



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Presidente del Consejo Directivo 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. **CARLA ALEJANDRA ZUÑIGA ENRIQUEZ** con número de matrícula **20154013040** cuyo título es:

“Producción de la proteína de adenovirus tipo 5, E1B 55KDa, en cepas de expresión de E. coli.

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 18 de septiembre del 2020

Atentamente
Por una universidad culta

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

DR. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA
DR. IVÁN MARTÍNEZ-DUNCKER RAMIREZ
DR. RAMON ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA-CONDE
DRA. PALOMA R. HIDALGO OCAMPO
DR. CHRISTOPHER DAVID WOOD

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2020-09-21 10:56:35 | Firmante

c9GwLY7OGOSCaocq68fvknhZARUoO5ym3MG72mupqfYFGdRbvP/pTYheRRghK5D1KwfTqEhF8T+FhaFuJYYQ1qUusK0XqNoPppmLb2ZqWSeRrcvneLBnd8MdnEY4tJR3uFOFA1iN/PDO68xx0JXGv/DbA1h2ruuAftV9UZb/Y0PnaJyLEcZLTxpXmPNckP7DzQv2HTDRO38b2uV/9tUW6EgoqA7uwo0JNNynBXURjrw1qRE1WcOLwY+7SFJakbszDD0dtGNjv0hoYXHONdv4cBZZQfB/HEzG3fKxp5Hwqm/fpuKE7FBJuiZLloqORVQwvIT54UOdtyBX5vUg/Fbzmg==

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2020-09-21 10:57:15 | Firmante

qXvMaSyMuniEHX7uq/w2bgw4khXHjbfldpvn7V4F7YKW+W2Am/TOVGlogAo7AmbFsQCD/jp9L31TvPO1mK55/bgP+nLmuCQCnxdBDIZ26Ej+pDEk2nhnE7112rclVJ4aJ/ZrM4SfA8oB5iw6VcRq7WstU+8AaibqLJhwpGI3aTW/wzgCHSJcFLNqKvKlmlGp+0JcNG2011G1rR/y6xvVIE3MWiUteJdnbVDoHdDNOquTW2uoR0Rg5VWVzw8Z7N+RMVwfPbrljsiqQCAka4oXcOfvpY5d8mzCoCTxk17C4g8bcDfjqk8plSKNUcqbxk3mYrGcvBvp9H0EeuSnAIV4Q==

PALOMA HIDALGO HIDALGO | Fecha:2020-09-21 11:24:38 | Firmante

UwgiN/2mGNU4bzKRRmd9yxf5LsGWY6UUO7MYMPO8hdyVWsvBEOVCV0dmY+JIZzbdN9m4KJ6QKxtSZPWGm1UqHXWkaggn65uTmL6n3MfSg2bEqT5MBxWkoHcfXLUhDaVJkS9c+PGVGg3gbaWa65OPRsQyHpzs2+IW6Ocl/K8Tpc30I0SvW6vL7JZTjWMP3GZPLPjmexblsxZSvO5A9am78HSDxdWNzjc/cmwXqNI5xbxuE5lyqEc4FepoRwQAFZCSMA7jzVLS5rHoKujaz8bPloDn7OMDuo7Yj785oxUq++ohuLWARDL4eetABo+dSCDPXAGR/GW6SU8SgeDzQA==

CHRISTOPHER WOOD DAVID | Fecha:2020-09-22 00:58:21 | Firmante

TkjbWBJxRi9OhXB5vZAI2fl2kRgUkMc1C/SaljptYBxG7vn6rU3bSGKei48g3guZmN7MDzWGCgfoHbI51sWvjv6SYozXIDfSE0MIhQ7N9qM/RfB3a6cks2gILEOreavIjpbQdCErMWDiuNdcU9qALKYfuXIKwO9D+TdjDT3HUJ/pz4UgSc8PN23ejMnjtGKbnwjrDCjz66rlp2ksx4y4PzYwdKb+XGEbGd8nnK+a3AIFBQ8F8alcw5Qcwz3yStpR5Pe/w1T8AX+I9U3ydt/ypMih2CzBjtoJ3XKoGCBveGsTy/7aXRMRkxYjAZKAeyXmb/DwjNicGbnrOalaAr+mA==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2020-09-23 11:29:20 | Firmante

RqEtyVnpqYLkYZFw3pTKHseSwY/XpSB8ODanbrRjYABTASVsQawVlWijAvAvnlOaQNYF3m++R67srYBjyack/U5z6uyocPVkNABMEzqvMfic+1vZhdY8GDc54AEONc19uN6Q2wAOjF6l+YiBIFD2LYz5OL4klAlZw08qxiAGbipzwUVD58vdhKuf/PjoNokfe67ePsAfCCU8XrMYWUgRU4Y2Fo4q8KOs+rC1m6qgY+ND2d3uuL3z21FAnba3q66w3/uYcjqIQqe6huzCagZw3y0KVPczUNsxJgZBfBtS7i1BwNE8r6IG7p0/u5Hru0IQKxWDECCQbmSR7gUJL8A==

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



sdmA7y

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7krz3XkYCu74iYDa68eRTDgciXkYNYy>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Centro de
Investigación en
Dinámica Celular

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Centro de Investigación en Dinámica Celular

Producción de la proteína de adenovirus tipo 5, E1B-55KDa en cepas de expresión de *E. coli*.

Tesis

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

Licenciada en Ciencias, área terminal: Bioquímica y Biología Molecular

Presenta:

Carla Alejandra Zúñiga Enríquez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Ramón Antonio González García-Conde
CIDC, IICBA, UAEM

Miembros del comité tutorial:

Presidente Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama.
[Facultad de Medicina, UAEM](#)

Secretario Dr. Iván Martínez-Duncker
[CIDC, IICBA, UAEM](#)

Vocal Dr. Ramón Antonio González García-Conde
[CIDC, IICBA, UAEM](#)

Suplente Dr. Christopher David Wood
[IBT, UNAM](#)

Suplente Dra. Paloma Rossana Hidalgo Ocampo
[CIDC, IICBA, UAEM](#)

CUERNAVACA, MORELOS. AGOSTO, 2019

ABREVIATURAS

Ad	Adenovirus	Adenovirus
bp	base pairs	pares de bases
CAR	Coxsackie and Adenovirus Receptor	
CR1	Conserved Region	Región conservada
CTLs	Cytotoxic T Lymphocytes	Linfocitos T Citotóxicos
DSBR	Double Stranded Break Response	
dsDNA	double stranded DNA	DNA doble cadena
E2E	E2 Early Ppromoter	Promotor de E2 temprano
E2L	E2 Late Promoter	Promotor de E2 tardío
HAd	Human Adenovirus	Adenovirus Humano
Tag-HSV	Herpex Simplex Virus Tag	
IDP	Intrinsically Disordered Protein	Proteína intrínsecamente desordenada
IDRs	Intrinsically Disordered Region	Regiones intrínsecamente desordenadas
IPTG		isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ISGs	Interferon Stimulated Genes	Genes Estimulados por IFN
ITR	Inverted Terminal Repeats	Repeticiones Terminales Invertidas
K104		Lisina 104
L4P	L4 Promoter	Promotor de L4
MHC-1	Major Histocompatibility Complex-1	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
miRNAs	microRNAs	
MLP	Major Late Promoter	Promotor Principal Tardío
MLTU	Major Late TU	TU Principal Tardía
MTOC	Microtubules Organization Center	Centro de Organización de Microtúbulos
NES	Nuclear Export Signal	Señal de Exportación Nuclear
NLS	Nuclear Localization Signal	Señal de Localización Nuclear
NPC	Nuclear Pore Complex	Complejo de Poro Nuclear
OGCP	mitochondrial 2- oxoglutarate/malate carrier protein	Proteína mitocondrial acarreadora de oxoglutarato-malato
ORF	Open Reading Frame	Marco abierto de lectura
PML NBs	PML-Nuclear Bodies	Cuerpos nucleares de PML
PTM	Post-Translational Modification	Modificación post-traducciona
RC	Replication Compartments	Compartimentos de Replicación
RE		Retículo Endoplásmico

RGD	Arg-Gly-Asp motif	
RID	Receptor of Internalization and Degradation	Receptor de internalización y degradación
RNP	Ribonucleoprotein	
S490		Serina 490
S491		Serina 491
T495		Treonina 495
T7 RNAP	T7 RNA Polymerase	RNA Polimerasa de T7
TAP	Transporter Associated with antigen Processing	Transportador asociado con el procesamiento de antígeno
TNF	Tumor Necrosis Factor	Factor de necrosis tumoral
TP	Terminal Protein	Proteína terminal
TU	Transcription Unit	Unidad Transcripcional
VA-RNA	Virus Associated- RNA	RNA asociado a virus

1. Índice

1	Resumen	6
2	Introducción	7
2.1	Generalidades	7
2.2	Estructura del virión	8
2.3	Genoma y organización	10
2.4	Ciclo de replicación viral	11
2.5	Reorganización de dominios nucleares durante la infección por Ad	1646
2.6	Compartimentos de replicación (RC)	1646
2.7	La unidad de transcripción E1B	1646
2.8	La proteína E1B-55kDa	1848
2.9	Información estructural de E1B-55kDa	1949
2.10	Cepas bacterianas para expresión de proteínas recombinantes	20
2.10.1	BL21	20
2.10.2	C41 y C43	21
2.10.3	pET27b(+)	21
3	Hipótesis	23
4	Objetivo general	23
4.1	Objetivos particulares	24
5	Materiales y métodos	24
5.1	Células competentes	24
5.2	Extracción de DNA plasmídico y cortes con enzimas de restricción	24
5.3	Transformación de Bacterias	25
5.4	Gliceroles	25
5.5	Prueba de expresión	25
5.6	SDS-PAGE	25
6	Resultados y Discusión	26
6.1	Obtención de los plásmidos que contienen los genes que codifican para cada una de las regiones de E1B-55 kDa	26
6.2	Transformación de las cepas de expresión	27
6.3	Expresión de las regiones de E1B-55kDa	35

7	Perspectivas	43
8	Bibliografía	44

2. Índice Figuras

Figura 1	Diagrama de la estructura del virión y su composición protéica	10
Figura 2	Organización del genoma de Ad tipo 5.....	11
Figura 3	Ciclo de replicación de Ad.....	15
Figura 4	Transcritos de la TU E1B de adenovirus según los distintos sitios de splicing.....	17
Figura 5	Diagrama de la proteína E1B 55 kDa.....	19
Figura 6	Mapa representativo del vector pET-27b(+).	23
Figura 7	Miniprep y cortes con enzimas de restricción del DNA obtenido de la cepa DH5 α transformada con las construcciones para cada una de las regiones de E1B-55kDa.	27
Figura 8	Tipos y tamaños de colonias obtenidas tras la transformación de BL21, C41 y C43 con cada una de las construcciones de las regiones de E1B-55kDa.	29
Figura 9	Colonias obtenidas tras la transformación de DH5 α , BL21, C41 y C43 con el plásmido pCDNA.....	31
Figura 10	DNA obtenido a partir de MiniPrep y los patrones de restricción de las cepas de expresión transformadas con las construcciones de E1B-55kDa	34
Figura 11	Patrones de bandas de proteínas en geles de Acrilamida de las distintas construcciones y temperaturas probadas con la cepa BL21.....	36
Figura 12	Geles de Acrilamida donde se muestra el patrón de bandas de proteína de las distintas construcciones y temperaturas evaluadas con la cepa C41	37
Figura 13	Geles de Acrilamida donde se muestra el patrón de bandas de proteína de las distintas construcciones y temperaturas evaluadas para C43	38
Figura 14	DNA obtenido a partir de MiniPrep y los patrones de restricción de la cepa DH5 α transformada con las construcciones de E1B-55kDa a lo largo de un cultivo de 12 horas sin inducción con IPTG.....	40
Figura 15	Seguimiento del crecimiento de cultivos inducidos con IPTG	41
Figura 16	Crecimiento de cultivo inducido en presencia y ausencia de antibiótico.	43

3. Índice Tablas

Tabla 1	Clasificación para HAdS, género Mastadenovirus.	8
Tabla 2	Proteínas estructurales de Adenovirus tipo 5	9
Tabla 3	Número de colonias y eficiencia de transformación pET 27 b(+).	30
Tabla 4	Número de colonias y eficiencia de transformación pCDNA.....	32

1 Resumen

Para caracterizar los mecanismos de acción asociados a actividades proteicas, es importante tener información estructural de la proteína a estudiar. Existen varios métodos para obtener información estructural de proteínas; entre ellos se encuentra la resonancia magnética nuclear (RMN) y la cristalografía de rayos X. Sin embargo, estas técnicas tienen limitantes relacionadas con la cantidad mínima de muestra necesaria y con la obtención de una sola conformación de la proteína, lo que dificulta obtener información estructural de proteínas que se obtienen en pequeñas cantidades o que son desordenadas.

La oncoproteína E1B-55kDa de adenovirus es una fosfoproteína que promueve la replicación y expresión del genoma viral, reprime la expresión de genes de respuesta a interferón y participa en la degradación de factores celulares antivirales, entre otras actividades. Esta proteína multifuncional favorece la formación eficiente de los Compartimentos de Replicación (RC, por sus siglas en inglés) que son estructuras inducidas durante la infección viral en donde se lleva a cabo la replicación y expresión del genoma viral y recientemente estos sitios han sido asociados a la regulación de la respuesta antiviral.

La E1B-55kDa es una proteína cuyos extremos amino y carboxilo están predichos como intrínsecamente desordenados; la región central es altamente conservada en varias especies de adenovirus y es la región más ordenada de la proteína. Hasta el momento no se cuenta con información estructural de esta proteína, ya que no se ha podido obtener en cantidades suficientes para estudiarse por las técnicas de resonancia y cristalografía antes mencionadas porque no ha sido posible expresar a la proteína en cantidades suficientes debido a que resulta tóxica para los sistemas hasta ahora probados. Por otro lado, al tener regiones amino terminal y carboxilo terminal desordenadas no se pueden obtener cristales de la proteína.

Recientemente, en el grupo se ha obtenido información con modelado por homología de E1B-55kDa y el conocimiento previo de las actividades asociadas a ciertas regiones de la proteína permite proponer que puede estar organizada en tres dominios que podrían tener actividad y plegarse de manera independiente, por lo que se obtuvieron construcciones que codifican para cada una de las regiones de E1B-55kDa. La región N-terminal que corresponde a los residuos 1-146, la central de los residuos 147-384 y la C-terminal correspondiente a los residuos 385-496. Las construcciones se hicieron usando el plásmido pET27b (+) como vector. El sistema de vectores pET se usa para clonación y expresión de proteínas recombinantes ya que la expresión de la proteína puede ser regulada y depende de un promotor fuerte. Además, se utilizaron tres cepas de *E.coli.*, la cepa parental BL21 ampliamente utilizada para expresión de proteínas recombinantes y dos cepas mutantes de BL21,

C41 y C43, con las que se ha logrado la expresión de proteínas recombinantes que han resultado ser tóxicas en otras cepas.

A pesar de haber obtenido colonias transformadas con cada una de las construcciones en cada una de estas cepas, en ninguno de los casos se logró detectar proteínas del tamaño esperado mediante SDS-PAGE en las condiciones evaluadas, por lo que se deberán de probar condiciones adicionales para determinar si estas cepas podrían permitir la expresión de niveles suficientes para estudios funcionales o estructurales de la proteína.

2 Introducción

2.1 Generalidades

Los adenovirus se aislaron por primera vez en 1953 al intentar identificar agentes etiológicos de infecciones respiratorias agudas (Rowe, W.P., 1953). Estos virus se encontraron en tejido adenoide por lo que se acuñó el término adenovirus (Ad) en 1956 (Enders, 1956).

La infección por Ad está asociada a 5% - 10% de las enfermedades respiratorias agudas en niños menores de 5 años. En adultos este porcentaje es menor siendo las poblaciones de mayor riesgo los militares, asilos y pacientes inmunosuprimidos (Fields, 2013). También son el agente etiológico de gastroenteritis (Yolken, 1982) y queratoconjuntivitis (Tullo & Higgins, 1979), dependiendo del tipo que cause la infección.

La formación de tumores en hamsters recién nacidos inducidos por la infección con Ad humano tipo 12, mostró por primera vez la capacidad oncogénica de un virus humano (Trentin, 1962). Existen reportes de inducción de tumores por la infección con Ad en otros modelos animales y transformación de líneas celulares, pero aún no existe evidencia que la infección con Ad esté asociada a la formación de tumores en humanos.

Debido a que presentan baja patogenicidad, infectan múltiples tipos celulares y la capacidad para obtener títulos virales altos, algunos Ad han sido utilizados como vectores en terapia génica y terapias anti cáncer con distintos enfoques, como inmunoterapia génica, estrategias de reemplazo genético y en enfoques que combinan terapia génica con quimioterapia (Vorbürger, S; Hunt, 2002). Además se han desarrollado mutantes de Ad con capacidad oncolítica (Fueyo et al., 2000). Estos virus también han sido utilizados para generar vacunas recombinantes, la más reciente contra el virus del ébola (Anguiano-Zarate et al., 2018; Bae & Myoung, 2014).

Adicionalmente, el estudio de los Ad ha permitido entender varios procesos celulares, como el control del ciclo celular, la función de supresores tumorales, expresión y regulación de genes, replicación del DNA y procesamiento por splicing de los RNAs mensajeros (mRNAs), entre muchos otros (Fields et al, 2001).

Los Ad infectan vertebrados y se clasifican en 5 géneros. Los Mastadenovirus, que agrupan a los Ad que infectan a mamíferos; Aviadenovirus aislados de aves; los Atadenovirus, nombrados así debido a su alto contenido en Adenina/ Timina, que infectan ruminantes, aves y reptiles; los Siadenovirus denominados de este modo debido a la presencia de un gen que codifica para una sialidasa, que infectan reptiles y aves; y los Ichtadenovirus que infectan peces. Hasta ahora, se han encontrado 90 tipos de Ad que infectan a humano (HAd) (HAdV Working Group, 2018), todos pertenecen al género Mastadenovirus y se clasifican en 7 especies (A-G) dependiendo de la región central de la proteína fibra que hemaglutina eritrocitos, homología en secuencia y capacidad oncogénica, como se muestra en la Tabla 1.

ESPECIE	GRUPO HEMAGLUTINACIÓN	TIPO	TUMORES EN ANIMALES	TRANSFORMACIÓN EN CULTIVO CELULAR	%GC	ENFERMEDAD ASOCIADA
HAdV-A	IV (nulo o pequeño)	12,18,31	Alto	+	46-47	Infección entérica críptica
HAdV-B	I (completo en eritrocitos de mono)	3,7,11,14,16 21,34,35,50	Moderado	+	49-51	Conjuntivitis Enfermedad respiratoria aguda Cistitis hemorrágica Sistema nervioso central
HAdV-C	II (parcial para eritrocitos de rata)	1,2,5,6	Nulo o bajo	+	55	Infección endémica Síntomas respiratorios
HAdV-D	III (completo para eritrocitos de rata)	8,9,10,13,15 17,19,20, 22-30,32,33 36-39,42-49, 51,53,54	Nulo o bajo (tumores mamarios)	+	55-57	Queratoconjuntivitis en pacientes inmunocomprometidos SIDA
HAdV-E	III	4	Nulo o bajo	+	58	Conjuntivitis
HAdV-F	III	40,41	Desconocido	-	51	Diarrea infantil
HAdV-G	Desconocido	52	Desconocido	Desconocido	55	Gastroenteritis

Tabla 1 Clasificación de HAds, género Mastadenovirus. Modificado de Fields, Virology, 6th edition, 2013

2.2 Estructura del virión

Las partículas de HAd no presentan envoltura lipídica, tienen un genoma de DNA de doble cadena (dsDNA) y una cápside icosaédrica de ~90 nm de diámetro con un número de triangulación T=25. La cápside está compuesta por 11 polipéptidos: El polipéptido II (967 amino ácidos), mejor conocido como hexón, es el componente más abundante de la cápside con un total de 720 subunidades que forman un arreglo de 240 capsómeros de trímeros de hexón, 12 por faceta triangular del icosaedro. Los polipéptidos VI (217aa), VIII (134aa) y IX (139aa), se asocian al capsómero hexón para estabilizar la cápside y unirla con la nucleocápside y a los capsómeros de pentón. Los doce capsómeros pentaméricos del polipéptido III (571 aa) denominado pentón, se ubican uno en cada vértice del icosaedro. De cada vértice se proyecta un trímero del polipéptido IV (582 aa) o proteína fibra que está

conformada de 3 dominios; el N-terminal que se une a la base pentamérica, un eje central de poca flexibilidad y un dominio terminal globular en C-terminal que interacciona con el receptor de las células hospederas (Tabla 2 y Figura 1) (Fields et al., 2001; Berk et al., 2006).

La nucleocápside del virión, consta de 7 proteínas y del genoma viral. Los polipéptidos V (368aa), VI (217aa), VII (174aa), μ (36 aa), IIIa, la proteína terminal (TP) y la proteasa p23. Las proteínas V, VII y μ son ricas en arginina; por lo que interaccionan con las cargas negativas del DNA viral en la nucleocápside. Se ha propuesto que la proteína VI se asocia con la cavidad interna de la superficie de los trímeros de hexón y con la nucleocápside al igual que la proteína IIIa (Fields, 2013).

El polipéptido VII forma dímeros que condensan el DNA viral, es decir, forma una estructura parecida a un centro de histonas que es rodeada por el vDNA. El polipéptido V se une a la base pentamérica y al polipéptido VI, formando un puente entre la nucleocápside y la cápside. La TP (671aa) se encuentra unida covalentemente a cada uno de los extremos 5' del genoma viral. Por último, la proteasa p23 procesa los precursores de las proteínas del virión y está implicada en el desensamblaje de la progenie viral y en el escape de los endosomas durante la entrada del virus a la célula (Fields, 2013).

Polipéptido	Residuos de aminoácidos en cada monómero	Copias en el virión
II (hexón)	967	240 trímeros
III (base pentón)	571	12 pentámeros
IIIa	585	60 monómeros
IV	582	12 trímeros
IVa2	449	<10
V	368	157
VI	217	60 hexámeros
VII	174	830
VIII	134	120
IX	139	240
μ	36	~100

Tabla 2 Proteínas estructurales de Adenovirus tipo 5. Modificada de Fields, *Virology*, 6th edition, 2013

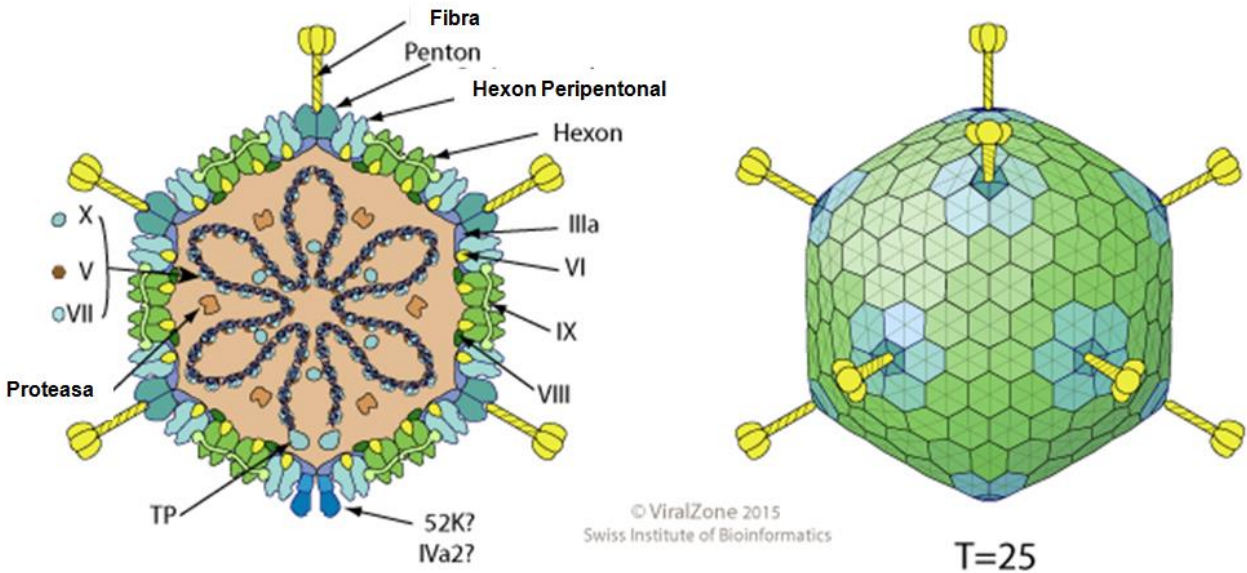


Figura 1 Diagrama de la estructura del virión y su composición proteica. Modificado de Viral zone 2015

2.3 Genoma y organización

El genoma de HAd5 es una molécula de dsDNA lineal de aproximadamente 36 Kb (Fields, 2013). El genoma viral tiene dos orígenes de replicación ubicados en los extremos del genoma, que son repeticiones terminales invertidas (ITR), con una longitud de 130 pares de bases (bp) cada una. Como se mencionó antes, en ambos extremos 5' se encuentra unida covalentemente la TP.

El genoma está organizado en cinco unidades transcripcionales tempranas (E1A, E1B, E2, E3 y E4), dos tempranas retrasadas (IX, IVa2) y una unidad transcripcional principal tardía (Major Late, MLTU por sus siglas en inglés). La MLTU está organizada a su vez en 5 familias de mRNA (L1-L5), definidas por sitios diferenciales de poliadenilación que producen diferentes mRNA por splicing alternativo. Todas estas unidades transcripcionales son transcritas por la RNA polimerasa II de la célula (Fig 2).

Además, dos genes son transcritos por la RNA polimerasa III, que producen dos RNA pequeños denominados RNAs asociados a virus (VA RNA-1 y VA-RNA-2). Estos RNAs regulan la síntesis eficiente de proteínas virales y la inhibición de micro RNAs (miRNAs) celulares (Schneider & Mohr, 2003) (Fig 2).

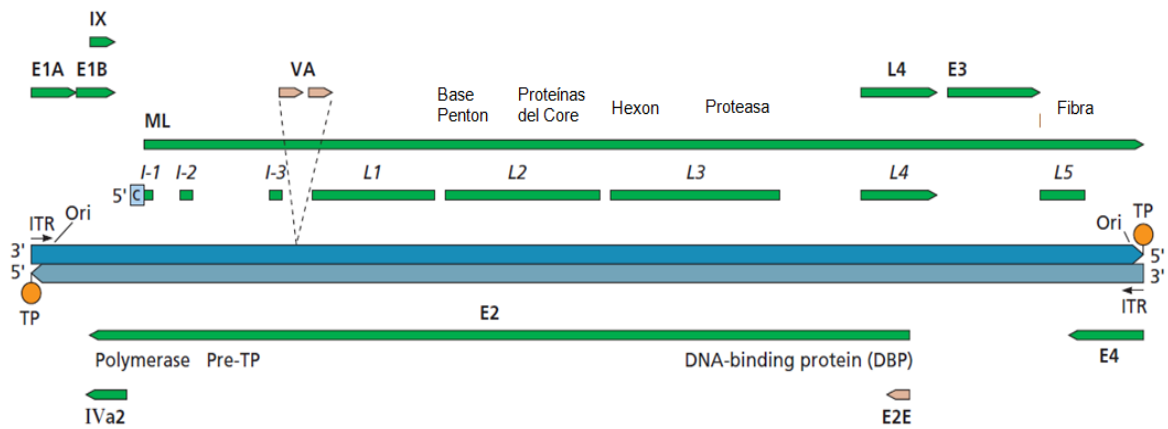


Figura 2 Organización del genoma de Ad tipo 5. Por convención el genoma de Ad es representado iniciando con la TL de E1A del lado izquierdo. Las TU E1A, E1B, IX, ML, VA-RNA y E3 están codificadas en la hebra que se lee de izquierda a derecha, mientras que las TU E4, E2 y IVa2 se encuentran codificadas en la hebra complementaria que se lee de derecha a izquierda. El DNA viral está representado en azul, las regiones verdes son los mRNA. Modificado de Flint, *Principles of Virology* 2015.

2.4 Ciclo de replicación viral

Por convención, el ciclo de replicación de los virus de DNA como Ad, se divide en dos fases, la temprana y la tardía, que se separan por el inicio de la replicación del DNA viral (Figura 4). La fase temprana inicia cuando la partícula viral interacciona con la célula. La unión inicial está mediada por el dominio globular con forma de perilla o “knob”, de la proteína fibra a una proteína transmembranal de la célula hospedera, llamada Receptor de Coxsackie y Ad (CAR), que es un componente de las uniones estrechas. La región RGD de los monómeros de pentón, se une a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$. La interacción con CAR, induce la unión de la partícula viral a la superficie celular, y la endocitosis mediada por clatrina es regulada por la interacción con las integrinas. Las fibras se disocian de la base pentón en la membrana plasmática y se disocian completamente en los endosomas tempranos. Después se terminan de disociar los vértices, los trímeros de hexón y se liberan las proteínas IIIa, VI y VIII. La disociación de la cápside es regulada por la proteasa p23 que es activada por la acidificación del endosoma, esta proteína también es requerida para desestabilizar la membrana endosomal. La proteína VI desestabiliza la membrana endosomal y se libera la nucleocápside hacia el citosol, donde es transportada por medio de dineína hacia el centro organizador de microtúbulos (MTOC). Posteriormente la nucleocápside se transporta al complejo del poro nuclear (NPC por sus siglas en inglés) y se asocia con la nucleoporina NUP214/CAN. El DNA viral que se encuentra unido a la proteína VII ingresa a través

del poro nuclear por medio de las importinas Imp7 y Transportina (Fields, 2013; Hindley et al., 2007).

Durante la fase temprana se establecen condiciones óptimas para la expresión de los genes virales y la replicación del genoma viral. Una vez en el núcleo, la unidad transcripcional (TU) E1A es la primera en ser transcrita por un promotor constitutivamente activo. Se sintetizan dos mRNAs principales, diferenciados por su coeficiente de sedimentación (12S y 13S). Las proteínas codificadas en la TU E1A se denominan E1A 248R y E1A 289R. Los polipéptidos comparten las regiones conservadas CR1, CR2 y CR4, una cuarta región CR3 es única del producto E1A grande (Berk, 2005).

Las proteínas E1A tienen múltiples funciones. En primer lugar, la activación del resto de las TU tempranas. Además, induce la entrada de la célula a la fase S. Las CR1 y CR2 se unen a la proteína supresora tumoral, retinoblastoma (pRB) y otras proteínas relacionadas a retinoblastoma como p107 y p130, desplazando su unión del factor E2F. E2F activa los genes celulares de fase S requeridos para la síntesis de DNA y duplicación del contenido celular.

Las CR de las proteínas E1A no se unen de manera directa a DNA, pero se asocian a dominios de múltiples factores de transcripción o co-activadores de la transcripción como p300/CBP, estimulan la unión a promotores celulares y virales, y regulan su expresión. E1A también interacciona con MED23 que es parte del complejo mediador de la transcripción. Esta interacción incrementa el ensamble de complejos de pre-inicio de la transcripción y estimula la elongación de la transcripción (Berk, 2005).

La respuesta del hospedero al efecto genotóxico provocado por E1A, es activar defensas celulares que incluyen la estabilización del supresor tumoral p53 y la activación de apoptosis (Fields, 2013). Estas respuestas celulares son inhibidas por las proteínas codificadas en la TU E1B. Estas proteínas son nombradas de acuerdo a su peso molecular, 19 kDa y 55 kDa.

La apoptosis es inhibida por E1B-19kDa que se une a las proteínas proapoptóticas BAK y BAX, pertenecientes a la familia BCL-2; cuando estas proteínas se oligomerizan forman poros en la membrana externa de la mitocondria. La unión de E1B-19kDa inhibe la oligomerización de BAX y BAK, lo que evita la liberación de citocromo C de la mitocondria y por consiguiente la activación de la vía intrínseca de las caspasas (Berk, 2005).

Por otro lado, la respuesta del hospedero es controlada por la proteína E1B-55kDa (E1B). Uno de los mecanismos en los que E1B participa, es la degradación de factores antivirales como p53 y el complejo MRN (Mre1, Rad50 y Nbs1). El complejo MRN es un complejo de proteínas dependientes de cinasas que se activan con la detección de daño en DNA de doble cadena. El genoma lineal de Ad es reconocido como DNA dañado, desencadenando esta respuesta (Shomita S. Mathew, 2007).

La degradación es dependiente de la formación de un complejo E3 ubiquitina ligasa conformado por E1B, el producto E4Orf6 de la TU E4 y las proteínas celulares Culina 5, Elonguina B y C y Rbx1 (Berk, 2005; Querido et al., 2001). La E1B se une al dominio de activación de p53 en el extremo N-terminal, modificando la afinidad que este tiene por sus sitios de unión y convirtiendo a p53 en un represor transcripcional (Berk, 2005). Además, E1B funciona como E3 SUMO-ligasa de p53 y Mre11, promoviendo su asociación a los cuerpos nucleares de PML (PML NBs). La asociación a PML NBs resulta en la relocalización de estas proteínas a compartimentos de replicación viral y la posterior poliubiquitinación y degradación por proteasoma, lo que se ha propuesto que ocurre asociado a agrosomas en citoplasma, en células transformadas (Castillo-Villanueva et al., 2014; Pennella et al., 2010).

Las proteínas codificadas en la TU E3 modulan la respuesta inmune del hospedero. Estas proteínas son nombradas por su masa molecular (ej 10.4k, 14.5k y gp19k). La E3 gp19k es una glicoproteína que se une a la cadena pesada del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1 (MHC-1) e inhibe al transportador asociado con el procesamiento de antígeno (TAP) en retículo endoplásmico (RE) evitando su translocación a la membrana celular y por lo tanto evita la exposición de MHC-1 y el reconocimiento de la célula infectada por linfocitos T citotóxicos (CTLs) (Bennett, Bennink, Yewdell, & Brodsky, 1999).

El complejo protéico E3-10.4k /14.5 k conocido como internalización y degradación de receptor (RID) inhibe la apoptosis inducida por Fas (Shisler et al., 1997) y la proteína 14.7 K inhibe apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF) (Woldt, 1990).

Las proteínas de E4 se denominan dependiendo del marco abierto de lectura (ORF) del mRNA producido por splicing alternativo. Algunas de sus funciones son la activación de la cinasa mTOR que estimula la síntesis protéica, por las proteínas E4Orf1 y E4Orf4. La inhibición de la respuesta a daño en DNA de doble cadena (DSBR) por la proteína E4Orf3 ya que la proteína viral relocaliza a los componentes del MRN a PML-NBs. La degradación de proteínas en proteosoma, por la formación del complejo E3 ubiquitina ligasa, descrito antes que depende de E4Orf6. El producto de E4Orf6/7 dimeriza a E2F incrementando su afinidad por el promotor temprano de E2, lo que promueve su transcripción (Fields, 2013).

La expresión de E1A y E1B establece el estado proliferativo permanente de la célula, que además no puede morir, y un mayor nivel de síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Por su parte E3 y E4 modulan la respuesta inmune y estimulan la síntesis protéica. En conjunto estas condiciones resultan óptimas para la progresión eficiente del ciclo de replicación viral. Los productos codificados en la TU E2 participan de manera directa en la replicación del DNA viral y son nombrados de acuerdo a su función. La transcripción de E2 es regulada por dos promotores, el E2 temprano (E2E) y el tardío (E2L), que como sus nombres indican, se activan ya sea en la fase temprana o tardía de la infección. Ambos dirigen la expresión de E2A y

E2B, que son definidos por distintos sitios de poliadenilación. En la región E2A se encuentra codificada DBP, que es la proteína de unión a DNA de cadena sencilla. La DNA polimerasa viral y la proteína pre-terminal pTP están codificadas en la región E2B.

La DNA polimerasa viral se une covalentemente al grupo α -fosforilo de dCMP del genoma viral y a la serina 580 en la pTP que está unida a los extremos 5' del genoma viral y funciona como primer para el inicio de la replicación del genoma viral, por el mecanismo de desplazamiento de cadena característico de Ad. La formación del complejo pTP-dCMP expone a un residuo 3' OH libre que funciona como primer para el inicio de la replicación de una de las cadenas parentales que se replica completamente. La cadena parental desplazada es estabilizada por DPB y esto permite la apertura del DNA independiente de ATP durante la replicación (Hoeben & Uil, 2013)

La fase tardía comienza con el inicio de la replicación del genoma viral, que en conjunto con la expresión de los genes tempranos E1A, E4 Orf3 y los tempranos retrasados IVa2 y IX estimulan al promotor L4 (L4P) que es independiente del promotor principal tardío (MLP). La activación del MLP depende de las proteínas tardías L4-22K y L4-33K cuya transcripción es regulada por el L4P (Morris, Scott, & Leppard, 2010). Como resultado del aumento de la actividad del MLP, se activa la producción de los transcritos de las familias tardías L1- L5 que codifican principalmente para proteínas que se requieren para el ensamblaje de las cápsides. Las proteínas hexón y pentón se ensamblan, ingresan al núcleo, se encapsida el genoma viral y finalmente se libera la progenie viral por lisis celular, resultando en la producción de hasta 10^5 partículas virales por célula (Fields, 2013).

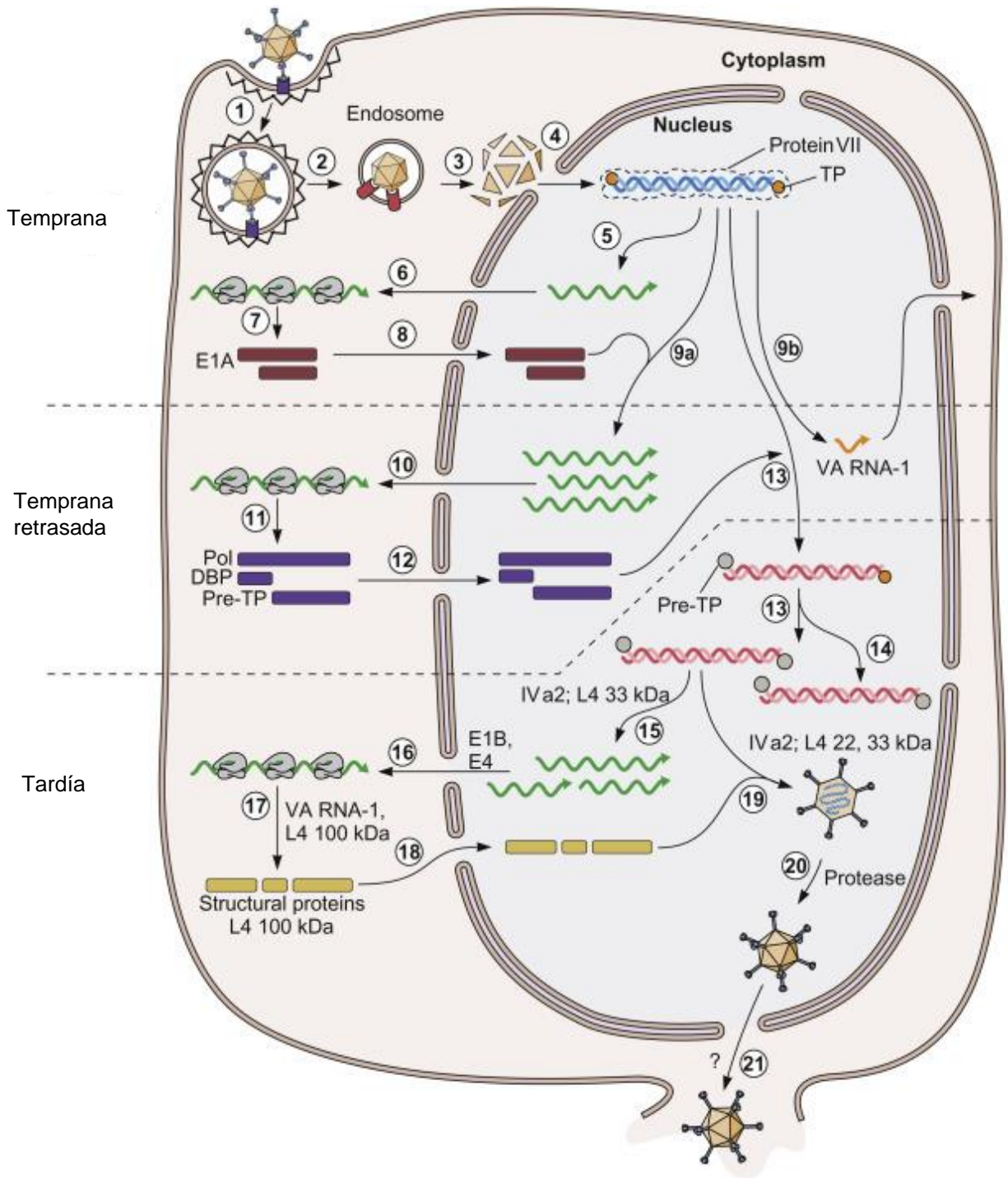


Figura 3 Ciclo de replicación de Ad. Modificado de Flint, *Principles of Virology*, 2009

2.5 Reorganización de dominios nucleares durante la infección por Ad

En células no infectadas, el núcleo se encuentra organizado en compartimentos especializados sin membrana, conocidos como dominios nucleares. Estos dominios se caracterizan por ser dinámicos ya que los componentes que los conforman se encuentran en intercambio constante con otros dominios y con el nucleoplasma. Algunos de estos compartimentos solo se encuentran en condiciones de estrés o estadios del ciclo celular específicos; otros se encuentran de manera permanente en el núcleo (Zimber et al., 2004).

Durante la infección por Ad se ha observado la reorganización de algunos de estos compartimentos nucleares. Entre los dominios reorganizados se encuentran, el nucléolo, los cuerpos de Cajal, los gránulos de intercromatina y los cuerpos nucleares de PML. Algunos de los componentes protéicos que forman a cada uno de estos dominios se mantienen en las estructuras reorganizadas y otros se relocalizan a los sitios inducidos por la infección, conocidos como compartimentos de replicación (RC).

2.6 Compartimentos de replicación (RC)

Durante el ciclo de replicación viral, se induce la formación de microambientes celulares especializados, en donde se localiza el genoma viral y se concentran proteínas celulares y virales necesarias para la replicación y expresión del genoma viral. En el caso de Ad en estos microambientes, además de las proteínas que promueven la replicación viral, se concentran factores que participan en la respuesta antiviral de la célula, por lo que los RC se proponen como un centro de control para las interacciones virus-célula que promueven la replicación viral y simultáneamente contrarrestan respuestas antivirales (Netherton et al., 2007; Schmid, Speiseder, Dobner, & Gonzalez, 2014).

2.7 La unidad de transcripción E1B

La unidad transcripcional (TU) E1B codifica para distintos productos proteicos dependiendo del sitio de splicing seleccionado. Como se mencionó antes los productos principales, 19KDa y 55 KDa, son requeridos para una infección productiva junto con los de E1A y se han asociado a distintas actividades regulatorias durante el ciclo de replicación viral. Sin embargo, también existen otros productos menores derivados de esta TU. Estas proteínas se producen por la traducción de dos marcos de lectura abiertos (ORF por sus siglas en inglés) distintos, pero sobrelapados en un transcrito de 22S. El producto 19kDa no se encuentra relacionado con otros productos de la TU E1B y se obtiene a partir de fragmentos de splicing (13S, 14S y 14.5S). Por otra parte, se obtienen otros

productos proteicos a partir de la región 55KDa (156R, 93R y 84R). Estos productos proteicos se caracterizan por compartir 79 residuos del extremo N-terminal de 55kDa. El fragmento 156R comparte también el extremo C-terminal con 55kDa (T. Sieber & Dobner, 2006) y no se ha comprobado pero existen en teoría otros tres productos posibles (69R, 71R y 203R) (Mun, 2014). Esto debido a que la TU de E1B de adenovirus tiene tres sitios donadores de splicing (SD1, SD2, SD3) y tres sitios aceptores de splicing (SA1, SA2, SA3).

Algunos de los productos secundarios de E1B-55KDa tienen actividades de la proteína completa E1B-55KDa como es el caso de E1B-156R que induce transformación de células en cultivo si es transfectada junto con E1A; este mecanismo es independiente de la represión transcripcional de p53 característica del producto 55KDa (T. Sieber & Dobner, 2006).

Aunque no se conoce la función de los otros productos, con E1B-93R se determinó por medio de técnicas de resonancia magnética nuclear y dicroísmo circular que la región amino terminal (N-terminal) de la proteína, compartida con E1B-55kDa, es intrínsecamente desordenada (Timo Sieber et al., 2011).

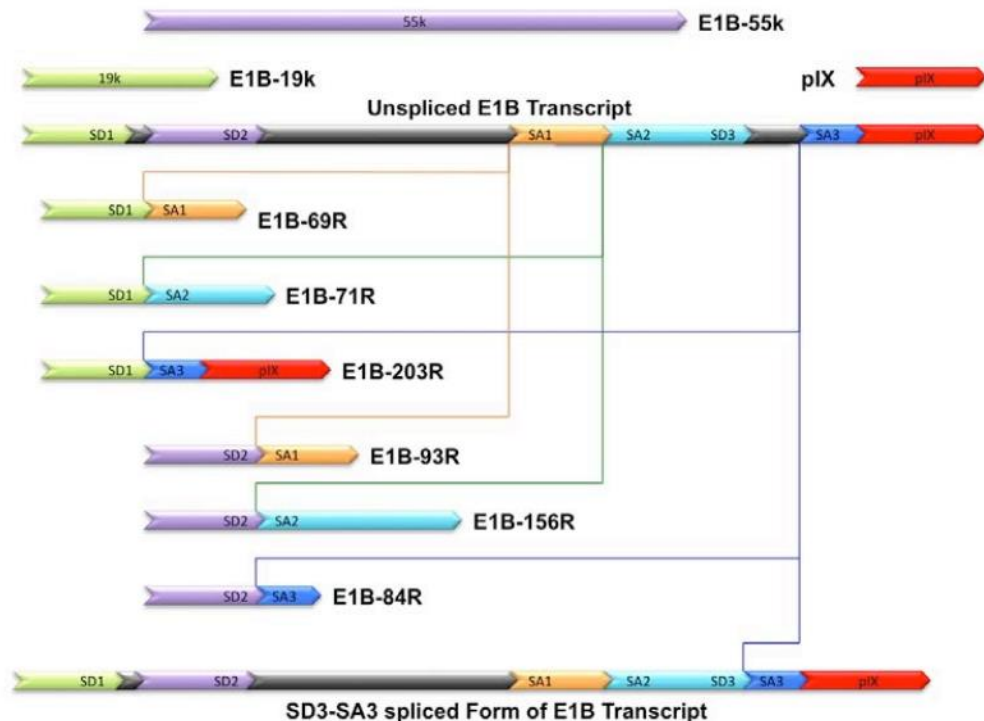


Figura 4 Transcritos de la TU E1B de adenovirus según los distintos sitios de splicing. En el diagrama se muestran los sitios donadores de splicing "D" y los sitios aceptores de splicing "A" y las combinaciones que se pueden hacer entre estos sitios para dar lugar a los productos conocidos y los que son hasta ahora solo propuestos de E1B. Tomado de Study on the alternative splicing in the human adenovirus serotype 5 E1B region, Mun, K., 2014.

2.8 La proteína E1B-55kDa (E1B)

La E1B es una fosfoproteína de 496 aa que puede ser fosforilada en los residuos serina 490 (S490) serina 491 (S491) y treonina 495 (T495) (Blackford, Andrew N. Grand, 2009) y SUMOilada en la lisina 104 (K104).

Aunque los efectos de estas modificaciones post-traduccionales (PTM) en las distintas actividades de la proteína no se comprenden completamente, existe evidencia de que son necesarias para la localización y actividades de E1B.

En experimentos del laboratorio (Raúl López, Arrona C., no publicado) se utilizaron mutantes con sustituciones de las Serinas y Treonina por Alanina o Aspartato en la E1B y se determinó su efecto sobre la localización de la proteína en los RC. Las sustituciones por alanina provocan que la fosforilación no se lleve a cabo y el cambio por ácido aspártico, mimetiza un estado fosforilado por la carga negativa de este aminoácido. Con estas mutantes y mediante microscopía de inmunofluorescencia se observó que la fosforilación es necesaria para la adecuada localización de la proteína a los RC.

La fosforilación de la E1B estimula su SUMOilación, por lo que es posible que estas dos modificaciones modulen su asociación a RC y sus actividades. Utilizando ensayos en los que se midió la activación de la transcripción por p53 en presencia de E1B, se encontró que las PTM son determinantes para la actividad de represor que tiene la E1B sobre p53 (Wimmer et al., 2013)

Además de las actividades de la E1B asociadas a degradación de proteínas, represión de la transcripción dependiente de p53 y su asociación con los RC, se sabe también que la E1B es necesaria para la replicación eficiente del DNA viral y la transcripción de los genes virales (Hidalgo, 2018) y la inhibición de los genes estimulados por interferón.

En el último caso, aunque no se conoce el mecanismo molecular, se ha reportado que E1B reprime la expresión de genes estimulados por interferón (ISGs). Usando microarreglos se observó que en ausencia de E1B la expresión de genes de respuesta a IFN aumenta, lo que sugiere que E1B puede actuar como un represor de estos genes. Además, en células tratadas con IFN e infectadas con un mutante nulo para E1B se observó que la formación de los RC y la replicación del genoma viral es deficiente, lo que sugiere que E1B es necesaria para la formación de RC y por tanto la replicación del genoma viral. Además en resultados recientes de laboratorio, en donde después de la infección de células HFF se midieron los niveles de DNA viral, se determinó mediante ensayos funcionales de RC aislados que la síntesis de DNA viral es menos eficiente cuando la proteína E1B está ausente (J. S. Chahal et al., 2013; J. S. Chahal, Qi, & Flint, 2012, Hidalgo P, no publicado).

2.9 Información estructural de E1B

La información que se tiene de la proteína E1B ha permitido construir el mapa presentado en la sección de actividades asociadas a E1B, sin embargo, no se cuenta con información estructural debido a su complejidad y al bajo rendimiento obtenido de la proteína recombinante en los sistemas hasta ahora probados ya que la proteína resulta tóxica. Si bien se tiene información de las distintas actividades de la proteína debido al análisis mutacional que se ha realizado hasta este momento; es necesario obtener información estructural para poder relacionar las actividades con mecanismos moleculares específicos.

E1B tiene una secuencia de exportación nuclear (NES) entre los aa 83-93, una secuencia de unión a RNA (RNP) entre los aa 250- 308 (Tejera, 2019), un dominio putativo de dedo de zinc (C2H2) entre los aa 350-376 y en el extremo carboxilo terminal una señal de localización nuclear (NLS). Estas señales le confieren a la proteína la capacidad de entrar y salir del núcleo, además de la posible interacción con ácidos nucleicos y otras moléculas que podrían regular las actividades asociadas a esta proteína (Blackford, Andrew N. Grand, 2009) (Figura 5). La información que se tiene de la proteína E1B ha permitido construir el mapa presentado a continuación, sin embargo, no se cuenta con información estructural debido a la complejidad de la proteína y al bajo rendimiento obtenido de la proteína recombinante en los sistemas hasta ahora probados, debido a que la proteína resulta tóxica. Si bien se tiene información de las distintas actividades de la proteína debido al análisis mutacional que se ha realizado hasta este momento, es necesario obtener información estructural para poder relacionar las actividades con un mecanismo de acción específico.

Los resultados del análisis in silico de Threading, Docking (Santiago, 2012) predicción de desorden, análisis co-evolutivo, y el modelo de la región central que se predijo como una estructura ordenada de tipo solenoide β (Tejera, 2019) sugiere que la proteína puede ser expresada en tres dominios independientes siendo los extremos N (a.a 1-150) y C (a.a 390-496) terminal predichos como IDRs, mientras que, la región central (a.a 151-389) de la proteína presenta una disposición espacial estructurada de tipo solenoide beta (Moser, 2010).

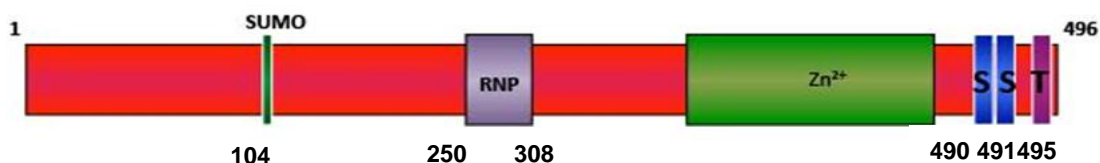


Figura 5 Diagrama de la proteína E1B-55kDa. Se muestran los sitios de fosforilación en las serinas (S) y treonina (T) el sitio de Sumoilación (SUMO) y los motivos de unión a RNA (RNP) y el dedo putativo de Zinc (Zn²⁺). Modificado de Blackford et al., 2009.

2.10 Cepas bacterianas para expresión de proteínas recombinantes

Escherichia coli es una bacteria entérica Gram negativa con un genoma circular de 4.6 Mb. Las altas tasas de crecimiento, (en medio rico *E. coli* se duplica cada 20-30 minutos por lo que se obtienen rendimientos altos en poco tiempo), el conocimiento de su medio de crecimiento (medio definido) y la facilidad para transformar a la bacteria y manipular su material genético han resultado en la generación de múltiples cepas para distintos propósitos, desde almacenar plásmidos hasta cepas especializadas en expresión de proteínas. Se han aislado y caracterizado una gran variedad de mutantes de *E. coli* y en el laboratorio muchas son utilizadas para experimentos con DNA recombinante. La mayoría de las cepas utilizadas en técnicas de DNA recombinante provienen ya sea de la cepa K o de la cepa B de *E. coli* (Casali & Preston, 2003).

2.10.1 BL21

Como todas las cepas derivadas de *E. coli* B, la cepa BL21 tiene como característica que es deficiente de la proteasa ompT que se encuentra ubicada en la membrana externa de la bacteria. Esta endoproteasa está involucrada en la degradación protéica después de la lisis bacteriana por lo que si se encuentra presente dificulta la purificación de proteínas recombinantes (Grodberg & Dunn, 1988).

La cepa tiene una copia cromosomal del gen que codifica para la T7 RNA-Pol del fago λ bajo el promotor lacUV5. Esta construcción es denominada DE3 y las cepas que la contienen son utilizadas para la producción de proteínas a partir de genes blanco, clonados en vectores de tipo pET mediante la inducción con IPTG.

La expresión de esta polimerasa es regulada por el promotor lacUV5 que es un derivado del promotor lac. El promotor lacUV5 tiene una mutación que lo hace insensible a la represión en respuesta a niveles altos de glucosa y permite que se utilicen medios ricos para el crecimiento de la cepa de expresión. La construcción DE3 es inducible por IPTG, un análogo de lactosa. El IPTG no tiene que estarse suministrando al cultivo ya que tiene un átomo de S que forma un enlace con el represor lac, debido a este átomo la interacción no puede ser hidrolizada por la célula y por tanto el IPTG no puede ser degradado y se mantiene unido al represor del promotor manteniendo de esta manera al promotor activo, lo que se traduce en una producción constantemente activa del gen que codifica para la T7 RNA-Pol. Además BL21 también carece de la proteasa Lon lo que resulta adecuado para evitar la degradación de los productos protéicos a producir (Casali & Preston, 2003).

2.10.2 C41 y C43

C41(DE3) se aisló de la cepa BL21(DE3) y subsecuentemente C43(DE3) se aisló a partir de C41.

La cepa C41 se obtuvo a partir del siguiente procedimiento; BL21 se transformó con un vector que contenía al gen que codifica para la proteína mitocondrial acarreadora de oxoglutarato-malato (OGCP). La expresión de esta proteína, inducida por IPTG es altamente tóxica, por lo que la expresión del gen *ogcp* sirvió de agente selectivo para obtener la cepa C41. Una vez seleccionadas las cepas resistentes a la expresión de la proteína OGCP y que la expresión fue eficiente, se curó del plásmido a las clonas mediante su cultivo prolongado. En una segunda ronda de selección se transformó a la cepa C41 con una construcción utilizando el plásmido pmW7; esto llevó al aislamiento de C43 que no solo produce de manera eficiente OGCP sino también otro set de proteínas transmembranales que resultan tóxicas para la cepa parental BL21 y en algunos casos para C41 como es el caso de la F-ATPasa. Se desconoce el genotipo de estas dos cepas, pero se sugiere que las mutaciones regulan la cantidad y/o actividad de la T7 RNA-Pol para ambas cepas y de manera adicional en C43 el plegamiento proteico de la proteína recombinante a producir parece estar favorecido por otra mutación (Miroux & Walker, 1996).

Una estrategia experimental utilizada para distinguir entre las cepas C41 y C43 es transformar con un plásmido de verificación denominado pAVD10. Este vector contiene el gen *uncF* que codifica para la subunidad- beta de la ATPasa de *E. coli* bajo el control del promotor T7. La construcción en este plásmido es letal para BL21 aunque el cultivo no sea inducido y para C41 es letal cuando se induce la transcripción del gen mediante la adición de IPTG, pero la inducción de la subunidad beta de la ATPasa es tolerada por C43 (Schlegel, Genevaux, & de Gier, 2017).

2.10.3 pET27b(+)

El sistema de vectores pET es ampliamente utilizado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. Coli*. Esto debido a que el gen blanco es clonado en los plásmidos pET bajo el control del promotor del fago T7, que es un promotor fuerte y por tanto favorece la producción de la proteína, además la expresión de los genes regulados por este promotor necesitan la presencia de la polimerasa T7 del mismo fago, esta polimerasa es altamente selectiva y activa por lo que el producto deseado puede llegar a comprender más del 50% de la proteína celular total unas horas después de la inducción y si no es inducida la producción de esta polimerasa, los genes se mantienen transcripcionalmente inactivos (Novagen, 1999).

Las cepas de expresión de vectores tipo pET tienen una copia cromosomal del gen que codifica a la polimerasa T7, este gen se encuentra bajo el control del promotor lacUV5 y su expresión es inducida por la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

Como la transcripción del gen de interés no utiliza la polimerasa del hospedero, no hay o existe muy poca expresión de productos génicos tóxicos a menos que estos sean inducidos. Este sistema puede ser inducido si se infecta con el fago T7 o si el gen de la T7 RNAP está incorporado al genoma de la cepa bacteriana (como en el caso de *E. coli* BL21) (Casali & Preston, 2003).

El plásmido cuenta con resistencia a Kanamicina para la selección de clonas transformadas (Novagen, 1999).

pET27b (+) tiene una secuencia señal en N-terminal denominada pelB, esta secuencia es de localización en periplasma que es el espacio entre la membrana plasmática y la membrana externa de bacterias gram-negativas. Esta localización es ideal para la producción de algunas proteínas, además confiere la ventaja de purificación proteica mediante shock osmótico (Novagen, 1999).

En ausencia de IPTG, hay expresión de fuga de la T7 RNA polimerasa (T7 RNA-Pol) y hay genes blanco que son suficientemente tóxicos para *E. Coli*, como para matar a la célula incluso con ese nivel de expresión, evitando así una buena producción de la proteína (Studier, 1991)

Un enfoque para disminuir la expresión de fuga, es usar vectores que tienen el promotor T7lac. Una característica importante de pET27b(+) (Figura 6) es que cuenta con dicho promotor. Estos plásmidos tienen una secuencia del operador lac río abajo del promotor T7 y la secuencia que codifican para el represor lac (*lacI*). Todo está orientado de manera tal, que los promotores T7lac y *lacI* divergen; se produce el represor *lacI* que se une al operador lac y se disminuye de esta forma la expresión de fuga tanto en el promotor lacUV5 en el hospedero, como en el promotor T7lac en el vector (Novagen, 1999).

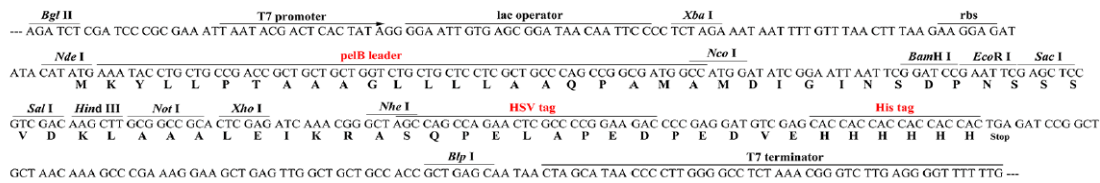
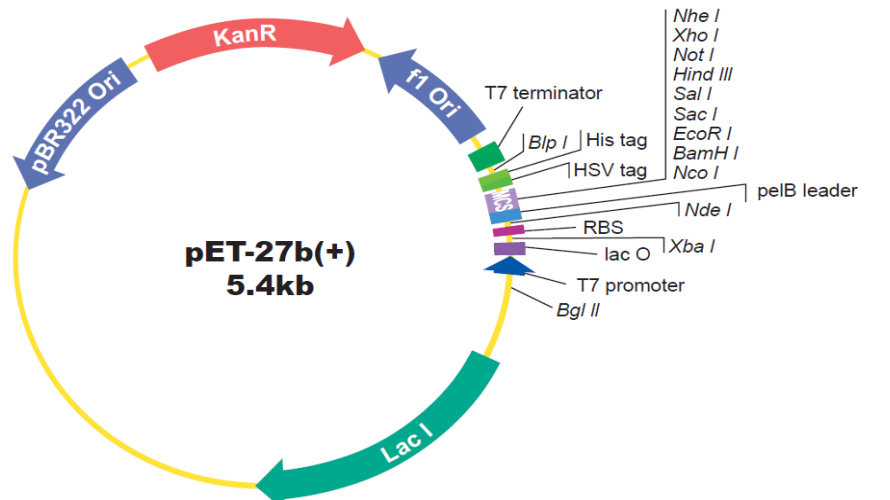


Figura 6 Mapa representativo del vector pET-27b(+). Se muestran los componentes principales que conforman al vector y la orientación que tiene con respecto al ORF. En la parte inferior de la figura se muestra el promotor de T7, los Tags y señales que se le pueden adicionar a la proteína a producir y la ubicación de algunas de las secuencias para enzimas de restricción en el MCS (sitio de multiclonación por sus siglas en inglés). Tomado de genscript

Como se describió en las secciones anteriores, la evidencia de que las regiones amino y carboxilo de la proteína E1B se predicen como intrínsecamente desordenadas y que la región central se predice como un β -solenoides cuando se alinea con una proteína relacionada, sugiere que E1B podría constar de tres dominios funcional y estructuralmente independientes. Por otro lado, BL21 y las mutantes C41 y C43 han sido utilizadas para la expresión de proteínas heterólogas que resultan tóxicas en otros sistemas. En conjunto esto nos permite plantear la siguiente hipótesis.

3 Hipótesis

La proteína adenoviral E1B puede ser expresada en tres regiones independientes para su análisis estructural

4 Objetivo general

Expresar las tres regiones de E1B en distintas cepas de *E. Coli*.

4.1 Objetivos particulares

- Transformación de 3 cepas de expresión de *E. coli* competentes con las construcciones que codifican para las regiones amino, central y carboxilo de E1B.
- Expresión de las construcciones amino, central y carboxilo en cuatro cepas de expresión distintas.
- Determinar la cepa más adecuada para la expresión de cada construcción

5 Materiales y métodos

5.1 Células competentes

Se transfirió una colonia a 5mL de medio LB y se incubó a 37°C over night (O/N) con agitación (200rpm). Posteriormente se inocularon 100 mL de medio LB con 1 mL de cultivo en un matraz de 500mL y se incubó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 650 nm de 0.5. El cultivo se transfirió a tubos de 50mL estériles y se dejó enfriar en hielo durante 10 minutos. Se centrifugó a 1792g por 10min a 4°C. El pellet fue resuspendido en 30 mL de CaCl₂ 0.1M frío y se 15 min en hielo. Se centrifugó a 1792g por 10 min a 4°C y el pellet fue resuspendido en 2mL (1.6 mL CaCl₂ frío + 0.4 mL de glicerol) para su posterior almacenamiento a -80°C en alícuotas de 100µL.

5.2 Extracción de DNA plasmídico y cortes con enzimas de restricción

Mini Preps

Se centrifugaron 1.5 mL de cultivo bacteriano a 21,952g durante 5 min a 4°C, posteriormente se resuspendieron en solución I (50mM Dextrosa, 25 Mm Tris HCl pH 8, 10mM EDTA) y se incubó por 5 minutos a TA, se agregó la solución II (0.2 N NaOH, 1% SDS) a temperatura ambiente (TA), se mezcló por inversión y se incubó por 5 min. Se adicionó la solución III fría (Acetato de K⁺ 1.8M, 11.5% ácido acético, pH 4.8), se mezcló por inversión, se incubó 5 min a T.A. Se centrifugó a 21,952g 4°C durante 10 min. El sobrenadante se recuperó en tubos nuevos evitando el precipitado y se adicionó EtOH absoluto (2 volúmenes). Se centrifugó a 21,952g 4°C durante 10 min se retiró el sobrenadante y se agregó EtOH 70% (1.5 volúmenes), se mezcló por inversión hasta desprender el pellet, se centrifugó a 21,952g 4°C durante 10 min, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Por último, el pellet se resuspendió en TrisHCl 10mM pH 7.4. Para confirmar la presencia de DNA plasmídico se cargaron geles de agarosa 1% con 2µL de los 20

µL totales de la muestra y se corrió a 90 volts por 1 hora, el resto de la muestra se guardó a -20°C.

Una vez confirmada la extracción de DNA plasmídico las muestras se trataron con RNAsa A (10 mg/mL) para eliminar el RNA de las muestras 1 hora a 37°C, se inactivó la RNAsa a 65°C por 10 min y se cortó el DNA con *Xba*I y *Eco*RI durante 1 hr a 37°C. Finalmente se corrió un gel de agarosa 1% y se evaluó si las colonias obtenidas tenían el plásmido de interés.

5.3 Transformación de Bacterias

Se mezclaron 0.1µg de DNA plasmídico con 0.1mL de células competentes, se mantuvieron en hielo durante 10 minutos y posteriormente se dio un shock térmico a 42°C durante 2 minutos. Se agregó 1mL de medio LB y el cultivo se dejó creciendo una hora a 200 rpm a 37°C. Se centrifugó para obtener el pellet (16 segundos a 21,952g). El pellet fue resuspendido en 200µL de medio LB y se plateó en cajas Petri con LB+ Kanamicina (60µg/mL) y se incubó 16 hrs a 37°C.

5.4 Gliceroles

Para mantener el plásmido en las células transformadas y tener un stock para análisis posteriores se prepararon gliceroles. Para esto se usó una solución 50% glicerol, 50% LB. De un cultivo previamente crecido durante 16 horas, se tomó 1 mL, se centrifugó a 21,952g 4°C 5min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1mL de la solución glicerol/LB en hielo e inmediatamente después las muestras se llevaron a -80°C.

5.5 Prueba de expresión

Se inocularon 5 mL de medio LB+Kanamicina a partir de los stocks de glicerol y el cultivo se dejó creciendo durante 12 hrs. Se inocularon 5 mL con 500uL de los cultivos crecidos durante 12 horas (DO a 650 nm de 0.8) se crecieron a 37°C, 200rpm durante ~3 hrs hasta obtener una DO a 650 nm de 0.4 – 0.5. Antes de la adición de IPTG se obtuvo 1 mL del inóculo como control sin inducir y se agregó IPTG 1mM al resto del cultivo. El cultivo se incubó a 16, 25 y 30°C. Se tomó 1 mL de cada cultivo a las 1, 3, 4 y 5 horas post inducción para los cultivos incubados a 25 y 30°C y a las 3, 6, 9 y 12 horas post inducción para los cultivos incubados a 16°C. Cada alicuota se centrifugó inmediatamente a 1792g, 5 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y el pellet se lavó con PBS 1X centrifugando a 1792g durante 5 min. Las muestras se mantuvieron en frío para evitar la degradación de las proteínas en todo momento. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la muestra en 25µL de buffer de carga (Laemmli 2x: 125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol y 0.004% azul bromofenol) y se mantuvieron a -20°C hasta su evaluación por SDS-PAGE.

5.6 SDS-PAGE

La electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes se realizó con geles al 15% de poliacrilamida. Para cargar las muestras obtenidas después de

inducir con IPTG se le adicionó a cada muestra β -mercaptoetanol (10% v/v), cada muestra fue sonicada por un lapso de 30 segundos y posteriormente se calentaron las muestras a 95°C durante 10 min. Se centrifugaron las muestras a 21,952g por 5 minutos e inmediatamente después se cargaron 25 μ L de muestra en cada pozo. Los geles se corrieron a 10mA durante 30 minutos y posteriormente a 20mA por 30 min. Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie (10% v/v de ácido acético, 50% v/v metanol, 0.05% w/v azul de Coomassie y 40% v/v agua), posteriormente se destiñeron (80% v/v agua, 10% v/v metanol y 10% v/v ácido acético) y se observó el patrón de bandas de proteínas obtenido en cada caso.

6 Resultados y Discusión

6.1 Obtención de los plásmidos que contienen los genes que codifican para cada una de las regiones de E1B

Las secuencias de cada una de las regiones del gen de E1B que fueron clonadas en los plásmidos pET27 b (+) se verificaron anteriormente (Cardenas, R. No publicado). Una vez verificada la secuencia, se utilizaron dichos plásmidos para transformar a la cepa DH5 α . Esta cepa se usa para mantener los plásmidos ya que es *recA*⁻ *endA*⁻ y este genotipo evita la recombinación (Novagen, 1999). Se aislaron los plásmidos de las colonias seleccionadas de DH5 α mediante minPrep y se verificaron mediante cortes con *Xba*I y *Eco*RI. Los patrones de restricción esperados son como los que se muestran en la Figura 7.

Cada una de las muestras de los paneles a y b de la Figura 7 se obtuvieron de tomar tres ocasiones un volumen de 1.5mL del total de 5 mL de cultivo O.N de la cepa DH5 α transformada con cada una de las construcciones. A cada muestra de 1.5 mL se le realizó el procedimiento de miniPrep descrito en la sección de materiales y métodos de manera independiente. Debido a que los patrones de migración obtenidos eran distintos en las muestras correspondientes al DNA de la región central de E1B, estos se cortaron de manera independiente mientras que el resto de las muestras que tenían un patrón de migración idéntico se juntaron y se cortaron.

En cada caso, los patrones de restricción obtenidos fueron una banda de 5281 bp correspondiente al plásmido y fragmentos de 570 bp, 847 bp y 472 bp correspondientes de manera respectiva a los fragmentos del gen que codifican para la región amino terminal, la región central y la región carboxilo terminal de la proteína adenoviral E1B.

De forma concluyente se obtuvieron y confirmaron cada uno de los plásmidos que codifican a las regiones correspondientes de E1B en la cepa de mantenimiento DH5 α

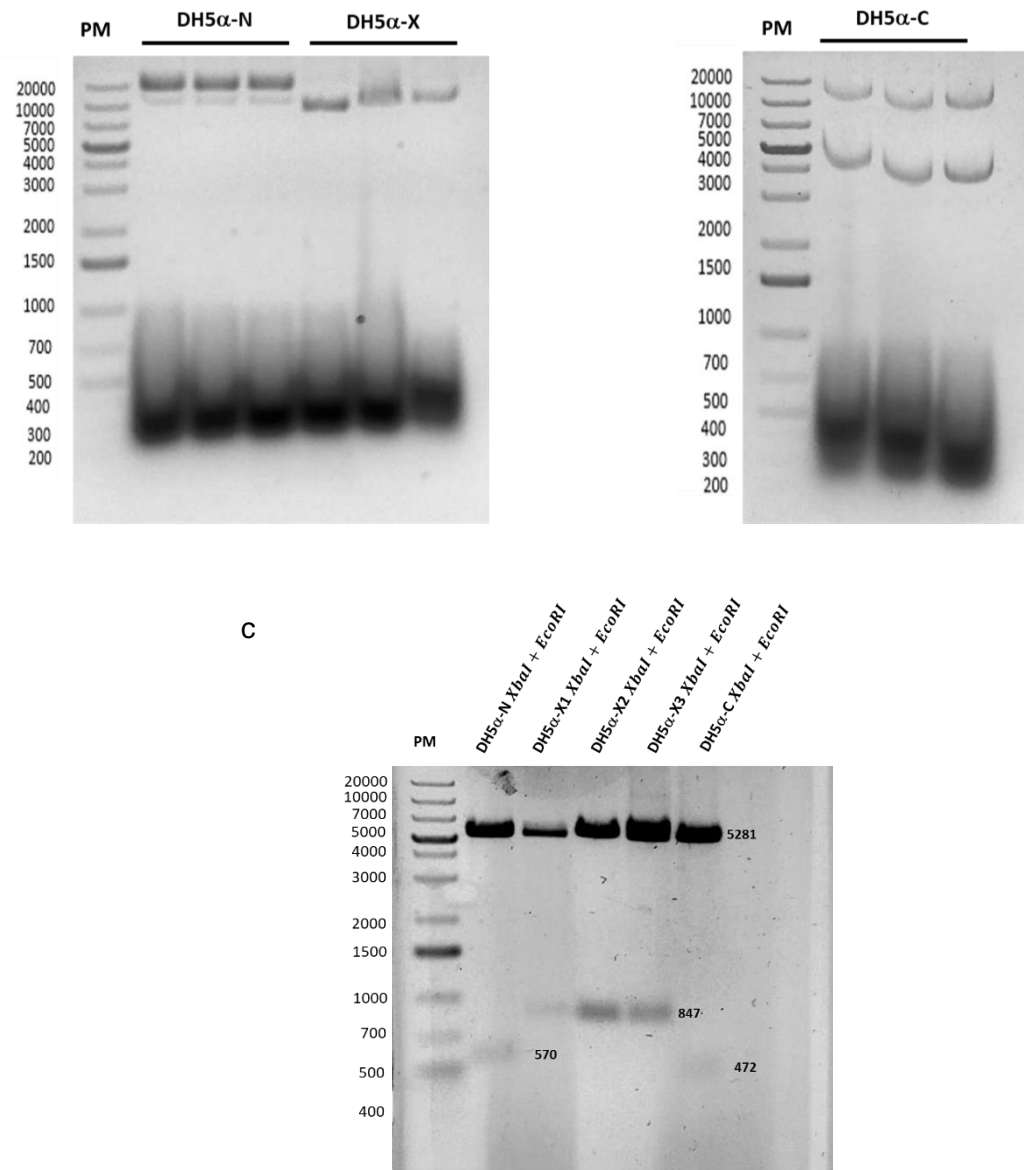


Figura 7 Miniprep y cortes con enzimas de restricción del DNA obtenido de la cepa DH5 α transformada con las construcciones para cada una de las regiones de E1B-55kDa. Panel a amino (N), central (X) y panel b carboxilo (C). Panel c Digestiones de plásmidos con cada una de las construcciones, se muestra en el primer carril el marcador de peso molecular (PM) y en el resto de los carriles los fragmentos esperados para cada una de las construcciones.

6.2 Transformación de las cepas de expresión

Una vez verificados los patrones de digestión de los plásmidos obtenidos de la cepa DH5 α transformada con cada una de las construcciones de E1B, se prosiguió a transformar cada una de las cepas de expresión con las construcciones verificadas.

Se monitoreó tanto el número de colonias que crecieron como el tamaño y apariencia en cada una de las cepas transformadas con las tres construcciones (Figura 8). Esto con el objetivo de obtener colonias positivas para el resto de los experimentos y adicionalmente, determinar la eficiencia de transformación de cada una de las construcciones en cada una de las cepas. Para esto se platearon 1/10 y 9/10 de las células transformadas en cajas Petri y se incubaron por 16 horas para obtener colonias. Transcurridas las 16 horas se contó y registró el número de colonias obtenidas en las cajas plateadas con 1/10 de las bacterias transformadas y se clasificaron de acuerdo con su tamaño en colonias pequeñas y grandes para posteriormente obtener eficiencias de transformación (Tabla 3).

En el caso de BL21 se obtuvieron colonias grandes traslucidas y colonias de menor tamaño obtenidas al comparar entre cepas. El tamaño tan reducido de las colonias pequeñas de BL21 podría interpretarse como una consecuencia de la alta carga metabólica que presentan dichas bacterias, si bien BL21 es una cepa que ha sido utilizada en muchos casos para la expresión exitosa de proteínas heterólogas (Novagen, 1999) esta parece presentar deficiencias en su crecimiento si es transformada con las construcciones que codifican para la región amino, central y carboxilo de E1B.

Las colonias pequeñas de BL21 no fueron picables y por tanto no se evaluaron durante estos ensayos, sin embargo, resultaría interesante dejarlas crecer durante un mayor número de horas hasta que alcancen el tamaño suficiente para poder cultivarse y entonces analizar si tienen plásmido y si es posible expresar la proteína.

En el caso de las colonias obtenidas para C41. Se obtuvieron colonias pequeñas y grandes. Las pequeñas en el caso de esta cepa tuvieron el tamaño suficiente para poder ser picadas y cultivadas. En cuanto a su apariencia, presentaron mayor opacidad y claridad que las colonias grandes con apariencia similar entre las tres cepas.

Finalmente, las colonias obtenidas en la transformación de C43, fueron colonias únicamente de tamaño grande y de mayor tamaño al comparar con las colonias obtenidas tanto en células BL21 como en C41 transformadas. El hecho de que solo se presenten colonias grandes en C43 podría sugerir que, debido a sus características, la cepa C43 presenta menor restricción en su crecimiento al ser transformada con los plásmidos que contienen las construcciones para E1B y por tanto la cepa C43 podría ser la más adecuada para la expresión de la proteína de interés.

Los números obtenidos de la eficiencia de transformación en cada una de las cepas transformada con cada una de las construcciones, mostraron que no existen diferencias mayores de tres veces entre dichas eficiencias de transformación.

Amino

Central

Carboxilo

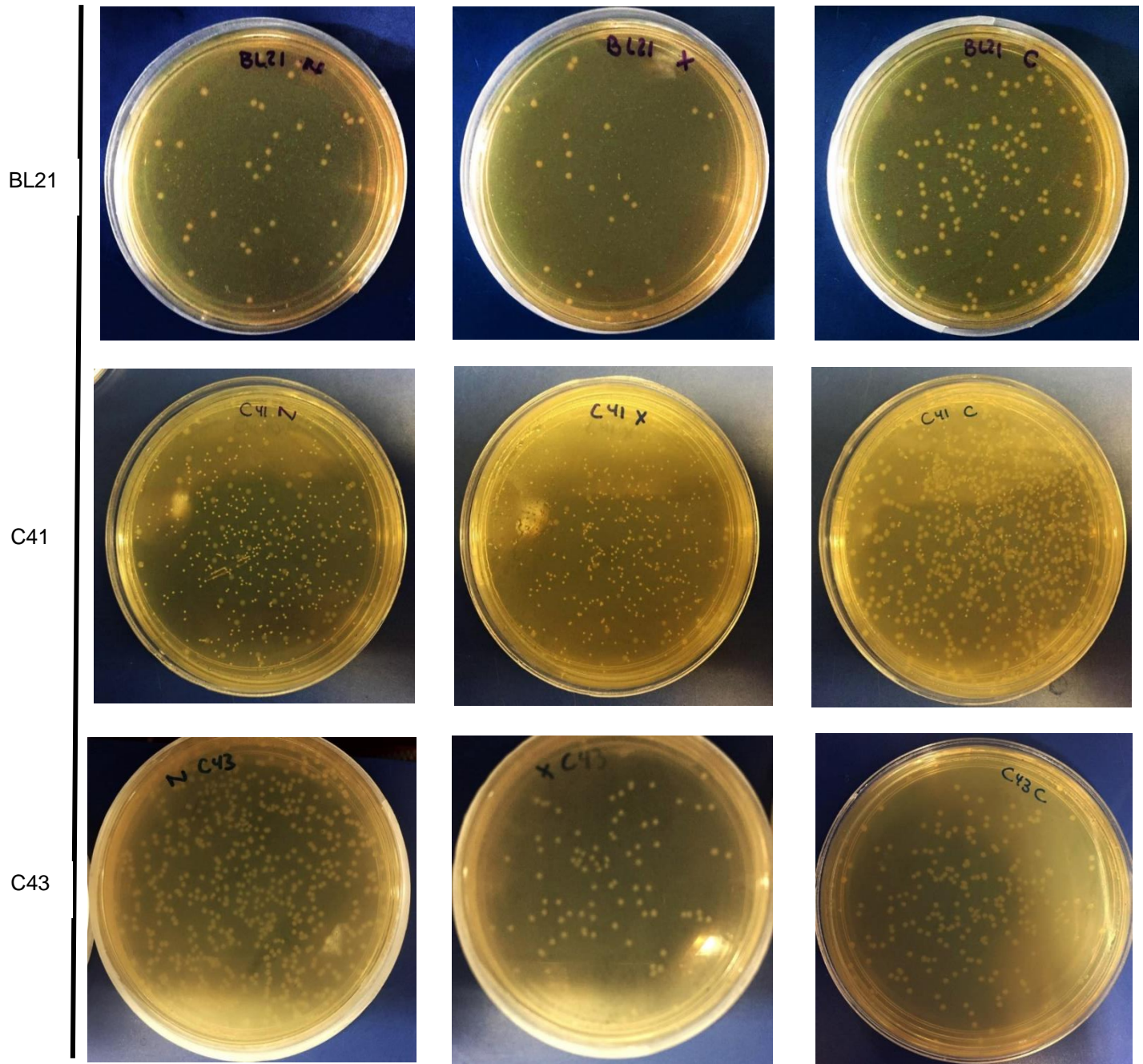


Figura 8 Tipos y tamaños de colonias obtenidas tras la transformación de BL21, C41 y C43 con cada una de las construcciones de las regiones de E1B-55kDa. Se transformaron 0.1mL de bacterias con 0.1 μ g de DNA de cada construcción. Se plateó en cada caso 20 μ L del cultivo obtenido después de una hora de cultivo a 37°C y 200rpm de agitación del cultivo transformado. La figura muestra las colonias presentes 16 horas post-plateo. Se muestra de izquierda a derecha las colonias presentes tras 16 horas de incubación en cajas Petri con 1/10 de la muestra de células transformadas con los plásmidos que tienen las construcciones que codifican para las regiones amino (N), central (X) y carboxilo (C).

Cepa/ Construcción	N			X			C		
No. De Colonias									
	pequeñas	grandes	Total	pequeñas	grandes	Total	pequeñas	grandes	Total
BL21	132	33	165	327	24	351	123	114	237
C41	206	77	283	186	33	219	149	390	539
C43	N/A	475	475	N/A	97	97	N/A	177	177
Eficiencia de transformación									
			16500			35100			23700
# cel. Transformadas por µg de DNA =			28300			21900			53900
			47500			9700			17700

Tabla 3 Número de colonias y eficiencia de transformación para las cepas de expresión transformadas con las construcciones de E1B-55kDa. Se encuentra representado el número de colonias obtenido para cada construcción en cada una de las cepas. Los datos en color gris corresponden a las colonias obtenidas de células transformadas con la construcción de la región amino de E1B-55kDa, los datos en color azul corresponden a las transformantes con la construcción de la región central y los datos en color verde corresponden a las colonias obtenidas tras la transformación con la construcción correspondiente a la región carboxilo de E1B-55kDa. Debajo del total de colonias obtenidas se muestra la eficiencia de transformación para cada una de ellas. Este número se obtuvo de multiplicar el total de colonias por dos factores. El primer factor corresponde a la fracción de células plateadas del total de la muestra y el segundo corresponde a la fracción de DNA con la que se transformó el cultivo.

En términos de las eficiencias de transformación obtenidas, no fueron altas en ninguno de los casos, pero si suficientes para obtener colonias y evaluar en dichas colonias la presencia del plásmido con la construcción de interés.

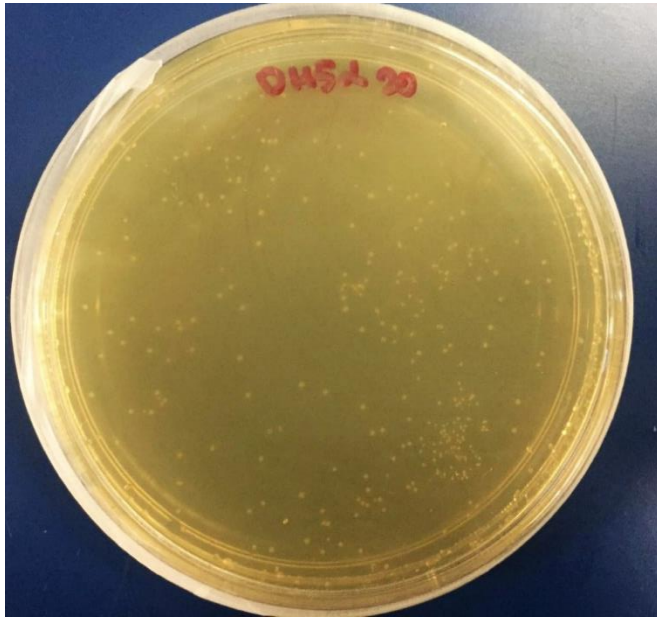
Con la finalidad de tener un control de la eficiencia de transformación del stock de bacterias utilizadas. Se transformaron todas las cepas utilizadas con el plásmido vacío pCDNA 3.0 HA. Este plásmido se utiliza ampliamente en laboratorio y tiene un tamaño de 5428 bp, que es similar al plásmido pET27b (+) que tiene 5414 bp. Una de las diferencias relevantes es que el plásmido pCDNA tiene resistencia a Ampicilina, así que fueron preparadas cajas con agar a una concentración de 100 µg/mL de Ampicilina.

En cuanto al tamaño y apariencia de las colonias obtenidas, estas fueron similares a las colonias grandes obtenidas para las cepas transformadas con las construcciones de E1B (Figura 9).

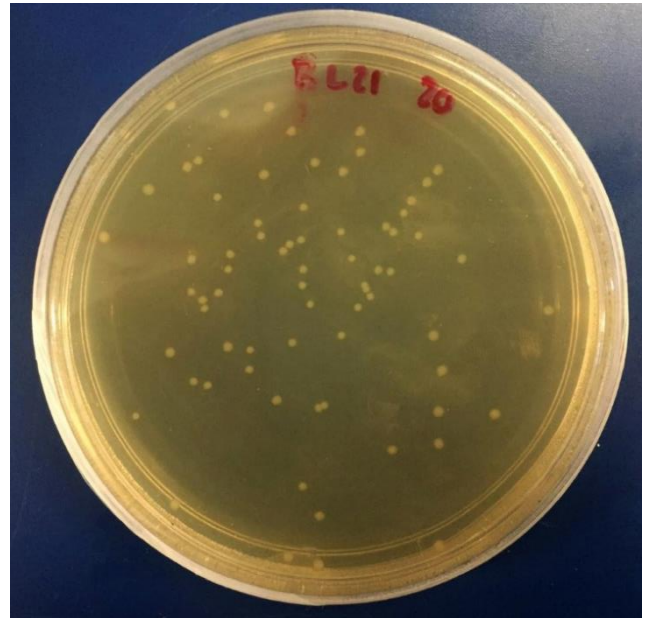
Por otro parte, las eficiencias de transformación obtenidas con el plásmido vacío pCDNA fueron en promedio diez veces menores que las obtenidas previamente con las construcciones con el plásmido pET27b (+) que codifican a las regiones de E1B (Tabla 4). Si bien, esta es una proporción no esperada, se sugiere que la eficiencia de transformación de las construcciones en los pET27b (+) no se encuentra muy por debajo de la eficiencia que se espera con algún otro plásmido con características similares y como se mencionó anteriormente, aunque no es particularmente alta, este proceso no parece ser determinante para obtener colonias que expresen las proteínas de interés.

pCDNA

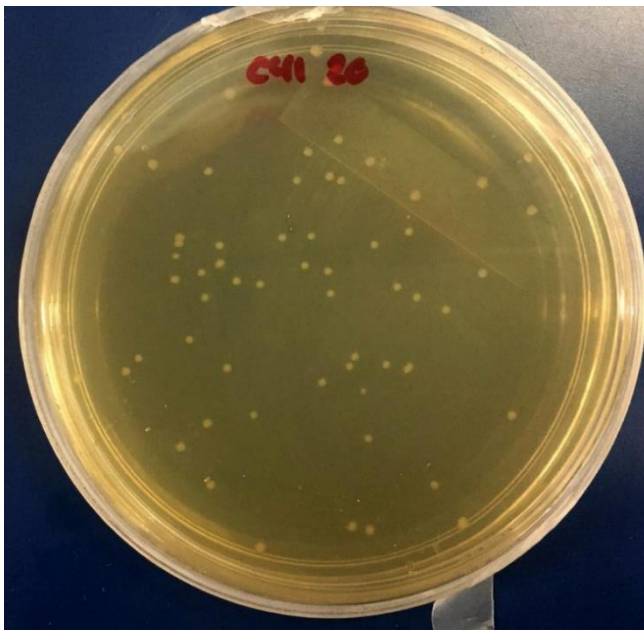
DH5 α



BL21



C41



C43

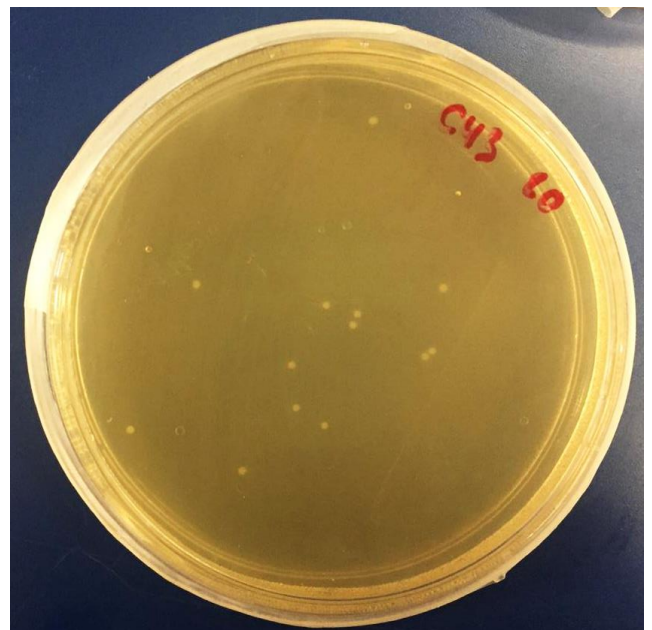


Figura 9 Colonias obtenidas tras la transformación de DH5 α , BL21, C41 y C43 con el plásmido pCDNA. Se transformaron 0.1 μ L de bacterias con 0.1 μ g de DNA. Se plateó en cada caso 20 μ L de 200 μ L del cultivo resuspendido, obtenido después de una hora de cultivo a 37°C y 200rpm de agitación del cultivo transformado. La figura muestra las colonias presentes 16 horas post-plateo de una proporción 1/10 de la muestra de bacterias transformadas con pCDNA y plateadas en cajas Petri con ampicilina (100 μ g/mL) La cepa utilizada se muestra en color rojo en cada caso.

Cepa	pCDNA			Eficiencia de transformación		
	No. de Colonias					
				# cel. Transformadas por μg de DNA =		
DH5 α		251			25100	
BL21		72			7200	
C41		58			5800	
C43		13			1300	

Tabla 4 Número de colonias y eficiencia de transformación de las cepas de mantenimiento y expresión transformadas con pCDNA. Se encuentra representado el número de colonias obtenido para cada una de las cepas. Los datos en los recuadros de color blanco corresponden a las colonias obtenidas de células transformadas con el plásmido pCDNA 3.0 HA en cada una de las cepas utilizadas durante los ensayos de transformación. Del lado derecho de las colonias obtenidas se muestra la eficiencia de transformación para cada una de ellas. Este número se obtuvo de multiplicar el total de colonias por dos factores. El primer factor de 10 corresponde a la fracción de células plateadas del total de la muestra y el segundo, igualmente de 10, corresponde a la fracción de DNA con la que se transformó el cultivo.

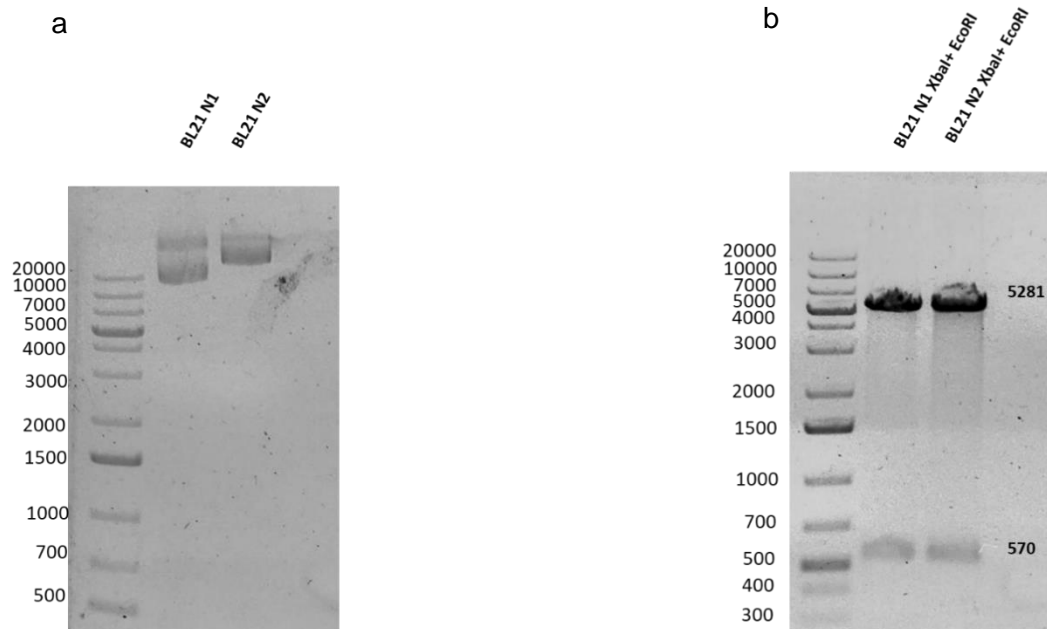
Una vez transformadas las cepas de expresión con los plásmidos que contienen las construcciones que corresponden a las regiones de residuos amino terminal (1-146) central (147-384) y carboxilo terminal (385-496) de la proteína E1B se procedió a aislar DNA plasmídico mediante miniPREP por lisis alcalina y simultáneamente se hicieron gliceroles como se describe en la sección de materiales y métodos, con el fin de tener muestras con las cuales trabajar una vez confirmado que la colonia de la que provenían tuviera el plásmido con el inserto.

En cada caso se picaron dos colonias pequeñas y dos colonias grandes (en el caso de C43 únicamente aplican las colonias grandes) y con cada muestra se confirmó la obtención de DNA plasmídico al correr 1/10 de la muestra total en un gel de agarosa. Posteriormente se trató la muestra con RNAsa y seguido a este tratamiento se hicieron cortes con las enzimas XbaI y EcoRI siguiendo el protocolo establecido en materiales y métodos.

Para cada corte con las enzimas de restricción se esperaba una banda de 5281 bp correspondiente al plásmido linearizado y dependiendo de cada caso una banda de 570bp correspondiente a la región de E1B amino terminal, una de 847bp para la región central y una banda de 472 bp para la región carboxilo terminal.

En todos los casos se obtuvieron colonias positivas (Figura 10). Las colonias con los plásmidos confirmados en su mayoría eran colonias grandes, excepto para la cepa C41 en la que la colonia confirmada para la construcción amino terminal fue una colonia pequeña.

Los datos vuelven a sugerir que la cepa más adecuada para la producción de los péptidos de la proteína viral E1B es C43, en todos los casos se produjo el mayor número de colonias grandes en esta cepa y además se confirmó que dichas colonias son positivas y contienen el plásmido con la construcción de interés.



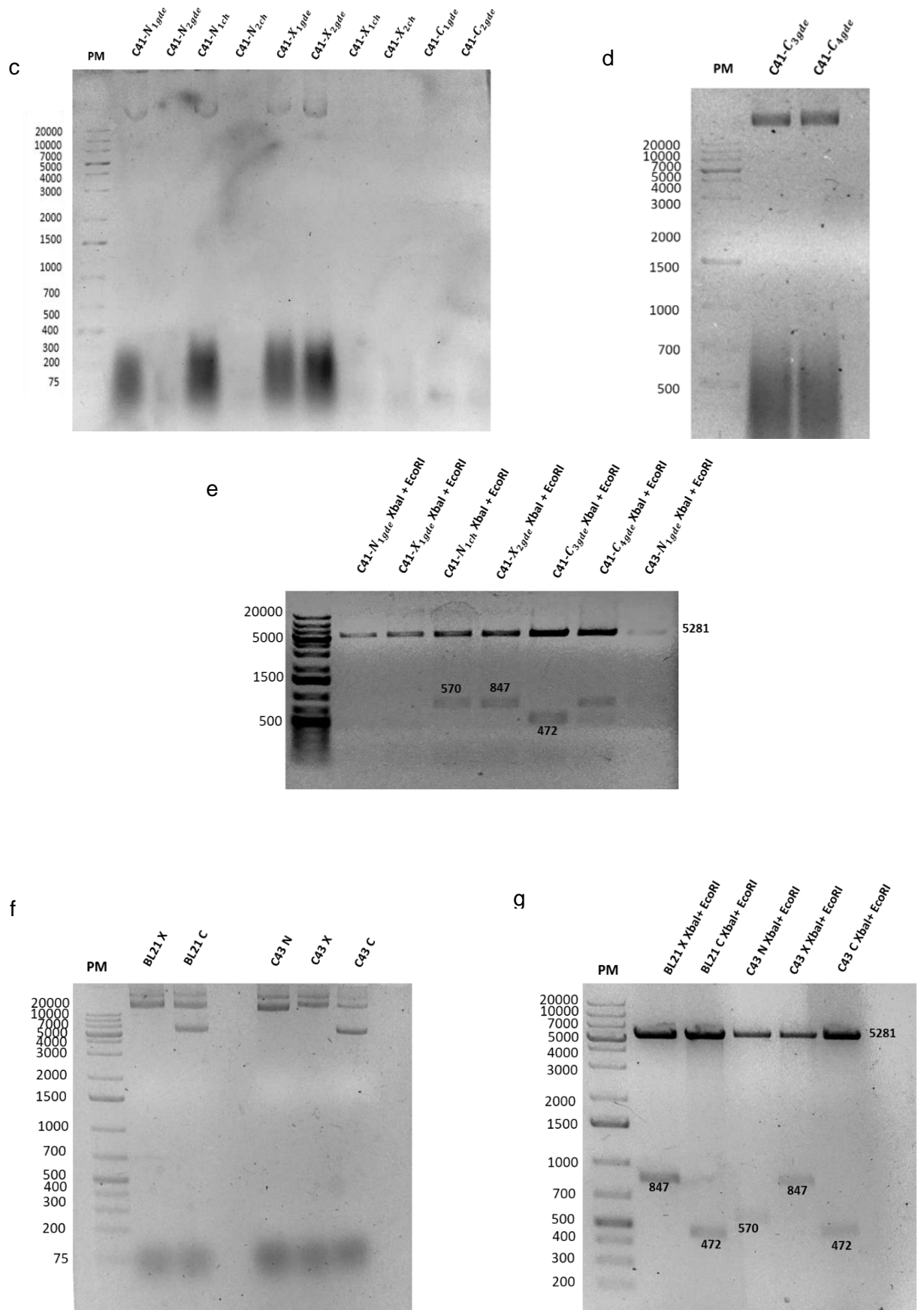


Figura 10 DNA obtenido a partir de MiniPrep y los patrones de restricción de las cepas de expresión transformadas con las construcciones de E1B-55kDa. Se muestra la obtención de plásmido para las colonias picadas de los cultivos de cada cepa transformados con cada una de las construcciones de E1B-55kDa seguido del patrón de digestión con los respectivos tamaños de bandas obtenidas de aquellas colonias positivas para DNA para confirmar que el DNA obtenido fuera el del plásmido con la construcción de interés. En los paneles a y b se presentan las muestras correspondientes a la cepa BL21 transformada con la región amino de E1B-55kDa. En los paneles c, d, e las muestras correspondientes a la cepa C41 transformada con cada una de las construcciones y en los paneles f, g las muestras correspondientes a la cepa C43 transformada con cada una de las construcciones de E1B-55kDa y la cepa BL21 transformada con las regiones central y carboxilo.

6.3 Expresión de las regiones de E1B determinadas mediante SDS-PAGE

Se hicieron pruebas de expresión para determinar si los polipéptidos de interés se produjeron. En cada prueba se siguió el procedimiento descrito en materiales y métodos. En todos los casos las pruebas iniciaron a partir de los gliceroles de cada una de las cepas confirmadas para cada construcción de E1B. Adicionalmente, se crecieron las cepas sin plásmido (vacías) esto con el fin de usar el patrón de bandas obtenido como referencia. Una vez procesadas las muestras obtenidas, se cargaron geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y se evaluó tanto la presencia de la banda esperada como el tiempo al cuál la proteína se producía de manera más eficiente.

Sin embargo, en ninguna de las cepas, bajo ninguna de las condiciones evaluadas se logró distinguir una banda que pudiera corresponder a alguno de los polipéptidos de interés tras la inducción con IPTG (Figuras 11, 12 y 13). Los tamaños de banda esperados para las construcciones eran de 15 kDa (146 aminoácidos) para la región amino, de 25 kDa (237 aminoácidos) para la región central y de 13 kDa (111 aminoácidos) para la región carboxilo de E1B. En algunos casos, se puede ver en los geles de las distintas cepas transformadas, bandas del tamaño esperado de las construcciones, sin embargo, las bandas también están en los geles de las muestras de las cepas sin plásmido. Si bien el péptido de interés puede coincidir con el tamaño de una proteína bacteriana, al ser inducido se espera que aumente el grosor de dicha banda, pero al no ver cambios en el grosor se descarta por el momento que las bandas observadas sean alguno de los péptidos correspondientes a E1B.

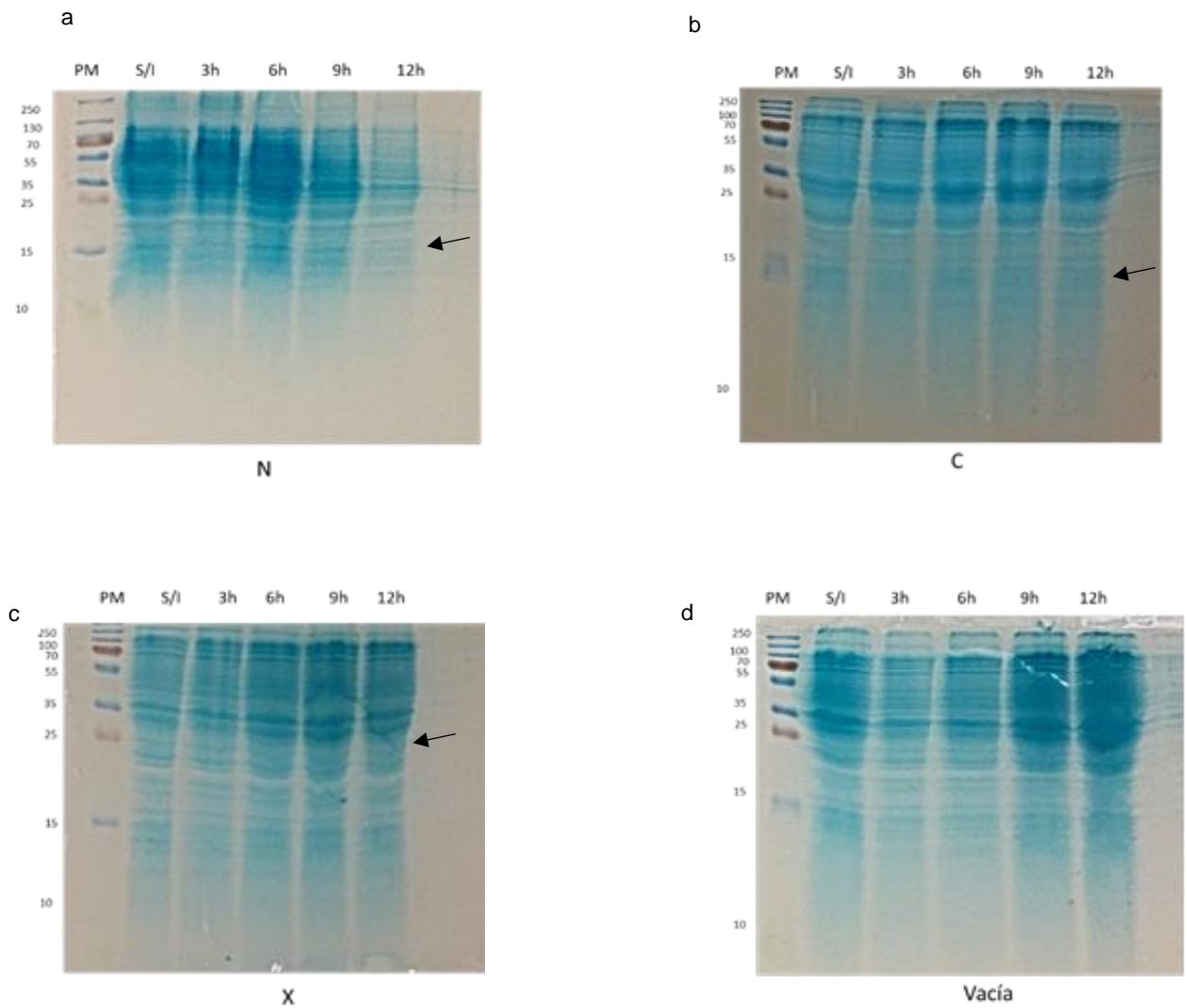


Figura 11 Patrones de bandas de proteínas en geles de Acrilamida de las distintas construcciones y temperaturas probadas con la cepa BL21. Las flechas muestran la región en donde se espera observar cada una de las construcciones de E1B-55kDa. En los paneles a, b se muestran los patrones de bandas de proteínas obtenidos para BL21 transformada con la construcción de la región amino (N) y la región carboxilo (C) a 16°C, en los paneles c, d se muestran los geles correspondientes a la proteína obtenida a partir del cultivo de la cepa BL21 transformada con el plásmido que contiene la región central (X) y de BL21 sin plásmido a 16°C respectivamente.

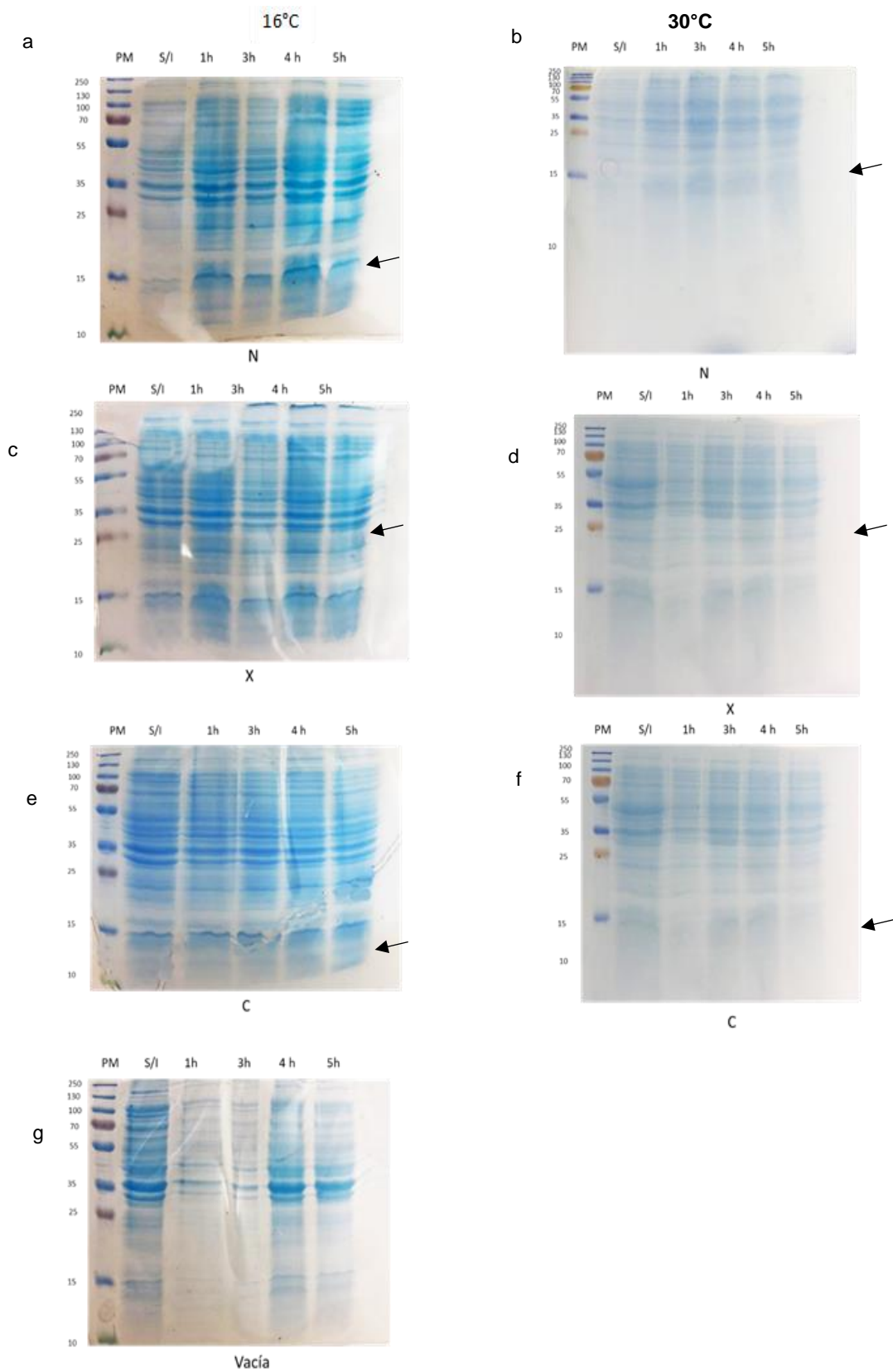


Figura 12 Geles de Acrilamida donde se muestra el patrón de bandas de proteína de las distintas construcciones y temperaturas evaluadas con la cepa C41. Las flechas muestran la región en donde se espera observar cada una de las construcciones de E1B-55kDa. En los paneles a, b se muestran los patrones de proteínas obtenidos para C41 transformada con la construcción de la región amino (N) en las pruebas de expresión de las temperaturas 16° y 30 C° respectivamente. En los paneles c, d se muestran los patrones de bandas obtenidos para la construcción de la región central (X) a 16° y 30 C°, en los paneles e, f se muestran los geles de C41 transformada con el plásmido que contiene la región carboxilo (C) de E1B-55kDa a 16° y 30 C° y en el panel g se muestra el gel de C41 sin plásmido para 16 °C.

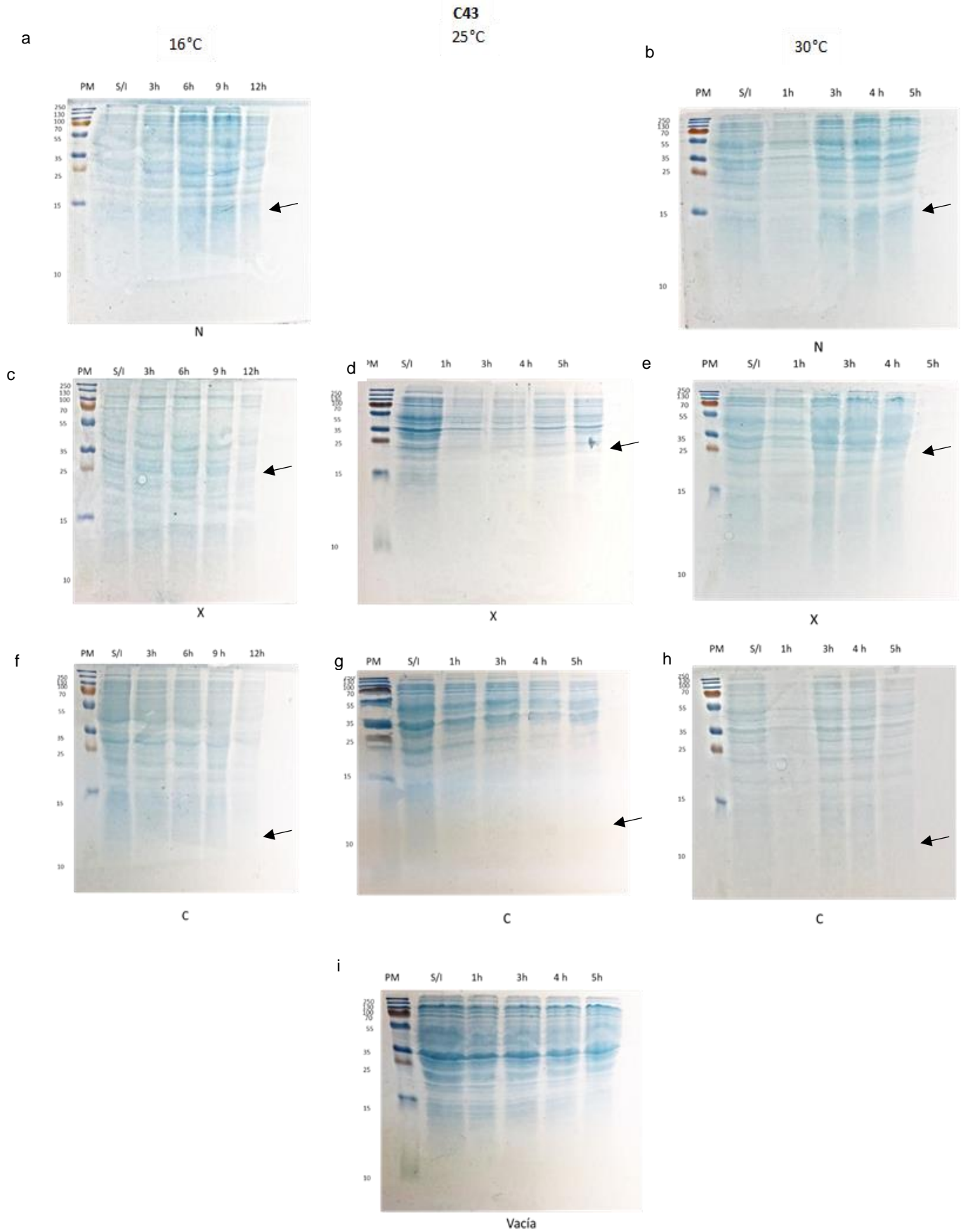


Figura 13 Geles de Acrilamida donde se muestra el patrón de bandas de proteína de las distintas construcciones y temperaturas evaluadas para C43. Las flechas muestran la región en donde se espera observar cada una de las construcciones de E1B-55kDa. En los paneles a, b se muestran los patrones de proteínas obtenidos para C43 transformada con la construcción amino (N) en las pruebas de expresión de las temperaturas 16° y 30 C° respectivamente. En los paneles c, d, e se muestran los patrones de bandas obtenidos para la construcción central (X) a 16°, 25° y 30 C°, en los paneles f, g, h se muestran los geles de C43 transformada con el plásmido que contiene la región carboxilo (C) de E1B-55kDa a 16°, 25° y 30 C° y en el panel i se muestra el gel de C43 sin plásmido a 25 C°.

Al no ver expresión en los geles de acrilamida, se hicieron pruebas adicionales. En primer lugar, se realizó una prueba para determinar si a lo largo del cultivo O.N de 12 hrs el plásmido se perdía. La segunda prueba consistió en seguir el crecimiento del cultivo durante una prueba de expresión mediante mediciones de D.O para determinar si la ausencia de la proteína podía estar relacionada a deficiencias de crecimiento una vez se inducía el cultivo y finalmente relacionado al crecimiento, una prueba de pérdida de resistencia a Kanamicina relacionada una vez más a la pérdida del plásmido, pero tras ser inducida la expresión de dicho plásmido en cultivo.

Para la prueba de pérdida de plásmido, los datos obtenidos para la cepa de clonación DH5 α se muestran en la Figura 14. Se tomaron muestras a las 6, 9 y 12 horas de cultivo líquido en medio LB+ Kanamicina a partir de los gliceroles de DH5 α confirmados para cada una de las construcciones de E1B y se realizó el procesamiento siguiendo lo establecido en la sección de materiales y métodos.

La figura 15 en los paneles a y b muestra el DNA obtenido a lo largo del tiempo del cultivo de la cepa DH5 α . La cantidad de DNA tiende a aumentar conforme pasa el tiempo de cultivo lo que correlaciona con que la cantidad de bacterias igualmente aumenta. Tenemos la mayor cantidad de DNA a las 12 horas de cultivo y es con cada una de las muestras de 12 horas donde podemos ver en el panel c los patrones de restricción esperados para cada una de las construcciones. Lo que indica que en DH5 α no se pierde el plásmido tras el cultivo O.N de 12 horas.

Los resultados no fueron concluyentes para las cepas de expresión ya que la cantidad de DNA obtenida era escasa y esto impedía el análisis posterior de los patrones de restricción (datos no mostrados).

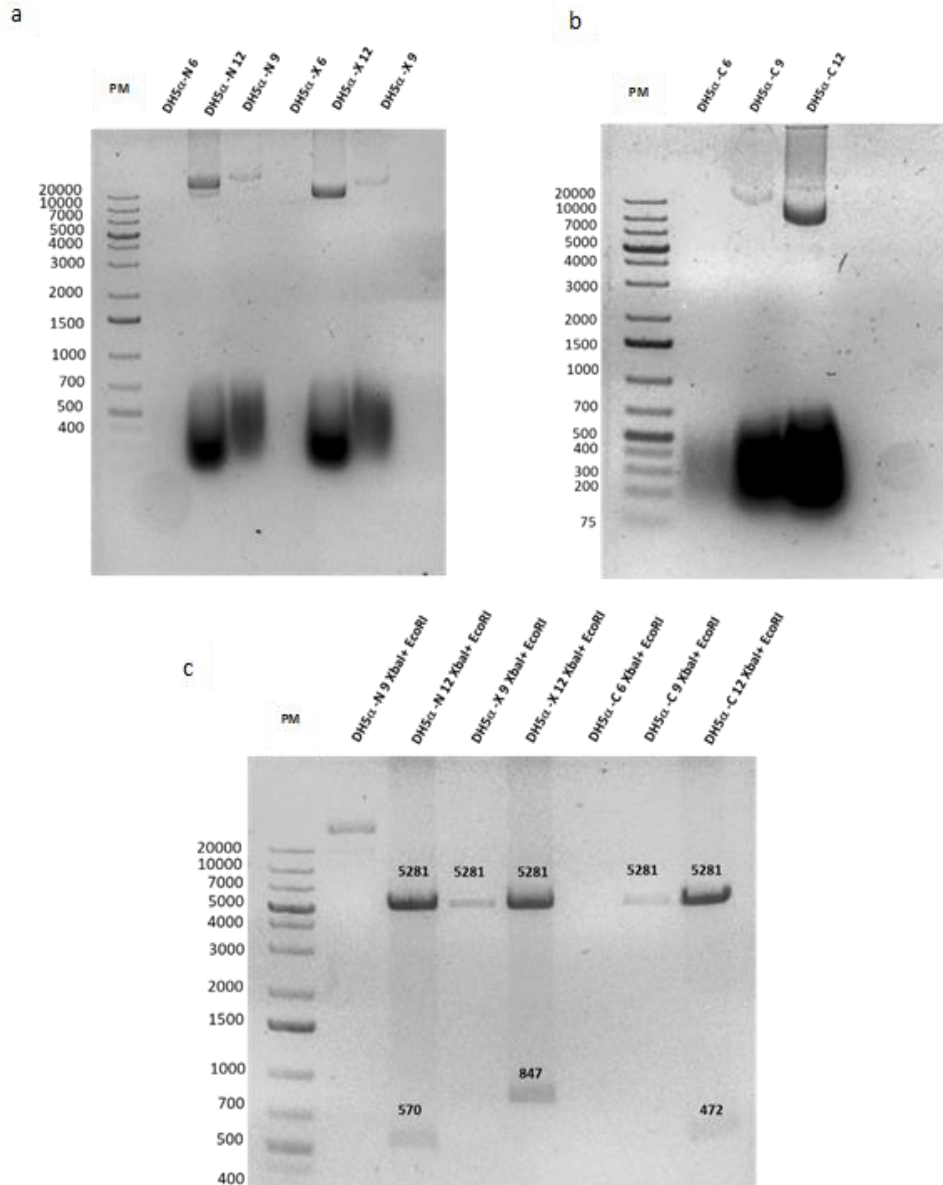


Figura 14 DNA obtenido a partir de MiniPrep y los patrones de restricción de la cepa DH5 α transformada con las construcciones de E1B-55kDa a lo largo de un cultivo de 12 horas sin inducción con IPTG. Esta prueba se llevó a cabo en cultivos de DH5 α transformados con cada una de las construcciones que codifican para las distintas regiones de E1B-55 KDa. Se cultivó durante 16 horas a 200rpm y 37°C. En el panel a se muestran las primeras tres muestras obtenidas de un miniPREP correspondientes a los tiempos 6, 12 y 9h del cultivo transformado con la construcción amino terminal (N) de E1B-55KDa. Las siguientes tres muestras del panel a corresponden a los mismos tiempos de 6, 12 y 9 horas del cultivo correspondiente a DH5 α transformada con el plásmido que codifica para la región central (X) de E1B-55 KDa. En el panel b se muestran las muestras de DNA obtenidas tras 6, 9 y 12 horas de cultivo de la cepa que contiene la construcción carboxilo terminal de E1B-55 KDa. En el panel c se muestran las digestiones con XbaI y EcoRI correspondientes a las muestras de los dos paneles superiores en el siguiente orden indicado en la parte superior de cada carril.

Durante las pruebas para seguir el crecimiento del cultivo bacteriano, las mediciones se hicieron en una única ocasión y se usó medio LB como el blanco de lectura una única vez al principio de las mediciones de D.O. Los datos obtenidos son preliminares, pero en algunos casos nos sirve para observar las tendencias de crecimiento de las cepas transformadas con cada una de las construcciones de E1B. Cabe destacar que las mediciones deben hacerse con mayor cuidado y que los cultivos deben de comenzar en la misma D.O. para poder compararlos.

De las tendencias de crecimiento que se muestran en la Figura 15 podemos destacar que como se espera, a 16°C se muestra el menor crecimiento de manera generalizada en todas las cepas, esto se relaciona con la disminución en la tasa metabólica de la bacteria y por tanto en la tasa de crecimiento.

Se sugiere toxicidad al inducir la producción de la región amino (N) de E1B ya que el crecimiento bacteriano es menor que con el resto de las construcciones bajo las condiciones evaluadas (excepto para C41 y C43 inducidas a 30°C), sin embargo, esto tendría que confirmarse.

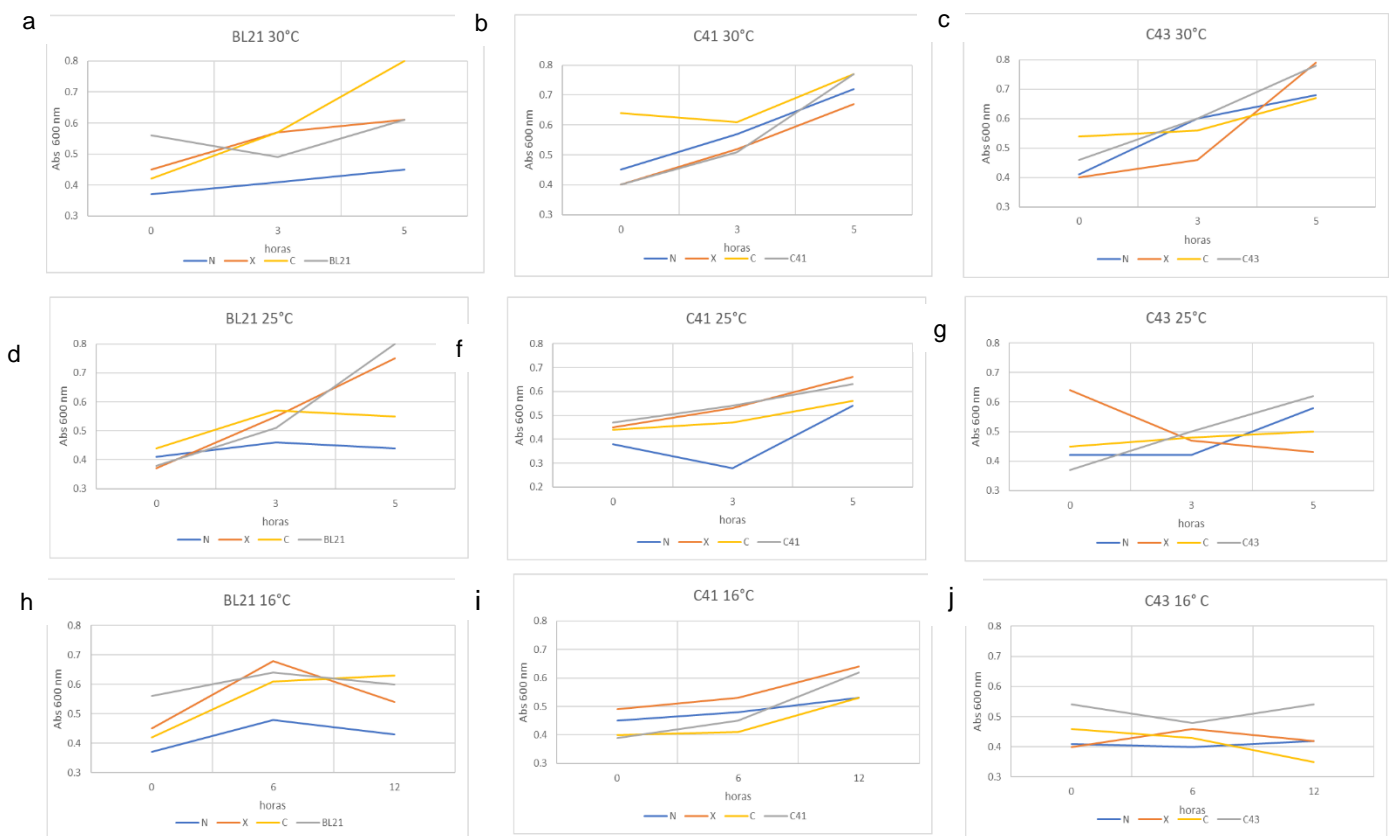


Figura 15 Seguimiento del crecimiento de cultivos inducidos con IPTG. Se realizó un único ensayo de medición de D.O con cada una de las cepas a cada una de las temperaturas evaluadas durante pruebas de inducción con 1mM de IPTG a 200 rpm. En todos los casos las lecturas a 600 nm fueron obtenidas de manera secuencial para cada cepa tomando la lectura del medio como blanco durante una única ocasión al inicio de la lectura del set de muestras correspondiente a dicho tiempo. Los paneles a, b, c muestran las lecturas de D.O a 600 nm obtenidas a las 0, 3 y 5 horas post inducción a 30°C de las cepas BL21, C41 y C43 respectivamente. Los paneles d, e, f muestran las D.O a 600 nm obtenidas a las 0, 3 y 5 horas post inducción a 25°C de las cepas BL21, C41 y C43 respectivamente y los paneles g, h, i muestran las D.O a 600 nm obtenidas a las 0, 3 y 5 horas post inducción a 16°C de las cepas BL21, C41 y C43 respectivamente.

Las condiciones establecidas para la prueba de crecimiento con y sin Kanamicina de los cultivos inducidos con IPTG fueron 25°C, 200 rpm y las muestras al igual que en el apartado anterior se tomaron a las 0, 3 y 5 horas post inducción con 1 mM de IPTG.

Cabe destacar que mediante estos experimentos no se puede discernir entre las posibilidades de toxicidad por expresión, percibida como la muerte del cultivo o si la tasa de división disminuye debido a la carga metabólica que representa el plásmido.

Los datos mostrados en la Figura 16, para el cultivo de BL21 transformada con cada una de las construcciones, muestran que durante las primeras 3 horas de cultivo la diferencia de D.O entre los cultivos con y sin Kanamicina parece no ser significativa, sin embargo, esta diferencia se vuelve mayor durante las siguientes dos horas de cultivo correspondientes al intervalo de 3 a 5 horas mostrado en la figura.

Esto podría estar relacionado a que la población que crece en ausencia del antibiótico, es decir, sin la presión de selección, esté perdiendo el plásmido. Si se contrasta con la población que crece en presencia de Kanamicina y que tiene el plásmido, la carga metabólica es mayor y el crecimiento es más lento. Otra posibilidad es que se esté induciendo la expresión del fragmento y por tanto la expresión de la construcción que corresponde a la región amino terminal de E1B, limitando el crecimiento debido a su toxicidad.

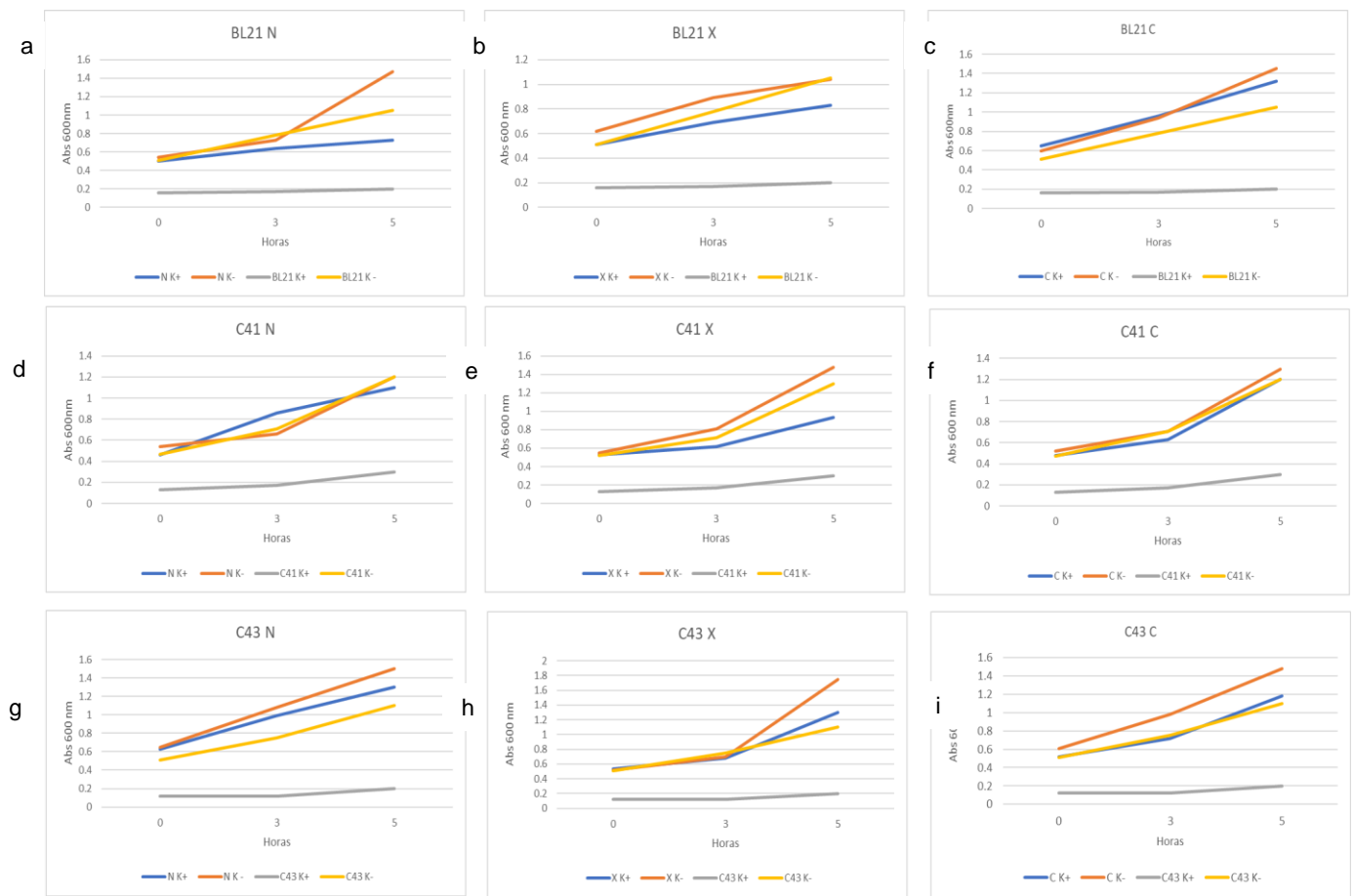


Figura 16 Crecimiento de cultivo inducido en presencia y ausencia de antibiótico. Se realizó un único ensayo de medición de D.O con cada una de las cepas a cada una de las temperaturas evaluadas durante pruebas de inducción con 1mM de IPTG a 200 rpm y 25°C. En todos los casos las lecturas a 600 nm fueron obtenidas de manera secuencial para cada cepa tomando la lectura del medio LB como blanco al inicio de la lectura de cada muestra. En cada caso las líneas color azul corresponden a las cepas con la construcción crecidas durante la prueba en presencia de antibiótico, las líneas naranjas corresponden a las cepas con la construcción crecida en ausencia de antibiótico, las líneas grises corresponden a las cepas vacías crecidas en presencia de antibiótico y las líneas amarillas corresponde a las cepas vacías crecidas en ausencia de antibiótico. Los paneles a, b, c muestran las lecturas de D.O a 600 nm obtenidas a las 0, 3 y 5 horas post inducción de la cepa BL21 con las construcciones con la región amino (N), región central (X) y región carboxilo (C) de E1B-55kDa. Los paneles d, e, f muestran las D.O a 600 nm obtenidas a las 0, 3 y 5 horas post inducción de la cepa C41 con las construcciones con la región amino (N), la región central (X) y la región carboxilo (C) y los paneles g, h, i muestran las D.O a 600 nm obtenidas a las 0, 3 y 5 horas post inducción de la cepa C43 con las construcciones con la región amino (N), la región central (X) y la región carboxilo (C) de E1B-55kDa.

7 Perspectivas

Con la información obtenida podemos proponer posibles soluciones para lograr expresar los tres fragmentos de E1B mediante la búsqueda de condiciones en las que la expresión de cada construcción pueda ser optimizada:

- Determinar el tiempo de duplicación de cada cepa para establecer condiciones de cultivo adecuadas en cada caso.
- Verificar que el plásmido no se esté perdiendo a lo largo de los cultivos líquidos de las cepas de expresión, tanto previo a la prueba de expresión, como durante la misma

- Mediante la búsqueda de mensajeros en diferentes tiempos de cultivo se puede determinar si el gen que codifica para cada una de las construcciones de E1B está siendo transcrito.
- Utilizar tiempos más largos durante las pruebas de expresión monitoreando que el cultivo se mantenga viable.
- Explorar el uso de medios definidos para controlar la regulación metabólica bacteriana, evitar la expresión de fuga y favorecer la expresión de cada construcción.
- Considerar el uso de sistemas “cell free” para la expresión de las construcciones *in vitro*.

8 Bibliografía

- Anguiano-Zarate, S. S., Matchett, W. E., Nehete, P. N., Sastry, J. K., Marzi, A., & Barry, M. A. (2018). A Replicating Single-Cycle Adenovirus Vaccine Against Ebola Virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 1–7. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy411>
- Bae, S. S., & Myoung, J. (2014). Recombinant Adenovirus Vaccines, 1(19). <https://doi.org/US 2010/0311130 A1>
- Bennett, E. M., Bennink, J. R., Yewdell, J. W., & Brodsky, F. M. (1999). Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J Immunol*, 162(9), 5049–5052. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.9.4473>
- Berk, A. J. (2005). Recent lessons in gene expression , cell cycle control , and cell biology from adenovirus, 7673–7685. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209040>
- Blackford, Andrew N. Grand, R. J. A. (2009). MINIREVIEW Adenovirus E1B 55-Kilodalton Protein : Multiple Roles in Viral Infection and Cell Transformation, 83(9), 4000–4012. <https://doi.org/10.1128/JVI.02417-08>
- Casali, N., & Preston, A. (2003). *E. coli plasmid vectors Methods and applications*. (H. Press, Ed.).
- Castillo-Villanueva, E., Ballesteros, G., Schmid, M., Hidalgo, P., Schreiner, S., Dobner, T., & Gonzalez, R. A. (2014). The Mre11 Cellular Protein Is Modified by Conjugation of Both SUMO-1 and SUMO-2/3 during Adenovirus Infection. *ISRN Virology*, 2014(52777), 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/989160>

- Chahal, J. S., Gallagher, C., DeHart, C. J., & Flint, S. J. (2013). The Repression Domain of the E1B 55-Kilodalton Protein Participates in Countering Interferon-Induced Inhibition of Adenovirus Replication. *Journal of Virology*, *87*(8), 4432–4444. <https://doi.org/10.1128/JVI.03387-12>
- Chahal, Jasdave S., Qi, J., & Flint, S. J. (2012). The Human Adenovirus Type 5 E1B 55 kDa Protein Obstructs Inhibition of Viral Replication by Type I Interferon in Normal Human Cells. *PLoS Pathogens*, *8*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002853>
- Fields. (2007). Virology. In *Virology* (p. Cap 63. 2000-2069).
- Fields. (2013).
- Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P. S. Y., McDonnell, T. J., Mitlianga, P., ... Kyritsis, A. P. (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene*, *19*(1), 2–12. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203251>
- Grodberg, J., & Dunn, J. J. (1988). ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *Journal of Bacteriology*, *170*(3), 1245–1253. <https://doi.org/10.1128/jb.170.3.1245-1253.1988>
- HAdV Working Group. (2018). HAdV Types. Retrieved from <http://hadvwg.gmu.edu/>
- Hidalgo, P. (2018). *Papel de la oncoproteína E1B 55K en la replicación y expresión del genoma de Adenovirus*.
- Hindley, C. E., Lawrence, F. J., & Matthews, D. A. (2007). A role for transportin in the nuclear import of adenovirus core proteins and DNA. *Traffic*, *8*(10), 1313–1322. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00618.x>
- Hoeben, R. C., & Uil, T. G. (2013). Adenovirus DNA Replication, 1–12.
- Miroux, B., & Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in Escherichia coli: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels ., 289–298.
- Morris, S. J., Scott, G. E., & Leppard, K. N. (2010). Adenovirus Late-Phase Infection Is Controlled by a Novel L4 Promoter □, *84*(14), 7096–7104. <https://doi.org/10.1128/JVI.00107-10>
- Moser, S. (2010). Protein Structure Predictions of the Adenovirus Type 5 E1B-55K Protein : a β -barrel fold correlates with known structural and functional data.
- Mun, K. (2014). Study on the alternative splicing in the human adenovirus serotype 5 E1B region. Retrieved from <http://files.webb.uu.se/uploader/271/BIOMSc-14-022-Mun-Kwangchol-report.pdf>
- Netherton, C., Moffat, K., Brooks, E., & Wileman, T. (2007). A Guide to Viral Inclusions, Membrane Rearrangements, Factories, and Viroplasm Produced During Virus Replication, *70*(07). <https://doi.org/10.1016/S0065->

- Novagen. (1999). pET System Manual 8th Edition, 1–50. Retrieved from <https://research.fhcrc.org/content/dam/stripe/hahn/methods/biochem/pet.pdf>
- Pennella, M. A., Liu, Y., Woo, J. L., Kim, C. A., & Berk, A. J. (2010). 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. *Journal of Virology*, 84(23), 12210–12225. <https://doi.org/10.1128/JVI.01442-10>
- Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison, M., Boivin, D., ... Branton, P. E. (2001). Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex, 53, 3104–3117. <https://doi.org/10.1101/gad.926401>.)
- Rowe, W.P., et al. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture.
- Santiago, A. (2012). *ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA ADENOVIRAL E1B 55KDA*.
- Schlegel, S., Genevaux, P., & de Gier, J. W. (2017). Isolating Escherichia coli strains for recombinant protein production. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(5), 891–908. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2371-2>
- Schmid, M., Speiseder, T., Dobner, T., & Gonzalez, R. A. (2014). DNA Virus Replication Compartments, 88(3). <https://doi.org/10.1128/JVI.02046-13>
- Schneider, R. J., & Mohr, I. (2003). Translation initiation and viral tricks. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(3), 130–136. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00029-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00029-X)
- Shisler, J., Yang, C., Walter, B., Ware, C. F., & Gooding, L. R. (1997). The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. *J Virol.*, 71(11), 8299–8306.
- Shomita S. Mathew, E. B. (2007). The cellular Mre11 protein interferes with adenovirus E4 mutant DNA replication. *Mechanisms of Ageing and Development*, 365(1). <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.049>
- Sieber, T., & Dobner, T. (2006). Adenovirus Type 5 Early Region 1B 156R Protein Promotes Cell Transformation Independently of Repression of p53-Stimulated Transcription. *Journal of Virology*, 81(1), 95–105. <https://doi.org/10.1128/jvi.01608-06>
- Sieber, Timo, Scholz, R., Spoerner, M., Schumann, F., Kalbitzer, H. R., & Dobner, T. (2011). Intrinsic disorder in the common N-terminus of human adenovirus 5 E1B-55K and its related E1BN proteins indicated by studies on E1B-93R. *Virology*, 418(2), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.07.012>
- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7

- expression system. *Journal of Molecular Biology*, 219(1), 37–44. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90855-Z](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90855-Z)
- Tejera, B. (2019). The human adenovirus type 5 E1B 55kDa protein interacts with RNA promoting timely DNA replication and viral late mRNA metabolism, 1–27.
- Trentin, J. (1962). Cancer Induction in Hamsters by Human Type 12 Adenovirus., 2–3.
- Tullo, A. B., & Higgins, P. G. (1979). An outbreak of adenovirus keratoconjunctivitis in Bristol, 621–626.
- Vorburger, S; Hunt, K. (2002). Adenoviral Gene Therapy, 46–59.
- Wimmer, P., Blanchette, P., Schreiner, S., Ching, W., Groitl, P., Berscheminski, J., ... Dobner, T. (2013). Cross-talk between phosphorylation and SUMOylation regulates transforming activities of an adenoviral oncoprotein. *Oncogene*, 32(13), 1626–1637. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.187>
- Woldt, A. N. D. W. S. M. (1990). The adenovirus E3-14 . 7K protein is a general inhibitor of tumor necrosis factor-mediated Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at: NECROSIS FACTOR-MEDIATED CYTOLYSIS '.
- Yolken, R. H. et al. (1982). Gastroenteritis associated with enteric type adenovirus in hospitalized infants. *The Journal of Pediatrics*, Volume 101(Issue 1), 21–26.
- Zimber, A., Nguyen, Q. D., & Gespach, C. (2004). Nuclear bodies and compartments: Functional roles and cellular signalling in health and disease. *Cellular Signalling*, 16(10), 1085–1104. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.03.020>