección de materiales y métodos. Para inmovilizar el

anticuerpo B6 a la resina, se aplicó sobrenadante de hibridoma de mAb-B6 a una resina de sefarosa-proteína A y se entrecruzó según el procedimiento establecido en la sección de cromatografía de afinidad de materiales y métodos. Se concluyó que la mayor parte del mAb-B6 se adsorbió y entrecruzó con la resina sefarosa-A ya que en los lavados se observó poca proteína (datos no mostrados). Posteriormente, se incubó durante 48 h el lisado de las células HFF infectadas con el AdV mCh-DBP, y la resina se lavó con PBS (datos nos mostrados). Para la elución se probaron distintas condiciones como se describe en materiales y métodos, en el panel B de la Figura 21 se muestran los correspondientes a la elución con 2 mM HCl y la elución por temperatura. Finalmente, la condición de elución elegida fue 5 mM HCl (Figura 21 panel C) ya que en esta condición se detectó el enriquecimiento de una banda alrededor de uno de los pesos esperados para DBP y un aparente bandeo difuso por encima de la banda de 55kDa, lo que sugirió presencia de todas las formas de DBP tanto no fosforilada como fosforilada y la fusión mCh-DBP, además no se detectó más proteína en los lavados ni bandas por debajo de 55kDa. Si bien el método de elución es deficiente, fue la mejor opción disponible en el momento, falta mejorar el protocolo de purificación y enriquecer sobre todo a mCh-DBP, esto se discutirá más adelante. A pesar del bajo rendimiento de mCh-DBP, la proteína obtenida fue utilizada para los ensayos de LLPS *in vitro* descritos más adelante.



\*1VC= 1 volumen de columna = 500µL



**Figura 22 Enriquecimiento de la proteína mCh-DBP por cromatografía de afinidad.** En el panel A y B se muestran respectivamente el SDS-Page teñido con Azul de Comassie y la inmunotransferencia de los métodos de elución probados para eluir a mCh-DBP de la columna Sefarosa-A-B6. En el panel C se muestra el SDS-Page teñido con plata de la elución 5mM HCl que fue la elegido como método de elución de mCh-DBP.

## ***Ensayos de LLPS in vitro***

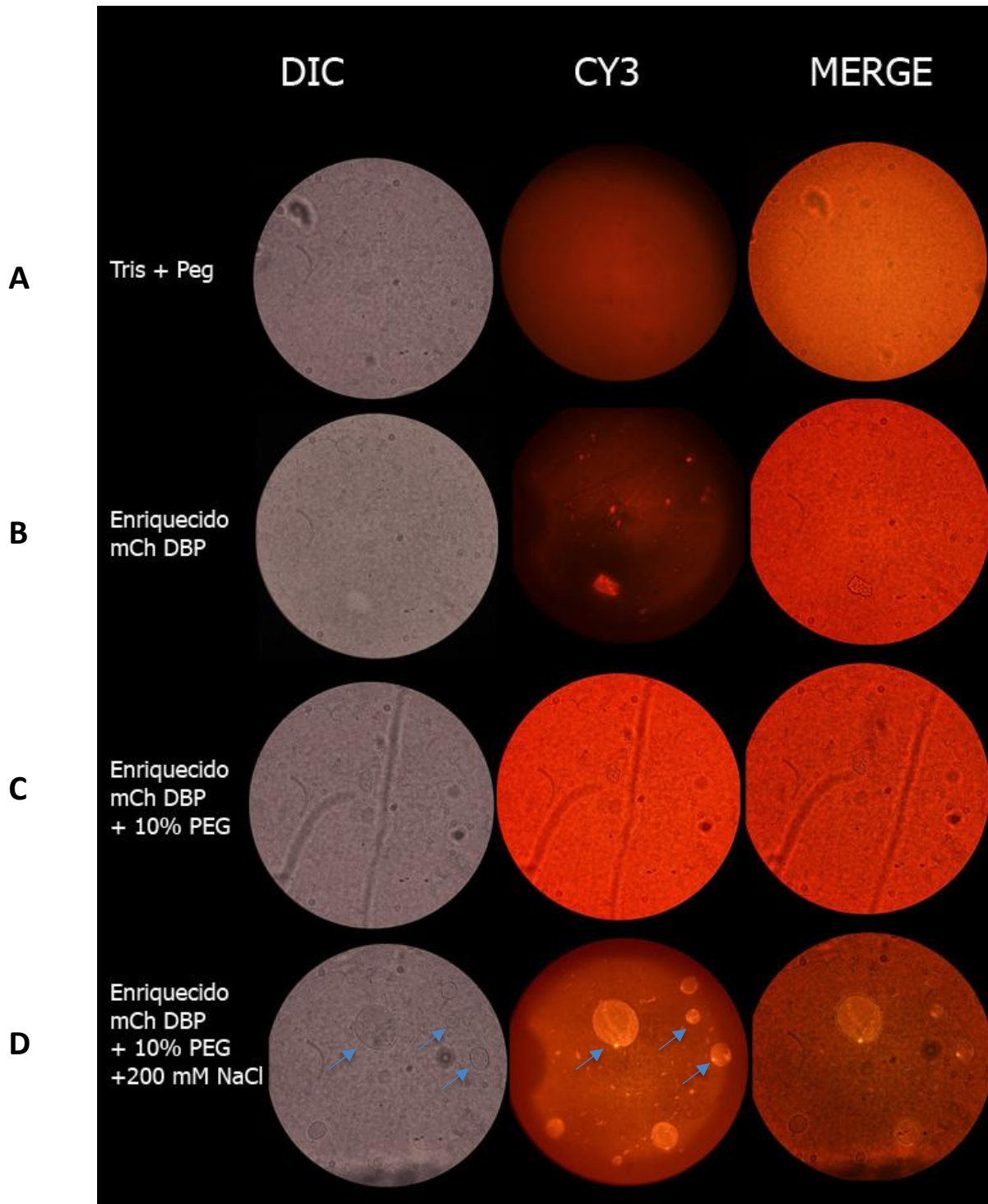
### ***Lisado de células infectadas con AdV mCh-DBP***

Para montar los ensayos *in vitro* y dado que los antecedentes de este proyecto fueron realizados en el contexto celular por lo que resultaba interesante replicar esto *in vitro*, se utilizaron los lisados totales de células HFF sin infectar (MK) o infectadas con AdV mCh-DBP y siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos se realizaron pruebas de LLPS *in vitro*. En cada caso se hicieron tres experimentos independientes a pH 6.5 (adquisiciones representativas para cada condición mostradas en la Figura suplementaria 1). Resultó interesante que a 200 mM NaCl y en presencia de 10% de PEG-8000 como agente de *crowding*, se vieron por DIC estructuras tipo gota, sin embargo, no se observó señal clara de fluorescencia que sugiriera que mCh-DBP se encontraba asociada a dichas estructuras tipo gota, probablemente debido a la baja concentración de la fusión mCh-DBP con respecto a las otras formas de DBP y el resto de los componentes celulares y virales presentes en el lisado total, por lo que se decidió enriquecer a la proteína.

### ***Proteína DBP enriquecida por cromatografía de afinidad***

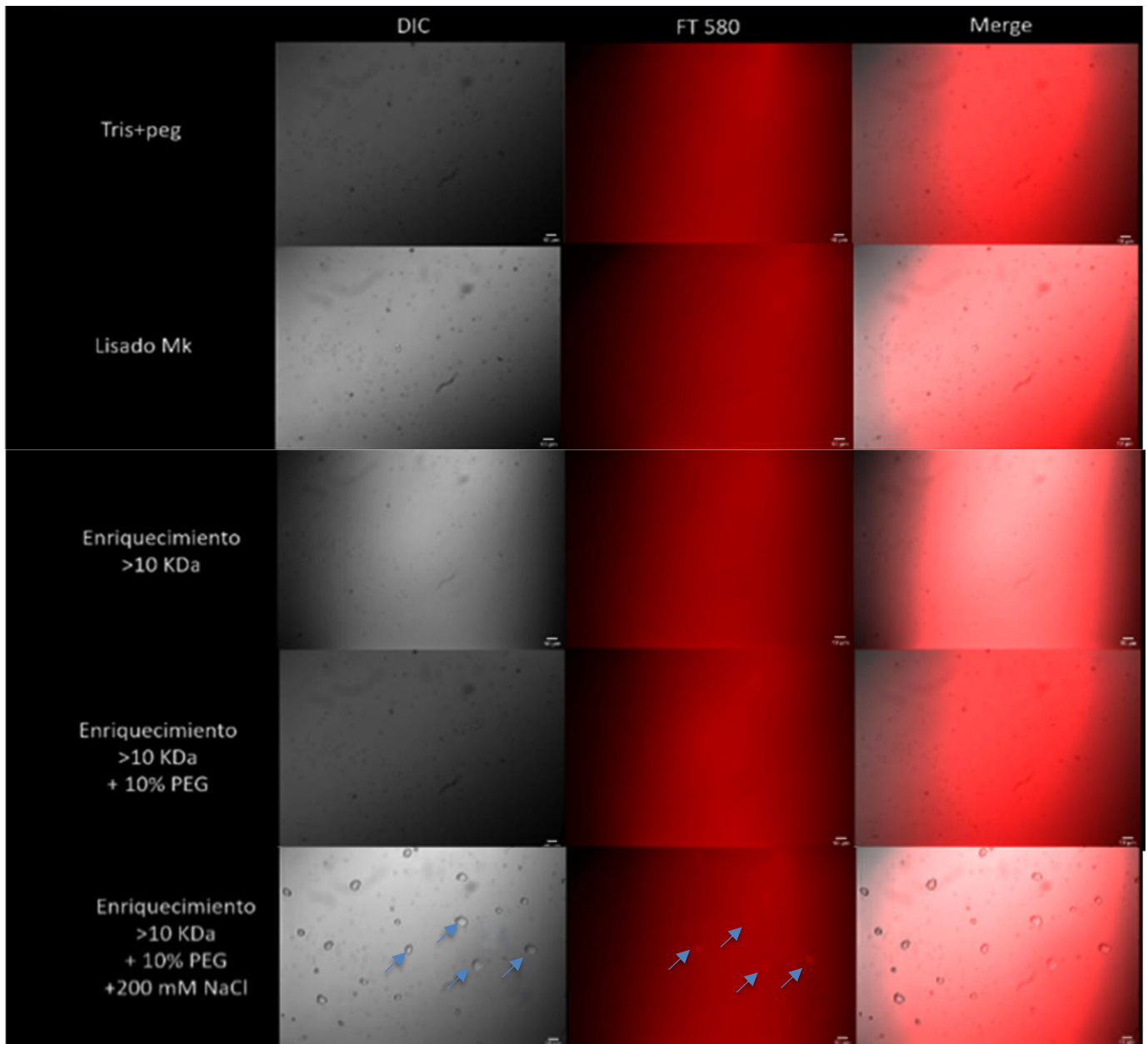
Para determinar si al enriquecer y concentrar a la proteína DBP aumentaba o se desplazaban las condiciones para observar estructuras tipo gota que tuvieran señal de mCh-DBP asociada, el lisado total con mCh-DBP se enriqueció por cromatografía de afinidad y se concentró utilizando un centrifugón con corte de 10 kDa según el procedimiento descrito en materiales y métodos. Nuevamente se realizaron tres experimentos independientes, con pH 8.5 (este pH fue debido a las condiciones de elución descritas en materiales y métodos) y se observó la distribución de la señal mCh-DBP vista con el filtro CY3 y la morfología de las estructuras vista por DIC (Figura 23). Resultó interesante que a los 15 min de realizado el mix y de nuevo a 200 mM NaCl la morfología detectada fue de tipo gota,

similar a lo observado para las pruebas con el lisado total, pero en este caso se observó también señal de fluorescencia en el canal CY3. En este caso, la morfología tipo gota se detectó desde la condición de 100 mM NaCl, pero a 200 mM NaCl se observó el mayor número de estructuras tipo gota. En 400 y 800 mM NaCl se detectaron estructuras tipo gota de mayor tamaño y con señal en la periferia o con aparente sub-compartimentalización (Figura Suplementaria 2) Esto sugiere que el enriquecimiento favoreció la formación de estructuras tipo gota con mCh-DBP asociada.



**Figura 23 Condición 200 mM NaCl de la prueba de LLPS in vitro con mCh-DBP enriquecida 1.** Se muestran adquisiciones representativas de los controles del ensayo y la condición con 200 mM NaCl; panel A Buffer Tris pH 8.5, panel B lisado enriquecido mCh-DBP + buffer Tris pH 8.5, panel C lisado enriquecido mCh-DBP + buffer Tris pH 8.5 + 10% PEG-800 como agente de crowding y en el panel D lisado enriquecido mCh-DBP + buffer Tris pH 8.5 + 10% PEG-800 + 200 mM NaCl en donde se observaron estructuras con morfología tipo gota y señal de fluorescencia asociada a dichas estructuras. Tres de las estructuras tipo gota con señal de fluorescencia asociada se señalan con flechas azules. Adquisiciones del resto de las condiciones probadas en este ensayo se encuentran en la Figura Suplementaria 2.

Con el fin de mejorar las adquisiciones se realizaron dos repeticiones más usando la muestra enriquecida de DBP y un microscopio con el sistema DIC calibrado y cámara acoplada directamente al microscopio. Las fotos se tomaron a los 15 min de incubación de la mezcla ya que a este tiempo se comenzaron a observar las estructuras tipo gota (Figura 24). De nuevo se pudieron observar estructuras tipo gota mediante DIC a los 200 mM de NaCl que fue la condición donde se vio el mayor número de estructuras tipo gota. Desde los 100 mM de NaCl se observaron gotas, sin embargo, la longitud promedio a 100 mM de NaCl fue de 35.71  $\mu\text{m}$  contra 6.65  $\mu\text{m}$  a 200 mM de NaCl. También se puede observar que si bien el tamaño de las gotas detectadas en 200 mM NaCl fue menor a las detectadas en 100 mM, la cantidad de estructuras tipo gota es aproximadamente 3 veces mayor en 200 mM de NaCl y en 400 mM NaCl se vieron gotas más grandes con un aparente enriquecimiento de la señal de fluorescencia en la periferia de la gota, mientras que en 800 mM NaCl si bien se observaron estructuras amorfas y aparentemente subcompartimentalizadas en varios campos, no se obtuvieron adquisiciones con suficiente contraste (Figura Suplementaria 3). En los casos en donde mediante DIC se observaron estructuras tipo gota, se observó una ligera señal de fluorescencia por encima de la señal de fondo dentro de las gotas, lo que sugiere que mCh-DBP se encuentra enriquecida dentro de las estructuras tipo gota, pero no se descarta que otras formas de DBP no fusionadas a mCherry puedan estar favoreciendo la formación de dichas gotas, por lo que estos experimentos son aún preliminares pero ayudaron a establecer las condiciones de NaCl en donde aparentemente se favorece la formación de BMCs con mCh-DBP asociada.

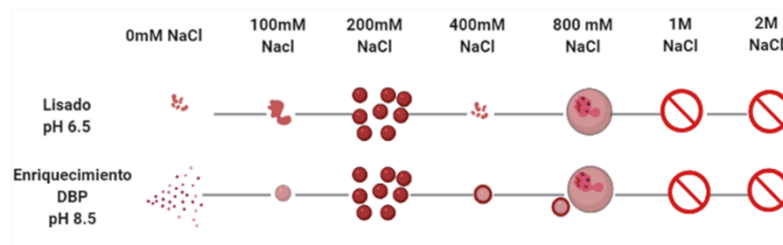


**Figura 24 Condición 200 mM NaCl de la prueba de LLPS in vitro con mCh-DBP enriquecida 2.** Se muestran adquisiciones representativas de los controles del ensayo y la condición con 200 mM NaCl; panel A Buffer Tris pH 8.5, panel B se adicionó un control de lisado de células no infectadas (Mk), panel C lisado enriquecido mCh-DBP + buffer Tris pH 8.5, panel D lisado enriquecido mCh-DBP + buffer Tris pH 8.5 + 10% PEG-800 como agente de crowding y en el panel E lisado enriquecido mCh-DBP + buffer Tris pH 8.5 + 10% PEG-800 + 200 mM NaCl en donde se observaron estructuras con morfología tipo gota y una ligera señal de fluorescencia asociada a dichas estructuras. Con flechas azules se señalan ejemplos. Adquisiciones del resto de las condiciones probadas en este ensayo se encuentran en la Figura Suplementaria 3



Los resultados obtenidos sugieren que los condensados con señal de mCh-DBP tienen la morfología característica de gotas que se forman por LLPS, en futuros experimentos será necesario purificar a mCh-DBP para confirmar que esta proteína viral puede separar fases por sí sola ya que en este trabajo enriquecimos a la DBP, pero no pudimos descartar presencia de otros componentes celulares o virales en la mezcla y por tanto tampoco calcular la concentración de la proteína. Tenemos que mejorar el método de cromatografía utilizado y asegurar una muestra más pura de DBP además de mejorar el rendimiento de producción de la fusión mCh-DBP, esto se discutirá más adelante. Como se muestra resumido en el esquema de la Figura 25 las condiciones preliminares que parecen propiciar la LLPS para DBP inician entre 100 y 200 mM NaCl, pH 6.5 y 8.5 y condiciones de *crowding*.

	pH 6.5	pH 8.5
Tris-PEG	--	--
MK	--	N/A
Mk+PEG	--	N/A
<10	N/A	--
<10+10%PEG	N/A	--
0mM	--	-/+
0mM+10%PEG	--	-/+
100mM NaCl	-/+	-/+
200mM NaCl	+++	+++
400mM NaCl	+	+
800mM NaCl	++	++
1M NaCl	N/A	-
2M NaCl	-	N/A



**Figura 25 Resumen de estructuras predominantes encontradas en los ensayos de formación de gotas in vitro.** En la tabla se muestran representadas cualitativamente el número de estructuras tipo gota encontradas en el conteo de las capturas de los campos realizados durante las pruebas de formación de gota. -- = no encontrado, -/+ = estructuras tipo agregado, +/- = 5-10 estructuras tipo gota, ++ = 10-15 estructuras tipo gota y estructuras complejas, +++ = 100-200 estructuras tipo gota. En el esquema las condiciones a las que se encontraba cada muestra y la morfología predominante en cada condición.

## DISCUSIÓN

Tanto en nuestro grupo como en otros laboratorios se ha intentado producir de forma heteróloga a la proteína E1B; sin embargo, esta proteína resulta tóxica para las cepas de expresión probadas y los rendimientos de la proteína son bajos incluso en sistemas eucariontes como el de baculovirus [65]. Durante mi trabajo de licenciatura [62] y durante este trabajo tampoco fue posible expresar por separado en cantidades detectables a los dominios de E1B (N, X y C). No se descarta que sea posible obtener mejores rendimientos de los dominios utilizando otros sistemas como baculovirus recombinante o sistemas *cell free* e incluso escalar el cultivo para producir cantidades de la proteína detectables y que sean suficientes para hacer ensayos de LLPS.

Por otro lado, si bien el PSPredictor no consideró a E1B ni a sus dominios como candidatos para inducir la separación de fases; dado que este predictor fue entrenado únicamente con proteínas *scaffold* y no con proteínas *reguladoras* o [62]*clientes*, no se puede descartar que la E1B pueda participar en LLPS. Además, las evidencias acumuladas que se describen en la introducción sugieren que la E1B juega un papel importante en la formación eficiente de los RC de adenovirus, por lo que será interesante explorar si la E1B exhibe propiedades similares a las que se han observado con DBP en células transfectadas con plásmidos que expresan a la E1B y cada uno de los dominios, además de obtener a las proteínas a partir de lisados de células infectadas.

Algo que cabe destacar es que, en experimentos recientes de colegas de nuestro grupo de investigación, en los que se transfectó un plásmido que expresa la misma fusión de mCh-DBP, utilizada durante este trabajo, la distribución de la señal de DBP intracelular en ausencia de otras proteínas virales es similar a la observada en los experimentos *in vitro* de esta tesis. Se observan estructuras tipo gota desde los 0.2  $\mu\text{g}$  de plásmido transfectado y estructuras complejas *RC-like* a 0.5  $\mu\text{g}$  de plásmido [31].

Hasta ahora las evidencias acumuladas indican que DBP puede inducir la formación de BMCs en la célula y si bien los datos obtenidos en este trabajo son preliminares, de confirmar la predicción de DBP como molécula tipo scaffold mediante la cuantificación de los resultados de los experimentos *in vitro*, podremos decir que DBP es una molécula tipo scaffold que forma BMCs por LLPS. Para confirmarlo será necesario un sistema más controlado de condiciones *in vitro* que se irá discutiendo a continuación.

Los resultados preliminares de los ensayos de LLPS *in vitro* se obtuvieron con preparaciones que por lo que vimos en los geles teñidos con Azul de Comassie y plata aún pueden contener otras proteínas virales y/o celulares, por lo que aún no se puede confirmar que DBP es un componente *scaffold* ya que para esto debe estar purificada. Una vez que confirmemos el método mediante el cual se obtienen buenos rendimientos de la fusión mCh-DBP, será de suma importancia conocer y definir la concentración de mCh-DBP necesaria para inducir la formación de condensados

Si bien en los ensayos preliminares de LLPS *in vitro* de este trabajo se pueden ver estructuras tipo gota a 200 mM NaCl + 10%PEG con una ligera señal de fluorescencia asociada, será importante tener una preparación de la proteína de fusión a una mayor concentración y de esta forma repetir y cuantificar los ensayos. Una propuesta es obtener el plásmido que expresa la fusión mCh-DBP utilizado por nuestros colegas [31] y la proteína de fusión se obtendrá por transfección ya que se reportaron mejores rendimientos de la banda de alrededor de 100 kDa comparando con los rendimientos obtenidos en este trabajo por infección con el virus mutante que expresa la misma fusión. Para detectar a la proteína de fusión se sugiere hacer inmunotransferencias de nuevo con el anticuerpo B6, pero también con un anticuerpo anti mCherry para confirmar que tenemos proteína de fusión además de las otras formas de DBP. Para purificar se propone aprovechar la asociación de DBP con el DNA [53] y diseñar una columna de afinidad, esto también buscando evitar el uso de ácido como método de elusión ya que desconocemos el efecto de los cambios de pH en la proteína de fusión.

A pesar de obtener pequeñas cantidades de la proteína de fusión mCh-DBP a partir de células infectadas, esta parece estar presente en estructuras con las características de gotas que se han reportado en experimentos *in vitro* de LLPS. Desconocemos si la proteína asociada a estos BMCs está fosforilada, por lo que será interesante determinar si es necesario el estado fosforilado de DBP para que esta proteína forme gotas. Para estos experimentos se deberá purificar la forma fosforilada y la no fosforilada, utilizar fosfatasas o hacer experimentos en los que se hacen sustituciones de los sitios sujetos a fosforilación para explorar su efecto en LLPS.

Otra propuesta para futuros experimentos es obtener a Fus o alguna otra proteína que ya se haya reportado que separa fases *in vitro* y utilizarla como control positivo para nuestros experimentos con mCh-DBP, en donde si bien las condiciones de pH, concentración de sal, tiempo de incubación y concentración de proteína pueden ser diferentes entre el control y mCh-DBP, nos puede servir de referencia.

Con DBP purificada se deberán realizar mediciones en tiempo real con las condiciones encontradas para observar eventos de formación, fusión y fisión de los condensados ya que son característicos de BMCs formados por LLPS y también disrupción de los condensados al modificar concentraciones de NaCl o agregar agentes que se han reportado como disruptores de LLPS como el 1-6 hexanodiol.

Los RC de adenovirus son condensados en los que se regula la expresión y replicación del genoma viral y donde simultáneamente se controlan las defensas antivirales de la célula, por lo que son determinantes para las interacciones virus-célula. No se sabe cuáles son las moléculas virales o celulares que permiten la formación de los RC de adenovirus en la célula infectada y será muy interesante determinar si la DBP tiene una función de proteína *scaffold* en este proceso. Además, otra de las moléculas que será interesante determinar si participa durante la formación de los RCs es el DNA viral (vDNA). Hasta ahora no se ha determinado cuál es el mecanismo responsable de localizar al genoma viral en el núcleo de la célula infectada, ni cómo inicia la formación de los RC; sin embargo, la transfección del DNA de Ad es suficiente para iniciar un ciclo de replicación productivo y la

entrada del genoma viral al núcleo de la célula infectada es suficiente para dar inicio a la transcripción de los genes tempranos del virus, por lo que es un evento necesario que posteriormente conduce a la formación de los RCs. Será interesante seguir el efecto de agregar vDNA previo a la formación y una vez formados los BMCs de DBP *in vitro* y por otra parte poder seguir al vDNA, junto con mCh-DBP durante la infección.

## RESUMEN DE RESULTADOS

- Los dominios, amino terminal, central y carboxilo terminal de la proteína E1B no pudieron expresarse en cantidades detectables utilizando el sistema pET y la cepa de expresión *E. coli* C43.
- E1B y sus dominios no son predichos como proteínas tipo *scaffold* de LLPS por el programa PsPredictor.
- Se obtuvo a la proteína DBP en cantidades suficientes tanto por expresión heteróloga en *E. coli*, como a partir de lisados de células humanas infectadas con HAdV5, pero se puede mejorar el rendimiento y obtener más proteína de fusión mCh-DBP para futuros experimentos.
- Aparentemente DBP se encuentra en estructuras tipo gota que se asemejan en morfología a BMCs formados por LLPS, las condiciones en donde se detectan estructuras tipo gota parecen ser tanto a pH 6.5 como pH 8.5 y se detectan sobre todo a 200 mM NaCl.

## CONCLUSIÓN

Por una parte, las evidencias obtenidas sobre las propiedades de DBP en la célula infectada y en la célula transfectada sugieren que DBP puede separar fases con propiedades tipo líquido, en este trabajo las condiciones que se probaron en los experimentos permitieron obtener datos y condiciones preliminares que son sugerentes de que la proteína DBP también puede formar estructuras tipo gota *in vitro*.

## PERSPECTIVAS

- Probar otros sistemas de expresión para los dominios de E1B.
- Purificar a mCh-DBP para confirmar si puede funcionar como *scaffold* de LLPS.
- Analizar la dinámica de formación de BMCs formadas por mCh-DBP *in vitro* usando microscopía con lapsos de tiempo y FRAP para determinar eventos de fusión, fisión y disrupción de los BMCs, y la tasa de difusión de la proteína, respectivamente.
- Evaluar el papel del DNA viral en la formación de los RCs tanto en el contexto celular como *in vitro*.

## FIGURAS SUPLEMENTARIAS

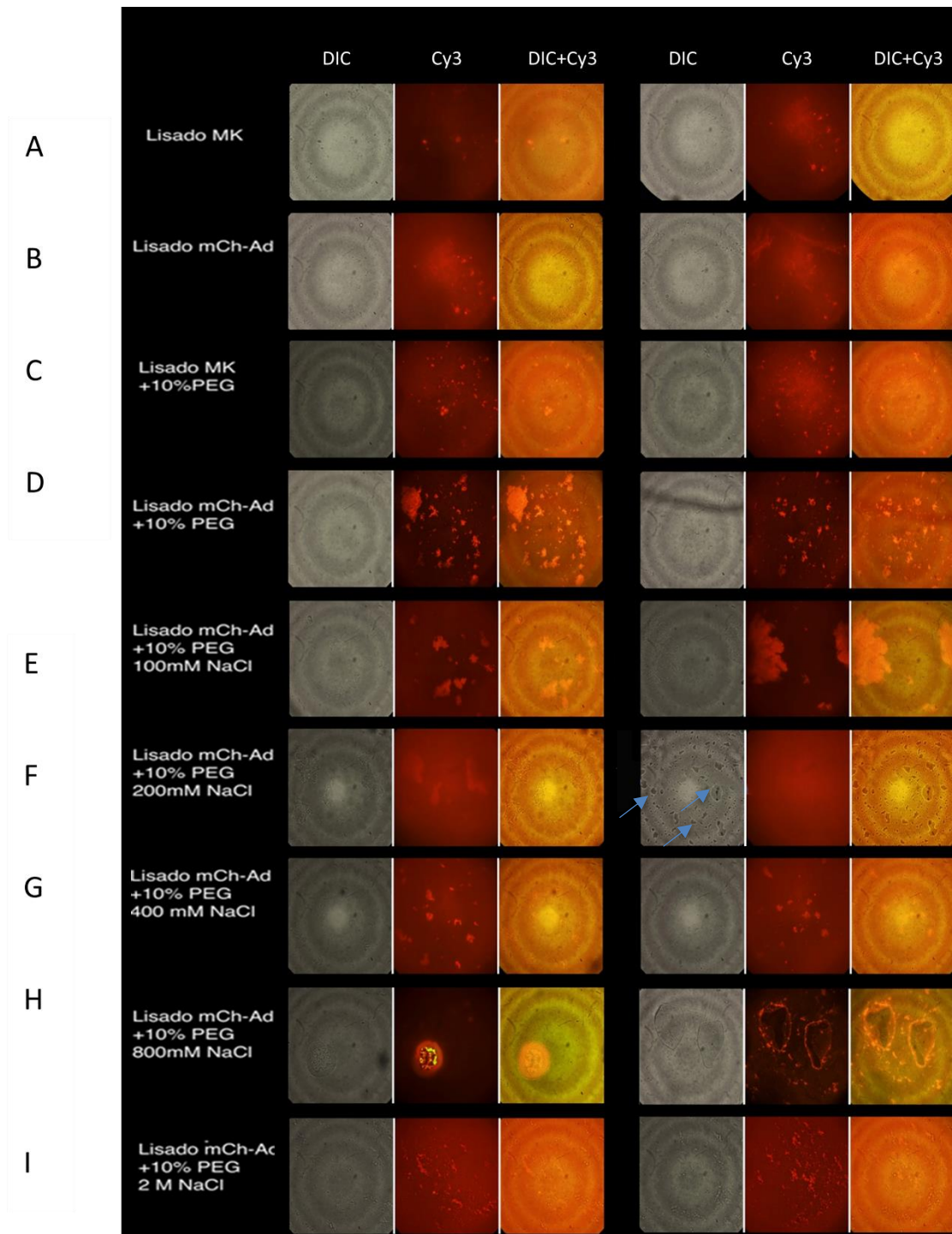
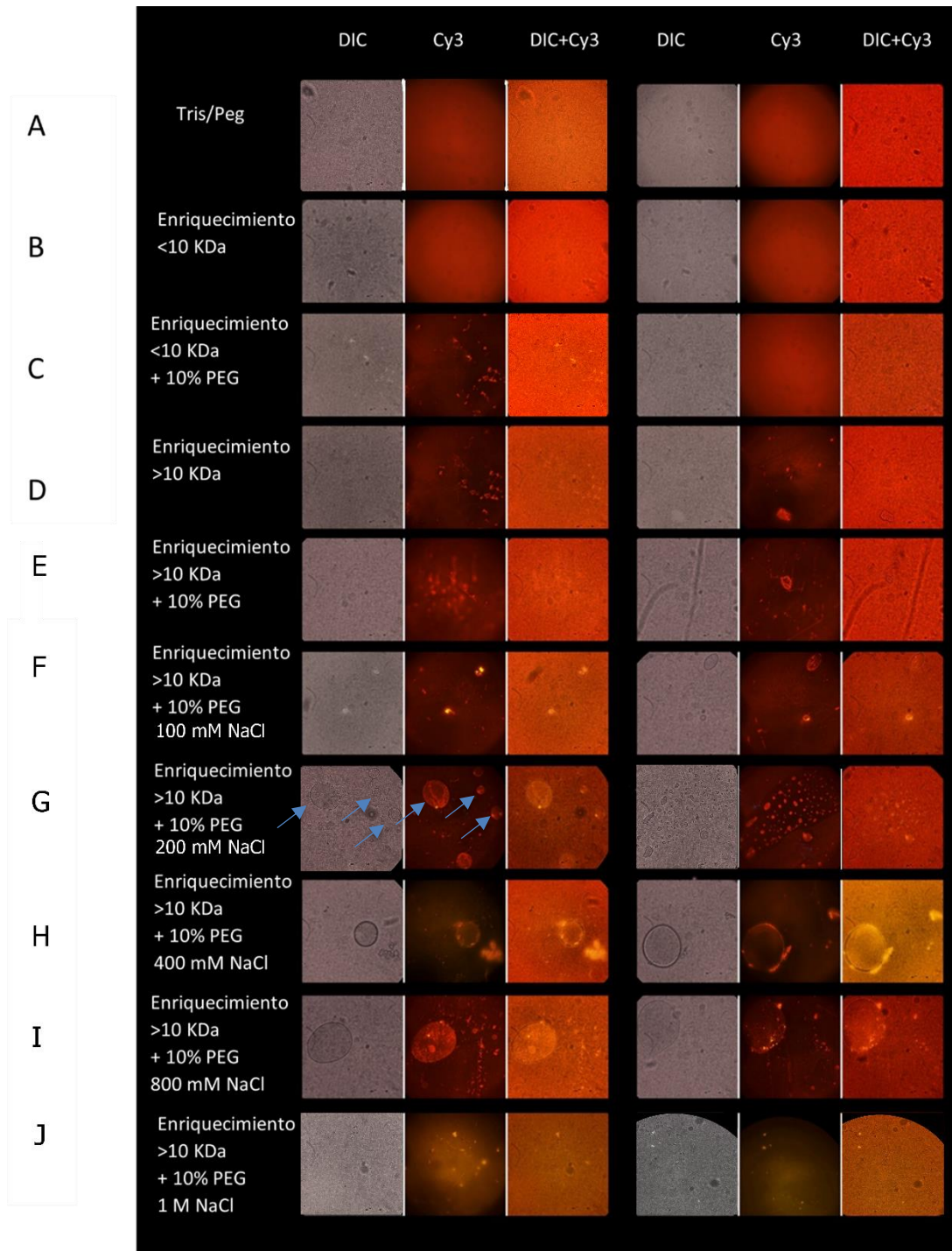


Figura Suplementaria 1 **Prueba LLPS in vitro con lisado de células infectadas con mCh-DBP.** En cada caso se realizó la mezcla establecida en la sección "in vitro" de materiales y métodos. Se muestran 2 sets de fotos de dos campos distintos para cada condición. Se montó 1 $\mu$ L en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos cuidando no atrapar aire y se utilizó el objetivo 63X con aceite de inmersión tanto para DIC como para el filtro CY3. Las fotos se tomaron a los 30 min de preparada la mezcla. Cada inciso (A-J) señala una condición distinta. Las flechas azules marcan algunas de las estructuras tipo gota vistas por DIC.



**Figura Suplementaria 2 Prueba LLPS in vitro con muestra enriquecida de mCh-DBP 1.** En cada caso se realizó la mezcla establecida en la sección “in vitro” de materiales y métodos. Se muestran 2 sets de fotos de dos campos distintos para cada condición. Se montó 1µL en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos cuidando no atrapar aire y se utilizó el objetivo 63X con aceite de inmersión tanto para DIC como para el filtro CY3. Las fotos se tomaron a los 30 min de preparada la mezcla. Cada inciso (A-J) señala una condición distinta, con flechas se marcan algunas de las estructuras tipo gota vistas tanto por DIC como por CY3.



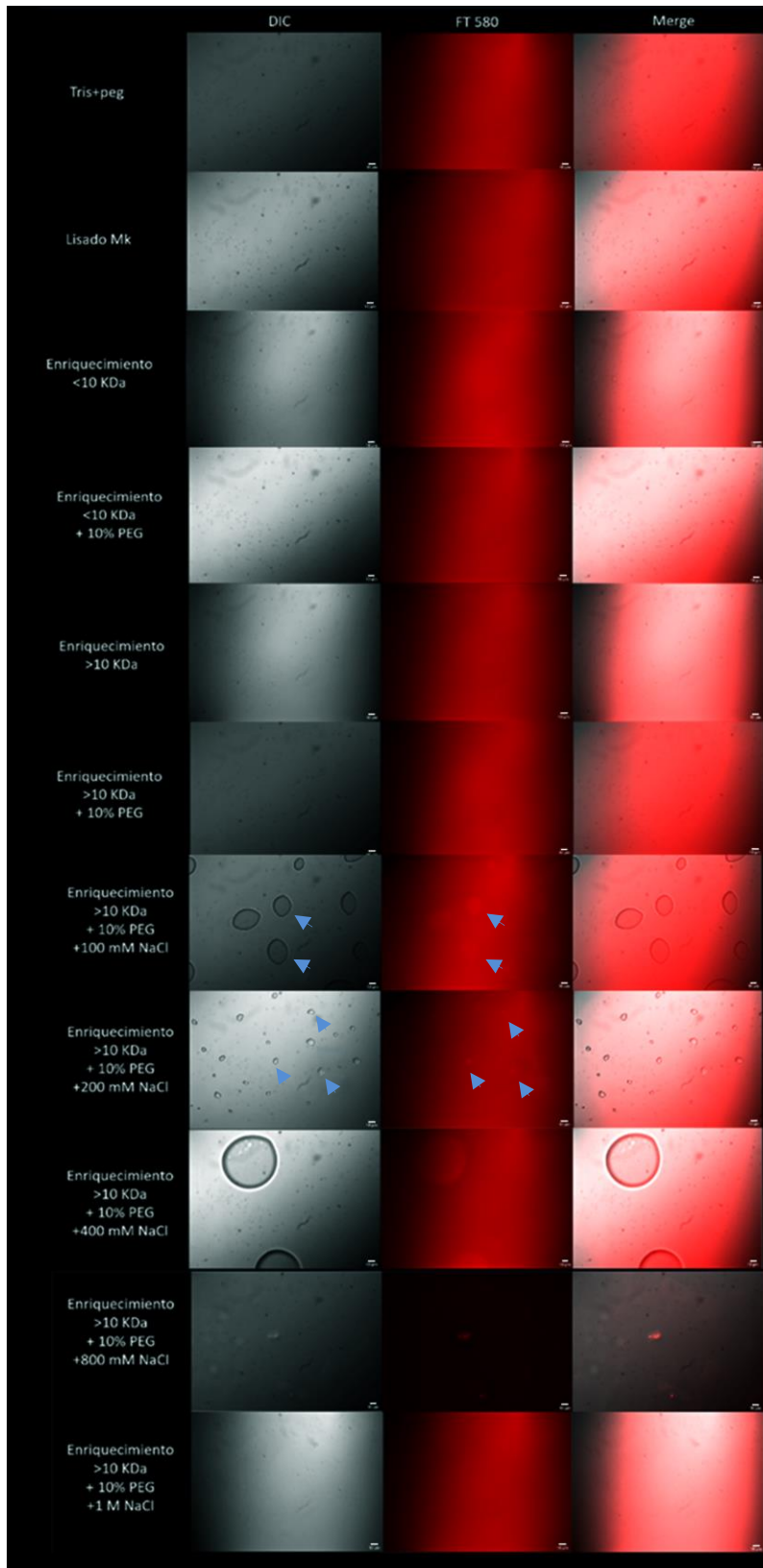


Figura Suplementaria 3 *Prueba LLPS in vitro* con muestra enriquecida de mCh-DBP 2. En cada caso se realizó la mezcla establecida en la sección “in vitro” de materiales y métodos. Se muestra 1 set de fotos para cada condición. Se montó 1 $\mu$ L en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos cuidando no atrapar aire y se utilizó el objetivo 63X de inmersión con agua tanto para DIC como para el filtro FT580. Las fotos se tomaron a los 15 min de preparada la mezcla. Con puntas de flecha se señalan algunas de las estructuras tipo gota vistas tanto por DIC como por CY3.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Fields, *Virology*, 6th edition. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- [2] V. Probst *et al.*, “Human adenovirus species in children with acute respiratory illnesses,” *Journal of Clinical Virology*, vol. 134, no. October 2020, p. 104716, 2021, doi: 10.1016/j.jcv.2020.104716.
- [3] S. Khanal, P. Ghimire, and A. S. Dharmoon, “The repertoire of adenovirus in human disease: The innocuous to the deadly,” *Biomedicines*, vol. 6, no. 1, 2018, doi: 10.3390/biomedicines6010030.
- [4] E. Ponterio and L. Gnessi, “Adenovirus 36 and obesity: An overview,” *Viruses*, vol. 7, no. 7, pp. 3719–3740, 2015, doi: 10.3390/v7072787.
- [5] Flint, *Principles of Virology*, 4th Edition. 2015.
- [6] Jane. Flint and G. Nemerow, *Human Adenoviruses From villains to vectors*. New Jersey: World Scientific, 2016.
- [7] Y. H. Chung, V. Beiss, S. N. Fiering, and N. F. Steinmetz, “Covid-19 vaccine frontrunners and their nanotechnology design,” *ACS Nano*, vol. 14, no. 10, pp. 12522–12537, 2020, doi: 10.1021/acsnano.0c07197.
- [8] A. J. Davison, M. Benko, and B. Harrach, “Genetic content and evolution of adenoviruses,” *Journal of General Virology*, vol. 84, no. 11, pp. 2895–2908, 2003, doi: 10.1099/vir.0.19497-0.
- [9] Paloma Hidalgo, Ramón A. González, “Adenoviruses,” *Elsevier*, no. Reference Module in Biomedical Sciences, 2021.
- [10] C. E. Hindley, F. J. Lawrence, and D. A. Matthews, “A role for transportin in the nuclear import of adenovirus core proteins and DNA,” *Traffic*, vol. 8, no. 10, pp. 1313–1322, 2007, doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00618.x.
- [11] A. J. Berk, “Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus,” pp. 7673–7685, 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1209040.
- [12] E. M. Bennett, J. R. Bennink, J. W. Yewdell, and F. M. Brodsky, “Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression,” *J Immunol*, vol. 162, no. 9, pp. 5049–5052, 1999, doi: 10.4049/jimmunol.171.9.4473.

- [13] J. Shisler, C. Yang, B. Walter, C. F. Ware, and L. R. Gooding, "The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis," *J Virol.*, vol. 71, no. 11, pp. 8299–8306, 1997.
- [14] M. Woldt, "The adenovirus E3-14. 7K protein is a general inhibitor of tumor necrosis factor-mediated cytolysis", *J Immunol.* 1990 Nov 1;145(9):3080-6. PMID: 2145367.
- [15] S. J. Morris, G. E. Scott, and K. N. Leppard, "Adenovirus Late-Phase Infection Is Controlled by a Novel L4 Promoter," *Journal of Virology*, vol. 84, no. 14, pp. 7096–7104, 2010, doi: 10.1128/jvi.00107-10.
- [16] R. C. Hoeben and T. G. Uil, "Adenovirus DNA Replication," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, pp. 1–12, 2013, a013003.
- [17] A. Monaghan, A. Webster, and R. T. Hay, "Adenovirus DNA binding protein: Helix destabilising properties," *Nucleic Acids Research*, vol. 22, no. 5, pp. 742–748, 1994, doi: 10.1093/nar/22.5.742.
- [18] L. M. Kaplan, H. Ariga, J. Hurwitz, and M. S. Horwitz, "Complementation of the temperature-sensitive defect in H5ts125 adenovirus DNA replication in vitro.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 76, no. 11, pp. 5534–5538, 1979, doi: 10.1073/pnas.76.11.5534.
- [19] C. Netherton, K. Moffat, E. Brooks, and T. Wileman, "A Guide to Viral Inclusions, Membrane Rearrangements, Factories, and Viroplasm Produced During Virus Replication," vol. 70, no. 07, 2007, doi: 10.1016/S0065-3527(07)70004-0.
- [20] M. Schmid, *et al.* "DNA Virus Replication Compartments," vol. 88, no. 3, 2014, doi: 10.1128/JVI.02046-13.
- [21] P. Hidalgo and R. A. Gonzalez, "Formation of adenovirus DNA replication compartments," *FEBS Letters*, vol. 593, no. 24, pp. 3518–3530, 2019, doi: 10.1002/1873-3468.13672.
- [22] K. G. Murti, D. S. Davis, and G. R. Kitchingman, "Localization of adenovirus-encoded DNA replication proteins in the nucleus by immunogold electron microscopy," pp. 2847–2857, 1990, doi: 10.1099/0022-1317-71-12-2847.
- [23] F. Puvion-Dutilleul, "Analysis by in Situ Hybridization and Autoradiography of Sites of Replication and Storage of Single- and Double-Stranded Adenovirus Type 5 DNA in Lytically Infected HeLa Cells," vol. 289, pp. 280–289, 1990, doi: 10.1016/1047-8477(90)90046-F.
- [24] D. M. Mitrea and R. W. Kriwacki, "Phase separation in biology; Functional organization of a higher order," *Cell Communication and Signaling*, vol. 14, no. 1, pp. 1–20, 2016, doi: 10.1186/s12964-015-0125-7.
- [25] N. O. Taylor, M. T. Wei, H. A. Stone, and C. P. Brangwynne, "Quantifying Dynamics in Phase-Separated Condensates Using Fluorescence Recovery after Photobleaching," *Biophysical Journal*, vol. 117, no. 7, pp. 1285–1300, 2019, doi: 10.1016/j.bpj.2019.08.030.
- [26] J. Nikolic *et al.*, "Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles," *Nature Communications*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00102-9.

- [27] A. Zimmer, Q. D. Nguyen, and C. Gespach, "Nuclear bodies and compartments: Functional roles and cellular signalling in health and disease," *Cellular Signalling*, vol. 16, no. 10, pp. 1085–1104, 2004, doi: 10.1016/j.cellsig.2004.03.020.
- [28] K. R. Drake, M. Kang, and A. K. Kenworthy, "Nucleocytoplasmic distribution and dynamics of the autophagosome marker EGFP-LC3," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 3, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0009806.
- [29] C. A. Day, L. J. Kraft, M. Kang, and A. K. Kenworthy, "Analysis of protein and lipid dynamics using confocal fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)," *Current Protocols in Cytometry*, no. SUPPL.62, 2012, doi: 10.1002/0471142956.cy0219s62.
- [30] R. Pahir and T. Misteli, "High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus," *Letters to nature*, vol. 404, no. 6778, pp. 604–609, 2000, doi: 10.1038/35007077.
- [31] L. Jawerth, "Protein condensates as aging Maxwell fluids," *Science (1979)*, vol. 370, no. 6522, pp. 1317–1323, 2020, doi: 10.1126/science.aaw4951.
- [32] Y. Lin, D. S. W. Protter, M. K. Rosen, and R. Parker, "Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins," *Molecular Cell*, vol. 60, no. 2, pp. 208–219, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2015.08.018.
- [33] P. Hidalgo *et al.*, "Evidence that the adenovirus single-stranded DNA binding protein mediates the assembly of biomolecular condensates to form viral replication compartments," *Viruses*, vol. 13, no. 9, pp. 1–21, 2021, doi: 10.3390/v13091778.
- [34] D. M. Mitrea *et al.*, "Methods for Physical Characterization of Phase-Separated Bodies and Membrane-less Organelles," *Journal of Molecular Biology*, vol. 430, no. 23, pp. 4773–4805, 2018, doi: 10.1016/j.jmb.2018.07.006.
- [35] V. N. Uversky, "Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: Membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 44, pp. 18–30, 2017, doi: 10.1016/j.sbi.2016.10.015.
- [36] A. Ghosh, K. Mazarakos, and H. X. Zhou, "Three archetypical classes of macromolecular regulators of protein liquid-liquid phase separation," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 116, no. 39, pp. 19474–19483, 2019, doi: 10.1073/pnas.1907849116.
- [37] B. S. et al Heinrich, "Phase transitions drive the formation of vesicular stomatitis virus replication compartments.," *mBio*, vol. 9, no. 5, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1128/mBio.02290-17.
- [38] F. Geiger *et al.*, "Rotavirus Replication Factories Are Complex Ribonucleoprotein Condensates," *bioRxiv*, p. 2020.12.18.423429, 2020, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1101/2020.12.18.423429>
- [39] T. A. et al. Alenquer, M., Vale-Costa, S., Etibor, "Influenza A virus ribonucleoproteins form liquid organelles at endoplasmic reticulum exit sites," *Nature Communications*, 2019, [Online]. Available: doi:10.1038/s41467-019-09549-4

- [40] C. M. Metrick, "Conserved Outer Tegument Component UL11 from Herpes Simplex Virus 1 Is an Intrinsically Disordered, RNA-Binding Protein," vol. 11, no. 3, pp. 1–22, 2020, doi: 10.1128/mBio.00810-20.
- [41] S. Alberti, A. Gladfelter, and T. Mittag, "Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates," *Cell*, vol. 176, no. 3, pp. 419–434, 2019, doi: 10.1016/j.cell.2018.12.035.
- [42] K. A. Burke, A. M. Janke, C. L. Rhine, and N. L. Fawzi, "Residue-by-Residue View of In Vitro FUS Granules that Bind the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II," *Molecular Cell*, vol. 60, no. 2, pp. 231–241, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2015.09.006.
- [43] J. S. Chahal, J. Qi, and S. J. Flint, "The Human Adenovirus Type 5 E1B 55 kDa Protein Obstructs Inhibition of Viral Replication by Type I Interferon in Normal Human Cells," *PLoS Pathogens*, vol. 8, no. 8, 2012, doi: 10.1371/journal.ppat.1002853.
- [44] R. Lopez, "Regulación de las actividades de la proteína adenoviral E1B-55KDa por fosforilación," Tesis para optar por el grado de maestro en Ciencias, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM 2016.
- [45] P. Hidalgo, "Morphological, Biochemical, and Functional Study of Viral Replication Compartments Isolated from Adenovirus-Infected Cells," *Journal of Virology*, vol. 90, no. 7, pp. 3411–3427, 2016, doi: 10.1128/JVI.00033-16.
- [46] S. J. Flint and R. A. Gonzalez, *Regulation of mRNA production by the adenoviral E1B 55-kDa and E4 Orf6 proteins*. CT Microbiology, volume 272, 2003, doi: 10.1007/978-3-662-05597-7\_10.
- [47] A. Santiago, "Análisis estructural de la proteína adenoviral E1B 55 kDa," Tesis para optar por el grado de Licenciado en Ciencias con área terminal en bioquímica y biología molecular, Facultad de Ciencias, UAEM, 2012.
- [48] B. Tejera, "The human adenovirus type 5 E1B 55kDa protein interacts with RNA promoting timely DNA replication and viral late mRNA metabolism," *PLoS ONE*, pp. 1–27, 2019, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214882>
- [49] T. Sieber, R. Scholz, M. Spoerner, F. Schumann, H. R. Kalbitzer, and T. Dobner, "Intrinsic disorder in the common N-terminus of human adenovirus 5 E1B-55K and its related E1BN proteins indicated by studies on E1B-93R," *Virology*, vol. 418, no. 2, pp. 133–143, 2011, doi: 10.1016/j.virol.2011.07.012.
- [50] R. Cárdenas, "Análisis del desorden estructural en el proteoma de adenovirus humano", Tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas, CIDC, UAEM, 2019.
- [51] A. P. Vaughn Cleghon, "Phosphorylation of the Adenovirus DNA-Binding Protein and Epitope Mapping of Monoclonal Antibodies against It." *Virology*, 1993.
- [52] D. Linné, T., Fowlkes, "Interaction Between the Adenovirus DNA-binding Protein and Double-stranded DNA," vol. 619, no. 1939, pp. 163–180, 1979.

- [53] M. H. Stuiver and P. C. van der Vliet, "Adenovirus DNA-binding protein forms a multimeric protein complex with double-stranded DNA and enhances binding of nuclear factor I.," *Journal of Virology*, vol. 64, no. 1, pp. 379–386, 1990, doi: 10.1128/jvi.64.1.379-386.1990.
- [54] V. G. Cleghon and D. F. Klessig, "Association of the adenovirus DNA-binding protein with RNA both in vitro and in vivo," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 83, no. 23, pp. 8947–8951, 1986, doi: 10.1073/pnas.83.23.8947.
- [55] P. A. Tucker, D. Tsernoglou, A. D. Tucker, F. E. J. Coenjaerts, H. Leenders, and P. C. van der Vliet, "Crystal structure of the adenovirus DNA binding protein reveals a hook-on model for cooperative DNA binding," *EMBO Journal*, vol. 13, no. 13, pp. 2994–3002, 1994, doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06598.x.
- [56] P. N. Kanellopoulos, D. Tsernoglou, P. C. van der Vliet, and P. A. Tucker, "Alternative Arrangements of the Protein Chain are Possible for the Adenovirus Single-stranded DNA Binding Protein," pp. 1–8, 1996, doi: 10.1006/jmbi.1996.0141.
- [57] D. Mojica, "Estudio del papel de la proteína viral DBP en los compartimentos de replicación de adenovirus", Tesis para optar por el grado de Licenciada en Ciencias con área terminal en bioquímica y biología molecular, CIDC, UAEM, 2021.
- [58] Sun, Tanlin, *et al.* "Prediction of liquid-liquid phase separation proteins using machine learning." *BioRxiv* (2019): 842336.doi: <https://doi.org/10.1101/842336>.
- [59] P. Hidalgo and R. A. Gonzalez, "Formation of adenovirus DNA replication compartments," *FEBS Letters*, vol. 593, no. 24, pp. 3518–3530, 2019, doi: 10.1002/1873-3468.13672.
- [60] Novagen, "pET System Manual 8th Edition," pp. 1–50, 1999, [Online]. Available: <https://research.fhcrc.org/content/dam/stripes/hahn/methods/biochem/pet.pdf>
- [61] B. Miroux and J. E. Walker, "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels .," pp. 289–298, 1996.
- [62] C.-A. Zúñiga., "Producción de la proteína adenoviral E1B-55 kDa en cepas de expresión de *E. coli*." Tesis para optar por el grado de Licenciada en Ciencias con área terminal en bioquímica y biología molecular, CIDC, UAEM, 2019.
- [63] J. Grodberg and J. J. Dunn, "ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification," *Journal of Bacteriology*, vol. 170, no. 3, pp. 1245–1253, 1988, doi: 10.1128/jb.170.3.1245-1253.1988.
- [64] V. Ramírez, "Expresión de la Cristalina H $\beta$ -B2", comunicación personal, 2020.
- [65] C. Valencia, "Localización de proteínas virales y celulares que interaccionan con la E1B 55 kD de adenovirus a lo largo del ciclo de replicación viral" Tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Ciencias,UAEM, 2009.

- [66] R. Cárdenas, “Verificación de las secuencias de las construcciones del sistema de plásmidos pET 27b(+) con los dominios de E1B-55 kDa”, comunicación personal, 2020.