



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Centro de
Investigación en
Dinámica Celular

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

“Estudio del papel de la proteína viral DBP en los Compartimentos de Replicación de Adenovirus”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN CIENCIAS CON ÁREA TERMINAL EN BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA:

Diana Itzé Mojica Santamaría

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Paloma Rossana Hidalgo Ocampo
CIDC, IICBA, UAEM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

Presidente Dra. Carmen Nina Pastor Colón
CIDC, IICBA, UAEM

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

Vocal Dra. Paloma Rossana Hidalgo Ocampo
CIDC, IICBA, UAEM

Suplente Dr. Tomás David López Díaz
IBT, UNAM

Suplente Dr. Christopher David Wood
IBT, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS. ENERO, 2021.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **MOJICA SANTAMARIA DIANA ITZE** con número de matrícula **20164009178** cuyo título es:

"Estudio del papel de la proteína viral DBP en los Compartimentos de Replicación de Adenovirus"

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **Licenciado Ciencias Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular**.

Cuernavaca, Mor a 09 de marzo del 2021

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. CARMEN NINA PASTOR COLÓN
DR. RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE
DRA. PALOMA HIDALGO OCAMPO
DR. CHRISTOPHER DAVID WOOD
DR. TOMÁS DAVID LÓPEZ DÍAZ

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE



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

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

Sello electrónico

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2021-03-10 09:00:51 | Firmante

Tm4Ybw4a6LrLeO8RE81f/OSGygMYMWG2U18cpR+eoGsbUeTzJX9PyA7bENVVW+XUOdt2cF627oMybog72tm3qynaQ4YCFacQcldTIY2aa+IkEkqF6Qz0z+vHmDlpzFO9bCm
9cpDofSfES8o4isMTM3CYeayrKFA+cOdUUhxBL+Sdlkl1ikJQO2P8NmcOqnuxulQY3fPluTK0oKfN8jyZaOajILDVDwvhR0yozQ2ijnVdnTrzHN+0HXxwBKM1HMg3csEijNyhZjmAjJdGbzrWdxnIpe2nmDtuKxHVVewfDQIST8m7QfG4EYQt9XvP8YtKYjjjWFIEIREHlaIO49Q==

CHRISTOPHER DAVID WOOD . | Fecha:2021-03-10 16:44:33 | Firmante

fbqQ9xVH69u8Cq0cl0S13q+ucc8irTpV7pzqWpob1tBuCZf5DunRnYnbOza0rGSgeCRoykYGzVPLWFs83pLEB6bRcG2d/OGXZKnnv2xcCvNvT49ym/6R0MELmSVewWe/b36pu
w3Qz0j90c7shhGnSM5DybsYUJ7lc/JQxVHTHcb5YKHNqk1nZUbMzqYwAooD7L0qMZWKH7IDQNYazYI2W9+GgBZUL2y0J2W4ngPzZWP1W4RO4pT5jm2Q1Q0MynyEW3y
W/WVIDSTbd1WvA2T82rGURbTciAL+4aswYbiGIVHJjwznxzL6YFYD4bI34Pxx7zQDyQjkQgD5CQE+nA==

TOMÁS DAVID LÓPEZ | Fecha:2021-03-11 11:38:11 | Firmante

g0lrqtdTcvlPvYeTHCJ0iauiHlyxEtOuae5tQGnU3yDwOLEerVOoW6t58H9IxesgWRxAd2QGt2HgB6URe/TfVAsl41ReNbVode2hKpApkyjC
P6DzwrRFgDQqqkUIDESSCwssxM/I
Rs8bSostg9UNHXitM41ESCpdxtN7BnZclQQAjncg6cGBmuSCNth/G2c5u6THzBeAy5E62qa23gG9yt/BVSox18LiwZuHqtN8P10xPNcggz
Z8F2PX/xWpEGd3TNIrnalfzli+GbYn6dlHwz3QA8Ik0ndS6eqrT39bS5MwtrUDLQpCjg36GMB0SXHLWwX42yQ7iF0EE0wN+NQUw==

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2021-03-17 16:28:37 | Firmante

KakgOELgSUsQ1aa6wTxNep6kw8aVNDvJoJttNCsOHGI2A2r7mx634bWc5PBJ7m15342zfYIEiv6GaBgRLpn0KJwseP1EJ6l1u9cvnYmBg
+BTWYUzkLYzjg3U9a6mfeWz8vKV9c
2hkJDdF8lhHvLCqvatrK+O8oK17jbFzRQJoRfVHxEZ2JVYPCpK+8XdzoSNvr7mQrxzMPDPC49tBH0aSZVb5zLvcioKf+N6UyS6UPhncIU
fvV7wqA4p6G6huFbGUUVfIINbMLVg Lhngfrn2LrOJ6XJ3qJnPtlY7SSa6j6wKqNh2URg1V7vi92MbbetKbOFFPw0nJA+vBTumV6g==

PALOMA ROSSANA HIDALGO OCAMPO | Fecha:2021-03-19 06:42:17 | Firmante

Hw6sLIMr8f+UDqodHSOOkLGeG4bg7KuslXxdugm166lX5L3tVq26zVTEkwGUNm1VDCILppd469ZhEWtjyr4aSZnrSGPQKdEggWwGR+
TxISYEimxrpjZvJwpbvUu9ZxZKW8jO
ZF7xCv/PGZ9mkq96yfAnB8npYXeQNTtoQJLK5DLhi+vMEIEHAjw27nH9XRuJjIzIH5asnoZ4A8ZuF6JTgz4uaQkpqskC37NuOHe+xPAO1Y
wUnT4nYj65TUVGdl4e+usaK1L326z
sOIR1GB9ZV7byuxSgN1X009Q/+Mf2QsXcWwX55VLCt4lyCDUQTRjbNWkVgCw+lbYJuVoguA==



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

pdV82K

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gGSvRclXY5Gi6i1zuyXIsJyfqBtl0y9B>

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora, la Dra. Paloma Hidalgo Ocampo, por su confianza y su tiempo dedicado, y quien con sus aportes y conocimientos me guió a través de cada una de las etapas de este proyecto y permitió que se concluyera de la mejor manera.

Al Dr. Ramón González, jefe del laboratorio de virología molecular, quien me aceptó en su laboratorio. No sólo fue un gran apoyo para el desarrollo de este proyecto con todas sus ideas y conocimientos, sino también para mi desarrollo académico durante los 4 años de mi carrera. Desde mis primeros semestres me enseñó lo maravillosa que es la ciencia y es uno de los principales motivos por los cuales decidí que quería hacer investigación toda mi vida. La mayor parte de los conocimientos que adquiriré se los debo a él, por lo que siempre estaré sumamente agradecida.

Al Dr. Arturo Pimentel, parte del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA-UNAM), quien fue una parte esencial para el proyecto, debido a que desarrolló los programas con los cuales se procesaron las muestras y me enseñó a usarlos con entusiasmo e infinita paciencia. Siempre estuvo disponible para contestar mis dudas o mis ataques de pánico en fines de semana cuando un programa dejaba de funcionar (¡O eso pensaba yo hasta que hablaba con él y me daba cuenta de que estaba equivocada!). Fue una experiencia maravillosa aprender de él y con él.

A Nina Pastor, Chris Wood y Tomás López, miembros de mi comité, por todas sus correcciones y amables comentarios.

A Grisel y a mis compañeros del laboratorio: Regina, Raúl, Lalo y Ale, por haber hecho este último año y medio más ligero y agradable.

A Vero Márquez, que más que una compañera, se convirtió en una persona muy importante en mi vida y siempre le tendré un afecto muy especial.

A Ali y Lupita, mis mejores amigas, porque las porras incondicionales de su parte nunca me han faltado desde hace años.

A mi abuelita y a mis tíos, Carlos y Erick, que siempre estuvieron al pendiente de mí.

A mi mamá y a mi hermanito Diego, por creer en mí, por todo el amor y el cariño. Por siempre apoyar y promover mi gusto por la ciencia, por llevarme y recogerme del laboratorio sin importar la hora, así se les cerraran los ojos del sueño. Por volverme a motivar cada que llegaba con ganas de llorar. Creo que las palabras nunca me podrán alcanzar ni serán suficientes para agradecerles todo, pero creo que todavía tengo mucho tiempo para intentarlo y regresarles un poquito de lo mucho que me han dado. Todo lo que haga siempre será por ellos y para ellos.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABLAS	III
RESUMEN	IV

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1-7
1.1 Clasificación y generalidades de los adenovirus	1-2
1.2 Estructura	2
1.3 Organización del genoma	3
1.4 Ciclo de replicación	3
1.4.1 Entrada y tráfico intracelular	3-4
1.4.2 Transcripción y replicación del genoma	4-5
1.4.3 Traducción	6
1.4.4 Ensamble	6-7
2. ANTECEDENTES	7-15
2.1 Separación de fases líquido-líquido (LLPS)	7-9
2.2 Formación de RCs en virus con genomas de RNA vía LLPS	9-10
2.3 Compartimentos de replicación adenovirales	10-11
2.4 La proteína adenoviral de unión a DNA de cadena sencilla (DBP)	11-15
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo general	16
4.2 Objetivos particulares	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17-24
6. RESULTADOS	25-49
7. DISCUSIÓN	49-53
8. CONCLUSIONES	53
9. PERSPECTIVAS	54
10. REFERENCIAS	55-62
11. ANEXOS	63-68

I. ABREVIATURAS

BMC	Condensados Biomoleculares
D	Coeficiente de difusión
DBP	Proteína de unión a DNA de cadena sencilla
DMEM	Dubbleco's Modified Eagle Medium
dsDNA	DNA de doble cadena
FRAP	Recuperación de la Fluorescencia después del foto-blanqueo
HAdV	Adenovirus Humano
HFF	Fibroblastos derivados de prepucio humano
hpi	Horas post-infección
IDP	Proteína intrínsecamente desordenada
IDR	Región intrínsecamente desordenada
ITRs	Repeticiones terminales invertidas
LLPS	Separación de fases líquido-líquido
mCh-DBP	Adenovirus recombinante que expresa a DBP fusionado a mCherry
MLTU	Unidad transcripcional Mayor Tardía
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
NB	Cuerpos nucleares
NPC	Complejo de poro nuclear
Ori	Origen de replicación
PBS	Buffer fosfato salino
PML	Promyelocytic leukaemia
RB	Retinoblastoma
RCs	Compartimentos de replicación
RF	Fracción de recuperación
ssDNA	DNA de cadena sencilla
TP	Proteína terminal
TPL	Secuencia líder tripartita
VA	Asociados a Virus
$\tau_{1/2}$	Tiempo medio de recuperación
ROI	Región de interés

II. ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Organización estructural de la cápside de adenovirus.	2
Figura 2	Organización del genoma de HAdV-C5.	3
Figura 3	Representación esquemática de la proteína DBP.	13
Figura 4	Eventos de fusión y fisión de la proteína DBP.	15
Figura 5	Diagrama de Flujo de análisis de datos adquiridos durante FRAP.	23
Figura 6	Alineamiento de secuencias de proteínas DBPs de especies de adenovirus humanos A-G.	26
Figura 7	Resultados del desorden predicho para las DBPs de HAdV A-G.	27-29
Figura 8	Resultado del desorden predicho para las secuencias de proteínas DBPs de especies de adenovirus humanos A-G.	29
Figura 9	Resultados de MotifScan.	30
Figura 10	FRAP en células infectadas con mCh-DBP.	34
Figura 11	Curva de FRAP de una estructura compleja blanqueada a las 36 hpi.	35
Figura 12	Medición de RF , D y $\tau_{1/2}$.	37
Figura 13	Células seleccionadas para cálculo de parámetros FRAP a las 16 hpi.	38
Figura 14	Células seleccionadas para cálculo de parámetros FRAP a las 24 hpi.	39
Figura 15	Células seleccionadas para cálculo de parámetros FRAP a las 36 hpi.	40
Figura 16	Simbología y categorías utilizadas en representación de predicción de red de interacción proteína-proteína (PPI).	47

III. **ÍNDICE DE TABLAS**

	Página	
Tabla 1	Clasificación de los adenovirus	1
Tabla 2	Descripción de ROIs para análisis de datos de FRAP.	20
Tabla 3	Resultados de la búsqueda de LCRs en la IDR del extremo N-terminal de DBP.	30
Tabla 4	Resultados del PSPredictor.	31
Tabla 5	Parámetros calculados para las células seleccionadas a las 16 hpi.	38
Tabla 6	Parámetros calculados para las células seleccionadas a las 24 hpi.	39
Tabla 7	Parámetros calculados para las células seleccionadas a las 36 hpi.	40
Tabla 8	Clasificación de células a las 24 hpi con morfología esférica y compleja.	41
Tabla 9	Predicción de la red PPI DBP-E1B.	44-45
Tabla 10	Calificaciones del PSPredictor de las proteínas de la red DBP-E1B.	45
Tabla 11	Categorización de red PPI DBP-E1B.	48
Tabla S1	Mutaciones reportadas en el dominio N-terminal de DBP.	63
Tabla S2	Predicción de red PPI.	64-68

IV. RESUMEN

La replicación del genoma, y en algunos casos el ensamble, de virus tanto de DNA como de RNA, se lleva a cabo en compartimentos intracelulares conocidos como fábricas virales o compartimentos de replicación (RCs) que resultan de la reorganización de componentes nucleares o citoplasmáticos de la célula hospedera. En algunos casos, la formación de los RCs permite el establecimiento de microambientes no asociados a membrana en los que se favorece la replicación viral. Recientemente, se ha estudiado la importancia de la separación de fases líquido-líquido (LLPS por sus siglas en inglés que significan liquid-liquid phase separation) en la formación de organelos sin membrana, como el nucleolo, así como otros cuerpos nucleares. Los compartimentos formados por LLPS poseen características en común: están compuestos por ácidos nucleicos y proteínas con regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) o secuencias de bajas complejidad (LCRs); presentan morfología esférica y eventos de fusión y fisión; así como un rápido intercambio de componentes con el exterior, resultado de su naturaleza líquida. Estas características se reportaron en RCs de virus con genomas de RNA, y se determinó que la LLPS es un mecanismo mediante el cual se ensamblan sus RCs en el citoplasma. Sin embargo, a la fecha, la biogénesis de RCs vía LLPS únicamente ha sido determinado para pocos virus de RNA, mientras que todavía no se ha determinado que sea el mecanismo mediante el cual se ensamblan los RCs de virus con genomas de DNA que establecen sus RCs en núcleo.

Los adenovirus son virus con genomas de DNA de doble cadena. La infección con estos virus altera la compartimentalización del núcleo, dando lugar a la formación de los RCs adenovirales (AdRCs), donde se localizan macromoléculas virales y celulares que regulan la replicación y transcripción del genoma viral y se procesan los RNAs mensajeros (mRNA) virales por splicing. A estos sitios se relocalizan también macromoléculas celulares encargadas de mecanismos de defensas antivirales. La proteína de unión a DNA de cadena sencilla (DBP), que participa en la replicación del DNA viral, ha servido como marcador *bona fide* de los RCs de adenovirus para el análisis de la morfología de estas estructuras, y se ha

determinado que tienen un comportamiento muy dinámico, cambiando de tamaño y forma a lo largo del ciclo de replicación. Inicialmente los RC aparecen como puntos o focos con apariencia esférica que aumentan en tamaño conforme avanza la infección y eventualmente forman estructuras con apariencia de toroides o donas que coalescen formando compartimentos amorfos en etapas avanzadas del ciclo de replicación viral. En el grupo se ha hipotetizado que los AdRCs se forman a través de LLPS, ya que, se ha observado que poseen algunas de las características que hasta ahora se han usado para definir la formación de condensados líquidos que se forman por el mecanismo de LLPS. El análisis de la cinética de distribución de DBP en tiempo real muestra que los RC presentan morfología esférica y eventos de fusión y fisión, características de los condensados líquidos. Por otra parte, el coeficiente de difusión (D) de DBP en distintos tiempos del ciclo de replicación es similar a los que han sido reportados para organelos sin membrana. En este trabajo se determinó, mediante técnicas de bioinformática y microscopía óptica confocal en células vivas, que la proteína DBP exhibe similitudes en secuencia y en su dinámica de difusión con proteínas reportadas que conducen a la formación de condensados líquidos.

INTRODUCCIÓN

Clasificación y Generalidades de los adenovirus.

Los adenovirus fueron descubiertos hace aproximadamente 60 años a partir de su aislamiento en tejidos adenoides, y son agentes infecciosos causales de un amplio rango de enfermedades, que van desde patologías respiratorias hasta gastroenteritis y conjuntivitis (**Tabla 1**). Pertenecen a la familia *Adenoviridae* y se clasifican en 5 géneros: Ichtadenovirus, Aviadenovirus, Siadenovirus, Atadenovirus y Mastadenovirus. La clasificación se hace con base en la especie del hospedero, contenido de adeninas y timinas del genoma, homología de secuencia entre los genomas virales y su organización genómica [1, 2]. Los Mastadenovirus engloban a los adenovirus que infectan mamíferos e incluyen a los adenovirus humanos (HAdVs), que a su vez se dividen en 7 especies distintas (A-G) (**Tabla 1**). Este proyecto se realizó con el adenovirus humano especie C tipo 5 (HAdV-C5).

Especies	Tipo de adenovirus	Tropismo
A	12, 18, 31, 61	Vías respiratorias, sistema urinario e intestino.
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 51, 66	Vías respiratorias, sistema urinario, intestino y ojos.
C	1, 2, 5, 6, 7	Tracto respiratorio e intestino.
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36, 37-39, 42-49, 51, 53, 54, 56-60, 63-67, 70	Intestino y conjuntiva.
E	4	Conjuntiva y vías respiratorias
F	40, 41	Intestino
G	52	Intestino

Tabla 1. Clasificación de los adenovirus. (Modificada de Human Adenovirus: From Villains to Vectors. Flint, 2016).

Debido a que los genes de HAdV-C5 son transcritos por la misma RNA polimerasa que transcribe genes celulares; la RNA polimerasa II, y se replican eficientemente

en diversos cultivos celulares de células transformadas y tejidos primarios permisibles, los adenovirus han sido un modelo para el estudio de la biología molecular de la célula. Una de las contribuciones de mayor impacto en este campo fue el descubrimiento del splicing de RNA, que se hizo en células infectadas con adenovirus. Adicionalmente, el estudio de los adenovirus ha permitido el descubrimiento de diversos genes celulares, entre los que se incluyen la familia de los factores de transcripción E2F, que participan en la regulación del ciclo celular. Es por eso que el estudio de la relación adenovirus-hospedero se usa para comprender procesos celulares y moleculares fundamentales, como la regulación de la expresión génica.

Estructura

Los adenovirus tienen un diámetro de ~90 nm, son icosaédricos, no envueltos, con un genoma de DNA lineal de doble cadena. Su cápside tiene un número de triangulación pseudoT=25, y está compuesta por doce proteínas. La proteína más abundante de la cápside es la proteína pII (también llamada hexón) que se organiza en 240 trímeros que forman la mayor parte de la superficie de la cápside. En cada uno de los 12 vértices contiene un pentámero de la proteína base pentón (pIII) unida no covalentemente a un trímero de la proteína fibra (pIV), que se proyecta formando espículas. Las proteínas IIIa, IX, VI y VIII interactúan con la superficie interior de la cápside, confiriéndole estabilidad. En el interior de la cápside, la nucleocápside está formada por la proteasa L3-23K y el DNA viral asociado a las proteínas pX, pV, pVII, TP (**Figura 1**).

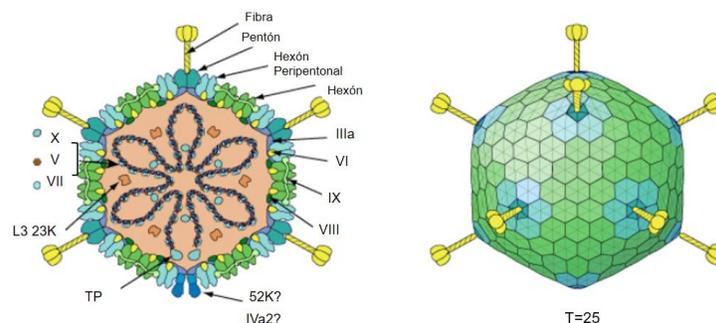


Figura 1. Organización estructural de la cápside de adenovirus. Esquema de composición y organización de la cápside y nucleocápside. Modificada de *ViralZone* 2015.

Organización del genoma.

El genoma de HAdV-C5 tiene un tamaño aproximado de 36 kilopares de bases (kbp) [1] y está organizado en unidades transcripcionales (TU, por sus siglas en inglés) que son transcritas por la RNA pol II celular: una TU inmediata temprana, E1A; cuatro TU tempranas, E2, E1B, E3 y E4; dos TU tempranas retrasadas, IX y IVa2; y una TU tardía, Major Late (MLTU). Adicionalmente, dos genes llamados Asociados a Virus (VA por sus siglas en inglés) son transcritos por la RNA pol III celular. El genoma tiene en sus extremos repeticiones terminales invertidas (ITRs) donde se encuentran los orígenes de replicación (Ori) y en los extremos 5' se encuentra unida covalentemente la proteína TP. La expresión de cada unidad transcripcional está regulada temporalmente, siendo la unidad transcripcional inmediata temprana (E1A) y las tempranas (E2, E1B, E3 y E4) expresadas antes del inicio de la síntesis de DNA viral. La unidad MLTU se expresa una vez que inicia una fase exponencial de la síntesis de DNA viral.

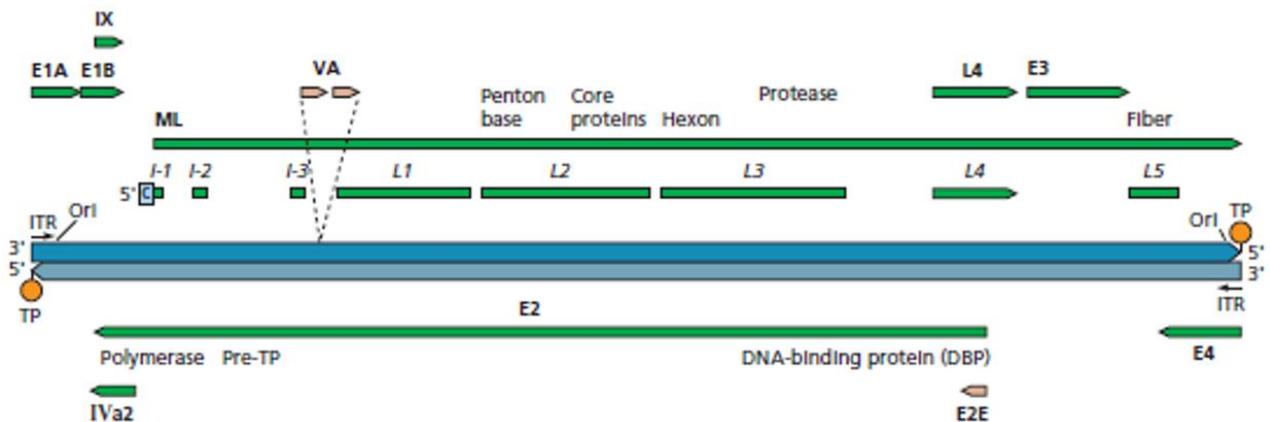


Figura 2. Organización del genoma de HAdV-C5. Las flechas indican el sentido de la transcripción. El genoma se representa en las barras azules. Las unidades transcripcionales transcritas por la RNA pol II están representadas por las barras verdes, y las transcritas por la pol III por las barras rosas. En los extremos 5' se representa como un círculo naranja la proteína TP unida covalentemente al genoma. Modificada de Principles of Virology, Flint, 2015.

Ciclo de replicación

Entrada y tráfico intracelular. La proteína fibra del virus se une al receptor CAR (Coxsackie virus and Adenovirus Receptor) que es expresado en la superficie basolateral de las células epiteliales polarizadas. Después, la proteína base pentón

interacciona con integrina $\alpha v_{\beta 3}$ o $\alpha v_{\beta 5}$, lo cual activa vías de señalización de cinasas celulares que resulta en la reorganización de filamentos de actina. Esta reorganización provee la fuerza mecánica necesaria para formar vesículas y favorecer la endocitosis de la partícula viral mediada por clatrina. Después del escape del endosoma, la partícula viral parcialmente desensamblada es dirigida al centro organizador de microtúbulos (MTOC) de localización perinuclear, facilitando su interacción con el complejo de poro nuclear (NPC por sus siglas en inglés). En el NPC interacciona con la NUP 214, y el genoma de la partícula viral es liberado al nucleoplasma, asociado con otras proteínas virales; entre ellas TP, pVII y posiblemente con la proteína μ [3].

Transcripción y replicación del DNA viral. Dentro del núcleo, la primera unidad transcripcional en ser expresada es E1A. E1A tiene un promotor constitutivamente activo, y una vez que es expresada, forma un loop de retroalimentación positiva que regula su propia transcripción. La expresión de E1A induce la transcripción de otras unidades transcripcionales tempranas, entre ellas E2, que es la unidad transcripcional que codifica para las proteínas de replicación del genoma; la DNA polimerasa, DBP y TP. La maquinaria basal de replicación del genoma de los adenovirus es de origen viral, sin embargo, los dNTPs requeridos para la síntesis de nuevos templados de DNA de doble cadena (dsDNA) virales son proveídos por la célula hospedera. La síntesis de dNTPs se ve incrementada en la fase S del ciclo celular, inducida por las proteínas virales tempranas. Diversos promotores de los genes que codifican proteínas que controlan la progresión del ciclo celular del punto de restricción G1 a la fase S contienen sitios de unión para miembros de la familia de factores de transcripción celulares E2F [4]. Cuando la proteína Retinoblastoma (RB) se encuentra unida a E2F en la secuencia promotora de un gen, se forma un complejo con proteínas desacetilasas de histonas y otras enzimas modificadoras de cromatina que reprimen su transcripción. La interacción de las proteínas E1A con RB resultan en la disociación del complejo E2F-RB derivando en la remoción de los complejos represores en E2F. Esto permite que E2F se asocie a sus secuencias blanco induciendo la expresión de genes que se requieren para la entrada de la célula a fase S del ciclo celular. Una vez que se han acumulado las proteínas de

replicación del genoma viral, codificadas por la unidad transcripcional E2, y se ha inducido la entrada a la fase S de la célula, inicia la síntesis del genoma viral.

El genoma viral es sintetizado por un mecanismo de desplazamiento de cadena, en el cual, una hebra del templado del dsDNA es desplazada mientras que la otra es copiada [5]. El complejo de pre-inicio se forma cuando la DNA polimerasa viral en complejo con la proteína precursora de TP (pTP) se unen a la secuencia de origen ubicada en las ITRs. Este complejo es estabilizado por factores de transcripción celulares [6], NF1 y OCT-1, que inducen cambios en la estructura del DNA promoviendo el inicio de la replicación del genoma. Una vez que el complejo de inicio está posicionado en los extremos del genoma, la polimerasa se disocia y aumenta su tasa de polimerización [7]. La proteína adenoviral de unión a DNA de cadena sencilla (DBP) promueve la desnaturalización del dúplex y se une de manera cooperativa a la cadena que está siendo desplazada [8]. La replicación del genoma viral se lleva a cabo en sitios intranucleares inducidos por la infección del virus, llamados Compartimentos de Replicación (RCs, por sus siglas en inglés).

La transcripción de la MLTU depende de la replicación del genoma viral. El promotor de la MLTU se encuentra activo durante la fase temprana del ciclo de replicación viral, pero es transcrito a una tasa máxima durante la fase tardía. La transcripción de la MLTU es promovida por las proteínas codificadas por los genes virales IVa2 y L4. La expresión de IVa2 está inhibida por un represor en la etapa temprana. Cuando empieza la síntesis exponencial de replicación del DNA viral, no se altera la concentración del represor, y éste ya no puede asociarse a todas las copias del DNA recién sintetizadas. El efecto de titulación del represor promueve la expresión de IVa2, que subsecuentemente activará la transcripción de la unidad transcripcional que da lugar a todas las proteínas estructurales, la MLTU, y este proceso es conocido como la transición de la fase temprana a la fase tardía. Los transcritos de esta unidad están sujetos a adición de cola de poliA en uno de cinco posibles sitios (L1-L5). Esto da lugar a cinco familias de mensajeros que codifican, en su mayoría, para las proteínas estructurales de la cápside.

Traducción. Durante la fase temprana del ciclo de replicación, los mensajeros virales y los celulares son exportados del núcleo por distintas vías. Los mRNAs celulares son exportados por NXF1 y, los virales tempranos por XPO1. Sin embargo, al inicio de la fase tardía, los mRNAs virales y los celulares son exportados a citoplasma por la misma vía: NXT1, lo cual influye en la selectividad de exportación de mensajeros.

La MLTU codifica para la proteína L4 100K, que promueve la traducción de los mensajeros virales tardíos por un mecanismo independiente de cap, llamado *shunting ribosomal* [12, 13]. En este mecanismo, hay secuencias que promueven la asociación y disociación parcial de la subunidad 40S a lo largo de la secuencia del mRNA viral, siendo la búsqueda del codón de inicio de la traducción (AUG) por *shunting ribosomal* lo que le da selectividad a la traducción de mensajeros virales sobre los mensajeros celulares. Se ha reportado que la formación del complejo entre las proteínas virales E1B 55K y E4 Orf6 aumentan dicha selectividad por un mecanismo que no es del todo conocido, ya que se ha observado que estas dos proteínas promueven la acumulación de mRNAs virales tardíos en citoplasma, y en ausencia de E1B 55K se reducen los niveles de mRNA virales tardíos en citoplasma [14].

Ensamble. El mecanismo a través del cual se lleva a cabo el ensamble de los adenovirus aún no se conoce con detalle. Una hipótesis es que la producción de nuevas cápsidas empieza con el ensamble de partículas inmaduras que carecen de DNA viral y contienen proteínas no procesadas. Las partículas inmaduras son procesadas mediante cortes proteolíticos que ocurren al mismo tiempo que la encapsidación del DNA viral, y esto resulta en la generación de partículas infecciosas maduras. La proteína 52/55K promueve la encapsidación del genoma viral, asociándose con la señal de empacamiento presente en el extremo del DNA viral [9]. En conjunto con 52/55K, IVa2 y 22K participan en el reconocimiento de la señal de empacamiento y por lo tanto en la encapsidación del DNA viral [10]. Se ha propuesto que la proteína IVa2 funciona como ATPasa, actividad que es estimulada por la proteína viral L4 33K [11]. La proteína con actividad chaperona L4 100K

también juega un papel fundamental en el proceso de ensamble, siendo auxiliar en el plegamiento de los trímeros de hexón, que es la proteína más abundante de la cápside. La progenie viral es liberada por lisis celular.

ANTECEDENTES

Separación de fases líquido-líquido (LLPS)

La división de la célula en distintos compartimentos permite la formación de microambientes específicos donde se llevan a cabo reacciones bioquímicas distintas. Esta compartimentalización incrementa la eficiencia de los procesos celulares, concentrando los componentes requeridos para una actividad en un espacio confinado dentro de la célula. Una de las estrategias celulares para concentrar componentes en un espacio delimitado es la formación de membranas celulares que resulta en estructuras especializadas delimitadas por una barrera física, y a estas estructuras se les conocen como organelos. Los organelos llevan a cabo funciones específicas, por ejemplo: las mitocondrias, los lisosomas, el aparato de Golgi, entre otros. Sin embargo, las membranas no son la única estrategia celular para el establecimiento de microambientes especializados: recientemente se ha estudiado la formación de organelos sin membrana, también conocidos como condensados biomoleculares (BMCs por sus siglas en inglés) cuya formación es resultado de la separación de fases líquido-líquido (LLPS) [12]–[15]. Lo que conduce a la formación de estos ensamblajes líquidos es el intercambio de interacciones entre las macromoléculas y el medio circundante: las macromoléculas funcionan mejor como solvente de sí mismas que el medio que las rodea bajo condiciones termodinámicas en las que este proceso es favorable, dando lugar a una fase densa que se asemeja a una gota líquida [14]. La LLPS depende de que la molécula esté presente en cantidades que sobrepasen su concentración de saturación (C_{sat}) y también depende de las características de la secuencia de aminoácidos de la macromolécula [14]. Los BMCs están enriquecidos en proteínas que son intrínsecamente desordenadas o que tienen regiones desordenadas (IDPs o IDRs, respectivamente). Las IDRs, cuya composición de aminoácidos cargados es baja,

inducen la separación de fases debido a una preferencia por las autoasociaciones sobre las interacciones con el solvente que las rodea. Adicionalmente, las IDR que conducen a la LLPS poseen regiones de baja complejidad (LCR por sus siglas en inglés) [16]. Cuando macromoléculas en solución como proteínas o ácidos nucleicos conducen a la formación de BMCs vía LLPS, se condensan en una fase densa que se asemeja a gotas líquidas en cuanto a sus propiedades físicas: presentan morfología esférica, experimentan eventos de fusión y fisión, intercambian componentes con el medio que los rodea y se reorganizan rápidamente. Las proteínas pueden inducir la LLPS por sí solas o en presencia de otras moléculas. Los BMCs pueden estar compuestos de miles de moléculas diferentes, sin embargo, su ensamble usualmente es conducido por una o pocas proteínas denominadas "*scaffolds*" o andamios, las cuales constituyen los componentes mínimos necesarios para la formación del condensado, mientras que los componentes que no son necesarios para su formación, son denominados "clientes", y son reclutados al BMC a través de su interacción con las de andamio [16,17]. Por ejemplo: los cuerpos de PML, cuerpos nucleares sin membrana inducibles por interferón, están formados por alrededor de 200 proteínas distintas, sin embargo, el *knockout* de PML inhibe su formación, por lo que PML es una proteína de andamio, mientras que los otros componentes proteicos, como Sp100 y BML son clientes, porque su ausencia no inhibe la formación de los cuerpos de PML [18,19]. Los clientes interactúan con las proteínas de andamio y definen las características funcionales del BMC. Adicionalmente, existen reguladores que impactan en el número, tamaño, forma y localización del BMC [17].

Por otro lado, en muchos casos, la dinámica de intercambio de componentes con el medio circundante de los BMCs disminuye con el tiempo y eso resulta en la transición de un estado tipo líquido a un estado tipo sólido [21-25]. A esta transición se le ha denominado "endurecimiento" o "envejecimiento" [21] y puede darse a través de distintas maneras. Una de ellas es la gelación a través de la introducción de interacciones covalentes entre las moléculas [26], lo cual resulta en estructuras amorfas.

La formación de BMCs se ha estudiado tanto en núcleo como en citoplasma, y se ha concluido que los siguientes BMCs son formados por ese mecanismo: nucleolo [27], centrosomas [28], gránulos de RNA mitocondriales [29], cuerpos de PML [30], gránulos de estrés [31], cuerpos de Cajal [32] y Cuerpos P [33], entre otros. Adicionalmente, se ha demostrado que los RCs de algunos virus citoplasmáticos se forman vía LLPS, sugiriendo que este fenómeno también juega un rol importante en la interacción virus-hospedero (siguiente sección).

Formación de RCs en virus con genomas de RNA vía LLPS

La replicación del genoma y, en algunos casos, el ensamble de distintos virus, tanto de DNA como de RNA, se lleva a cabo en compartimentos intracelulares conocidos como fábricas virales o compartimentos de replicación [33, 34]. La localización, función y composición de estos compartimentos depende de la estrategia de replicación del virus. Por lo general, los virus con genomas de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva establecen sus compartimentos de replicación asociados a membranas resultantes del re-arreglo de organelos celulares (mitocondria, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, etc.) [36]; mientras que, en su mayoría, los virus con genomas de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa, inducen la formación de compartimentos en el citoplasma y carecen de membranas. La formación de los compartimentos de replicación de virus con genomas de DNA será abordada más adelante.

En estudios realizados con el Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV), virus con genoma de RNA no segmentado de cadena sencilla y polaridad negativa, se observó que los compartimentos poseen una forma esférica, presentando eventos de fusión y fisión, así como un rápido intercambio de componentes con el medio que los rodea, exhibiendo un comportamiento de naturaleza líquida, siendo las proteínas nucleoproteína (N), polimerasa (L) y fosfoproteína (P) suficientes para la formación de estos compartimentos citoplasmáticos. N y L son proteínas de unión a RNA, mientras que P es un cofactor de la proteína L la cual tiene regiones de baja complejidad (LCR) en su secuencia [37]. Los virus de la familia *Rhabdoviridae* pertenecen a la misma clasificación de Baltimore que VSV, y se determinó que los

RCs del virus de la rabia (a los que se les ha llamado cuerpos de Negri, NB por sus siglas en inglés) son formados vía LLPS y que las proteínas N y P son las proteínas de andamio que conducen a su formación, siendo el dominio de oligomerización y la IDR de la proteína P esencial para la formación de los NBs. Los mismos autores sugieren que el establecimiento de los RCs vía LLPs podría ser una estrategia común entre el orden de los Mononegavirales [38]. Adicionalmente, se reportó que los RCs de Rotavirus, virus con genoma segmentado de RNA de doble cadena (dsRNA), también son formados vía LLPS. En este estudio se determinó que NSP5, proteína de unión a RNA que posee IDRs y LCRs en su secuencia, es suficiente y necesaria para la formación de los RCs y se reporta una transición de líquido a sólido que correlaciona con el aumento del tamaño de los RCs [23].

Por otro lado, en estudios con el virus de la influenza A (IAV), virus con genoma segmentado de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa, se ha estudiado la formación de condensados tipo líquidos adyacentes a los sitios de salida del retículo endoplásmico (ERES). Ahí se propone se lleva a cabo el ensamble de partículas virales [39], mas no la replicación de su genoma.

Algunos RCs de virus con genomas de DNA que establecen RCs en el núcleo, como citomegalovirus (CMV), herpes simple 1 (HSV-1) y HAdV muestran características de BMCs. Se observan eventos de fusión y fisión y se componen de proteínas con IDRs cuya acumulación por el nucleoplasma es detectada previo a la formación de sus RCs, sugiriendo que su formación es un proceso dependiente de la concentración de estas macromoléculas [34]. A pesar de presentar estas características, no se ha demostrado que su formación sea conducida por LLPS.

Compartimentos de Replicación de Adenovirus (AdRCs)

Durante la infección viral, los adenovirus inducen una reorganización extensiva del núcleo de la célula infectada y la estructura resultante de esta reorganización son los RCs adenovirales (AdRCs) [40]. A estos sitios se reclutan macromoléculas cuyas funciones se pueden dividir en dos: moléculas celulares y virales que promueven la

replicación del virus, y moléculas celulares reclutadas para inhibir mecanismos antivirales de la célula. Por lo tanto, en estos microambientes se ven favorecidas las condiciones necesarias para que el virus se replique eficientemente, regulándose en ellas la replicación y expresión del genoma viral. A pesar de ser sitios clave de regulación de la interacción virus-hospedero, no se ha elucidado el mecanismo mediante el cual se ensamblan.

La proteína adenoviral de unión a ssDNA (DBP) es una molécula abundante en células infectadas con adenovirus, con una abundancia de 2×10^7 moléculas por célula (HEK293) durante la etapa temprana de la infección [41]. Adicionalmente, el estudio del proteoma de los AdRCs aislados de células infectadas ha determinado que esta proteína viral es una de las proteínas virales más abundantes en estos sitios. Por su abundancia y participación directa en la replicación del genoma viral, DBP ha funcionado como marcador *bona fide* de los AdRCs que ha permitido el estudio de la morfología de estos compartimentos a lo largo del ciclo de replicación (DBP-AdRCs). Conforme avanza el ciclo de replicación, los DBP-AdRCs exhiben cambios morfológicos [46]. A las 16 horas post-infección (hpi), tiempo temprano o anterior al inicio de la síntesis de DNA, se expresan las unidades transcripcionales tempranas, entre ellas E2, que codifica para DBP. En este tiempo, los DBP-AdRCs se observan como puntos dispersos en el núcleo o con morfología esférica. A las 24 hpi, inicia de la fase exponencial de la síntesis de DNA viral y esto define la transición de un tiempo temprano a un tiempo tardío del ciclo de replicación, en el que comienza la síntesis de proteínas estructurales de la cápside. En este tiempo, se observan como esferas que ya han empezado a experimentar eventos de fusión, y como estructuras de tipo anillo. A las 36 hpi, tiempo tardío del ciclo de replicación en el que ya son detectables partículas virales ensambladas, se pueden observar morfologías más complejas, conformadas por varias estructuras esféricas y de tipo anillo que coalescen formando una sola estructura más grande y amorfa.

La proteína adenoviral de unión a DNA de cadena sencilla (DBP)

DBP es una proteína de 529 aminoácidos codificada por la unidad transcripcional temprana E2. Se ha asociado con distintas actividades a lo largo del ciclo de

replicación del virus, sin embargo, su actividad de desnaturalización del dúplex de DNA durante la replicación del genoma es su función mejor caracterizada hasta el momento [8]. DBP se une de manera cooperativa a DNA de cadena sencilla (ssDNA), es decir, la unión de una molécula promueve la unión de la siguiente. La interacción de su extremo C-terminal a una hendidura hidrofóbica en la molécula adyacente, permite la formación de cadenas de DBP, lo cual promueve la desnaturalización y elongación del genoma por un mecanismo independiente de ATP [42]. En su dominio globular, se encuentra una asa flexible, la cual se ha propuesto que le permite tener los cambios conformacionales necesarios para la transición de unión al dúplex parental a la unión al ssDNA que está siendo desplazado durante la elongación del genoma [43]. Se ha concluido a partir de ensayos con sistemas de replicación *in vitro* que DBP no se une únicamente a ssDNA, sino también a DNA de doble cadena (dsDNA). Sin embargo, a pesar de que se forma un complejo DBP-dsDNA, éste tiene una tasa de disociación mayor que la del complejo DBP-ssDNA, por lo que se ha propuesto que el modo de unión es distinto. Esto ha llevado a sugerir que DBP tiene una actividad distinta cuando interacciona con ssDNA y cuando interacciona con dsDNA, aunque esto todavía no se ha determinado [44]. Entre las otras actividades con las que se ha asociado a DBP, están el potenciamiento del inicio de la síntesis de DNA viral, estimulando la formación del intermediario inicial de la proteína pTP-CAT (cebador de la elongación de la replicación del genoma) [45]; la inducción de alteraciones en el Ori viral que facilitan la unión del factor de transcripción celular NF1 al Ori gracias a un incremento en la afinidad de NF1 por la secuencia [44]; la regulación de la transcripción de promotores virales tempranos, promoviendo la expresión de E1A, E2A [46] y E1B [47] e inhibiendo la expresión de E4 [46]; la regulación de la estabilidad de los mensajeros virales tempranos de E1A y E1B [48] y en la expresión de mensajeros virales tardíos [49]. En cuanto a sus modificaciones post-traduccionales (PTM, por sus siglas en inglés), DBP es modificada por fosforilación y SUMOilación (**Figura 3**) [50]. No está claro ninguno de los papeles de estas dos modificaciones sobre las actividades de la proteína, ni tampoco se sabe con exactitud todos los aminoácidos que son modificados, sin embargo, se sabe que al

menos un aminoácido es modificado por fosforilación (Y195) y tres aminoácidos por SUMOilación (K94, K132 y K202) [50]. Se ha propuesto que DBP potencia su propia síntesis, y que su estado de fosforilación es importante para esta función [51].

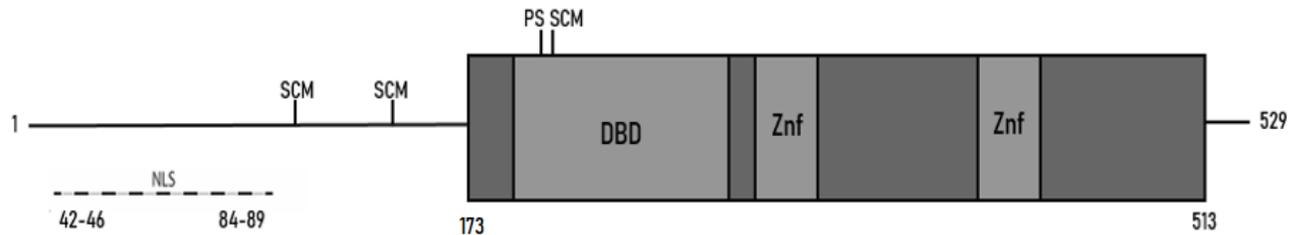


Figura 3. Representación esquemática de la proteína DBP. DBP está organizada en dos dominios estructurales; el N-terminal, que corresponde a los primeros 173 aminoácidos de la proteína; y el C-terminal, que corresponde a los últimos 349 aminoácidos de la proteína. Las líneas negras representan las IDRs predichas en el N-terminal y en el C-terminal. La línea punteada corresponde a las dos señales de localización nuclear presentes en la proteína (42-46 y 84-89). Las cajas de color gris claro corresponden a los motivos de coordinación con Zinc (266-384 y 294-519) y al de unión a DNA (176-264). Se muestran Motivos de Conjugación con Sumo (SCM) correspondientes a las lisinas 94,132 y 202 así como también un sitio de fosforilación (PS) correspondiente a la tirosina 195.

DBP está dividida en dos dominios estructurales; el carboxilo terminal (C-terminal) y el amino terminal (N-terminal) [52]. El dominio N-terminal va de los aminoácidos 1 al 173, y todo el dominio se predice intrínsecamente desordenado [53]; mientras que el C-terminal va de los aminoácidos 174-529 y tiene IDRs que van de los aminoácidos 294-334 y 518-529 (**Figura 3**). Los dos dominios se han relacionado con distintas actividades. El extremo C-terminal de la proteína es el que tiene la actividad de unión al DNA [54]. Se ha observado en ensayos *in vitro* de síntesis de DNA que el extremo C-terminal de la proteína puede sustituir la actividad de desnaturalización del dúplex de DNA de la proteína completa [55], siendo prescindible el extremo N-terminal en estos ensayos. En 1985, Kitchingman y colaboradores, hicieron una comparación entre la secuencia de aminoácidos de DBPs de las especies HAdV-A12, HAdV-B7, HAdV-C5 y HAdV-E4. De esta comparación se concluyó que el extremo N-terminal presenta un 17.2% de similitud

y está menos conservado que el extremo C-terminal, que presenta un 47.8% de similitud [56]. Esto podría sugerir que el extremo C-terminal tiene una mayor importancia en las actividades de DBP durante el ciclo de replicación viral, ya que el nivel de conservación de una proteína puede ser indicativo de la importancia de esos dominios para las actividades que lleva a cabo, sin embargo, se ha concluido que las sustituciones en el extremo N-terminal disminuyen la eficiencia de la síntesis de DNA en células infectadas (**Tabla S1**) [45], así como también otras actividades con las que se ha relacionado a DBP, como la expresión de genes virales [51]. Sin embargo, no se ha reportado si el N-terminal impacta directamente alguna de las actividades asociadas a DBP, o si la disminución en la síntesis de DNA y expresión de genes observados en estos ensayos son debidos a que el N-terminal tiene una participación en el ensamble de los DBP-AdRCs.

Como se discutió anteriormente, no se conoce el mecanismo de ensamble de los AdRCs. Con datos de nuestro grupo de investigación, donde se siguen en tiempo real células vivas infectadas con un virus mutante que expresa a la proteína DBP fusionada en su extremo N-terminal a la proteína fluorescente mCherry (mCh-DBP), se ha podido observar que hay eventos de fusión entre estructuras de forma esférica, así como también hay eventos de fisión. En muchos casos, después de los eventos de fusión, las estructuras vuelven a formar estructuras esféricas; mientras que, en otros, se observa la formación de estructuras alargadas con morfología más compleja (**Figura 4**). Adicionalmente, se calculó el coeficiente de difusión de DBP en células infectadas con mCh-DBP a las 24 hpi, siendo el valor estimado de $1.12 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ consistente con el de otros cuerpos nucleares, como el nucleolo, cuerpo nuclear cuyo tamaño es comparable con el de los DBP-AdRCs [57].

Los DBP-AdRCs exhiben morfología esférica; eventos de fusión y fisión en los que, eventualmente hay un proceso de relajación en la que vuelven a adquirir morfología esférica; IDRs; y afinidad por ácidos nucleicos. Como ya se mencionó, se puede detectar su expresión en puntos dispersos por todo el núcleo anterior a la biogénesis de los AdRCs, siendo todas estas características comunes entre BMCs formados por LLPS [14].

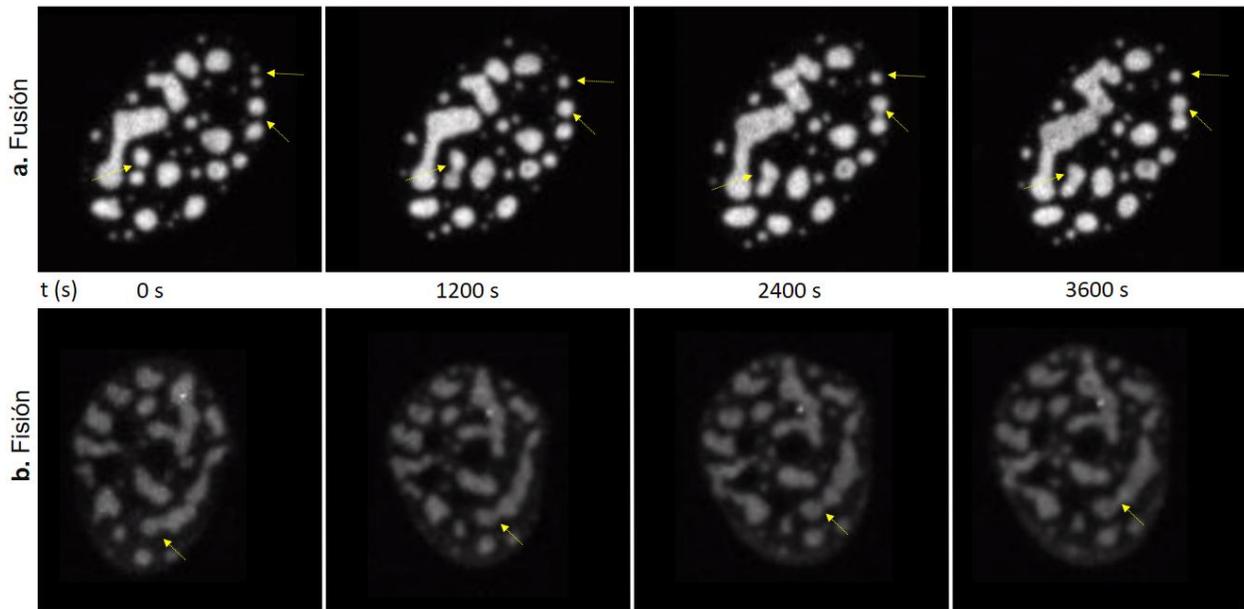


Figura 4. Eventos de fusión y fisión de la proteína DBP. Se muestran micrografías de células infectadas con mCherry-DBP seguidas en tiempo real de las 21 a las 22 hpi. En **a)** las flechas amarillas marcan algunos de los eventos de fusión observados en ese lapso de tiempo y en **b)** las flechas amarillas muestran eventos de fisión de las 20 a las 22 hpi.

HIPÓTESIS

- La proteína DBP de HAdV-C5 tiene características de proteínas que participan en la separación de fases líquido-líquido.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar si la proteína viral DBP cumple con características de proteínas que separan fases líquido-líquido.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar si la secuencia de aminoácidos de la proteína DBP tiene características de secuencias que separan fases líquido-líquido haciendo uso de herramientas bioinformáticas.
2. Determinar el coeficiente de difusión de DBP en los Compartimentos de Replicación a partir del análisis de ensayos FRAP en diferentes tiempos post-infección.
3. Predecir una red de interacción entre DBP y proteínas celulares y virales posiblemente implicadas en la formación y actividades de los AdRCs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Alineamiento de secuencias en Clustal Omega y JalView.

Clustal Omega es una herramienta con la capacidad para realizar múltiples alineamientos de secuencias de aminoácidos. El algoritmo de Clustal Omega produce un alineamiento por pares usando el método K-tuple y las secuencias son agrupadas usando el método mBed seguido de una agrupación por k-means. Posteriormente, se construye un árbol utilizando el método de grupo de pares no ponderados (Unweighted Pair Group Method with arithmetic mean,UPGM por sus siglas en inglés). El alineamiento múltiple de secuencias se produce utilizando el paquete HAlign, una herramienta que compara dos alineamientos entre sí mediante el alineamiento por pares del Modelo Oculto de Markov (Hidden Markov Model, HMM por sus siglas en inglés) [58]. El alineamiento fue editado en JalView, una herramienta para edición, visualización y análisis de alineamientos [59]. En JalView se midió la conservación entre los aminoácidos previamente alineados. La conservación se mide como un índice numérico que refleja la conservación de las propiedades físico-químicas en la alineación con valores crecientes de conservación indicados del 0 al 9 y el asterisco que indica una conservación absoluta en el alineamiento.

Predictores de Desorden

Para la predicción de desorden se emplearon secuencias de la proteína DBP reportadas para HAdV-A12 (NCBI: NC_001460.1), HAdV-B7 (NCBI: AAA42508), HAdV-C5 (NCBI: AC_000008.1), HAdV-D8 (NCBI: ANW60752.1), HAdV-E4 (NCBI: AAA42465.1), HAdV-F40 (NCBI: NC_001454.1) y HAdV-G52 (NCBI: ABK35046.1) y los servidores web de predicción de desorden PONDR VLXT [60], PONDR® XL1_XT, PONDR® VL3-BA , PONDR® VSL2 [61] y IUPRED [62].

PONDR VLXT. Integra tres redes neuronales de retroalimentación: el predictor VL1, el predictor N-terminal (XN) y el predictor C-terminal (XC). VL1 se entrenó utilizando 8 regiones largas desordenadas identificadas por la falta de densidad de electrones en estudios cristalográficos de rayos X y 7 regiones largas desordenadas caracterizadas por Resonancia Magnética Nuclear (NMR, por sus siglas en inglés).

Los predictores XN y XC, llamados juntos XT, también se entrenaron usando datos de cristalografía de rayos X, donde las regiones terminales desordenadas tenían 5 o más aminoácidos de longitud. Los resultados de VL-XT son valores reales entre 1 y 0, donde 1 es la predicción ideal de desorden y 0 es la predicción ideal de orden. Las salidas de VL-XT generalmente no son ideales y se aplica un umbral con desorden asignado a valores iguales o superiores a 0.5.

PONDR XL1_XT. El predictor XL1 es una red neuronal para predecir regiones de desorden de más de 39 aminoácidos. Se entrenó con 7 de las 8 regiones desordenadas identificadas por la densidad de electrones faltantes que se utilizaron para entrenar el predictor VL1. Este predictor utiliza una ventana deslizante de 9 aminoácidos para suavizar los valores de predicción a lo largo de la secuencia, por lo que las predicciones solo se proporcionan comenzando y terminando a 15 aminoácidos de los extremos. Los resultados de la predicción son combinados con los arrojados por el predictor XT, descrito anteriormente.

PONDR VL3-BA. El predictor VL3-BA es una red neuronal de retroalimentación que se entrenó con regiones de 152 regiones largas de desorden caracterizadas por varios métodos. El conjunto de proteínas ordenadas constaba de 290 cadenas de aminoácidos del PDB que no tenían residuos desordenados. Este predictor se basa en 20 atributos (18 frecuencias de aminoácidos, flexibilidad promedio y complejidad de secuencia) en una ventana de entrada de longitud 41. Las predicciones en bruto se promedian sobre una ventana de salida de longitud 31 para obtener la predicción final para una posición determinada.

PONDR VSL2. Esta extensión de PONDR combina en una sola red la optimización de regiones desordenadas largas (≥ 30) y cortas (< 30). La red se entrenó con 230 regiones largas desordenadas y 983 regiones cortas desordenadas caracterizadas por varios métodos. Los atributos empleados por esta red son: complejidad de la secuencia, relación carga neta/hidrofobicidad, flexibilidad media, perfil PSI-BLAST y la frecuencia en la que se presenta cada aminoácido.

IUPRED2. Basado en los principios físicos del orden/desorden en las proteínas. Estima el potencial de los polipéptidos de formar contactos que estabilicen la

estructura mediante el uso de un potencial de interacción estadístico. El cálculo del potencial involucra una matriz de predicción de energía de 20x20, la cual está parametrizada para acercarse a la energía de los pares en las proteínas globulares. De tal modo, la probabilidad de un aminoácido de ser desordenado depende de su tipo químico y de su potencial de interacción con sus vecinos. Para cada aminoácido se considera la interacción con los vecinos que están de 2 a 100 residuos en ambas direcciones. Las calificaciones de más de 0.5 son indicativos de desorden.

Motif Scan.

Es una herramienta desarrollada por el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB por sus siglas en inglés) y usa las bases de datos de HAMAP, PROSITE y Pfam para encontrar similitudes en secuencia entre los motivos reportados con los de la secuencia de la proteína de interés. Funciona con HitKeeper, un paquete de software de gestión de listas de aciertos que contiene una colección de scripts que interactúan con un sistema de gestión de bases de datos relacionales.

Predictor de Separación de fases líquido-líquido (PSPredictor).

La base de datos en la que se basa el predictor es la Base de Datos de Separación de Fases Líquido-Líquido (LLPSDB, por sus siglas en inglés) desarrollada por Li et al., 2019, la cual tiene resultados experimentales encontrados en la literatura de proteínas que pueden separar fases líquido-líquido [63]. Posee un algoritmo de *Machine Learning* que utiliza secuencias depositadas en la LLPSDB. El algoritmo fue entrenado con aprendizaje supervisado de árboles de decisión *Gradient Boosting*. Una calificación arriba de 0.5 indica que la proteína se predice que separa fases, y abajo de 0.5 se predice como una proteína que no separa fases.

Análisis de ensayos de Recuperación de la Fluorescencia después del Foto-blanqueo (FRAP)

Adquisición de datos. La adquisición de los datos para los ensayos fue realizada por la Dra. Paloma Hidalgo Ocampo. Se cultivaron células HFF y se infectaron al 80% de confluencia con el adenovirus recombinante que expresa a la proteína DBP fusionada a la proteína fluorescente mCherry (mCh-DBP) con la metodología

previamente descrita. A las 16, 24 y 36 hpi las células infectadas se procesaron para ser analizadas por FRAP. La adquisición de datos se realizó en el microscopio confocal invertido IX81 Olympus con un objetivo de inmersión en aceite 60X/NA 1.3, con la línea de láser 543 nm, en una incubadora con control de temperatura (37 °C) y CO₂ (5%). El blanqueamiento se realizó en una región de interés, con una línea de láser de 405 nm al 100%. Durante la adquisición de datos, se seleccionaron las regiones de interés (ROI) que se muestran en la **Tabla 2**:

Regiones de interés (ROI)	Descripción de cada ROI
ROI ₁	Región de interés blanqueada.
ROI ₂ .	Región de interés de referencia
ROI ₃	Región de interés de fluorescencia de fondo

Tabla 2. Descripción de ROIs para análisis de datos de FRAP.

Corrección de desplazamiento en eje de X y eje Y. Algunos datos adquiridos presentaron desplazamientos en el eje de las X o en el eje de las Y. Para realizar la corrección de este tipo de datos, se usó el Plug In *Template Matching* de ImageJ [64].

Generación de series de tiempo. El cambio de la intensidad de la fluorescencia promedio a lo largo del tiempo en las ROIs fue calculado con un Macro de Image J desarrollado por Arturo Pimentel (LNMA-IBT-UNAM). El macro tiene dos variantes: En la primera, Macro_tiff, la serie de pasos automatizados en el macro permiten al usuario definir manualmente las ROIs. En la segunda variante, Macro_oib, la serie de tiempo se genera con las ROIs que fueron definidas durante la adquisición de los datos. En ambos macros, para la medición simultánea del cambio en la intensidad de los pixeles en función del tiempo de las ROIs definidas, se utilizó el Plug In *Multi Measure* de ImageJ.

Corrección de fluorescencia de fondo, blanqueo secundario y normalización de los datos. La corrección y/o normalización de datos se realizó con un script en R desarrollado por Arturo Pimentel (no publicado). El script tiene como archivo de

entrada la serie de tiempo original previamente generada con el Macro_oib y el Macro_tiff en Image J. Con los datos de la serie original, se genera un gráfico. Posteriormente, procede a hacer la normalización y corrección de las series de tiempo. Genera dos archivos como archivos de salida; un archivo al cual únicamente le hizo normalización de datos, y otro archivo al cual le hizo una normalización y corrección a los datos, generando un gráfico por cada archivo. La corrección y normalización de los datos se realizó de la siguiente manera. Los datos fueron normalizados utilizando el valor de la intensidad de la fluorescencia promedio:

$$1. ROI_1 = ROI_1(t) / ROI_1 \text{ promedio}$$

$$2. ROI_2 = ROI_2(t) / ROI_2 \text{ promedio}$$

Para corregir el fondo presente en las regiones donde no hay moléculas marcadas, se midió la fluorescencia en estas regiones (ROI_3) en las mismas condiciones en las que se realizó FRAP y se restó a las ROIs de blanqueo (ROI_1) y de referencia (ROI_2).

$$1. ROI_1 = [ROI_1(t)] - [ROI_3(t)]$$

$$2. ROI_2 = [ROI_2(t)] - [ROI_3(t)]$$

El blanqueo secundario, efecto colateral que resulta del blanqueamiento de la ROI de interés, y los desplazamientos en Z, fueron corregidos implementando un factor de corrección que toma en cuenta los decaimientos de la fluorescencia debido a blanqueos secundarios y desenfocados.

Medición de los radios de ROI de blanqueo. La medición de los radios de la ROI de blanqueo, tomados en cuenta en el modelo difusivo empleado, fue realizada en Image J.

Ajuste de datos a una ecuación exponencial para el cálculo de $\tau_{1/2}$, fracción de recuperación y coeficiente de difusión. El script que ajusta los datos a un modelo exponencial para calcular la $\tau_{1/2}$, fracción de recuperación y coeficiente de difusión fue desarrollado por Arturo Pimentel en R (no publicado). Los datos obtenidos

después de la corrección y/o normalización fueron ajustados al siguiente modelo exponencial:

$$E(y)=\alpha e^{\beta x} + \theta$$

Donde los valores α , β y θ son determinados por el método de mínimos cuadrados y x es la variable independiente. Una vez que los datos se ajustaron al modelo exponencial, se calculó la $\tau_{1/2}$, parámetro que está relacionado con la τ_D (tiempo de difusión) mediante la expresión:

$$\tau_{1/2}=\beta \tau_D$$

Donde β es un parámetro que depende del porcentaje de blanqueo por el láser [65]. La τ_D está relacionada a su vez con el coeficiente de difusión mediante la expresión:

$$\beta \tau_D= \beta r^2/4D$$

por lo que el coeficiente de difusión fue calculado mediante la expresión:

$$D= \beta r^2 / 4 \tau_{1/2}$$

En la Figura 5 se muestra un diagrama de flujo general en el cual se resumen los pasos para el análisis de los datos adquiridos mediante FRAP.

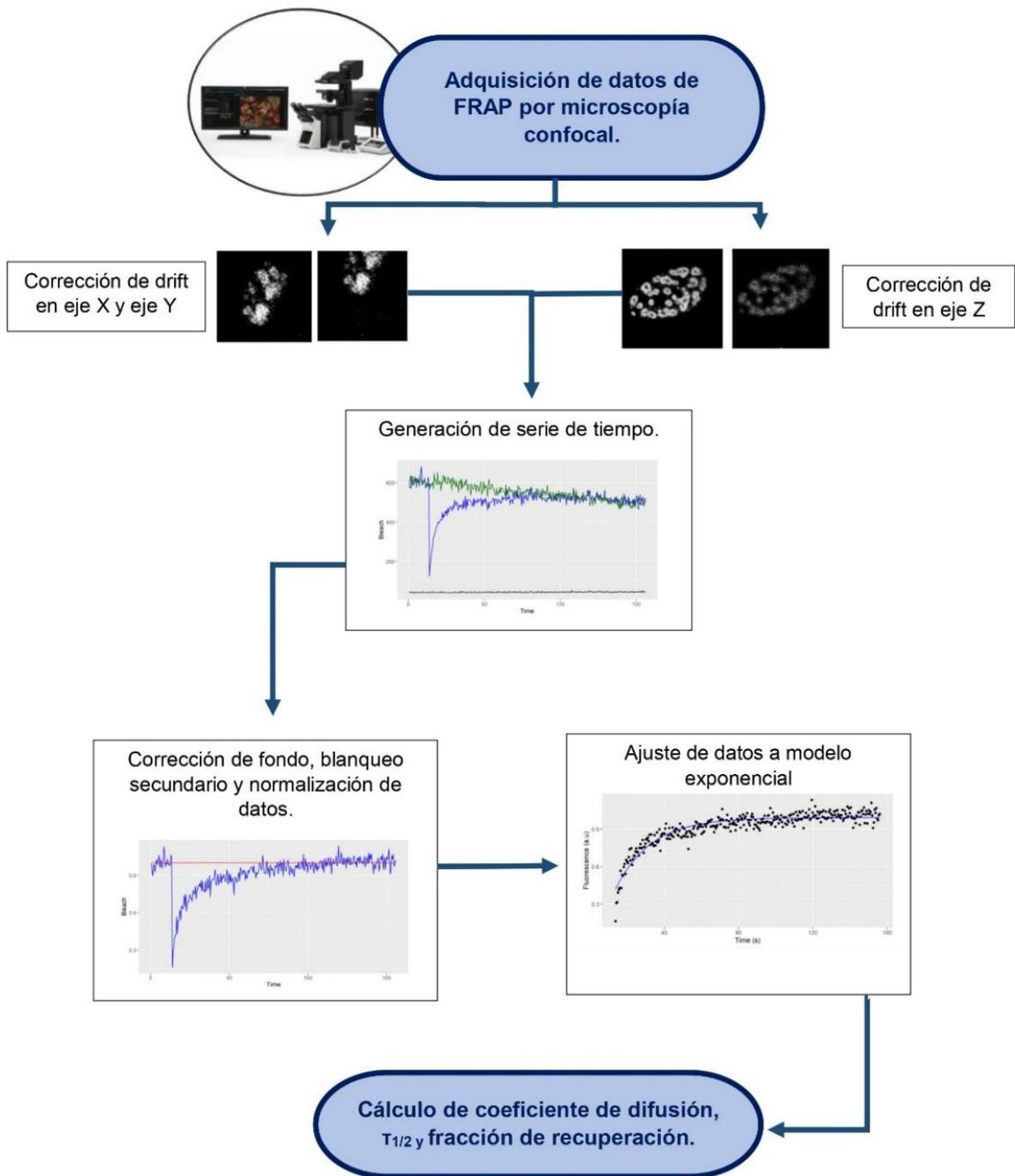


Figura 5. Diagrama de flujo de análisis de datos adquiridos durante FRAP.

Construcción de una red de interacción proteína-proteína (PPI) de DBP.

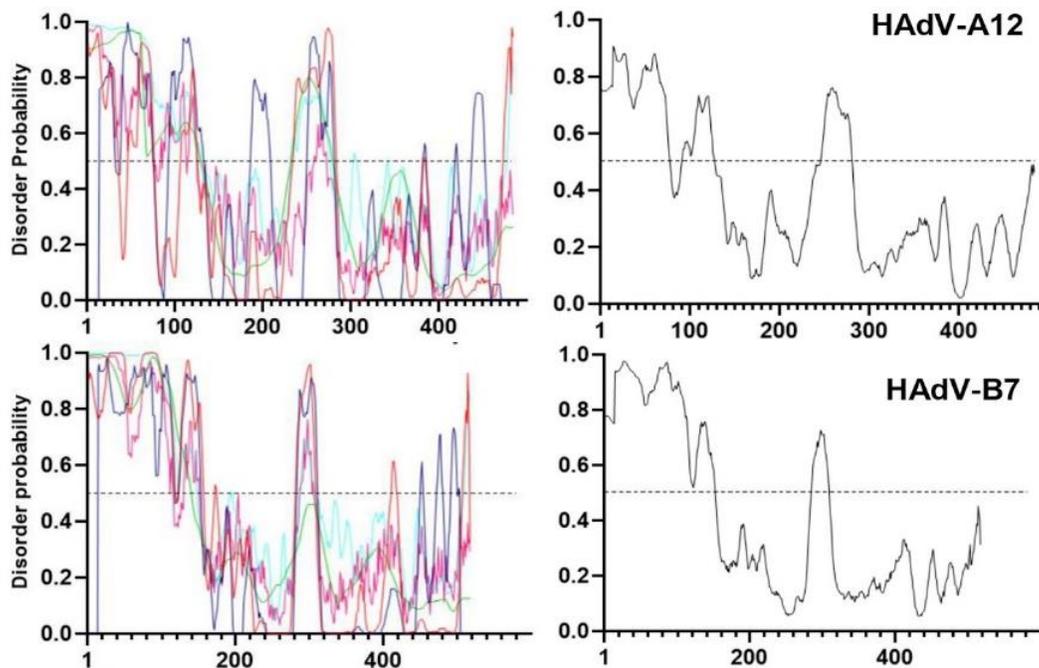
Para las predicciones de las redes de PPI entre DBP y las proteínas celulares y virales, se hizo una búsqueda en la literatura, y en las siguientes bases de datos: la base de datos The Molecular Interaction Data Base (*MINT*) [66], *BioGrid* [67] y *STRING* [68]. En estas bases de datos se hizo una búsqueda de aquellas proteínas que se sabe que colocan y/o que interaccionan con la proteína viral DBP. A partir de esta lista se construyó una red de PPI basada en 4 niveles de interacción. La red de interacción se hizo dirigida hacia la proteína viral E1B 55K (E1B); proteína que es de interés en nuestro laboratorio porque está involucrada en la regulación de múltiples procesos del ciclo de replicación viral, entre los que se encuentra la formación eficiente de los AdRCs. En cada nivel de interacción, se buscaron las proteínas interactoras de DBP que se encuentran en el interactoma de E1B (proteínas coincidentes). Con base en las proteínas coincidentes encontradas en cada nivel de interacción, se fue construyendo la red.

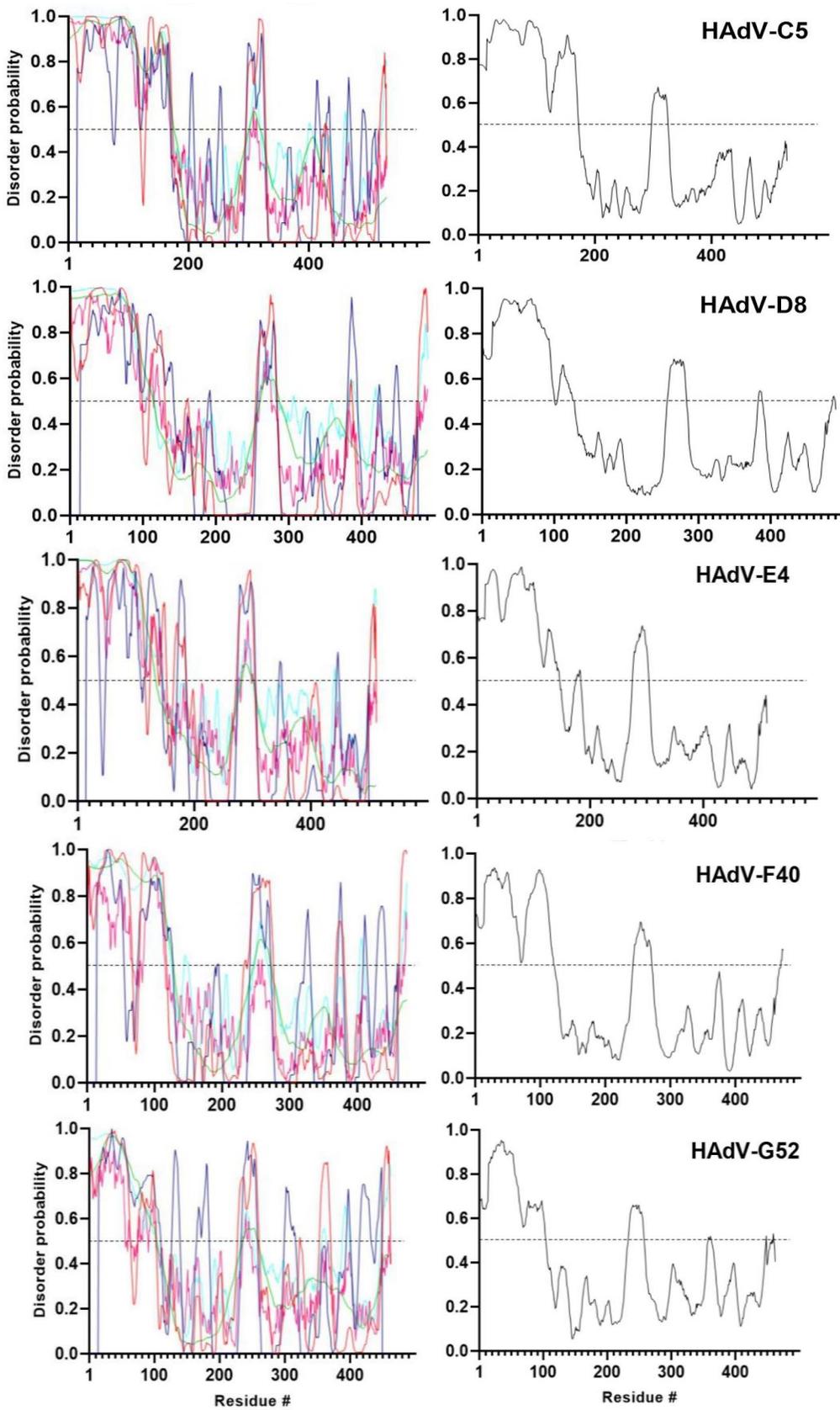
RESULTADOS

La proteína DBP presenta similitudes con proteínas que separan fases líquido-líquido a nivel de la secuencia de aminoácidos.

Como se describió antes, DBP es una proteína de 529 aminoácidos que consta de dos dominios funcionales: un dominio N-terminal (poco conservado entre especies) y un dominio C-terminal (muy conservado entre especies). Se han hecho análisis del desorden presente en DBP de HAdV-C5 que sugieren que presenta dos IDR's principales: una en el extremo N-terminal de 173 aminoácidos y otra en el C-terminal, correspondiente a 30 aminoácidos [53]. Estas predicciones coinciden con los datos obtenidos por cristalografía de rayos X, ya que la región N-terminal no ha sido cristalizada y la región correspondiente a la IDR en el C-terminal muestra una disminución de la densidad electrónica [69]. Si bien está reportado que la región C-terminal es la que posee actividad de unión a DNA, no se sabe cuál es la participación del N-terminal en las actividades biológicas a las que se ha asociado a la proteína. El análisis de conservación entre secuencias de aminoácidos de DBP antes descrito hecho en 1985 por Kitchingman y colaboradores, donde observan un mayor grado de similitud en el dominio C-terminal que en el N-terminal, se realizó únicamente con 4 especies de HAdVs [56]. Desde entonces se han reportado secuencias de otras especies de adenovirus, por lo que aquí se realizó un alineamiento de secuencias con las DBPs de cada una de las 7 especies (de la A a la G) (**Figura 6**). Como se puede observar en el diagrama de barras que se encuentra debajo del alineamiento de aminoácidos en la **Figura 6**, los aminoácidos correspondientes al extremo N-terminal de la proteína (1-173 aa) muestran valores indicativos de conservación (ver materiales y métodos) menores que los aminoácidos correspondientes al C-terminal de la proteína, como lo describió Kitchingman para las especies A, B, C y E. Este alineamiento nos permite concluir que la secuencia de aminoácidos del N-terminal varía más entre especies que la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal, lo cual podría estar relacionado con la habilidad del C-terminal de unirse a DNA (dada por los aminoácidos 176 al 264) y de coordinar zinc (dada por los aminoácidos 266 al 384 y 294 al 519) (**Figura 3**).

Por otro lado, como se mencionó antes, el extremo N-terminal de DBP se predice como una región intrínsecamente desordenada [53]. Como se observó en la figura anterior, el N-terminal no está conservado entre las distintas especies de adenovirus. Para confirmar si las IDRs presentes en la DBP de HAdV-C5 también se encuentran en otras especies, se hizo una predicción del desorden de la secuencia de DBP de las especies de la A a la G, utilizando los siguientes predictores de desorden: VXLT, XL1_XT, VL3-BA, VSL2, y IUPRED. Con los resultados de cada uno de los cinco predictores, se obtuvo un promedio del desorden presente (**Figura 7**). Lo que se muestra en la **Figura 8**, es el promedio de la calificación de desorden obtenido de cada una de las DBPs a partir de los predictores que fueron utilizados. De los análisis a nivel de secuencia realizados podemos concluir que, aunque el dominio N-terminal tiene un menor grado de conservación entre especies que el C-terminal, los predictores de desorden muestran que el extremo N-terminal se predice como IDRs en todas las especies de adenovirus. La conservación de las IDRs en el N-terminal de DBP sugiere que es relevante en sus actividades biológicas. Como se mencionó antes, los condensados moleculares están enriquecidos en proteínas que contienen IDRs [15], sin embargo, queda por determinar si la importancia de las IDRs presentes en DBP están directamente relacionadas con el fenómeno de LLPS.





— VXLT — XL1_XT — VL3-BA — VSL2 — IUPRED

Figura 7. Resultados del desorden predicho para las DBPs de HAdV A-G. A la izquierda se muestra el resultado de cada uno de los cinco predictores empleados. A la derecha se muestra el promedio de los cinco predictores, siendo 0.5 el umbral entre orden y desorden.

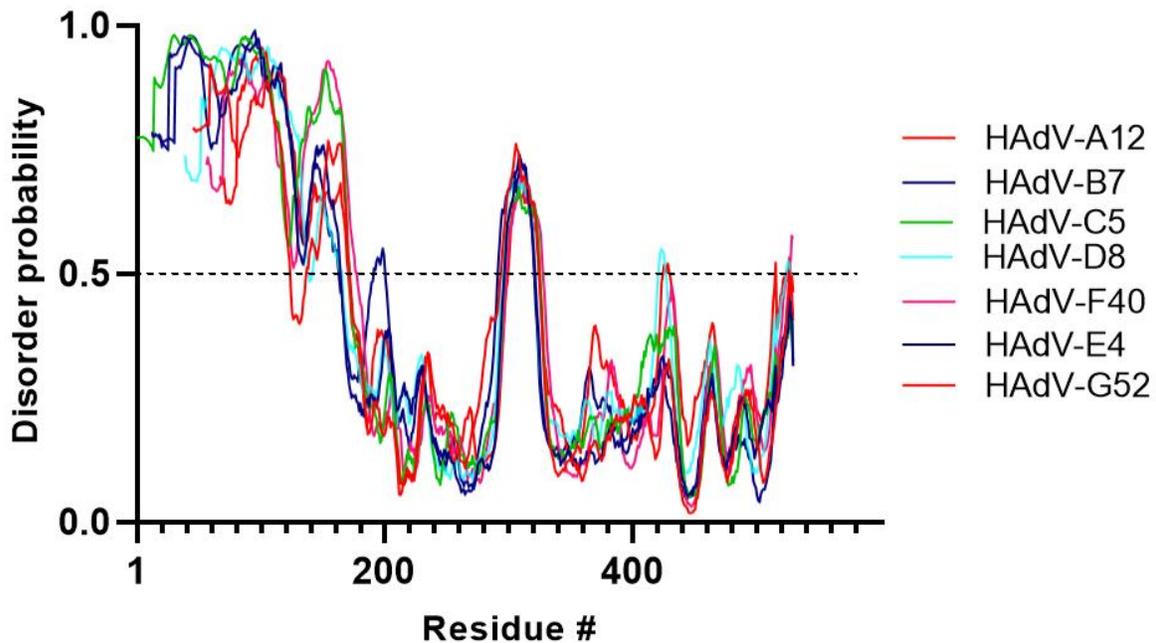


Figura 8. Resultado del desorden predicho para las secuencias de proteínas DBPs de especies de adenovirus humanos A-G. El desorden de las secuencias de DBP de especies representativas de HAdVs de las especies A (HAdV-A12; 484 aminoácidos), B (HAdV-B7; 517 aminoácidos), C (HAdV-C5; 529 aminoácidos), D (HAdV-D8; 490 aminoácidos), E (HAdV-E4; 512 aminoácidos), F (HAdV-F40; 473 aminoácidos) y G (HAdV-G52; 462 aminoácidos) fueron predichas usando los predictores VXLT, XL1_XT, VL3-BA, VSL2, y IUPRED. En la gráfica se muestra el promedio de los 5 predictores para cada una de las DBPs. Los valores superiores a 0.5 indican desorden.

Adicional a las IDRs, se ha observado que las proteínas presentes en condensados líquidos pueden contener LCRs en su secuencia [70] y estas regiones promueven su comportamiento en condensados líquidos. Para determinar si la DBP de HAdV-C5 tiene LCRs en su secuencia, se utilizó el Meta Predictor de dominios Motif Scan, descrito anteriormente en materiales y métodos. Según este predictor, DBP cuenta con un dominio rico en prolina (**Figura 9**) que va del aminoácido 23 al 101. El alto contenido de prolina en la región N-terminal ya había sido reportado por Kruijer et

al. en 1981 [71]. Interesantemente, recientemente se reportó que una región rica en prolinas promueve la separación de fases de la proteína Tau [72].

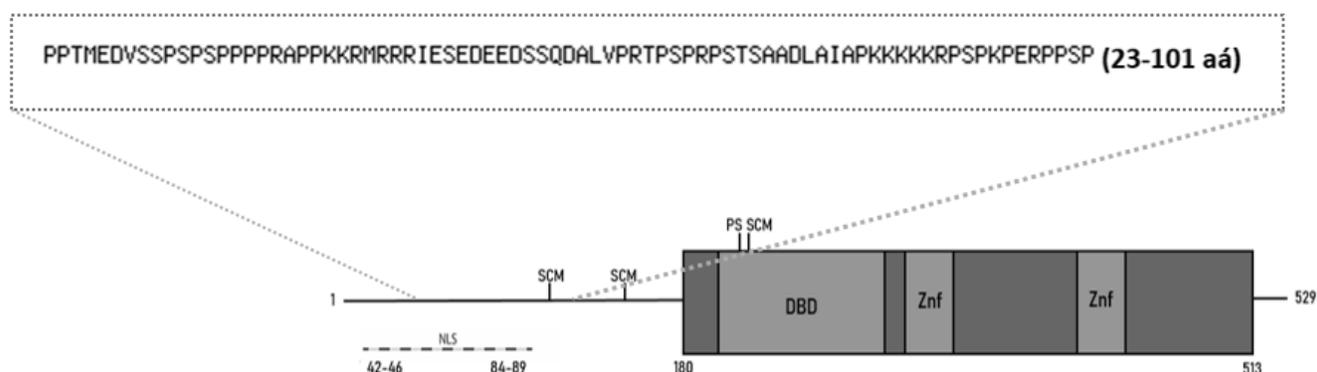


Figura 9. Resultados de MotifScan. Se muestra la secuencia de la región predicha como una LCR y su ubicación en la longitud completa de la proteína. El diagrama de la proteína completa se encuentra descrito en la figura 3.

Por otro lado, se buscaron LCRs en las IDR predichas en el extremo N-terminal de otras especies de adenovirus utilizando Motif Scan (**Tabla 3**). Se encontró una LCR rica en prolinas en el N-terminal de las especies B, C, D y E; mientras que para las especies A, F y G no se predijo ninguna LCR. Este análisis nos permite concluir que la región rica en prolinas en el extremo N-terminal de DBP únicamente está presente en 4 de 7 especies de adenovirus, y que la región rica en prolinas más larga la presenta HAdV-C5.

Especie	IDR	MotifScan
HAdV-A12	1-127	No LCR.
HAdV-B7	1-152	Región rica en prolinas del aminoácido 28 al 45.
HAdV-C5	1-173	Región rica en prolinas del aminoácido 23 al 101.
HAdV-D8	1-128	Región rica en prolinas del aminoácido 18 al 43.
HAdV-E4	1-146	Región rica en prolinas del aminoácido 27 al 83.
HAdV-F40	1-122	No LCR.
HAdV-G52	1-104	No LCR.

Tabla 3. Resultados de la búsqueda de LCRs en la IDR del extremo N-terminal de DBP de las especies A-G. En la primera columna se nombran la especie; en la segunda los aminoácidos presentes en las IDRs; y en la tercera el resultado de la búsqueda de LCRs.

Por último, para determinar si la DBP de HAdV-C5 es una proteína que puede inducir la separación de fases líquido-líquido, se utilizó el PSPredictor, descrito anteriormente en materiales y métodos. Se analizó la secuencia de la proteína completa (529 aminoácidos), así como también el extremo N y C terminal (173 aminoácidos y 349 aminoácidos, respectivamente) y, por último, la región rica en prolinas predicha por MotifScan (**Tabla 4**).

<i>Región</i>	<i>Calificación PSP</i>
DBP (529 aminoácidos, longitud completa)	0.9456
C-terminal (174-529, longitud de 349 aminoácidos)	0.094
N-terminal (1-173, longitud de 173 aminoácidos)	0.9603
Región rica en prolinas (23-101, longitud de 78 aminoácidos)	0.9897

Tabla 4. Resultados del PSPredictor. En la primera columna, se nombran las regiones con las que se hizo la predicción: la longitud completa de DBP, correspondiente a 529 aminoácidos; la región correspondiente al extremo C-terminal, de una longitud de 349 aminoácidos (174-529); la región correspondiente al extremo N-terminal, de una longitud de 173 aminoácidos (1-173); y la región rica en prolinas predicha por MotifScan, con una longitud de 78 aminoácidos (23-101). Los valores superiores a 0.5 indican que la proteína puede separar fases líquido-líquido.

Los resultados del predictor muestran una calificación indicativa de LLPS para DBP de longitud completa, así como para el extremo N-terminal y la región rica en prolinas (encontrada dentro del N-terminal); y una calificación no indicativa de LLPS para el C-terminal. El análisis bioinformático sugiere que DBP presenta características en su secuencia de aminoácidos de proteínas que separan fases líquido-líquido, y que la IDR presente en su extremo N-terminal podría ser importante para este comportamiento, así como también la LCR rica en prolinas.

DBP presenta coeficientes de difusión similares a los reportados para BMCs

Como se mencionó antes, uno de los criterios que se usan comúnmente para definir que un coacervado se forma por LLPS es que las moléculas que lo componen transitan entre su interior y el entorno con coeficientes de difusión que van desde 1×10^{-5} hasta $1 \times 10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$ [73]. Para determinar el coeficiente de difusión de una molécula de interés asociada a un coacervado se puede medir la recuperación después de foto-blanqueo en experimentos de FRAP [14]. En FRAP, la difusión de una población de moléculas fluorescentes puede ser estudiada mediante el foto-blanqueo de las moléculas en una región definida (ROI de blanqueo) por el usuario y, posteriormente, monitorear la recuperación de la fluorescencia debido al intercambio de las moléculas blanqueadas dentro de la ROI de blanqueo con las moléculas no blanqueadas de alrededor [74]. Para evaluar la dinámica de difusión en los DBP-AdRCs se infectaron células HFF con el virus mCh-DBP, como se describió en la sección de materiales y métodos, y se realizó FRAP a las 16, 24 y 36 hpi. Posteriormente, se procedió a hacer el análisis de los datos adquiridos. Los datos pueden presentar errores artefactuales, como desplazamientos de la célula en el eje de las X y Y; desenfoques, que son desplazamiento en eje de las Z; así como blanqueo secundario en otras regiones como efecto colateral resultante del blanqueamiento hecho en la ROI de interés, por lo que la intensidad de la fluorescencia promedio disminuye en toda la célula. Es importante corregir dichos errores, ya que, de no ser así, pueden llevar a estimaciones erróneas de los parámetros de interés a calcular.

Primeramente, se corrigieron los desplazamientos en xy. Posteriormente, se generaron las series de tiempo, las cuales describen el cambio de la intensidad promedio de la fluorescencia en función del tiempo en las ROI. Las series de tiempo fueron corregidas y normalizadas para generar una curva de FRAP. Las curvas de FRAP que describen cómo la fluorescencia decae y posteriormente se recupera, tienen un comportamiento exponencial, por lo que se pueden ajustar los datos generados a un modelo exponencial. Una vez que se realizó este ajuste, se

cuantificaron los parámetros de interés. Las mediciones de FRAP pueden ser cuantificadas en términos de Fracción de Recuperación (RF, por sus siglas en inglés), tiempo medio de recuperación ($\tau_{1/2}$), y coeficiente de difusión (D). La RF es la fracción móvil, es decir, la fracción de moléculas que contribuyeron a la recuperación [75]; la $\tau_{1/2}$ está definida como el tiempo requerido para que la zona blanqueada llegue a la mitad de la curva de recuperación entre el estado inicial después del blanqueo y el estado estable recuperado [75]; y el D es un parámetro que proporciona una medida del desplazamiento cuadrático medio por unidad de tiempo de la especie en difusión, y describe la dinámica con la que difundieron las moléculas [76]. Para estos experimentos, se calcularon los tres parámetros mencionados.

Los dos modelos más usados en la literatura para analizar datos adquiridos por FRAP para el estudio de BMCs son un modelo de exponencial simple y un modelo 2D con frontera infinita. El cálculo de D se hizo bajo la suposición de que la célula es lo suficientemente plana como para ser tratada como un objeto en 2D y se asumió que la condición de frontera es infinita, considerando a la ROI de blanqueo como una zona infinitesimalmente más pequeña que la célula completa [76]. Es de importancia considerar que los valores de D son completamente dependientes del modelo de difusión utilizado. Se han reportado diferencias de hasta 2 órdenes de magnitud (dentro de los intervalos establecidos para BMCs que van de 1×10^{-5} a $1 \times 10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$) en el valor de D de proteínas que separan fases líquido-líquido dependiendo del modelo de difusión utilizado para el análisis de los datos de FRAP [73].

La selección de células a analizar se hizo con base en el análisis de su curva de recuperación de la fluorescencia. Únicamente se seleccionaron las células que alcanzaron un estado estable de la fluorescencia al finalizar la ventana de tiempo en la cual se adquirieron los datos. De esta manera, se seleccionó un número total de 15 células ($n=15$) por cada tiempo; 16, 24 y 36 hpi. En la **Figura 10** se muestra el FRAP de una célula representativa de cada tiempo. A las 16 hpi, se observa que la fluorescencia se recupera rápidamente con la misma morfología previa al foto-

blanqueo, mientras que a las 36 hpi la estructura blanqueada no se recupera en la ventana de tiempo en la que se hizo la adquisición de los datos (155.53 s). A las 24 hpi, tiempo en el que se sintetiza el DNA viral, se observan estructuras más variadas, desde formas esféricas, tipo anillo y más complejas, por lo que lo que exhibieron RFs de un rango más variado. Sin embargo, todas las estructuras en este tiempo se recuperaron después del foto-blanqueo.

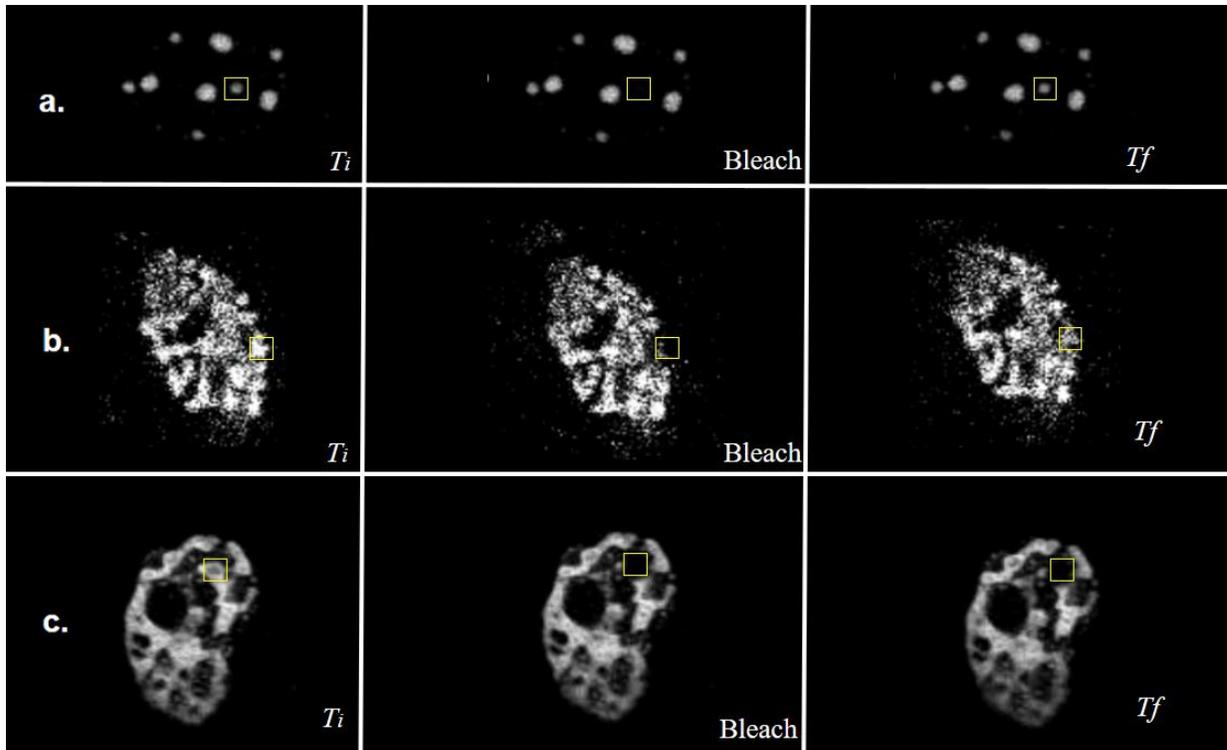


Figura 10. FRAP realizado en células infectadas con mCh-DBP a las a) 16 hpi b) 24 hpi y c) 36 hpi. Los recuadros amarillos indican las ROIs de blanqueo; *T_i*, el tiempo previo al foto-blanqueo; *T_f*, el tiempo posterior al foto-blanqueo una vez que se llegó a un valor de fluorescencia estable.

Como se mencionó antes, cuando la curva de FRAP tiene un comportamiento exponencial, estos datos pueden ajustarse a un modelo que describe una ecuación de este tipo para calcular el D . Sin embargo, a las 36 hpi, la mayoría de las células no presentaron un comportamiento exponencial; después del blanqueo, la fracción móvil es prácticamente nula en la mayoría de los casos, por lo que el comportamiento de la curva se asemeja más una ecuación lineal, que a una

ecuación exponencial (**Figura 11**). Directamente de la curva FRAP (antes del ajuste de los datos al modelo exponencial), pueden estimarse parámetros como la $\tau_{1/2}$ y la RF, sin embargo, la $\tau_{1/2}$ de igual manera depende de que la curva tenga un comportamiento exponencial; de tal manera que para las 36 hpi, bajo las condiciones del modelo utilizado, únicamente se puede estimar la RF para este tiempo.

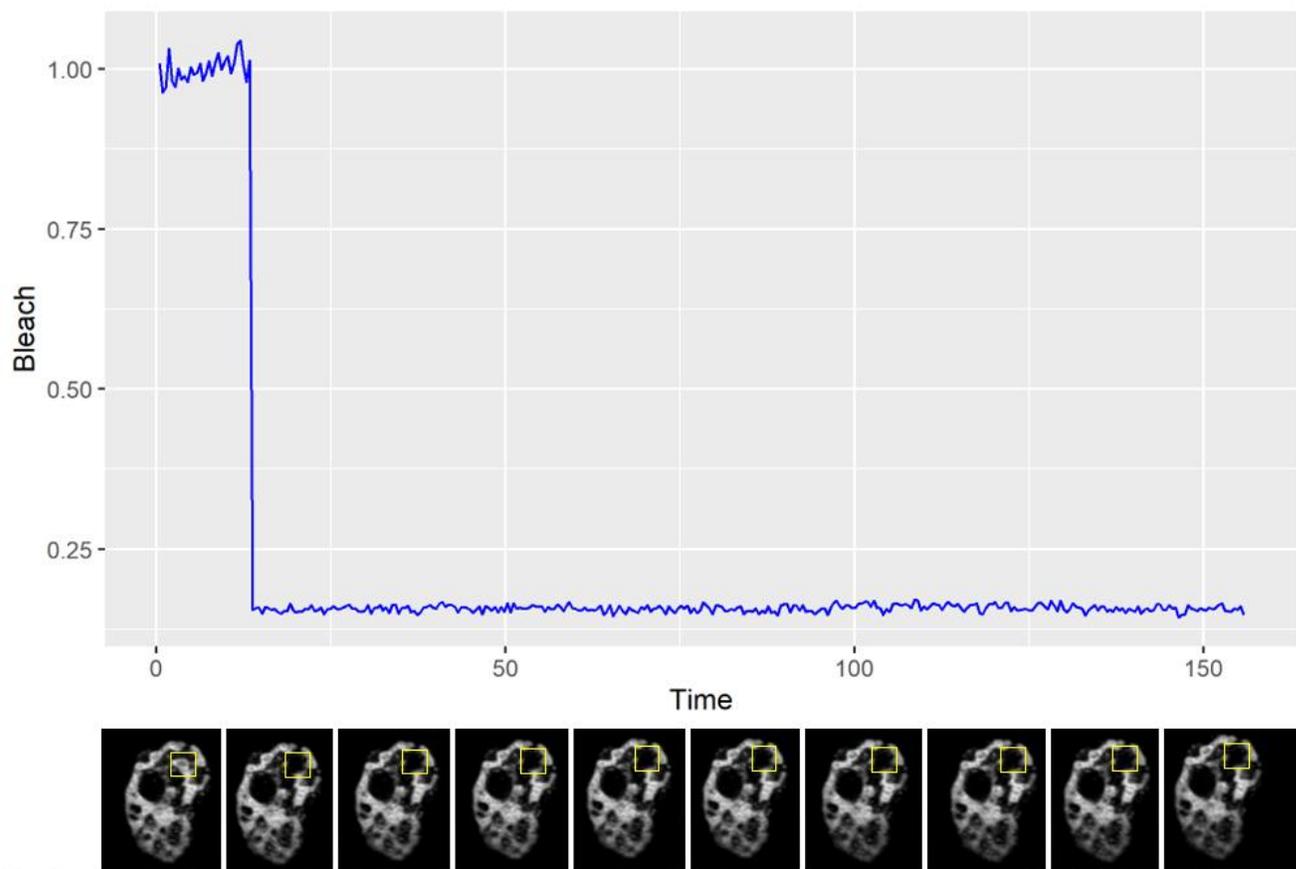


Figura 11. Curva de FRAP de una estructura compleja blanqueada a las 36 hpi.

A las 16 hpi el promedio de RF fue de 92.65 %, a las 24 hpi fue de 71% y a las 36 hpi fue de 19.2% (**Tabla 5, 6 y 7**). Observaciones previas al análisis de los datos a las 36 hpi, parecen indicar que la recuperación es nula (**Figura 11**). No obstante, el promedio calculado, como se mencionó antes, es de 19.2%. Esto podría deberse a que el porcentaje de blanqueo no siempre es igual al 100%, siendo 83.50% el promedio para las 36 hpi (**Figura 12e, tabla 7**). Este factor es tomado en cuenta

cuando se calcula el D (ver materiales y métodos), sin embargo, como se describió antes, para las 36 hpi, este parámetro no se pudo calcular. Por lo que, para el cálculo de la RF, el porcentaje de blanqueo sigue siendo un factor de error sobre la estimación de la RF. Las RF calculadas sugieren que, conforme avanza el ciclo de replicación y los DBP-AdRCs incrementan la complejidad de su estructura, hay una disminución de la fracción de moléculas que contribuyen a la recuperación de la fluorescencia, lo que quiere decir a su vez, una menor movilidad de las moléculas. La **Figura 12b** muestra la $\tau_{1/2}$ calculada para las 16 y 24 hpi, siendo el promedio de $\tau_{1/2}$ para las 16 hpi de 7.54 segundos y para las 24 hpi de 16.89 segundos, por lo que las estructuras blanqueadas que se recuperaron con una mayor velocidad fueron las de las 16 hpi. La **Figura 12c** muestra los coeficientes de difusión calculados para las 16 y 24 hpi, mientras que en la **Figura 12d** se muestran las variaciones en los radios de las ROIs blanqueadas. Los coeficientes de difusión más grandes corresponden a las estructuras blanqueadas a las 16 hpi, con un promedio de $0.0809 \mu\text{m}^2/\text{s}$, mientras que a las 24 hpi el promedio es de $0.0352 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

A las 24 hpi, se hizo el blanqueo a estructuras esféricas y a estructuras de tipo anillo y de morfologías más complejas (**Figura 14**). Como las células presentan morfologías diferentes, se clasificaron por morfología aquellas células en las que se distingue claramente morfología esférica o compleja (**Tabla 8**). Interesantemente, las estructuras que mostraron un coeficiente de difusión más bajo para este tiempo, fueron las células que presentan los DBP-AdRCs con las morfologías más complejas (tipo anillo o toroide) de las estructuras medidas en este tiempo (**Figura 14 y Tabla 6 y 8, células 13 y 15**). Cabe resaltar que todas las estructuras blanqueadas a estos dos tiempos, 16 y 24 hpi, se recuperaron después del foto-blanqueo a diferencia de las estructuras blanqueadas a las 36 hpi. Las estructuras blanqueadas a las 36 hpi son estructuras de morfología compleja, o bien, amorfas, en las que no se conserva la morfología esférica en ningún caso (**Figura 15**).

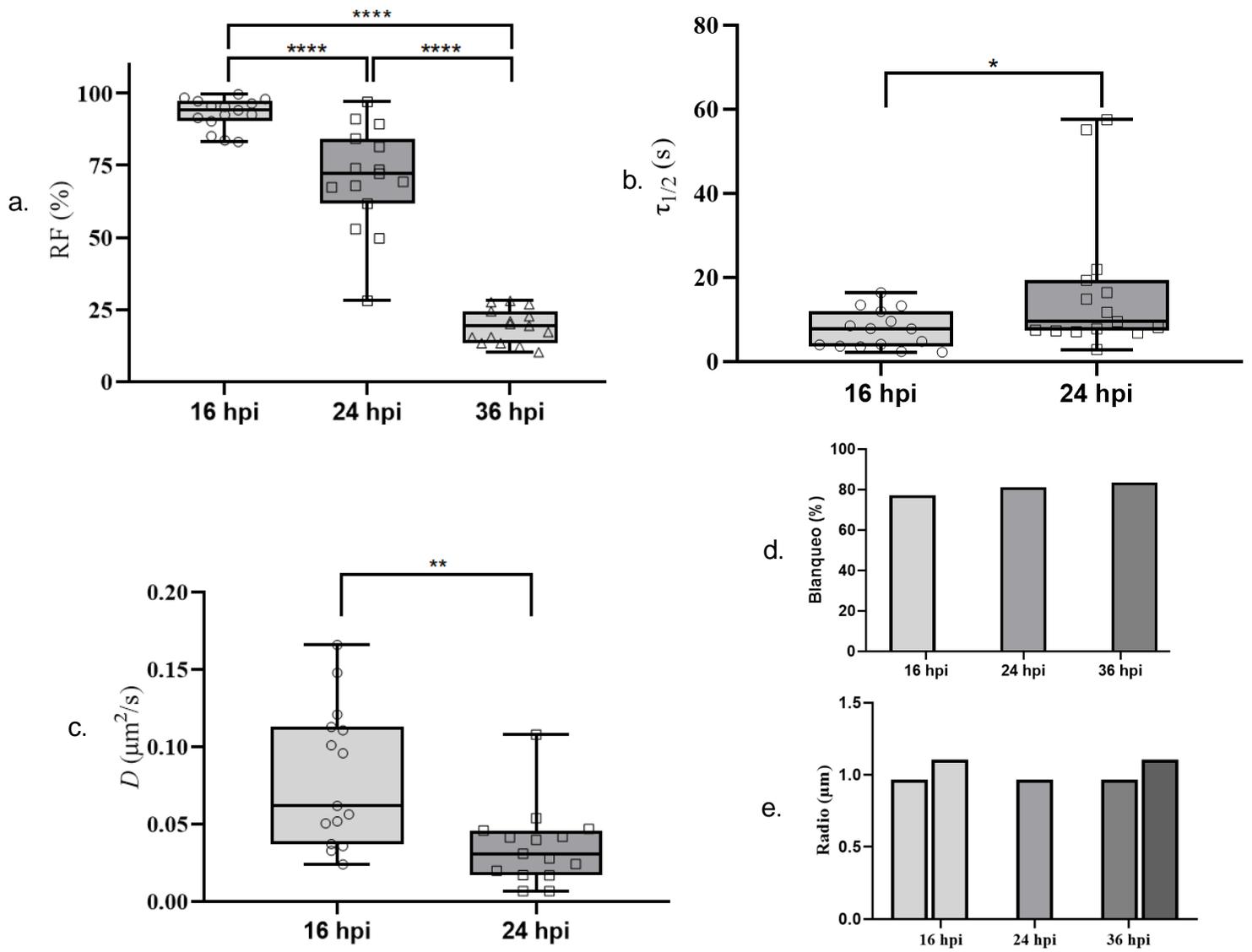


Figura 12. Medición de RF, D y $\tau_{1/2}$. El gráfico **a)** muestra la fracción de recuperación a las 16, 24 y 36 hpi. El gráfico **b)** muestra el tiempo medio de recuperación a las 16 y 24 hpi. El gráfico **c)** muestra el coeficiente de difusión a las 16 y 24 hpi, **d)** los valores de los radios medidos de las ROI de blanqueo y **e)** el promedio del porcentaje de blanqueo realizado en cada tiempo. Los P-values fueron calculados con un t-test. *, $P=0.0470$; **, $P=0.0020$; **, $P=0.0002$; ****, $P<0.0001$.

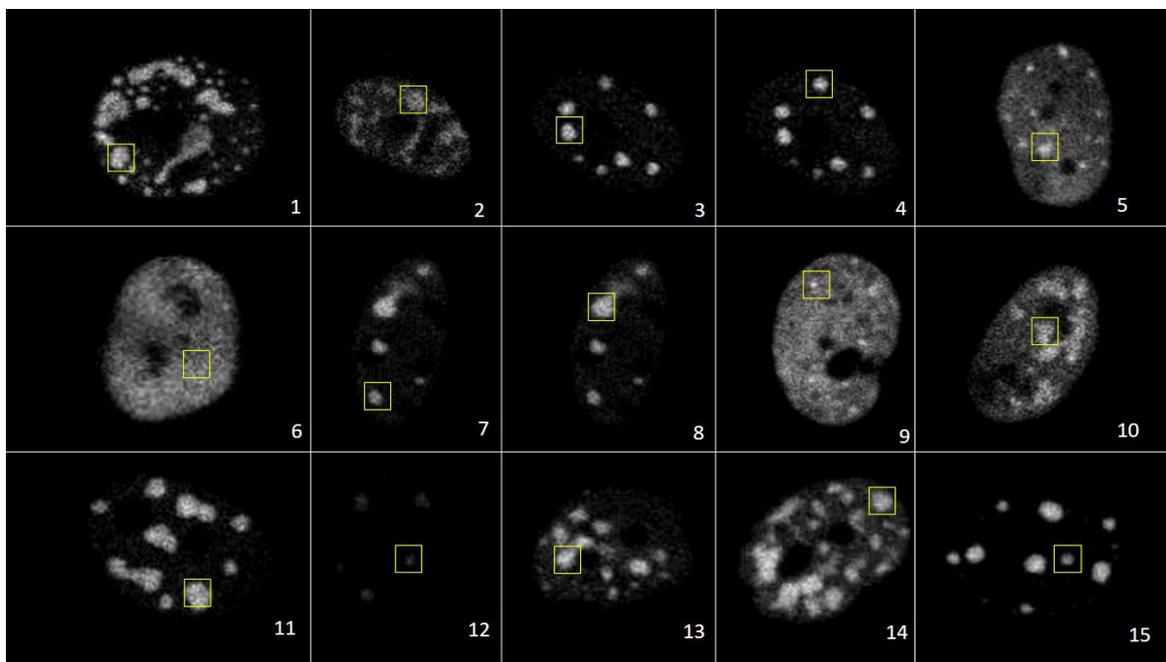


Figura 13. Células seleccionadas para cálculo de parámetros a las 16 hpi. El cuadro amarillo muestra la ROI de blanqueo.

<i>Células 16hpi</i>	<i>RF (%)</i>	$T_{1/2}$ (s)	D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	<i>Radio</i> (μm)	<i>Bleach (%)</i>
1	94.20%	2.38	0.166	0.965	72.4
2	90.30%	4.09	0.096	0.965	68.5
3	99.70%	13.2	0.036	1.104	83.7
4	96.50%	7.77	0.062	1.104	91.6
5	92.50%	16.39	0.0241	0.965	90.6
6	98%	2.23	0.148	1.104	36.3
7	83.70%	3.64	0.121	0.965	80.2
8	83.20%	3.99	0.1107	1.104	78.4
9	95.60%	11.87	0.0372	1.104	78.2
10	98.50%	3.49	0.113	0.965	72.8
11	85.20%	7.83	0.0564	1.104	76.3
12	92.60%	4.76	0.101	1.104	85.7
13	91.50%	13.42	0.0329	1.104	76.2
14	97.30%	8.51	0.0519	1.104	78.3
15	95.40%	9.59	0.0505	0.965	90.2
Promedios	92.95%	7.544	0.0804 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	1.0484 μm	77.29 %

Tabla 5. Parámetros calculados para las células seleccionadas a las 16 hpi. El radio promedio y el blanqueo promedio no fueron utilizados para el cálculo, ya que se usaron los valores indicados para cada célula.

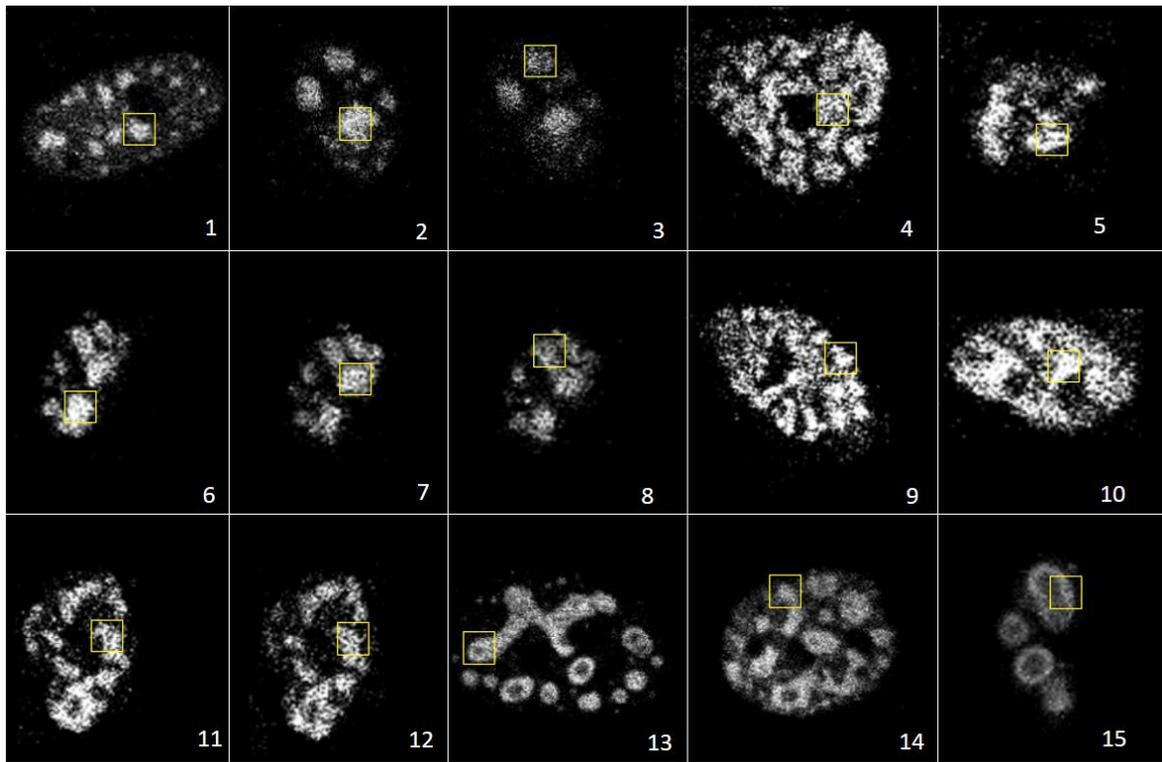


Figura 14. Células seleccionadas para cálculo de parámetros a las 24 hpi. El cuadro amarillo muestra la ROI de blanqueo.

Células 24 hpi	RF (%)	$\tau_{1/2}$ (s)	D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	Radio (μm)	Bleach (%)
1	97%	2.8	0.108	0.965	69.8
2	91.10%	9.47	0.031	0.965	73.8
3	81.40%	14.81	0.02	0.965	73.9
4	73.50%	8.12	0.0415	0.965	77.6
5	49.70%	19.28	0.017	0.965	77.9
6	69.30%	7.77	0.047	0.965	85.3
7	74.00%	7.13	0.042	0.965	74.2
8	68%	7.45	0.04	0.965	72.3
9	61.70%	11.7	0.028	0.965	75.2
10	28.10%	16.37	0.02422	0.965	80.3
11	89.30%	7.3	0.046	0.965	79.3
12	84.30%	6.74	0.054	0.965	89.5
13	52.90%	55.12	0.0067	0.965	96.9
14	72.20%	21.88	0.0169	0.965	95.1
15	67.40%	57.52	0.0067	0.965	96.9
Promedio	71%	16.89 s	0.0352 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	0.965 μm	81.2 %

Tabla 6. Parámetros calculados para las células seleccionadas a las 24 hpi. El radio promedio y el blanqueo promedio no fueron utilizados para el cálculo, ya que se usaron los valores indicados para cada célula.

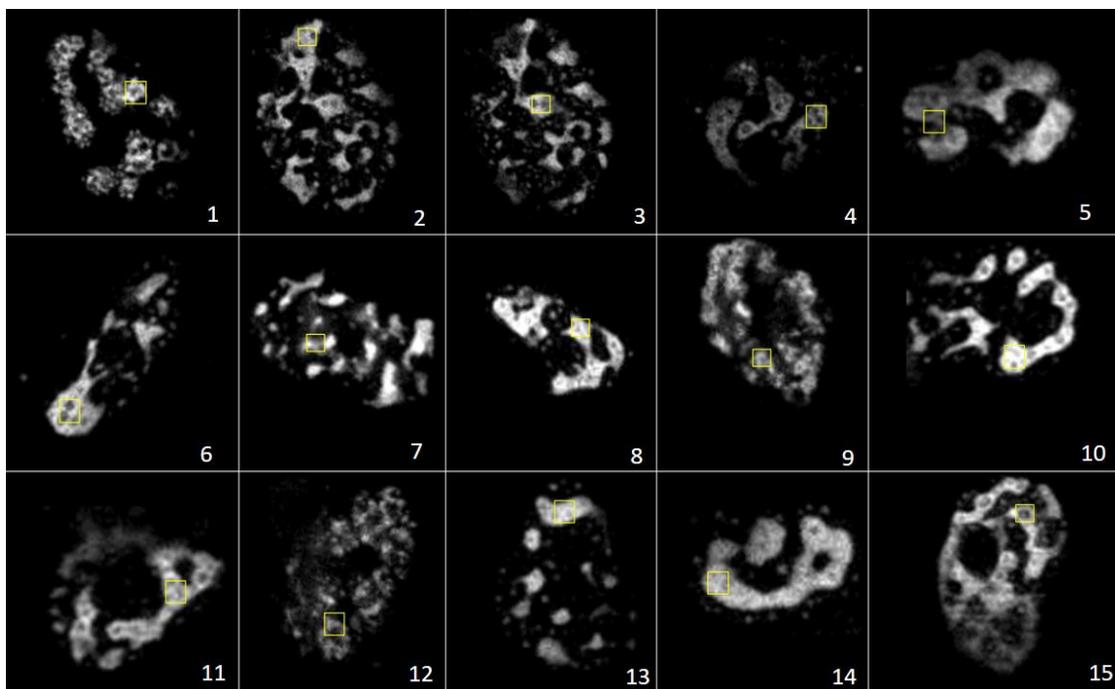


Figura 15. Células seleccionadas para cálculo de parámetros a las 36 hpi. El cuadro amarillo muestra la ROI de blanqueo.

<i>Células 36 hpi</i>	<i>RF (%)</i>	<i>Bleach (%)</i>
1	13.4	75.4
2	24.5	73.7
3	13.4	91.5
4	15.4	86.1
5	20.1	79.6
6	28.1	89.2
7	26.9	87.6
8	15.5	90.9
9	21	83.6
10	10.3	91.5
11	12.2	89.1
12	27.6	82.7
13	19.5	87.9
14	22.8	93.9
15	17.3	85.5
Promedio	19.2%	85.88 %

Tabla 7. Parámetros calculados para las células seleccionadas a las 36 hpi. El blanqueo promedio no fue utilizado para el cálculo, ya que se usaron los valores indicados para cada célula.

Morfología esférica				Morfología compleja			
Célula	RF (%)	$\tau_{1/2}$ (s)	D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	Célula	RF (%)	$\tau_{1/2}$ (s)	D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
1	97%	2.8	0.108	13	52.90%	55.12	0.0067
2	91.10%	9.47	0.031	15	67.40%	57.52	0.0067
3	81.40%	14.81	0.02				
6	69.30%	7.77	0.047				
7	74.00%	7.13	0.042				
8	68%	7.45	0.04				
9	61.70%	11.7	0.028				

Tabla 8. Clasificación de células a las 24 hpi con morfología esférica y compleja.

Todas estas observaciones sugieren que las estructuras de morfología esférica presentan una recuperación mayor y más rápida que las estructuras morfológicamente más complejas en las que no predomina la forma esférica y la recuperación de la fluorescencia es prácticamente nula. Como se describió antes, se han reportado BMCs que inicialmente presentan las características de un líquido y que, eventualmente, se vuelven más rígidas y viscoelásticas lo que resulta en una transición de un estado tipo líquido a un estado tipo sólido en el que ya no hay un intercambio de componentes con el medio circundante, por lo que no hay una recuperación de la fluorescencia después del foto-blanqueo [21,77,78,79]. La aparente transición de líquido a sólido en los DBP-AdRCs podría deberse a que, en tiempos tardíos, la concentración nuclear de proteínas estructurales del virus es suficiente para iniciar el ensamblaje de partículas virales. En estudios del desorden del proteoma de adenovirus humano, las proteínas de la cápside se predicen como las que contienen un menor número de IDRs en su secuencia [53], lo cual podría promover un estado menos dinámico entre los AdRCs y el medio circundante. Este análisis nos permite determinar que los coeficientes de difusión de DBP son similares a los que se han reportado previamente para proteínas que conducen a la LLPS, sugiriendo que la LLPS es el mecanismo mediante el que se forman los AdRCs. Adicionalmente, la disminución de la RF y del D conforme aumenta la complejidad morfológica de los DBP-AdRCs es un comportamiento comparable con estructuras que se forman vía LLPS y envejecen, presentando características físicas

que se asemejan a un sólido, como un hidrogel. Sin embargo, queda por determinar si los DBP-AdRCs tienen las características de un hidrogel mediante otras técnicas, como analizar la sensibilidad al 1,6-hexanodiol; un compuesto capaz de disolver estructuras tipo líquidas, mas no estructuras sólidas [80].

Dentro de la predicción de la red PPI DBP-E1B se encuentran proteínas celulares que podrían estar implicadas tanto en la formación, como en las actividades de los AdRCs.

En los AdRCs se localizan proteínas celulares involucradas en respuesta a daño en DNA, organización de la cromatina, respuesta inmune, regulación de la transcripción y modificaciones post-traduccionales; y proteínas virales de replicación del genoma (entre las que se encuentra DBP) y otras proteínas involucradas en múltiples procesos del ciclo de replicación viral, entre las que se encuentra E1B. E1B es una proteína multifuncional que interacciona con alrededor de 80 proteínas celulares y virales [81]. Las actividades que lleva a cabo a lo largo del ciclo de replicación son reguladas por SUMOilación y fosforilación, las cuales tienen un impacto en su localización e interacción con otras proteínas. Entre las actividades que lleva a cabo en el ciclo de replicación de adenovirus se encuentran: poliubiquitilación de sustratos para su degradación vía proteasoma [50]; procesamiento y exportación de mensajeros virales; y regulación de expresión de genes virales y celulares. Adicionalmente, está reportado que la proteína viral E1B impacta en la composición de los DBP-AdRCs [49] y que, en su ausencia, los DBP-AdRCs presentan un menor diámetro y área en comparación con los DBP-AdRCs del virus WT [76, 92].

Por otro lado, los análisis antes descritos demuestran que DBP tiene las características de una proteína de andamio de LLPS: tiene IDRs y una LCR en su secuencia, y presenta coeficientes de difusión similares a los previamente reportados para otros BMCs. El ensamble de los BMCs es conducido por proteínas de andamio de LLPS, sin embargo, las proteínas reguladoras impactan en el número, tamaño, forma y localización del BMC; y las proteínas cliente definen las

características funcionales del BMC. Por esta razón, es importante comprender qué otros componentes celulares y virales de los AdRCs podrían estar involucrados en su formación comportándose como co-andamios o como proteínas reguladoras. Como se describió antes, E1B impacta en la morfología, composición y formación de los AdRCs. Adicionalmente, otros grupos han reportado (no publicado) que éstas dos proteínas virales co-inmunoprecipitan. Por lo tanto, investigar una relación funcional entre DBP y E1B, así como el impacto de las mismas en la formación y función de los RCs, podría ser importante para determinar las actividades de cada una en los AdRCs que resultan en una replicación eficiente. E1B podría tener un efecto sobre la formación de los RCs promoviendo la LLPS de los RCs por sí sola o a través de su interacción con otras proteínas celulares que interaccionan con DBP para promover la LLPS, y, por lo tanto, el ensamble de los AdRCs. La red de predicción PPI fue construida como se describe en materiales y métodos. Primeramente, se tomaron en cuenta los reportes realizados mediante microscopía donde se observa un sobre lape espacial entre la señal de fluorescencia de dos proteínas (colocalización) y también las reportadas mediante los siguientes métodos experimentales: co-inmunoprecipitación, ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H), purificación por afinidad en tándem seguido de espectrometría de masas (TAP/MS), co-cristalización, ensayos de pulldown con Glutación-S-transferasa (GST-pulldown), inmunoprecipitación seguida de espectrometría de masas (IP/MS), MALDI (ionización por desorción láser asistida por matriz)/ Nano ES MS-MS (seguida de nano-electrospray mass spectrometry), Far Western Blot y transferencia de energía de resonancia Förster (FRET) (**Tabla S2**). Sin embargo, para el siguiente análisis, se eliminaron las colocalizaciones y se tomaron en cuenta las interacciones reportadas por los otros métodos (**Figura 16a**). Posteriormente, utilizando el PSPredictor, se analizó qué proteínas se predice que participan en la formación de BMCs. Las casillas marcadas en rojo, son las proteínas cuya calificación resultante (**Tabla 10**) indica que cumplen con las características de proteínas que participan en la LLPS. En la **Tabla 9**, se muestra el resultado de la predicción de las redes de interacción. Cada celda de la tabla corresponde a cada una de las proteínas encontradas, y cada celda contigua a otra representa una

interacción, siendo cada fila representante de una red de interacción, o bien, de un complejo proteico. En cada celda, está el nombre del gen en mayúsculas; y en cursiva y minúscula está el nombre de la proteína.

Tabla 9. Red de interacción DBP-E1B55K				
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	JUN Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	HDAC1 ¹ Histone Deacetylase 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	JUN Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	MRE11 ² Proteína reparadora de doble hebra	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	EP300 p300 HAT	RAD50 ² DNA repair protein RAD50	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	CBP CREB Binding Protein	TP53 [82] Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	EP300 p300 HAT	TP53 [82] Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	ZNHIT1 Zinc finger HIT domain-containing protein 1	TP53 [82] Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	JUN Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	HNRNPD Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0, AU-rich element RNA-binding protein 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	ZNHIT1 Zinc finger HIT domain-containing protein 1	TP53[82] Cellular tumor antigen p53	WT1 Wilms tumor protein homolog
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	CBP CREB Binding Protein	TP53[82] Cellular tumor antigen p53	WT1 Wilms tumor protein homolog
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	JUN Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	THOC2 THO Complex 2	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	JUN Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	SRSF3 Serine And Arginine Rich Splicing Factor 3	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	JUN Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	KPNA2 Karyopherin Subunit Alpha 2	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	VPS72 Vacuolar protein sorting-associated protein 72 homolog	KPNA1 importin alpha-1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	JUN Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	CUL5 Cullin5	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	JUN Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	ELOB Elongin B, Transcription elongation factor B polypeptide 2	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	JUN Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	PSMC2 The human protein 26S protease regulatory subunit 2	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	JUN Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	USP7 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	JUN Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	TUBB Tubulin Beta Chain	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP	SRCAP	CBP	RUNX1	E1B55K

Adenovirus DNA-binding protein	SNF2-related CBP activator protein	CREB Binding Protein	Runt-related transcription factor 1	Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP SNF2-related CBP activator protein	EP300 p300 HAT	RUNX1 Runt-related transcription factor 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	UBC9 ⁸ <i>SUMO-conjugating enzyme UBC9</i>			E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein

Tabla 9. Predicción de Red de PPI DBP-E1B. Cada columna corresponde a un nivel de interacción, cada celda a una proteína y cada fila a la predicción de una red de PPI DBP-E1B. En rojo se muestran las proteínas cuya predicción indica que están involucradas en LLPS.

Gene name	Score
DBP	0.9456
E1B 55K	0.0485
SRCAP	0.8349
JUN	0.7399
HDAC1	0.8624
MRE11	0.7323
EP300	0.9922
RAD50	0.2978
TP53	0.94
CBP	0.977
ZNHIT1	0.0098
HNRNPD	0.9949
WT1	0.9773
THOC2	0.1681
SRSF3	0.8645
VPS72	0.1724
KPNA2	0.5364
KPNA1	0.0235
CUL5	0.4094
ELOB	0.0209
PSMC2	0.0035
USP7	0.1051
TUBB	0.0145
RUNX1	0.6741
UBC9	0.0125

Tabla 10. Resultados del PSPredictor de las proteínas de la red DBP-E1B. En la primera columna, se nombran las regiones con los nombres de los genes de las

proteínas con las que se realizó la predicción. Los valores superiores a 0.5 indican que sí hay separación de fases líquido-líquido.

Los resultados mostrados en la **Tabla 9** sugieren que dentro de la red DBP-E1B, se encuentran proteínas que podrían estar involucradas en la separación de fases, ya sea como andamio, clientes o reguladores. Cabe resaltar que el algoritmo del PSPredictor fue entrenado con secuencias de proteínas scaffolds, por lo que no es una herramienta que puede usarse para la predicción de clientes y reguladores, y tampoco considera proteínas cuya LLPS es regulada por alguna PTM. Este estudio predictivo nos podría ayudar a definir grupos de proteínas que podrían tener un papel importante en la formación y actividades de los AdRCs.

Por otro lado, no está reportado que DBP y E1B interactúen directamente, sin embargo, ambas son proteínas involucradas en distintos procesos del ciclo de replicación viral, y ambas presentan IDRs que podrían favorecer su interacción con muchas otras proteínas, lo cual podría ser determinante para las actividades descritas de ambas en los AdRCs. Para estudiar la posible relación funcional de estas dos proteínas virales, se crearon categorías correspondientes a actividades que son reguladas en los AdRCs para clasificar a cada una de las proteínas encontradas y a cada categoría se le asignó un número y un color. El método mediante el cual se reportó cada interacción está representado por un triángulo de distinto color en la intersección entre una celda y otra. El color de la celda indica la categoría correspondiente a su actividad mejor caracterizada, así como también lo indica el número que está subrayado en negritas en el superíndice del nombre del gen. Los otros números que aparecen en las celdas corresponden a otras categorías con las que también se ha relacionado a la proteína. Los blancos de ubiquitinación de la E3 ubiquitinina ligasa formada por E1B están indicados por un círculo rojo (**Figura 16**).

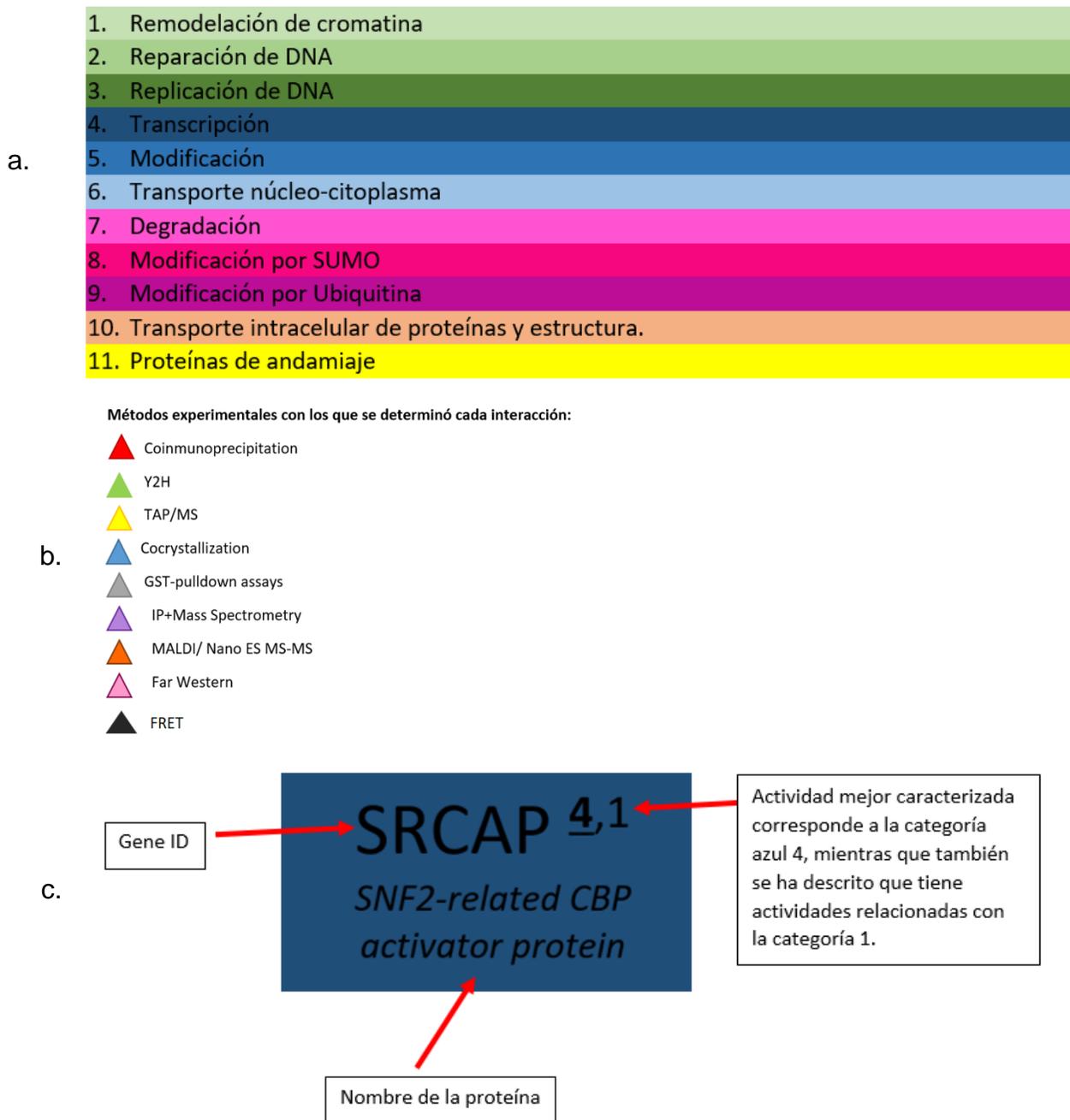


Figura 16. Simbología y categorías utilizadas en representación de predicción de red PPI. En **a)** se muestran las categorías utilizadas para clasificar a cada proteína, así como también su número y color correspondiente. En **b)** se muestra la simbología utilizada para la descripción del método de determinación de la interacción reportada y en **c)** se muestra un ejemplo de la descripción que se hizo para cada proteína.

Tabla 11. Red de interacción DBP-E1B55K					
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	JUN ⁴ Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	HDAC1 ¹ Histone Deacetylase 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	JUN ⁴ Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	MRE11 ² Proteína reparadora de doble hebra	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	EP300 ¹ p300 HAT	RAD50 ² DNA repair protein RAD50	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	CBP ⁴ CREB Binding Protein	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	EP300 ¹ p300 HAT	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	ZNHIT1 ⁴ Zinc finger HIT domain-containing protein 1	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	JUN ⁴ Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	HNRNPD ^{4,5} Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0, AU-rich element RNA-binding protein 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	ZNHIT1 ⁴ Zinc finger HIT domain-containing protein 1	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	WT1 Wilms tumor protein homolog	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	CBP ⁴ CREB Binding Protein	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	WT1 Wilms tumor protein homolog	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	JUN ⁴ Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	THOC2 ⁵ THO Complex 2	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	JUN ⁴ Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	SRSF3 ^{5,6} Serine And Arginine Rich Splicing Factor 3	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	JUN ⁴ Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	KPNA2 ⁶ Karyopherin Subunit Alpha 2	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	VPS72 ⁴ Vacuolar protein sorting-associated protein 72 homolog	KPNA1 ⁶ importin alpha-1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	JUN ⁴ Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	CUL5 ^{7,9} Cullin5	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	JUN ⁴ Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	ELOB ^{7,9,4} Elongin B, Transcription elongation factor B polypeptide 2	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	JUN ⁴ Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	PSMC2 ^{7,5,9} The human protein 26S protease regulatory subunit 2	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	JUN ⁴ Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	USP7 ⁹ Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	JUN ⁴ Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	TUBB ¹⁰ Tubulin Beta Chain	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	CBP ⁴ CREB Binding Protein	RUNX1 ^{11,4} Runt-related transcription factor 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	SRCAP ^{4,1} SNF2-related CBP activator protein	EP300 ¹ p300 HAT	RUNX1 ^{11,4} Runt-related transcription factor 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	
DBP Adenovirus DNA-binding protein	UBC9 ⁸ SUMO-conjugating enzyme UBC9			E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein	

Tabla 11. Predicción de Red de PPI DBP-E1B. Cada columna corresponde a un nivel de interacción, cada celda a una proteína y cada fila a la predicción de una red de PPI DBP-E1B.

Los resultados mostrados en la **Tabla 11** nos podrían ayudar a definir proteínas a evaluar experimentalmente que puedan estar involucradas con las actividades con las que se ha asociado a E1B y a DBP, y con ello, tener una mayor comprensión de sus actividades regulatorias en el ciclo de replicación de adenovirus.

DISCUSIÓN

Como se describió antes, los RCs son centros de reguladores de la interacción virus-hospedero donde se establecen condiciones favorables para que el virus se replique eficientemente, sin embargo, no se conoce cuál es el mecanismo de su biogénesis. Los DBP-AdRCs se han estudiado por microscopía en tiempo real con células vivas infectadas con el virus mCh-DBP, lo cual ha permitido observar la presencia de eventos de fusión que llevan a la formación de estructuras cada vez más complejas conforme progresa el ciclo de replicación viral. Adicionalmente, DBP es una proteína que se expresa en altas concentraciones en células infectadas, posee IDRs en su secuencia y presenta afinidad por ácidos nucleicos, siendo todas éstas evidencias que nos permiten sugerir que DBP promueve la LLPS en los AdRCs.

En este trabajo, el análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de DBP y el análisis de experimentos de FRAP en distintas etapas del ciclo de replicación nos permitió determinar que DBP presenta características de proteínas que conducen a la LLPS.

El análisis bioinformático de la secuencia de DBP muestra que las IDRs presentes en la proteína se conservan en todas las especies de HAdVs de la A a la G, sugiriendo que la conservación podría estar relacionada con la importancia de las IDRs para las actividades de la proteína. Adicionalmente, se utilizaron otras herramientas bioinformáticas para determinar la presencia de una LCR en la secuencia de DBP y, utilizando un predictor basado en proteínas que separan fases líquido-líquido, se determinó que DBP podría separar fases. Estos resultados sugieren que el C-terminal de la proteína no participa en este fenómeno mientras que el extremo N-terminal sí. De ser así, los estudios donde se reporta que los efectos de las mutaciones en el extremo N-terminal (**Tabla S1**) resultan en la

deficiente síntesis de DNA viral y expresión de mensajeros virales podrían deberse a la importancia del N-terminal para la formación de los AdRCs y no necesariamente a un efecto directo sobre la síntesis del DNA y la expresión de genes, ya que en los AdRCs son reguladas estas actividades. Por lo tanto, un defecto en la compartimentalización de los AdRCs podría llevar a un defecto en los procesos que son regulados ahí.

El análisis de los FRAP a las 16, 24 y 36 hpi determinó que DBP presenta valores de coeficientes de difusión reportados para proteínas que forman parte de condensados líquidos [73]; siendo las estructuras con morfología esférica (morfología representativa de tiempos tempranos) las que presentaron la fracción de recuperación más alta, una recuperación después del foto-blanqueo más rápida y coeficientes de difusión con valores mayores que las estructuras más largas y complejas, correspondientes a etapas posteriores al inicio de la síntesis del DNA viral. Las estructuras predominantes en tiempos tardíos, en su mayoría, carecen de morfología esférica y presentan estructuras complejas y alargadas cuya recuperación es prácticamente nula después del foto-blanqueo. Al no presentar recuperación, no fue posible el cálculo de sus coeficientes de difusión. Estos datos sugieren que los AdRCs presentan características de un líquido principalmente en tiempos tempranos que correlacionan con estructuras de morfología esférica y que en tiempos tardíos parecería haber una transición a un gel que se asemeja más a un estado sólido que a un estado líquido, donde hay un menor intercambio entre los componentes de los AdRCs con el medio que los rodea. Este comportamiento es comparable con el envejecimiento reportado para otros BMCs formados por LLPS.

La predicción de las redes PPI DBP-E1B sugieren que hay proteínas celulares que interaccionan tanto con DBP como con E1B que podrían estar implicadas en la formación de los AdRCs vía LLPS y en las actividades que son reguladas en los AdRCs, permitiéndonos definir grupos de proteínas de interés a evaluar experimentalmente.

Según la predicción, a pesar de que E1B tiene IDRs, no tiene las características de proteínas que inducen LLPS, pero sí interacciona con otras proteínas cuya

predicción indica que promueven la separación de fases, como con el supresor tumoral p53. Está reportado que E1B promueve la relocalización de p53 a los AdRCs [83], sin embargo, no se conoce con detalle cuál es la actividad de p53 una vez que es relocalizada a estos sitios. La predicción indica que p53 tiene las características de proteínas que participan en LLPS, lo cual recientemente se reportó en ensayos *in vitro* [82]. En estos estudios, se propone que la LLPS regula negativamente a p53 y que la compartimentalización de ésta suprime su actividad como regulador transcripcional de sus genes blanco, sin embargo, uno de los reguladores negativos de la LLPS de p53 es el DNA [82]. Aunque en estos estudios el DNA es un regulador negativo de la LLPS de p53, esto podría ser distinto en los AdRCs.

Como podemos observar en la **Tabla 11**, la mayoría de las proteínas en la predicción corresponden a la categoría de regulación de la transcripción. Una de las proteínas que resalta en las listas es la proteína asociada con SNF2 activadora de CBP (SRCAP, por sus siglas en inglés), un regulador de cromatina [84], y un regulador transcripcional [85] (categoría 4 y 1). En 1994, Klessig y colaboradores reportaron que DBP forma un complejo de 650 kDa cuya actividad todavía no ha sido elucidada [86], y tampoco se ha identificado la identidad de las otras proteínas asociadas al complejo. Posteriormente, en el 2001, Xu y colaboradores inmunoprecipitaron a SRCAP y reportaron que DBP forma un complejo multiproteico con esta proteína. Adicionalmente, en este mismo estudio se reportaron dos productos virales asociados: uno de 72 kDa, identificado como DBP y otro de 55 kDa, sin embargo, no se estudió su identidad ni su posible participación en el complejo DBP-SRCAP [87]. Si E1B es el producto no identificado, una posibilidad es que DBP, SRCAP y E1B se encuentren formando un complejo en conjunto con otras proteínas celulares o virales, y esto podría ser determinante para alguna de sus actividades en el ciclo de replicación viral, como regulación de la transcripción. Se sabe que E1B regula la transcripción de promotores virales y celulares, sin embargo, el mecanismo mediante el cual lo hace todavía no se ha elucidado. Análisis bioinformáticos realizados en el laboratorio en 2019, predicen que las proteínas RUNX1, p53 y Wt1 tienen secuencias blanco en promotores virales,

sugiriendo que la interacción de E1B con éstas pudiera regular la transcripción de sus genes blanco [88]. Estas tres proteínas aparecen en la predicción de complejos junto con SRCAP. Como ya se discutió, también se ha relacionado a DBP con la regulación de la transcripción, por lo que la posible participación de DBP en complejo con E1B y otras proteínas celulares (entre ellas SRCAP, RUNX1, p53 y Wt1) en la regulación de la transcripción es una posibilidad que todavía queda por explorar.

El primer complejo de la lista podría estar implicado en regulación epigenética ya que asocia a DBP y E1B con las proteínas SRCAP, JUN, HDAC1. E1B es capaz de interaccionar con el complejo mSin3A/HDAC1 y de esta manera, formar un complejo desacetilador [89]. El complejo mSin3A/HDAC es utilizado por diversas proteínas represoras como complejo co-represor; entre estas proteínas se encuentran las N-CoR [90]. Interesantemente, N-CoR1 forma un complejo multiproteico con SRCAP [91], sugiriendo la posibilidad de la formación de un complejo proteico con actividad de desasetilación en las que estén involucradas tanto DBP, como E1B.

La última fila asocia directamente a Ubc9, una enzima conjugadora de SUMO, tanto con DBP, como con E1B [50, 91]. Como se describió antes, tanto E1B como DBP son modificadas por SUMOilación. En experimentos hechos con virus mutantes que tienen sustituciones en los sitios de conjugación con SUMO en DBP, hay una disminución en splicing asociado a AdRCs, así como también en el tamaño y número de AdRCs [50]. En experimentos del laboratorio, se ha observado que en células infectadas con el virus mutante que no expresa a E1B, hay una disminución en bandas correspondientes a formas moleculares más pesadas de DBP (probablemente formas SUMOiladas, aunque esto no se ha confirmado), así como también en el número y tamaño de los AdRCs. Adicionalmente, E1B es una E3 SUMO ligasa para p53 [93], mas no se ha reportado que tenga otros blancos proteicos. Estas evidencias podrían sugerir la posibilidad de que E1B promueva la SUMOilación de DBP y con ello, la eficiente formación de los AdRCs.

Es de importancia resaltar que no queda descartado que DBP interaccione con otras proteínas que no fueron consideradas en este estudio para promover la formación eficiente de los AdRCs.

CONCLUSIONES

- El análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos indica que DBP tiene características propias de proteínas que participan en LLPS.
- Los coeficientes de difusión de DBP son similares a coeficientes de difusión previamente reportados para proteínas que participan en la separación de fases líquido-líquido. Esto sugiere que los AdRCs se forman vía separación de fases líquido-líquido.
- El aumento de complejidad morfológica de los DBP-AdRCs conforme avanza el ciclo de replicación correlaciona con una menor fracción de recuperación de la fluorescencia y con coeficientes de difusión menores. Este es un comportamiento comparable con estructuras que se forman vía LLPS y envejecen conforme aumenta la complejidad estructural.
- La relación funcional que se predijo entre DBP y E1B indicó que hay proteínas celulares que, en complejo con ambas proteínas virales, podrían estar implicadas en la formación eficiente de los AdRCs vía LLPS y en las actividades que son reguladas en estos sitios, como regulación de la replicación y transcripción del genoma viral.

PERSPECTIVAS

- Para confirmar que DBP sea uno de los componentes mínimos necesarios para la formación de los AdRCs, se requiere llevar a cabo experimentos donde se transfecten células con un vector que exprese a DBP fusionado a una proteína fluorescente para, posteriormente, evaluar por microscopía de fluorescencia si los AdRCs continúan formándose únicamente en presencia de DBP.
- Evaluar cuál es el papel del extremo N-terminal de DBP sobre el ensamble de los AdRCs.
- Utilizar un tratamiento con 1,6-hexadiol para confirmar la naturaleza líquida de los AdRCs que presentan morfología esférica y para evaluar su transición de tipo-líquido a tipo-gel cuando aumentan su complejidad estructural.
- Determinar si E1B y DBP pueden interactuar, ya sea directamente o través de un complejo multiproteico en el que participen proteínas celulares, mediante ensayos de inmunoprecipitación, así como también evaluar la presencia de las proteínas encontradas en el estudio predictivo realizado en caso de ser así. Esto podría ser fundamental para comprender todas las actividades con las que se ha asociado a estas dos proteínas a lo largo del ciclo de replicación, entre las que se encuentran la modificación post-traducciona l de proteínas, y la regulación de la replicación y transcripción del genoma viral.
- Determinar si el virus recombinante mCh-DBP se comporta como el silvestre en cuanto a síntesis de DNA y producción de progenie, ya que en este trabajo no se pudo llegar a ningún resultado concluyente. Esto nos permitirá asegurar que la fusión de la proteína fluorescente al extremo N-terminal de DBP no cambia las actividades llevadas a cabo por la proteína y que las conclusiones a las que hemos llegado en ensayos realizados con el virus mCh-DBP son válidas para el virus silvestre.

REFERENCIAS

- [1] A. J. Davison, M. Benko, and B. Harrach, "Genetic content and evolution of adenoviruses," *J. Gen. Virol.*, vol. 84, no. 11, pp. 2895–2908, 2003, doi: 10.1099/vir.0.19497-0.
- [2] C. M. Robinson *et al.*, "Molecular evolution of human adenoviruses," *Sci. Rep.*, vol. 3, pp. 1–7, 2013, doi: 10.1038/srep01812.
- [3] A. Composition and B. Properties, "Adenovirus Composition ," pp. 15–41, 2015.
- [4] N. Dyson, "The regulation of E2F by pRB-family proteins," *Genes Dev.*, vol. 12, no. 15, pp. 2245–2262, 1998, doi: 10.1101/gad.12.15.2245.
- [5] M. D. Challberg and T. J. Kelly, "Adenovirus DNA replication in vitro," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 76, no. 2, pp. 655–659, 1979, doi: 10.1073/pnas.76.2.655.
- [6] M. T. Armentero, M. Horwitz, and N. Mermod, "Targeting of DNA polymerase to the adenovirus origin of DNA replication by interaction with nuclear factor I," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 24, pp. 11537–11541, 1994, doi: 10.1073/pnas.91.24.11537.
- [7] R. N. De Jong, P. C. Van Der Vliet, and A. B. Brenkman, "Adenovirus DNA replication: Protein priming, jumping back and the role of the DNA binding protein DBP," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 272, pp. 187–211, 2003, doi: 10.1007/978-3-662-05597-7_7.
- [8] 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 J.*, vol. 13, no. 13, pp. 2994–3002, 1994, doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06598.x.
- [9] K. E. Gustin and M. J. Imperiale, "Encapsidation of Viral DNA Requires the Adenovirus L1 52/55-Kilodalton Protein," *J. Virol.*, vol. 72, no. 10, pp. 7860–7870, 1998, doi: 10.1128/jvi.72.10.7860-7870.1998.
- [10] W. Zhang and M. J. Imperiale, "Requirement of the Adenovirus IVa2 Protein for Virus Assembly," *J. Virol.*, vol. 77, no. 6, pp. 3586–3594, 2003, doi: 10.1128/jvi.77.6.3586-3594.2003.
- [11] P. Ostapchuk and P. Hearing, "Adenovirus IVa2 Protein Binds ATP," *J. Virol.*, vol. 82, no. 20, pp. 10290–10294, 2008, doi: 10.1128/jvi.00882-08.
- [12] A. A. Hyman, C. A. Weber, and F. Jülicher, "Liquid-liquid phase separation in biology," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 30, pp. 39–58, 2014, doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013325.
- [13] Y. Shin and C. P. Brangwynne, "Liquid phase condensation in cell physiology and disease," *Science (80-.)*, vol. 357, no. 6357, 2017, doi:

10.1126/science.aaf4382.

- [14] 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.
- [15] V. N. Uversky, “Protein intrinsic disorder-based liquid–liquid phase transitions in biological systems: Complex coacervates and membrane-less organelles,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 239, pp. 97–114, 2017, doi: 10.1016/j.cis.2016.05.012.
- [16] E. W. Martin and T. Mittag, “Relationship of Sequence and Phase Separation in Protein Low-Complexity Regions,” *Biochemistry*, vol. 57, no. 17, pp. 2478–2487, 2018, doi: 10.1021/acs.biochem.8b00008.
- [17] 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.
- [18] W. Ning *et al.*, “DrLLPS: A data resource of liquid-liquid phase separation in eukaryotes,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 48, no. D1, pp. D288–D295, 2020, doi: 10.1093/nar/gkz1027.
- [19] J. A. Ditlev, L. B. Case, and M. K. Rosen, “Who’s In and Who’s Out—Compositional Control of Biomolecular Condensates,” *J. Mol. Biol.*, vol. 430, no. 23, pp. 4666–4684, 2018, doi: 10.1016/j.jmb.2018.08.003.
- [20] A. M. Ishov *et al.*, “PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein Daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1,” *J. Cell Biol.*, vol. 147, no. 2, pp. 221–233, 1999, doi: 10.1083/jcb.147.2.221.
- [21] L. Jawerth *et al.*, “Protein condensates as aging Maxwell fluids,” *Science (80-.)*, vol. 370, no. 6522, pp. 1317–1323, 2020, doi: 10.1126/science.aaw4951.
- [22] S. Ray *et al.*, “ α -Synuclein aggregation nucleates through liquid–liquid phase separation,” *Nat. Chem.*, vol. 12, no. 8, pp. 705–716, 2020, doi: 10.1038/s41557-020-0465-9.
- [23] F. Geiger *et al.*, “Rotavirus Replication Factories Are Complex Ribonucleoprotein Condensates,” pp. 1–34, 2020.
- [24] A. Patel *et al.*, “A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation,” *Cell*, vol. 162, no. 5, pp. 1066–1077, 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.07.047.
- [25] J. Wang *et al.*, “A Molecular Grammar Governing the Driving Forces for Phase Separation of Prion-like RNA Binding Proteins,” *Cell*, vol. 174, no. 3, pp. 688–699.e16, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.06.006.
- [26] D. T. Murray *et al.*, “Structure of FUS Protein Fibrils and Its Relevance to Self-Assembly and Phase Separation of Low-Complexity Domains,” *Cell*, vol.

- 171, no. 3, pp. 615-627.e16, 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.08.048.
- [27] D. L. J. Lafontaine, J. A. Riback, R. Bascetin, and C. P. Brangwynne, "The nucleolus as a multiphase liquid condensate," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2020, doi: 10.1038/s41580-020-0272-6.
- [28] J. W. Raff, "Phase Separation and the Centrosome: A Fait Accompli?," *Trends Cell Biol.*, vol. 29, no. 8, pp. 612–622, 2019, doi: 10.1016/j.tcb.2019.04.001.
- [29] H. Antonicka and E. A. Shoubridge, "Mitochondrial RNA Granules Are Centers for Posttranscriptional RNA Processing and Ribosome Biogenesis," *Cell Rep.*, vol. 10, no. 6, pp. 920–932, 2015, doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.030.
- [30] S. F. Banani *et al.*, "Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies," *Cell*, vol. 166, no. 3, pp. 651–663, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.06.010.
- [31] F. Wippich, B. Bodenmiller, M. G. Trajkovska, S. Wanka, R. Aebersold, and L. Pelkmans, "Dual specificity kinase DYRK3 couples stress granule condensation/ dissolution to mTORC1 signaling," *Cell*, vol. 152, no. 4, pp. 791–805, 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.01.033.
- [32] S. V. Razin and A. A. Gavrillov, "The Role of Liquid–Liquid Phase Separation in the Compartmentalization of Cell Nucleus and Spatial Genome Organization," *Biochem.*, vol. 85, no. 6, pp. 643–650, 2020, doi: 10.1134/S0006297920060012.
- [33] C. J. Decker, D. Teixeira, and R. Parker, "Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Cell Biol.*, vol. 179, no. 3, pp. 437–449, 2007, doi: 10.1083/jcb.200704147.
- [34] M. Charman and M. D. Weitzman, "Replication compartments of DNA viruses in the nucleus: Location, location, location," *Viruses*, vol. 12, no. 2, pp. 1–20, 2020, doi: 10.3390/v12020151.
- [35] Y. Zhang, X. Cao, and D. Li, "Architecture of viral replication factories," *Oncotarget*, vol. 6, no. 31, pp. 30439–30440, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.5900.
- [36] A. Shulla and G. Randall, "(+) RNA virus replication compartments: A safe home for (most) viral replication," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 32, pp. 82–88, 2016, doi: 10.1016/j.mib.2016.05.003.
- [37] B. S. Heinrich, Z. Maliga, D. A. Stein, A. A. Hyman, and S. P. J. Whelan, "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] J. Nikolic *et al.*, "Negri bodies are viral factories with properties of liquid

organelles,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00102-9.

- [39] M. Alenquer, S. Vale-Costa, T. A. Etibor, F. Ferreira, A. L. Sousa, and M. J. Amorim, “Influenza A virus ribonucleoproteins form liquid organelles at endoplasmic reticulum exit sites,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–19, 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09549-4.
- [40] P. Hidalgo and R. A. Gonzalez, “Formation of adenovirus DNA replication compartments,” *FEBS Lett.*, vol. 593, no. 24, pp. 3518–3530, 2019, doi: 10.1002/1873-3468.13672.
- [41] C. Caravokyri and K. N. Leppard, “Human adenovirus type 5 variants with sequence alterations flanking the E2A gene: Effects on E2 expression and DNA replication,” *Virus Genes*, vol. 12, no. 1, pp. 65–75, 1996, doi: 10.1007/BF00370002.
- [42] J. Dekker *et al.*, “Multimerization of the adenovirus DNA-binding protein is the driving force for ATP-independent DNA unwinding during strand displacement synthesis,” *EMBO J.*, vol. 16, no. 6, pp. 1455–1463, 1997, doi: 10.1093/emboj/16.6.1455.
- [43] B. Van Breukelen, P. N. Kanellopoulos, P. A. Tucker, and P. C. Van Der Vliet, “The formation of a flexible DNA-binding protein chain is required for efficient DNA unwinding and adenovirus DNA chain elongation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 52, pp. 40897–40903, 2000, doi: 10.1074/jbc.M005745200.
- [44] M. H. Stuiver, W. G. Bergsma, A. C. Arnberg, H. van Amerongen, R. van Grondelle, and P. C. van der Vliet, “Structural alterations of double-stranded DNA in complex with the Adenovirus DNA-binding protein,” *J. Mol. Biol.*, vol. 225, no. 4, pp. 999–1011, 1992, doi: 10.1016/0022-2836(92)90100-x.
- [45] D. E. Brough, G. Droguett, M. S. Horwitz, and D. F. Klessig, “Multiple functions of the adenovirus dna-binding protein are required for efficient viral dna synthesis,” *Virology*, vol. 196, no. 1, pp. 269–281, 1993, doi: 10.1006/viro.1993.1475.
- [46] L. S. Chang and T. Shenk, “The adenovirus DNA-binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters,” *J. Virol.*, vol. 64, no. 5, pp. 2103–2109, 1990, doi: 10.1128/jvi.64.5.2103-2109.1990.
- [47] M. Rossini, “The role of adenovirus early region 1A in the regulation of early regions 2A and 1B expression,” *Virology*, vol. 131, no. 1, pp. 49–58, 1983, doi: 10.1016/0042-6822(83)90532-9.
- [48] A. Babich and J. R. Nevins, “The stability of early adenovirus mRNA is controlled by the viral 72 kd DNA-binding protein,” *Cell*, vol. 26, no. 3 PART 1, pp. 371–379, 1981, doi: 10.1016/0092-8674(81)90206-3.
- [49] D. F. Klessig and T. Grodzicker, “Mutations that allow human Ad2 and Ad5 to

express late genes in monkey cells map in the viral gene encoding the 72K DNA binding protein," *Cell*, vol. 17, no. 4, pp. 957–966, 1979, doi: 10.1016/0092-8674(79)90335-0.

- [50] M. Stubbe *et al.*, "Viral DNA binding protein SUMOylation promotes PML nuclear body localization next to viral replication centers," *MBio*, vol. 11, no. 2, pp. 1–21, 2020, doi: 10.1128/mBio.00049-20.
- [51] N. Morin, C. Delsert, and D. F. Klessig, "Mutations that affect phosphorylation of the adenovirus DNA-binding protein alter its ability to enhance its own synthesis.," *J. Virol.*, vol. 63, no. 12, pp. 5228–5237, 1989, doi: 10.1128/jvi.63.12.5228-5237.1989.
- [52] D. Tsernoglou, A. Tsugita, A. D. Tucker, and P. C. van der Vliet, "Characterization of the chymotryptic core of the adenovirus DNA-binding protein," *FEBS Lett.*, vol. 188, no. 2, pp. 248–252, 1985, doi: 10.1016/0014-5793(85)80381-1.
- [53] R. F. C. MENA, "Análisis del Desorden Estructural en el Proteoma de Adenovirus Humano", 2019.
- [54] P. A. Eagle and D. F. Klessig, "A zinc-binding motif located between amino acids 273 and 286 in the adenovirus DNA-binding protein is necessary for ssDNA binding," *Virology*, vol. 187, no. 2, pp. 777–787, 1992, doi: 10.1016/0042-6822(92)90479-9.
- [55] H. Ariga, H. Klein, A. J. Levine, and M. S. Horwitz, "A cleavage product of the adenovirus DNA binding protein is active in DNA replication in vitro," *Virology*, vol. 101, no. 1, pp. 307–310, 1980, doi: 10.1016/0042-6822(80)90510-3.
- [56] G. R. Kitchingman, "Sequence of the DNA-Binding Protein of a Human Subgroup E Adenovirus (Type 4): Comparisons with Subgroup A (Type 12), Subgroup B (Type 7), and Subgroup C (Type 5)," vol. 101, pp. 90–101, 1985.
- [57] Y. Garcés *et al.*, "Automatic detection and measurement of viral replication compartments by ellipse adjustment," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. November, pp. 1–14, 2016, doi: 10.1038/srep36505.
- [58] F. Sievers and D. G. Higgins, "Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences," *Protein Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 135–145, 2018, doi: 10.1002/pro.3290.
- [59] A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin, M. Clamp, and G. J. Barton, "Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench," *Bioinformatics*, vol. 25, no. 9, pp. 1189–1191, 2009, doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- [60] P. Romero, Z. Obradovic, X. Li, E. C. Garner, C. J. Brown, and A. K. Dunker, "Sequence complexity of disordered protein - Romero - 2000 - Proteins:

Structure, Function, and Bioinformatics - Wiley Online Library,” vol. 48, no. December 1999, pp. 38–48, 2001, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11093259?dopt=AbstractPlus&holding=f1000,f1000m,isrcn%0Apapers3://publication/uuid/A6D984C3-E8B6-49C6-92CC-6ABFA909BD5A>.

- [61] B. Xue, *Pondr*, vol. 1804, no. 4. 2011.
- [62] Z. Dosztányi, V. Csizmok, P. Tompa, and I. Simon, “IUPred: Web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content,” *Bioinformatics*, vol. 21, no. 16, pp. 3433–3434, 2005, doi: 10.1093/bioinformatics/bti541.
- [63] T. Sun, Q. Li, Y. Xu, Z. Zhang, L. Lai, and J. Pei, “Prediction of liquid-liquid phase separation proteins using machine learning,” *bioRxiv*, 2019, doi: 10.1101/842336.
- [64] L. S. V. Thomas and J. Gehrig, “Multi-Template Matching: A versatile tool for object-localization in microscopy images,” *bioRxiv*, vol. 7, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1101/619338.
- [65] J. Yguerabide, J. A. Schmidt, and E. E. Yguerabide, “Lateral mobility in membranes as detected by fluorescence recovery after photobleaching,” *Biophys. J.*, vol. 40, no. 1, pp. 69–75, 1982, doi: 10.1016/S0006-3495(82)84459-7.
- [66] A. Chatr-aryamontri *et al.*, “MINT: The Molecular INTERaction database,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. SUPPL. 1, pp. 2006–2008, 2007, doi: 10.1093/nar/gkl950.
- [67] R. Oughtred *et al.*, “The BioGRID interaction database: 2019 update,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. D1, pp. D529–D541, 2019, doi: 10.1093/nar/gky1079.
- [68] C. von Mering, M. Huynen, D. Jaeggi, S. Schmidt, P. Bork, and B. Snel, “STRING: A database of predicted functional associations between proteins,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 1, pp. 258–261, 2003, doi: 10.1093/nar/gkg034.
- [69] P. N. Kanellopoulos, D. Tsernoglou, P. C. Van Der Vliet, and P. A. Tucker, “Conformational change of the adenovirus DNA-binding protein induced by soaking crystals with K3UO2F5 solutions,” *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 52, no. 5, pp. 942–945, 1996, doi: 10.1107/S09074444996005525.
- [70] M. P. Hughes *et al.*, “Atomic structures of low-complexity protein segments reveal kinked β sheets that assemble networks,” *Science (80-.)*, vol. 359, no. 6376, pp. 698–701, 2018, doi: 10.1126/science.aan6398.
- [71] A. N. Cauthen and K. R. Spindler, “Sequence of the mouse adenovirus type-1 DNA encoding the 100-kDa, 33-kDa and DNA-binding proteins,” *Gene*, vol.

- 168, no. 2, pp. 183–187, 1996, doi: 10.1016/0378-1119(95)00715-6.
- [72] X. Zhang *et al.*, “The proline-rich domain promotes Tau liquid-liquid phase separation in cells,” *J. Cell Biol.*, vol. 219, no. 11, pp. 1–30, 2020, doi: 10.1083/JCB.202006054.
- [73] N. O. Taylor, M. T. Wei, H. A. Stone, and C. P. Brangwynne, “Quantifying Dynamics in Phase-Separated Condensates Using Fluorescence Recovery after Photobleaching,” *Biophys. J.*, vol. 117, no. 7, pp. 1285–1300, 2019, doi: 10.1016/j.bpj.2019.08.030.
- [74] R. Jones, “基因的改变NIH Public Access,” *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2014, doi: 10.1111/tra.12008.Simplified.
- [75] K. Miura, “Analysis of FRAP Curves,” *Embl*, no. IgorPro 6, pp. 1–35, 2005, [Online]. Available: <http://www.embl.de/eamnet/frap/FRAP6.html>.
- [76] M. Kang, C. A. Day, A. K. Kenworthy, and E. DiBenedetto, “Simplified equation to extract diffusion coefficients from confocal FRAP data,” *Traffic*, vol. 13, no. 12, pp. 1589–1600, 2012, doi: 10.1111/tra.12008.
- [77] A. Molliex *et al.*, “Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization,” *Cell*, vol. 163, no. 1, pp. 123–133, 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.09.015.
- [78] T. Murakami *et al.*, “ALS/FTD Mutation-Induced Phase Transition of FUS Liquid Droplets and Reversible Hydrogels into Irreversible Hydrogels Impairs RNP Granule Function,” *Neuron*, vol. 88, no. 4, pp. 678–690, 2015, doi: 10.1016/j.neuron.2015.10.030.
- [79] S. Wegmann *et al.*, “Tau protein liquid–liquid phase separation can initiate tau aggregation,” *EMBO J.*, vol. 37, no. 7, pp. 1–21, 2018, doi: 10.15252/embj.201798049.
- [80] S. Kroschwald, S. Maharana, and A. Simon, “Hexanediol: a chemical probe to investigate the material properties of membrane-less compartments,” *Matters*, pp. 1–7, 2017, doi: 10.19185/matters.201702000010.
- [81] P. Hidalgo, W. H. Ip, T. Dobner, and R. A. Gonzalez, “The biology of the adenovirus E1B 55K protein,” *FEBS Lett.*, vol. 593, no. 24, pp. 3504–3517, 2019, doi: 10.1002/1873-3468.13694.
- [82] K. Kamagata *et al.*, “Liquid-like droplet formation by tumor suppressor p53 induced by multivalent electrostatic interactions between two disordered domains,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-57521-w.
- [83] F. M. Cardoso, S. E. M. Kato, W. Huang, S. J. Flint, and R. A. Gonzalez, “An early function of the adenoviral E1B 55 kDa protein is required for the nuclear relocalization of the cellular p53 protein in adenovirus-infected normal human cells,” *Virology*, vol. 378, no. 2, pp. 339–346, 2008, doi:

10.1016/j.virol.2008.06.016.

- [84] M. M. Wong, L. K. Cox, and J. C. Chrivia, "The chromatin remodeling protein, SRCAP, is critical for deposition of the histone variant H2A.Z at promoters," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 36, pp. 26132–26139, 2007, doi: 10.1074/jbc.M703418200.
- [85] M. A. Monroy, D. D. Ruhl, X. Xu, D. K. Granner, P. Yaciuk, and J. C. Chrivia, "Regulation of cAMP-responsive Element-binding Protein-mediated Transcription by the SNF2 / SWI-related Protein , SRCAP *," vol. 276, no. 44, pp. 40721–40726, 2001, doi: 10.1074/jbc.103615200.
- [86] J. W. Ricigliano, D. E. Brough, and D. F. Klessig, "Identification of a High-Molecular-Weight Cellular Protein Complex Containing the Adenovirus DNA Binding Protein," *Virology*, vol. 202, no. 2, pp. 715–723, 1994, doi: 10.1006/viro.1994.1393.
- [87] X. Xu *et al.*, "Adenovirus DNA Binding Protein Interacts with the SNF2-Related CBP Activator Protein (SrCap) and Inhibits SrCap-Mediated Transcription," *J. Virol.*, vol. 75, no. 21, pp. 10033–10040, 2001, doi: 10.1128/jvi.75.21.10033-10040.2001.
- [88] E. M. Nájera, "Determinación de la unión de la oncoproteína E1B-55KDa a promotores virales de adenovirus tipo 5."
- [89] T. Punga and G. Akusjärvi, "The adenovirus-2 E1B-55K protein interacts with a mSin3A/histone deacetylase 1 complex," *FEBS Lett.*, vol. 476, no. 3, pp. 248–252, 2000, doi: 10.1016/S0014-5793(00)01739-7.
- [90] P. S. Knoepfler and R. N. Eisenman, "Sin meets NuRD and other tails of repression," *Cell*, vol. 99, no. 5, pp. 447–450, 1999, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81531-7.
- [91] C. Underhill, M. S. Qutob, S. P. Yee, and J. Torchia, "A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 51, pp. 40463–40470, 2000, doi: 10.1074/jbc.M007864200.
- [92] P. Wimmer *et al.*, "Cross-talk between phosphorylation and SUMOylation regulates transforming activities of an adenoviral oncoprotein," *Oncogene*, vol. 32, no. 13, pp. 1626–1637, 2013, doi: 10.1038/onc.2012.187.
- [93] M. A. Pennella, Y. Liu, J. L. Woo, C. A. Kim, and A. J. Berk, "Adenovirus E1B 55-Kilodalton Protein Is a p53-SUMO1 E3 Ligase That Represses p53 and Stimulates Its Nuclear Export through Interactions with Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies," *J. Virol.*, vol. 84, no. 23, pp. 12210–12225, 2010, doi: 10.1128/jvi.01442-10.
- [94] H. L. Vos *et al.*, "Characterization of adenovirus type 5 insertion and deletion mutants encoding altered DNA binding proteins," *Virology*, vol. 172, no. 2, pp. 634–642, 1989, doi: 10.1016/0042-6822(89)90206-7.

ANEXOS

MUTANTE	OBSERVACIONES	REFERENCIA
H5dl808 (Delección en los aminoácidos 39-81)	Fenotípicamente WT.	Vos et al., 1989.[94]
H5in800 (Inserción de 4 aminoácidos entre los aminoácidos 2 y 3)	Defectos en producción en progenie y acumulación de DNA viral (5 a 10 veces). La progresión de DBP dispersa en el núcleo a la formación de estructuras esféricas y más complejas se retrasa.	Vos et al., 1989. [94] Brough et al., 1993. [45]
H5dl807 variante (Delección de los aminoácidos 2-40)	No viable.	Vos et al., 1989. [94]
H5dl807 (Delección en los aminoácidos 26-50)	Menor producción de progenie, acumulación de DNA viral y síntesis de proteínas virales tardías (5 a 10 veces).	Vos et al., 1989. [94]
H5dl810 (Delección en los aminoácidos 32-40)	Defectos en producción de progenie y acumulación de DNA viral.	Brough y Klessig, no publicado.

Tabla Suplementaria 1. Mutaciones reportadas en el dominio N-terminal de DBP.

Tabla S2. Red de interacción DBP-E1B55K

DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	UBC9 ⁸ <i>SUMO-conjugating enzyme UBC9</i>			E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	JUN ⁴ <i>Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>	THOC2 ⁵ <i>THO Complex 2</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	JUN ⁴ <i>Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>	KPNA2 ⁶ <i>Karyopherin Subunit Alpha 2</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	JUN ⁴ <i>Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>	CUL5 ^{7,9} <i>Cullin5</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	JUN ⁴ <i>Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>	USP7 ⁹ <i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	JUN ⁴ <i>Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>	ELOB ^{7,9,4} <i>Elongin B, Transcription elongation factor B polypeptide 2</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	JUN ⁴ <i>Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>	HNRNPD ^{4,5} <i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0, AU-rich element RNA-binding protein 1</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	JUN ⁴ <i>Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>	HDAC1 ¹ <i>Histone Deacetylase 1</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	JUN ⁴ <i>Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>	SRSF3 ^{5,6} <i>Serine And Arginine Rich Splicing Factor 3</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	JUN ⁴ <i>Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>	MRE11 ² <i>Proteína reparadora de doble hebra</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	JUN ⁴ <i>Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>	PSMC2 ^{7,5,9} <i>The human protein 26S protease regulatory subunit 2</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	JUN ⁴ <i>Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>	TUBB ¹⁰ <i>Tubulin Beta Chain</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	EP300 ¹ <i>p300 HAT</i>	RAD50 ² <i>DNA repair protein RAD50</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	EP300 ¹ <i>p300 HAT</i>	TP53 ^{4,1,9} <i>Cellular tumor antigen p53</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	EP300 ¹ <i>p300 HAT</i>	RUNX1 ⁴ <i>Runt-related transcription factor 1</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	ZNHIT1 ⁴ <i>Zinc finger HIT domain-containing protein 1</i>	TP53 ^{4,1,9} <i>Cellular tumor antigen p53</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	VPS72 ⁴ <i>Vacuolar protein sorting-associated protein 72 homolog</i>	KPNA1 ⁶ <i>importin alpha-1</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	CBP ⁴ <i>CREB Binding Protein</i>	TP53 ^{4,1,9} <i>Cellular tumor antigen p53</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	SRCAP ^{4,1} <i>SNF2-related CBP activator protein</i>	CBP ⁴ <i>CREB Binding Protein</i>	RUNX1 ⁴ <i>Runt-related transcription factor 1</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	TOPB1 ^{3,2} <i>Proteína 1 de unión a ADN topoisomerasa 2</i>	PTBP3 ⁵ <i>Poly pyrimidine tract-binding protein 3</i>	THOC2 ⁵ <i>THO Complex 2</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	TOPB1 ^{3,2} <i>Proteína 1 de unión a ADN topoisomerasa 2</i>	PTBP3 ⁵ <i>Poly pyrimidine tract-binding protein 3</i>	TUBB ¹⁰ <i>Tubulin Beta Chain</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>
DBP <i>Adenovirus DNA-binding protein</i>	TOPB1 ^{3,2} <i>Proteína 1 de unión a ADN topoisomerasa 2</i>	PTBP3 ⁵ <i>Poly pyrimidine tract-binding protein 3</i>	TP53 ^{4,1,9} <i>Cellular tumor antigen p53</i>	E1B55K <i>Adenovirus E1B 55 kDa protein</i>

DBP Adenovirus DNA-binding protein	TOPB1 ^{3,2} Proteína 1 de unión a ADN topoisomerasa 2	UBC ^{9,7} Polyubiquitin-C	NEDD8 ⁹ NEDD8 Ubiquitin Like Modifier	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	TOPB1 ^{3,2} Proteína 1 de unión a ADN topoisomerasa 2	UBC ^{9,7} Polyubiquitin-C	PSMD4 ⁷ Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 4	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	TOPB1 ^{3,2} Proteína 1 de unión a ADN topoisomerasa 2	UBC ^{9,7} Polyubiquitin-C	SQSTM1 Sequestosome-1, also known as the ubiquitin-binding protein p62	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	TOPB1 ^{3,2} Proteína 1 de unión a ADN topoisomerasa 2	UBC ^{9,7} Polyubiquitin-C	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	TOPB1 ^{3,2} Proteína 1 de unión a ADN topoisomerasa 2	UBC ^{9,7} Polyubiquitin-C	USP15 ⁹ Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	TOPB1 ^{3,2} Proteína 1 de unión a ADN topoisomerasa 2	UBC ^{9,7} Polyubiquitin-C	DAXX ^{4,8} Death-associated protein 6	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	TOPB1 ^{3,2} Proteína 1 de unión a ADN topoisomerasa 2	PIAS2 ⁸ E3 SUMO-protein transferase PIAS2	NEDD8 ⁹ NEDD8 Ubiquitin Like Modifier	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATRIP ² ATR-interacting protein	CHEK1 ^{2,1} Checkpoint kinase 1	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATRIP ² ATR-interacting protein	IKBKG ⁴ NF-kappa-B essential modulator	SQSTM1 ⁹ Sequestosome-1, also known as the ubiquitin-binding protein p62	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	CDC5L ^{4,2} Cell Division Cycle 5 Like	NUDC ¹⁰ Nuclear migration protein nudC	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	CDC5L ^{4,2} Cell Division Cycle 5 Like	NUMA1 ¹⁰ Nuclear mitotic apparatus protein 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	CDC5L ^{4,2} Cell Division Cycle 5 Like	SIN3A ^{4,1} Histone deacetylase complex subunit Sin3a	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	CDC5L ^{4,2} Cell Division Cycle 5 Like	ZNF638 ^{4,5} Zinc Finger Protein 638	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	CDC5L ^{4,2} Cell Division Cycle 5 Like	HDAC1 ¹ Histone Deacetylase 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	CDC5L ^{4,2} Cell Division Cycle 5 Like	PSMC6 ^{7,5,9} 26S proteasome regulatory subunit 10B	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	CDC5L ^{4,2} Cell Division Cycle 5 Like	AP2A1 ¹⁰ AP-2 complex subunit alpha-1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	CDC5L ^{4,2} Cell Division Cycle 5 Like	MRE11 ² Double-strand break repair protein MRE11	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	CDC5L ^{4,2} Cell Division Cycle 5 Like	PSMC4 ^{7,5,9} 26S proteasome regulatory subunit 6B	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	CDC5L ^{4,2} Cell Division Cycle 5 Like	PSMC2 ^{7,5,9} 26S proteasome regulatory subunit 7	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	BLM ^{3,2,7} Bloom syndrome protein	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	ATRX ^{4,1} Transcriptional regulator ATRX	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein

Adenovirus DNA-binding protein	Serine/threonine protein kinase			Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	NUDC ¹⁰ Nuclear migration protein nudC	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	NUMA1 ¹⁰ Nuclear mitotic apparatus protein 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	RAD50 ² DNA repair protein RAD50	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	THOC2 ⁵ THO Complex 2	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	ZNF638 ^{4,5} Zinc Finger Protein 638	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	HNRNPD ^{4,5} Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0, AU-rich element RNA-binding protein 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	HDAC1 ¹ Histone Deacetylase 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	SQSTM1 ⁹ Sequestosome-1, also known as the ubiquitin-binding protein p62	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	SRSF3 ^{5,6} Serine And Arginine Rich Splicing Factor 3	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	PSMC6 ^{5,9} 26S proteasome regulatory subunit 10B	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	KPNA1 ⁶ importin alpha-1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	MRE11 ² Double-strand break repair protein MRE11	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	PSMC4 ^{7,5,9} 26S proteasome regulatory subunit 6B	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	PSMC2 ^{7,5,9} 26S proteasome regulatory subunit 7	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	SNRNPB ⁵ Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide B2	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	TUBB ¹⁰ Tubulin Beta Chain	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	SMC2 ¹⁰ Structural maintenance of chromosomes protein 2	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATR ² Serine/threonine protein kinase	SNW1 ^{5,4} SNW domain-containing protein 1	HNRNPR ⁵ Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein R	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2		TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2		BLM ^{3,2,7} Bloom syndrome protein	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein

DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	FOXA3 ⁴ Hepatocyte nuclear factor 3-gamma	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	FOXB1 ⁴ Forkhead box protein B1	KPNA1 ⁶ importin alpha-1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	FOXB1 ⁴ Forkhead box protein B1	LIG4 ³ DNA ligase 4	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	FOXB1 ⁴ Forkhead box protein B1	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	FOXB1 ⁴ Forkhead box protein B1	SMC2 ¹⁰ Structural maintenance of chromosomes protein 2	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	FOXN1 ⁴ Forkhead box protein N1	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	FOXP1 ⁴ Forkhead box protein P1	BLM ^{3,2,7} Bloom syndrome protein	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	FOXP1 ⁴ Forkhead box protein P1	MRE11 ³ Double-strand break repair protein MRE11	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	FOXP1 ⁴ Forkhead box protein P1	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	MAX ⁴ Protein max. Transcription regulator	SIN3A ^{4,1} Histone deacetylase complex subunit Sin3a	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	RIF1 ² Telomere-associated protein RIF1	BLM ^{3,2,7} Bloom syndrome protein	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	RNF146 ^{7,9} E3 Ubiquitin-protein ligase RNF146	RAD50 ³ DNA repair protein RAD50	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	RPA1 ^{2,3} Replication protein A1	BLM ^{3,2,7} Bloom syndrome protein	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	SMARCAL1 SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	RMI-1 RecQ-mediated genome instability protein 1	BLM ^{3,2,7} Bloom syndrome protein	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	RPA3 ^{2,3} Replication protein A3	BLM ^{3,2,7} Bloom syndrome protein	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	HDAC1 ¹ Histone Deacetylase 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	SIN3A ^{4,1} Histone deacetylase complex subunit Sin3a	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	NEDD8 ⁹	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	HDAC1 ¹ Histone Deacetylase 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP	RPA2 ^{2,3}	TP53 ^{4,1,9}	RBX1 ^{7,9,4}	E1B55K

Adenovirus DNA-binding protein	Replication protein A2	Cellular tumor antigen p53	E3 Ubiquitin-protein ligase RBX1	Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	BLM ^{3,2,7} Bloom syndrome protein	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	RPA2 ^{2,3} Replication protein A2	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	TUBB ¹⁰ Tubulin Beta Chain	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATRIP ³ ATR-interacting protein	BRCA1 ^{2,2,4} Breast cancer type 1 susceptibility protein	KPNA1 ⁶ importin alpha-1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATRIP ³ ATR-interacting protein	BRCA1 ^{2,2,4} Breast cancer type 1 susceptibility protein	BLM ^{3,2,7} Bloom syndrome protein	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATRIP ³ ATR-interacting protein	BRCA1 ^{2,2,4} Breast cancer type 1 susceptibility protein	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATRIP ³ ATR-interacting protein	BRCA1 ^{2,2,4} Breast cancer type 1 susceptibility protein	RAD50 ² DNA repair protein RAD50	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATRIP ³ ATR-interacting protein	BRCA1 ^{2,2,4} Breast cancer type 1 susceptibility protein	MRE11 ² Double-strand break repair protein MRE11	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATRIP ³ ATR-interacting protein	BRCA1 ^{2,2,4} Breast cancer type 1 susceptibility protein	HNRNPD ^{4,5} Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0, AU-rich element RNA-binding protein 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATRIP ³ ATR-interacting protein	CINP ^{3,2} Cyclin-dependent kinase 2-interacting protein	HNRNPD ^{4,5} Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0, AU-rich element RNA-binding protein 1	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATRIP ³ ATR-interacting protein	ETAA1 ³ Ewing's tumor-associated antigen 1	BLM ^{3,2,7} Bloom syndrome protein	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein
DBP Adenovirus DNA-binding protein	ATRIP ³ ATR-interacting protein	PNKD Probable hydrolase PNKD	TP53 ^{4,1,9} Cellular tumor antigen p53	E1B55K Adenovirus E1B 55 kDa protein

Tabla suplementaria 2. Predicción de red PPI. En la tabla están reportadas interacciones y colocalizaciones.