

Tesis Doctoral

# Oligomerización de la oncoproteína E7 del papilomavirus humano y su interacción con el regulador de transcripción y replicación viral E2

Smal, Clara

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Smal, Clara. (2010). Oligomerización de la oncoproteína E7 del papilomavirus humano y su interacción con el regulador de transcripción y replicación viral E2. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Smal, Clara. "Oligomerización de la oncoproteína E7 del papilomavirus humano y su interacción con el regulador de transcripción y replicación viral E2". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

Oligomerización de la oncoproteína E7 del papilomavirus humano y su interacción con el regulador de transcripción y replicación viral E2

Trabajo de Tesis para optar el título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Físicas

*Clara Smal*

Director de Tesis: Dr. Gonzalo de Prat Gay

Lugar de trabajo: Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas,  
Fundación Instituto Leloir e IIBBA-CNICET

Buenos Aires, 2010

## Resumen

Título: Oligomerización de la oncoproteína E7 del papilomavirus humano y su interacción con el regulador de transcripción y replicación viral E2

E7 es una proteína de expresión temprana del papilomavirus humano. Es una proteína pequeña de aproximadamente 100 aa, que consta de dos dominios estructurales. El dominio C-terminal, globular y de plegamiento independiente, cuya estructura fue descrita recientemente y el dominio N-terminal, intrínsecamente desordenado. Se han descrito hasta el momento más de 40 blancos celulares que interactúan con E7, siendo su blanco principal la proteína supresora de tumores Retinoblastoma (pRB) y hasta el momento no se ha reportado ninguna actividad enzimática. E7 se la denomina oncoproteína ya que posee la capacidad de transformar la célula que la expresa.

En nuestro laboratorio se observó que esta proteína posee la capacidad de formar oligómeros de alto peso molecular, E7SOs, al desplazar el Zn que coordina el dominio C-terminal. Este oligómero comparte características con las fibras amiloides ya que posee una estructura del tipo beta repetitiva. E7SOs posee actividad chaperona tipo holdasa y se observó que este oligómero se localiza en el citosol de líneas celulares transformadas, en células transfectadas y en biopsias de tejidos cancerosos infectados con HPV. Los estudios realizados *in vivo* propusieron que esta partícula tiene la funcionalidad de almacenamiento de la oncoproteína.

En el presente trabajo de tesis se estudió la ruta de formación de E7SOs. Se analizó la cinética de formación de los mismos monitoreando diferentes sondas que reportaron distintos arreglos estructurales en la reacción. Debido a que E7SOs posee una geometría esférica, se aplicó un modelo elaborado para estudiar el ensamblado de cápsidas virales, que puede ser aplicado a la formación de oligómeros esféricos. Los resultados demostraron que E7SOs posee un ensamblado novedoso, ya que requiere de la formación previa del monómero desplegado de E7, como sucede en el ensamblado de fibras amiloides, pero no posee un oligómero de menor tamaño como núcleo de la reacción. Se definió a la ruta de formación de E7SOs como un ensamblado truncado hacia la formación de fibras amiloides.

Muchos blancos celulares se han descrito para E7, no obstante en la mayoría de estas interacciones se desconoce su consecuencia biológica y poco se sabe de las características de estas interacciones, como regiones de unión, competencia por otros ligandos, etc. Por otro lado, la única interacción analizada en detalle es la que E7 realiza con su principal blanco pRB. En este trabajo de tesis se halló y se caracterizó *in vitro*, bajo diferentes técnicas biofísicas, la interacción de E7 con un nuevo blanco, la proteína E2. E2 es codificada por el genoma viral y es el factor de transcripción negativo de E7. En consecuencia con los resultados obtenidos de este estudio, se propuso que la interacción de estas proteínas presenta un mecanismo de ajuste en la concentración de las mismas dentro de las células. Esto propiciaría la modificación del ambiente celular dando lugar a diferentes estadios de la infección viral y su consecuencia con la proliferación celular y la cancerogénesis relacionada con el virus.

Palabras Claves:

Papilomavirus Humano; Oncoproteína; Oligómeros; Amiloides; Mecanismo de ensamblado; Cinética.

## Abstract

Title: Oligomerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein and its interaction with the viral transcription and replication regulator E2

E7 is a papillomavirus early protein. It is a small protein of approximately 100 aa consisting of two structural domains. The C-terminal domain, which structure has been recently described, is globular and with independent folding and the N-terminal domain which is intrinsically disordered. Until present more than 40 cellular targets have been described to interact with E7. The main target is the tumor supresor protein Retinoblastoma (pRB) and up to present no enzymatic activity has been reported. E7 is considered an oncoprotein because it has the ability to transform the cells where it is expressed.

In our laboratory we observed that this protein is able to form high molecular weight oligomers, E7SOs, when it displaces the Zn atom that coordinates the C-terminal domain. These oligomers share characteristics with amyloid fibers because they have the beta repetitive kind of structure. E7SOs show holdase chaperone activity and it was observed that these oligomers are found in the cytosol of transformed cellular lines, in transfected cells and in biopsies of cancerous tissues infected with HPV. *In vivo* studies suggest that these particles have the function of storing the oncoprotein.

In the present Thesis the formation pathway of E7SOs has been studied. The kinetics of formation of these oligomers was analyzed monitoring different probes which reported different structural arrangements in the reaction. Due to the fact that E7SOs have a spherical geometry, an elaborated model was applied to study the assembly of viral capsids that can also be applied to the formation of spherical oligomers. The results showed that E7SOs have a novel assembly They require the previous formation of E7 displayed monomer, as it happens in the assembly of amyloid fibers, but they lack a smaller oligomer as core of the reaction. It has been defined that the E7SOs pathway formation is a truncated assembly toward the formation of amyloid fibers. Many cellular targets have been reported for E7. However, in most of these interactions the biological consequence is unknown and very little is known about the characteristics of these interactions, like binding regions, competition for other ligands, etc. On the other hand, the only interaction analyzed in detail is that of E7 with its main target pRB. In this Thesis the interaction of E7 with a new target, the E2 protein was found and characterized *in vitro*, using different biophysics techniques. E2 is codified by the viral genome and is E7 negative transcription factor. In consequence with the results obtained in this study, we propose that the interaction of these two proteins shows a mechanism of adjustment of their concentrations in the cells. This might favor the modification of the cellular environment giving place to different stages in the viral infection and its consequences with the cellular proliferation and the carcinogenesis related to the virus.

Keywords:

Human Papillomavirus; Oncoprotein; Oligomers; Amyloids; Assembly mechanism; Kinetics.

## **Agradecimientos**

A Gonzalo mi director de Tesis, por que le abrió las puertas de su laboratorio a una física con ganas de pipetear y siempre estuvo dispuesto a responder con mucha paciencia todas sus preguntas. Porque no solo me enseñó bioquímica y biofísica de proteínas sino que me enseñó a investigar.

A la Universidad de Buenos Aires, por hacer posible mi doctorado y a la cual le debo mi formación profesional. Porque me enorgullece decir que estudié en la universidad pública.

A mis compañeros del 209. A Diana y Leo porque me enseñaron innumerables cosas, siempre estuvieron dispuestos a analizar y discutir y mis resultados y me contagiaron su enorme motivación por la ciencia. A las chicas Gaby, Angeles, Sol, Mariangeles, Kari, Marikena y la flaca, porque en el día a día de trabajo podemos hablar como amigas y compartir muy buenos momentos, y porque puedo decir: "chicas son unas copadas". A Lucia porque atravesamos por las mismas etapas y siempre nos ayudamos y porque trabajamos como equipo poniendo a punto siete mil millones de cosas que dieron, por suerte, buenos resultados. A Mariam, Seba y Esteban, representando el staf masculino del labo: aguante chicos! A los que ya pasaron y fueron los que me ensaaron las primeras cosas: Diego, Ale, María, Santi, Cris, Ele y Marce. A Lili, que la quiero mucho.

Al Instituto Leloir que me dio la posibilidad de realizar mi doctorado en un excelente lugar.

Al comité de seguimiento de tesis, formado por: la Dra Gamarnik, el Dr Castaño, el Dr Paris y Dr Craig. Por ayudarme a mejorar mi trabajo.

A la gente del Dto de Física por darme la posibilidad de defender esta tesis en su departamento.

A mi papá: porque te esforzaste mucho y gracias a eso yo pude estudiar y hoy trabajo en lo que me gusta. A mi mamá, que me ayudo mucho mucho con la maternidad mientras escribía la tesis, sin vos ese tramo no hubiese sido posible. A mi hermana que es de fierro y siempre está ahí.

A Martín y Jonás que me iluminan la vida y me demuestran todos los días que es lo realmente importante.

*A mi familia:  
Mis viejos, mi hermana  
Martín y Jonás*

No nos olvidemos de nosotros mismos, recordémonos.  
Carlos *Indio* Solari

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Capítulo 1: | <b>Introducción</b>  | 1  |
|             | Papilomavirus: Generalidades y su relación con el cáncer cervical        | 3  |
|             | Ciclo de vida y organización génica                                      | 5  |
|             | E2, proteína reguladora  | 7  |
|             | E2C, dominio de unión a ADN  | 10 |
|             | Interacción E2C-ADN  | 12 |
|             | E7, proteína transformante   | 13 |
|             | E7, regiones y dominios de la proteína                                   | 15 |
|             | Características conformacionales de E7 en solución                       | 17 |
|             | Dominio N-terminal, E7N  | 20 |
|             | Dominio C-terminal, E7   | 21 |
|             | E7SOs  | 23 |
| Capitulo 2: | <b>Mecanismo de ensamblado de E7SOs</b>                                  | 27 |
|             | Cinética del autoensamblado de E7SOs seguida por sondas espectroscópicas | 30 |
|             | Cinética seguida por el método de dispersión de luz dinámica, <i>DLS</i> | 35 |
|             | Morfología de E7SOs  | 38 |
|             | Base teórica de modelos para mecanismos de ensamblado                    | 39 |
|             | <i>Modelo de equilibrio (EQ)</i>   | 40 |
|             | <i>Ensamblado limitado cinéticamente (KL)</i>                            | 41 |
|             | Comparación y elección del modelo  | 42 |
|             | Determinación de la especie que conforma el núcleo                       | 44 |
|             | Determinación del orden de reacción de la elongación                     | 46 |
|             | Efecto de la temperatura en el ensamblado de E7SOs                       | 46 |
|             | Discusión  | 49 |
| Capitulo 3: | <b>El dominio C-terminal de E7</b>                                       | 53 |
|             | Expresión y Purificación de HPV E7C                                      | 55 |
|             | Estructura secundaria  | 58 |
|             | Comportamiento en función de la temperatura                              | 59 |
|             | Desnaturalización química  | 61 |
|             | E7C, dominio de oligomerización de E7SOs                                 | 62 |

|                    |  |           |
|--------------------|--|-----------|
|                    | <i>Cambios en la estructura secundaria</i>                                       | 62        |
|                    | <i>Estudio de morfología de E7C-EDTA a través de DLS</i>                         | 65        |
|                    | <i>Microscopía de fuerza atómica (AFM) de E7C tratado con EDTA</i>               | 67        |
|                    | Discusión  | 69        |
| <b>Capitulo 4:</b> | <b>Interacción de E7 y el dominio E2C</b>  | <b>73</b> |
|                    | <b>Parte 1</b>   |           |
|                    | La interacción de E7 con E2C en solución es sensible al pH y a la fuerza iónica  | 75        |
|                    | Unión específica entre E2C y E7 determinada en ensayos en geles                  | 77        |
|                    | La agregación depende de la concentración relativa entre ambas proteínas         | 80        |
|                    | Diferentes estados de oligomerización analizados por <i>DLS</i>                  | 81        |
|                    | Caracterización de las especies por medio de dicroísmo circular, <i>CD</i>       | 84        |
|                    | Estequiometría y constante de disociación de E7E2Cx                              | 85        |
|                    | Determinación de la región de E7 que interacciona con E2C                        | 86        |
|                    | Desplazamiento de E7 de E2C-E7 por el ADN específico a E2                        | 89        |
|                    | Mutaciones en la hélice de unión al ADN alteran la formación del complejo E2C-E7 | 90        |
|                    | Interacción de E2C con el dominio E7C  | 91        |
|                    | Titulación de E7C-FITC con E2C   | 92        |
|                    | Discusión  | 93        |
| <b>Capitulo 5:</b> | <b>Interacción de E7 y el dominio E2C</b>  | <b>97</b> |
|                    | <b>Parte 2</b>   |           |
|                    | Efecto del NaCl en la oligomerización de E2C-E7                                  | 99        |
|                    | Unión de E2E7SOs a rojo congo  | 101       |
|                    | Formación de E2C amiloides por aumento de temperatura                            | 102       |
|                    | Termodesnaturalización de E2C-E7   | 103       |
|                    | Cinética a temperatura constante del complejo E2E7Os                             | 105       |
|                    | Caracterización de la especie E2E7SOs tratada a 60 °C                            | 106       |
|                    | Termodesnaturalización a diferentes estequiometrías del complejo E2E7Os          | 108       |
|                    | Discusión  | 110       |



|             |  |                                 |
|-------------|--|---------------------------------|
|             | <b>Discusión General</b>   | 113                             |
| Capítulo 6: | Mecanismo de oligomerización y formación de amiloides de E7          | 115                             |
|             | Interacción de E2C E7  | 118                             |
|             | Ruta amiloide E2C  | 122                             |
| Capítulo 7: | <b>Materiales y Métodos</b>  | 125                             |
|             | Clonado, expresión de E7 y E7C HPV 16                                | 127                             |
|             | Purificación de E7 y E7C.  | 124                             |
|             |  | <i>E7</i> 128                   |
|             |  | <i>E7C</i> 128                  |
|             | Expresión y purificación de E2C                                      | 129                             |
|             | Determinación de la concentración de proteína                        | 130                             |
|             | Péptido sintéticos   | 131                             |
|             | Unión covalente con Isotiocianato de fluoresceína (FITC)             | 131                             |
|             | Oligonucleótido sintético  | 132                             |
|             | Dispersión de luz dinámica   | 132                             |
|             | Dicroísmo circular   | 133                             |
|             | Ensayos de fluorescencia   | 133                             |
|             |  | <i>Cinéticas</i> 133            |
|             |  | <i>Curvas de titulación</i> 134 |
|             | Modelo aplicado para determinar la $K_D$ en la interacción de E2C-E7 | 135                             |
|             | Dispersión de luz adsorbida  | 137                             |
|             | Ensayo de retardo en la movilidad electroforética                    | 137                             |
|             | Líneas celulares e inmunodetección                                   | 137                             |
|             |  | <i>Cultivo celular</i> 137      |
|             | Inmunodetección  | 138                             |
|             |  | <i>A) Western Blot</i> 138      |
|             |  | <i>B) Far Western Blot</i> 138  |
|             | Microscopía de fuerza atómica  | 139                             |
|             | Apéndice   | 141                             |
|             | Equilibrio monómero-dímero de E7                                     | 143                             |
| Referencias |  | 145                             |

# 1. Introducción



### **Papilomavirus: Generalidades y su relación con el cáncer cervical**

Los papilomavirus, *PVs*, comprenden un grupo de virus de ADN sin envoltura que inducen lesiones benignas en la piel (verrugas) y en las mucosas (condilomas). Algunos *PV* han sido involucrados en el desarrollo en neoplasias malignas del epitelio, especialmente en cáncer de cuello de útero en humanos y otros tumores del tracto urogenital.

Aunque en la antigua Grecia ya se conocía este tipo de lesiones, las cuales eran asociadas a enfermedades como la sífilis y la gonorrea, los papilomavirus fueron identificados a principio del siglo XX cuando Ciuffo demostró la posibilidad de formación de verrugas cutáneas inducidas por el filtrado, libre de células, de un exudado de verrugas comunes (1). De esta manera se determinó, que esta patología era causada por algún agente infeccioso.

El primer papilomavirus fue identificado en conejos por Richard Shope en 1933 y se lo clasificó como CRPV (Cottontail Rabbit Papilloma-virus) (2). Se observó que el trasplante de verrugas al tejido muscular o a órganos internos desarrollaba tumores malignos en los órganos transplantados, de esta forma se obtuvo la primera asociación entre cáncer y virus.

Históricamente los *PVs* fueron clasificados junto a los Poliovirus y los Simian Vacuolating (SV40), formando la familia de los Papovavirus, con los cuales comparten características biológicas. Estos virus son oncogénicos, relativamente pequeños y con un genoma circular doble cadena. A pesar de compartir una organización genética similar, los *PVs* han sido designados como una familia aparte por el International Committee of Taxonomy of Virus (3).

Los *PVs* ha sido aislados en mamíferos y aves, donde se han descrito cientos de tipos diferentes, todos ellos específicos de especie. Hasta el momento se han secuenciado completamente 96 cepas de diferentes genotipos de papilomavirus que infectan a humanos, *HPV*, y existen más de 100 que se encuentran parcialmente secuenciadas (3). Los diferentes genotipos de *PV* se pueden clasificar en distintos grupos o subgrupos de acuerdo a diferentes propiedades como: especie huésped epitelial que infectan, lesiones que producen y según la homología de secuencia que muestren entre sí, en base a la comparación de secuencia de un fragmento de la proteína L1.

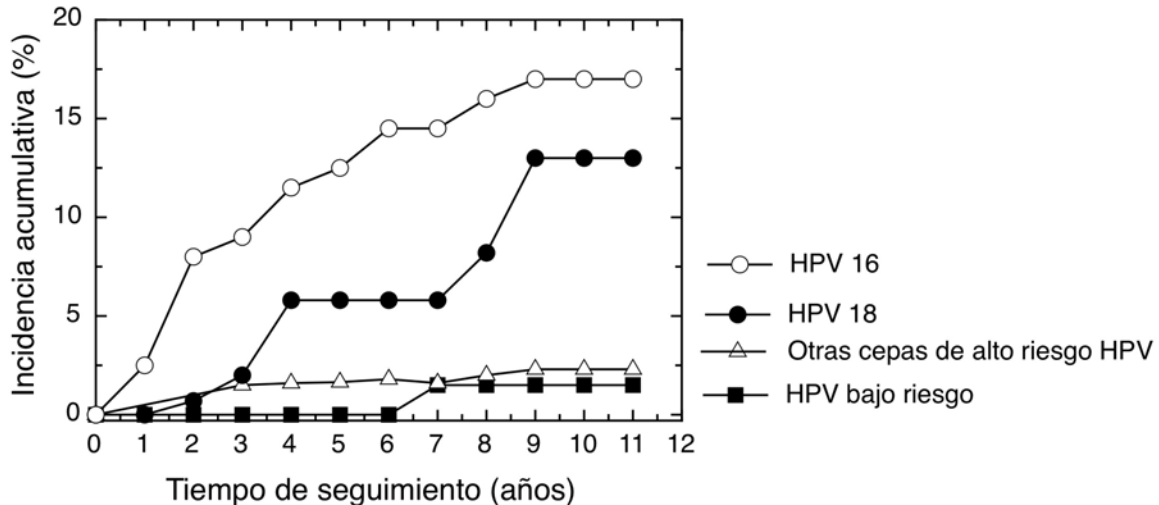
Los papilomavirus humanos se encuentran divididos en diferentes cepas, las cuales están asociadas a un tipo de lesión. Las cepas de HPV-1, 2, 3, 4 y 10 son las causantes de proliferaciones cutáneas presentando lesiones benignas, crecimiento autolimitado, no invasivo y forman papilomas o verrugas comunes en extremidades corporales.

Las cepas de *HPV* que infectan el epitelio mucoso del tracto genital constituyen alrededor del 50% de los genotipos humanos. En estos casos, el *HPV* se transmite sexualmente y se considera que la mayoría de la población sexualmente activa está o estuvo infectada con algún tipo de *HPV* (4). Las lesiones anogenitales que estos virus desencadenan pueden desarrollar malignidades severas, siendo la más común de ellas el carcinoma de cuello de útero. El cáncer cervical es el segundo carcinoma más frecuente en la población femenina: son diagnosticados aproximadamente 500.000 nuevos casos por año, siendo el responsable de una tasa de mortalidad estimada de 275.000 personas anualmente (5-6). Un estudio mundial realizado con 1.000 muestras de secciones histológicas de cáncer cervical indicó que más del 90 % de las muestras contenían ADN de HPV (7). Las cepas de HPV asociadas a lesiones anogenitales se clasifican como de bajo riesgo o de alto riesgo según la frecuencia en que estas se encuentran en tumores. A pesar que fueron encontrados más de 20 tipos de HPV en tumores, las cepas de alto riesgo 16, 18, 31 y 45 representaron cerca del 80 % de los carcinomas de cervix con HPV positivo. Mientras que las cepas de bajo riesgo, como por ejemplo 6 y 11, fueron encontradas en solo dos de las muestras estudiadas. En general los HPV de las cepas 6 y 11 se encuentran en más del 90 % de las lesiones genitales benignas, que pueden revertir espontáneamente o persistir por años sin causar mayor efecto.

El HPV-16 es la cepa más oncogénica seguida por la HPV-18. Estas dos cepas están presentes en el 70 % de los carcinomas de cervix. Estudios de infecciones asintomáticas prevalentes de HPV, realizados en un período de 10 años, pusieron en evidencia que los casos con mayor probabilidad de progresar a la fase de cáncer eran aquellos infectados con HPV 16 o 18, siendo más alta para HPV 16 (8), ver figura 1.1.

En la actualidad existen en el mercado dos vacunas profilácticas contra HPV (Gardasil de la farmacéutica Merck y Cervarix de GSK) que protegen efectivamente contra las cepas 16 y 18 de alto riesgo y las cepas de bajo riesgo HPV-6 y 11. Sin embargo, todavía sigue en auge el desarrollo de nuevas vacunas y terapias contra el virus, ya que no existe una vacuna terapéutica que trate los casos pre-existentes de

infección por HPV o de cáncer cervical. Por otro lado, aunque HPV-16 y 18 son responsables de la mayoría de los cánceres cervicales, muchas otras cepas son también capaces de producirlo. Otro inconveniente que presenta esta vacuna es la dificultad de su aplicación universal a través de planes nacionales de vacunación ya que la misma posee una limitación económica. El costo de misma en el mercado es de 900 dólares, cifra muy superior a la de cualquier otra vacuna.



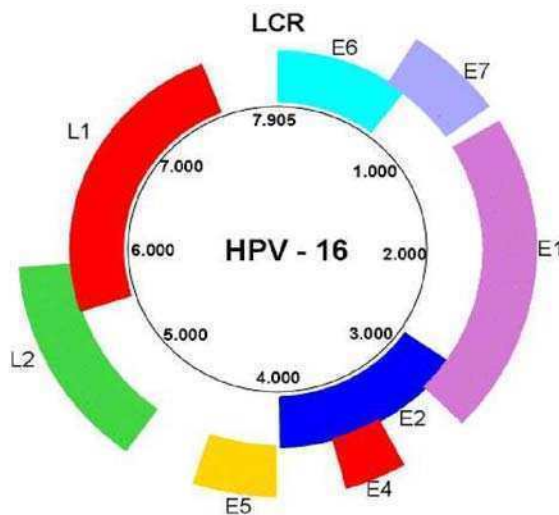
**Figura 1.1:** Incidencia acumulativa en la progresión de displasias o cáncer por HPV de una estudio realizado a 20.500 mujeres (8). Imagen adaptada de Fields Virology (9)

### Ciclo de vida y organización génica

Los papilomavirus infectan células epiteliales y son altamente específicos de especies y tejidos. La expresión génica viral está íntimamente ligada al estado de diferenciación de la célula infectada. Una vez que el virus penetra en la célula huésped y se desensambla, permanece como episoma libre, donde se mantiene constante la cantidad de copias de genomas por células replicándose en sincronía con el ADN celular. Asimismo, se lo puede encontrar integrado al genoma celular. Esto se observa en líneas celulares utilizadas comúnmente en investigación, las cuales poseen una o más copias de algún genotipo de HPV de alto riesgo, HeLa (HPV-18), SiHa (HPV-16) y CaSki (HPV-16).

La cápside de PV posee un tamaño de aproximadamente 55 nm de diámetro. La misma esta compuesta de 72 capsomeros pentaméricos que forman un icosaedro de simetría T = 7.

El genoma de los papilomavirus esta compuesto por un ADN circular doble cadena que consta de 8000 pares de bases aproximadamente. En el genoma de la cepa HPV-16 que se presenta en la figura 1.2, se distinguen 8 marcos de lectura o orf (*open reading frame*), ubicados en la misma hebra. Estos se clasifican según el momento de expresión respecto a la replicación viral como tempranos, *E* (*early*) o tardíos, *L* (*late*). Dentro del genoma existe una región no codificante, de aproximadamente 800 pb denominada LCR (*Long Control Region*) o URR (*Upstream Regulatory Region*). En esta región se identificaron los elementos controladores de la replicación viral y la mayoría de los elementos regulatorios de la expresión génica (10). El virus es completamente dependiente de la maquinaria de la célula huésped para su replicación y completitud del ciclo de vida.



**Figura 1.2:** Esquema genómico de HPV 16. Los promotores y el origen de replicación se localizan en el LCR. Se esquematiza en diferentes colores los 8 orf con diferentes marcos de lectura. Los genes tempranos se indican con la letra E (Early) y los tardíos con L (Later)

En la tabla 1.I se presentan los productos de los orf de HPV-16 y una pequeña descripción de sus funciones. Cabe destacar que excepto por la proteína E1 que posee actividad helicasa de ADN, no se ha encontrado actividad enzimática de las proteínas de los PV (9). Una descripción más detallada de las proteínas E2 y E7 se presenta a continuación.

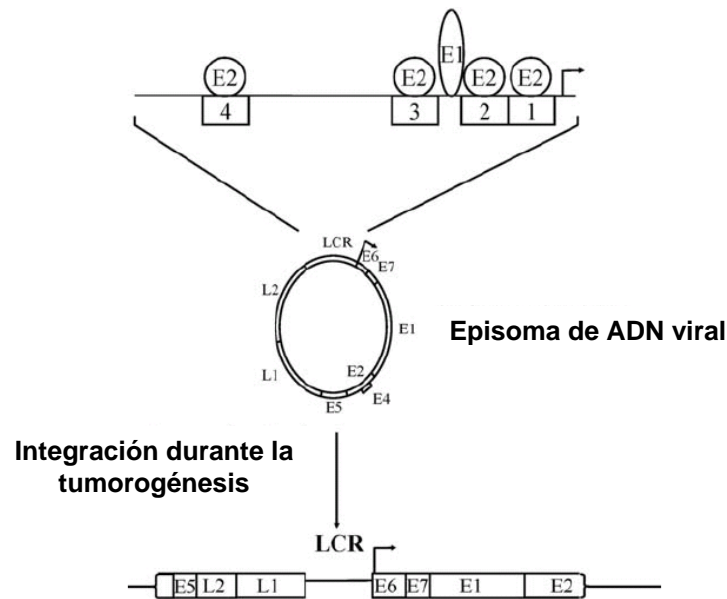
| Proteína | Función   |
|----------|---|
| L1       | Proteína mayoritaria de la cápside viral, posee una secuencia altamente conservada entre las diferentes cepas.  |
| L2       | Proteína minoritaria de la cápside viral.   |
| E1       | Única proteína codificada en el genoma viral que presenta actividad enzimática, presentando actividad helicasa. Es requerida para la iniciación y elongación de la síntesis de ADN. Se describió que la interacción de la misma con E2 es fundamental para iniciar la replicación viral (11). |
| E2       | Regulación de la transcripción viral  |
| E4       | No es esencial en la replicación ni en la transformación celular (12). Modifica la citokeratina pudiendo contribuir en la replicación vegetativa del virus.   |
| E5       | Interacciona con los receptores de factores de crecimiento. Se observó que la misma es capaz de transformar células de ratón en cultivo pero su efecto oncogénico todavía está en discusión.  |
| E6       | Junto con E7 está caracterizado como uno de los principales agentes responsables de la transformación celular. Su blanco principal es el modulador de la transcripción, la proteína p53. Su interacción inactiva a p53 induciendo su degradación.   |
| E7       | Proteína transformante. Su blanco principal es la proteína que regula el ciclo celular, pRB.  |

**Tabla 1.1:** Proteínas pertenecientes a la cepa HPV-16.

### **E2, proteína reguladora**

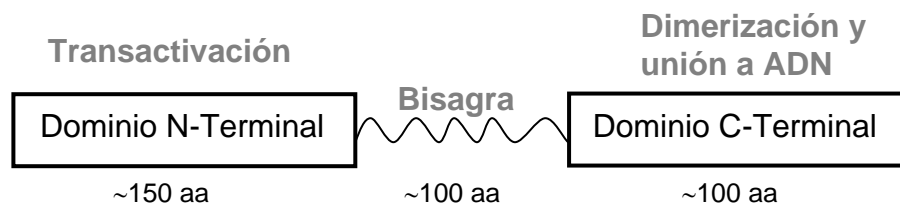
La proteína E2 ha sido caracterizada como una proteína reguladora de la transcripción de todos los genes virales y de la replicación del ADN viral. Recientemente se ha observado que E2 está involucrada en la persistencia a largo plazo del genoma viral en células infectadas. La inactivación de esta proteína tiene efectos pleiotrópicos sobre la fisiología viral, afectando la transformación celular, la replicación viral, y las funciones asociadas a la regulación de la transcripción. E2 media estas funciones al interactuar con el ADN viral. Los genomas de HPV contienen 4 sitios específicos de unión a E2 dentro de la URR o LCR, figura 1.3.





**Figura 1.3:** El genoma de HPV y su integración durante la tumorigénesis. Se muestra una ampliación de la región LCR, en donde se esquematizan los sitios de unión con E2, los sitios 1 y 2 son los que poseen menor afinidad y se encuentran cercanos al promotor. El sitio 4 posee mayor afinidad y se encuentra alejado del promotor. Figura adaptada de Prat gay et al 2008(13).

Las proteínas E2 están relativamente conservadas a través de los diferentes tipos de papilomavirus y se pueden identificar 3 dominios altamente conservados. El dominio C-terminal, con ~80 aa, posee la secuencia específica de unión a ADN y es el dominio de dimerización. El dominio N-terminal que consta de aproximadamente 150 aa, está involucrado en la transactivación a partir de secuencias promotoras. Estas dos regiones están unidas a través de una región flexible de aproximadamente 100 aa, denominada bisagra, figura 1.4. Esta región no se encuentra conservada en cuanto la cantidad y composición de aminoácidos a través de los diferentes PVs.



**Figura 1.4:** Esquema de la proteína E2, se muestra el dominio N-Terminal o dominio de transactivación, el dominio C-Terminal o dominio de dimerización y unión a ADN. La región bisagra une los dos dominios.

La función de regulación transcripcional asociada a E2 ha sido estudiada, principalmente, en proteínas pertenecientes a las cepas asociadas al HPV que infectan la región anogenital. La unión de E2 a los sitios de reconocimiento dentro del LCR del genoma de HPV modula la actividad de ciertos promotores virales, como por ejemplo: p97 y p105. Estos son los principales promotores de los genes que codifican para las proteínas transformantes E6 (p97) y E7 (p105). En células del epitelio, se observó que las actividades básicas de HPV16 P97 y HPV18 P105 son reprimidas por E2 (14-15). Esta represión está mediada por los cuatro sitios de unión específica a E2 que se encuentran río arriba de dichos promotores. A pesar que existen varios modelos propuestos, todavía no está claro el mecanismo por el cual E2 reprime la expresión de E6 y E7. Se ha propuesto que uno de los mecanismos de represión consiste en que E2 presenta un impedimento estérico a la unión y posterior actividad de factores de transcripción, como por ejemplo a la unión de TBP (TATA box binding protein), y Sp1 (16-18).

Por otro lado, se ha observado que E2 reprime o activa la transcripción dependiendo de la afinidad con los sitios de interacción dentro del LCR. Estudios realizados en la cepa HPV-16 mostraron que E2 se une fuertemente al sitio más distante del promotor y más débilmente a los más cercanos (13, 19-20) (ver figura 1.3). En consecuencia de esto se propone, como modelo de regulación de la transcripción de los genes virales, que a bajas concentraciones E2 se une al sitio más alejado del promotor activando la transcripción. Cuando la concentración aumenta, E2 se une a los sitios más cercanos reprimiendo la transcripción. Este tipo de comportamiento no es compartido con la cepa HPV 6 ni HPV 11 indicando que el mecanismo de regulación podría ser dependiente de la cepa.

Además de su interacción con el ADN, las múltiples funciones de esta proteína están mediadas por la interacción con otras proteínas, tanto virales como celulares. Dentro de los blancos celulares de interacción de E2 se identificaron varias proteínas que están involucradas en los procesos mencionados: TBP, TFIIB, Brd4, YY1, etc. La función de activador y represor transcripción está posiblemente mediada por la interacción específica de factores celulares como Brd4, TBP, etc (13, 21). Al rol de regulador transcripcional se le suma la participación en la replicación del ADN viral. Asimismo, esta función posiblemente sea mediada a través de interacción específica con otras proteínas. Se ha descrito para la cepa bovina, BPV, que la formación de un

complejo con la proteína viral E1 fortalece la unión específica por el origen de replicación del ADN (22-23).

Como consecuencia de las funciones descritas, se ha observado que E2 puede suprimir el crecimiento de células pertenecientes a líneas celulares cancerosas HPV positivas, a través de la represión de los genes virales E6 y E7 (15, 24-25). Esta represión tiene como resultado la activación de las vías de supresión de tumores donde participan pRB y p53, las cuales son inhibidas por E6 y E7 e induce el arresto celular y la senescencia. Otro rol dentro de la proliferación celular es la consecuencia de la interacción de E2 con p53 y con CBO, un co-activador del proceso apoptótico independiente de p53 (26). E2 de HPV de alto riesgo parece actuar como supresor de tumores.

En el proceso de tumorigenesis viral se ha encontrado al genoma del virus inserto en el genoma de la célula huésped. Esto ha sido observado en el caso de las cepas de alto riesgo HPV-16 y HPV-18 (27). La integración del genoma tiene como consecuencia la ruptura del gen de E2, ver figura 1.3. Esta ruptura del orf de E2 o la pérdida de su expresión, deviene en células que son más propensas a proliferar y, como consecuencia, más propensas a la generación de lesiones tumorales.

### **E2C, dominio de unión a ADN**

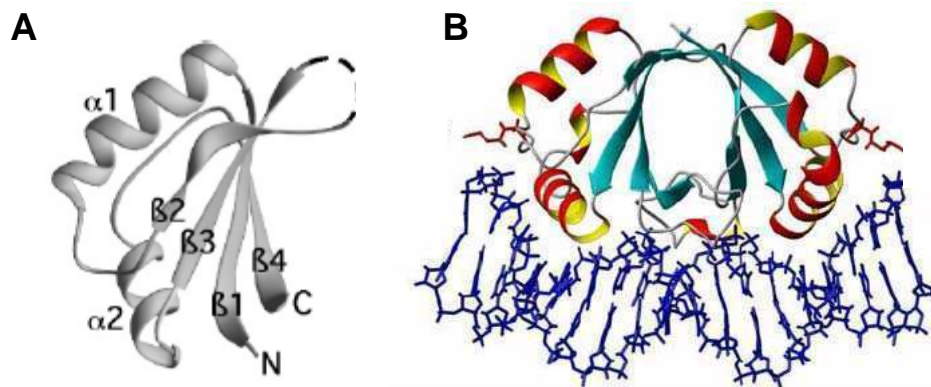
Como se mencionó anteriormente E2C es el dominio de dimerización y de unión al ADN. Todas las actividades de E2 descritas están mediadas por la capacidad de unir específicamente secuencias de ADN. E2C es un homodímero de plegamiento independiente con capacidad de unir a ADN (28-29). Se cuenta con estructuras de alta resolución para los dominios E2C de varias cepas de PV. Se han resuelto por cristalografía de rayos X las estructuras de las cepas: BPV-1, HPV-16 (30-31) y la cepa de bajo riesgo HPV-6 (32). Asimismo se cuenta con las estructuras del dominio unido a su ADN específico en: BPV-1, HPV-6 y HPV-18 (30, 33). Por la técnica de RMN (Resonancia Magnética Nuclear), se resolvieron las estructuras pertenecientes a las cepas BPV-1, HPV-31 y HPV-16 (34-36).

E2C es el prototipo de una clase novedosa de proteínas que unen a ADN. Se ha observado que la misma posee una topología de barril  $\beta$  dimérico, donde cada subunidad contribuye con 4 láminas beta antiparalelas, figura 1.5. La topología secundaria de cada subunidad es  $\beta 1-\alpha 2-\beta 2$ -loop- $\beta 3-\alpha 2-\beta 4$ . La hélice  $\alpha 1$ , que se encuentra fuera del barril- $\beta$ , es la hélice de unión o reconocimiento del ADN específico

ya que todos los aminoácidos que la conforman están directamente involucrados específicamente en dicha unión. En la dimerización, los residuos de los bordes de las hebras  $\beta 2$  y  $\beta 4$  de cada subunidad forman una red continua de puentes de hidrógeno, formando de esta manera el barril de 8 láminas betas antiparalelas. La dimerización presenta una interfaz de 1500 Å a 2500 Å, observada consistentemente en varias estructuras.

En todas las estructuras analizadas se observó que el *loop* que conecta a  $\beta 2$  y  $\beta 3$  presenta una estructura desordenada. Asimismo, este *loop* posee una secuencia poco conservada, dado que su tamaño varía entre 6 a 10 residuos. No obstante, la secuencia de E2C de diferentes PV se encuentra altamente conservada. Se observa que dicha conservación varía entre un 54 % de identidad (77 % de similitud) entre los papilomavirus cercanos (HPV-16 y HPV-18) y hasta un 33 % de identidad (51 % de similitud) entre las cepas más distante (HPV-16 y BPV-1)

Se observó un alto grado de movilidad en las regiones de E2C involucradas en la unión de ADN. Esto fue descrito en estudios realizados por RMN a la proteína E2C de la cepa HPV-31 (34), donde se observó que tanto el *loop* que conecta a  $\beta 2$  y  $\beta 3$  como la hélice de unión presentan altos grados de movilidad local cuando el dímero no está unido al ADN. En nuestro laboratorio los estudios realizados por RMN al dominio E2C HPV-16, mostraron que esta cepa también posee alta flexibilidad local en las zonas de unión a ADN (36).



**Figura 1.5:** Estructura del dominio C-terminal de E2, E2C. **A)** Se muestra el monómero en donde se indica su estructura secundaria. **B)** E2C presenta una topología de barril  $\beta$  dimérico, donde cada monómero aporta 4 cintas  $\beta$  antiparalelas y dos  $\alpha$  hélices. Modelo de HPV-16 E2C-ADN extraído de Prat Gay *et al* 2008 (13).

El núcleo en forma de barril contribuye significativamente a la estabilidad de la proteína dimérica, observándose una constante de disociación del orden de  $10^{-13}$  M (37). Estudios realizados sobre el plegamiento de E2C mostraron que la dimerización está acoplada al plegamiento de los monómeros, es decir que en solución solo pueden encontrarse los monómeros desplegados o dímeros plegados (37). E2C está constituida por dos cadenas polipeptídicas que conforman un solo dominio de plegamiento independiente. Dados estos antecedentes y las condiciones en las cuales trabajamos, nos referiremos aquí siempre a E2C como al dímero E2C.

La descripción del camino cinético de plegamiento de E2C identificó la formación de un intermediario monomérico, de rápida formación y desaparición (38). Se identificó también que este intermediario tiene características que lo identifican como no-nativo (38-39). El efecto de la fuerza iónica reveló que el dímero E2C se estabiliza con el aumento de ésta, y que dicha estabilización resulta mayor aún si se utilizan sales de fosfato. Tanto la unión específica de ADN como la unión inespecífica de heparina estabilizan fuertemente el dímero frente al evento de desplegamiento/disociación inducido por urea (11).

E2C también se utilizó como modelo de desplegamiento sin el uso de agentes químicos, como es el caso de la alta presión hidrostática (40). Se identificó que los monómeros desplegados por presión presentan estructura residual, y que éste estado es más compacto que el estado desplegado obtenido por desnaturalización con urea. Los estudios estructurales por RMN sobre el estado desplegado en urea, muestran que éste también presenta estructura residual (41). Posteriormente se propuso que una vez unido a ADN, el dímero de E2C puede ser desplegado por presión hidrostática en monómeros que se mantienen unidos a ADN (42).

### **Interacción E2C-ADN**

Las proteínas E2 de todas las cepas de *PV* unen a la secuencia consenso palíndrome ACCgnnnncGGT , donde los nucleótidos en letra minúscula son preferidos pero no requeridos. La región central nnnn es denominada separador y su largo se encuentra bien conservado. Como se comentó anteriormente esta secuencia palindrómica se encuentra presente 4 veces en el genoma de HPV de las cepas de alto riesgo.

El mecanismo de unión al ADN específico fue descrito en nuestro laboratorio para E2C HPV-16 (43). Se observó que existen dos rutas de unión paralelas: una que procede con intermediarios con arreglos lentos y otra de dos estados sin intermediarios.

Las afinidades reportadas para la interacción E2C-ADN específico varían entre  $10^{-8}$  y  $10^{-13}$  M (44-45). En general estas mediciones varían según las condiciones del entorno y las técnicas utilizadas, por lo tanto los valores no son comparables entre sí. En el laboratorio se midió la constante de disociación del complejo en solución a pH 7.0 y 0.2 M NaCl, la cual resultó ser de aproximadamente  $0.2 \times 10^{-9}$  M (46).

Con el fin de evaluar las contribuciones energéticas de la interacción E2C-ADN se realizaron mutaciones sitio dirigidas en la hélice de reconocimiento de la proteína E2C de HPV-16 (47). En dicho trabajo, se pudo medir la contribución energética de todas las cadenas laterales que no afectan el estado de plegamiento y estabilidad global de la proteína. La mutagénesis sitio dirigida se realizó en más del 90 % de la hélice de reconocimiento. Se observó que no existía ninguna mutación individual que contribuyera a la energía libre de asociación en forma desproporcional al resto de las sustituciones. Este tipo de comportamiento ha sido observado en estudios de interfaces macromoleculares, en donde se identificó que aminoácidos individuales pueden contribuir desproporcionalmente a la energía libre de asociación, a estos residuos se los denominó como *hot-spots* y los contactos que establecen son caracterizados como claves de las interfaces (48-49). Por otro lado, la presencia de *hot-spots* produce un efecto de cooperatividad en la interacción. Esto significa que la contribución energética de los residuos no es independiente entre sí. En el caso de E2C no se observó la presencia de un *hot-spot* en la interfase de interacción con el ADN. Los efectos causados por las sustituciones individuales de los residuos son aditivos, indicando que las contribuciones energéticas de los mismos son independientes y no existe cooperatividad significativa en la unión.

### **E7, proteína transformante**

La proteína E7, junto con E6, es denominada oncoproteína ya que posee la capacidad de generar la transformación celular. Estas proteínas son capaces de modificar el ciclo celular estableciendo un ambiente propicio para la replicación del genoma viral. E7 participa en la interacción de un número importante de proteínas reguladoras de ciclo celular, incluyendo al producto del gen supresor de tumores retinoblastoma, pRB. La proteína pRB pertenece a la familia de las proteínas

denominadas *pocket* junto con las proteínas p107 y p130 que también interactúan con E7 y están involucradas en la regulación del ciclo celular. E7 de las cepas de alto riesgo induce la degradación vía proteasoma de estas proteínas (50-51).

El estado de fosforilación de la proteína pRB es regulado mediante el ciclo celular, siendo hipofosforilada en G0 y G1 y fosforilada durante la fase S, G2 y M. pRB se fosforila en múltiples residuos serinas mediante una kinasa dependiente de ciclina. La forma hipofosforilada posee como función la inhibición de la progresión del ciclo celular. E7 se une preferentemente a la forma hipofosforilada de pRB, dando como resultado la desactivación funcional de pRB. De esta manera, se libera el factor de transcripción E2F permitiendo la progresión de la célula a fase S. Este evento iniciaría la síntesis de ADN y la proliferación celular.

Estudios genéticos indicaron que la formación del complejo E7 y las proteínas *pocket*, incluyendo pRB, no son suficientes para la inmortalización y transformación celular, sugiriendo que probablemente existan otros blancos celulares que sean relevantes en la transformación celular (52). Cabe mencionar que ninguna de estas interacciones puede explicar por sí sola el fenotipo celular que produce la transformación con E7. Una gran variedad de blancos han sido y continúan siendo identificados, sugiriendo que existen múltiples formas con las cuales E7 puede inducir la transformación y posteriormente la progresión al cáncer (53). En la tabla 1.11 se muestran varios de los blancos celulares que posee E7, la relevancia fisiológica de muchos de ellos es todavía desconocida.

La función de la proteína en el ciclo de vida de la infección de HPV probablemente sea la de permitir la replicación del ADN. Las proteínas virales E1 y E5 son necesarias para la iniciación de la replicación del ADN viral, sin embargo el virus es totalmente dependiente de los factores de la célula huésped, incluyendo la ADN polimerasa  $\alpha$ , timidina kinasa, etc. Estas proteínas son expresadas normalmente durante la fase celular S, como se mencionó anteriormente, esta fase es promovida por E7 al interactuar con las proteínas *pocket* y liberar E2F.

La localización de E7 es principalmente nuclear aunque no existe un consenso generalizado ya que la misma varía según el tipo de célula. La localización dentro de la célula depende de si se trata de líneas celulares que naturalmente expresan E7 ya que son derivadas de carcinoma de cuello de útero o si son transformadas con un vector que sobre exprese E7. Se ha observado en líneas celulares transformadas con HPV-16, que la localización de la proteína E7 puede ser tanto nuclear como citosólica (54-56).

| Blanco Celular             | Consecuencias  |
|----------------------------|--|
| pRB, P107,p130             | Disrupción del complejo E2F y degradación              |
| p21                        | Inactivación de la actividad kinasa                    |
| p27                        | Inactivación de la actividad inhibidora de kinasa      |
| TBP                        | Desconocida  |
| TAF-110                    | Desconocida  |
| AP-1                       | Activación de la función activadora de c-jun           |
| Mi2 $\beta$ (HDAC)         | Desconocida  |
| M2 piruvato kinasa         | Desconocida  |
| $\alpha$ -Glucosidasa      | Desconocida  |
| hTuid-1                    | Desconocida  |
| p48 componente de ISGF3    | Inhibición de la estimulación por interferon- $\alpha$ |
| F-actina                   | Desconocida  |
| MPP2                       | Activación de la actividad transcripcional de MPP2     |
| Subunidad S4 del protosoma | Desconocida  |
| IGFBP-3                    | Inhibidora de apoptosis mediada por IGFBP-3            |

**Tabla 1.II:** Alguno de los blancos celulares descritos para E7 HPV-16.

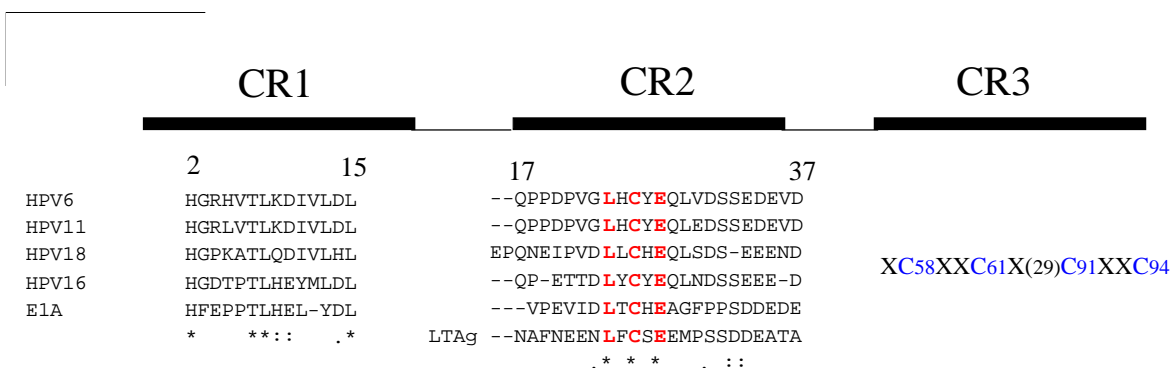
### **E7, regiones y dominios de la proteína**

La proteína E7 puede dividirse, según el alineamiento de secuencias, en dos dominios estructurales: el N-terminal, E7N, y el dominio C-terminal, E7C.

E7 guarda homología de secuencia y función con otras dos proteínas: E1A de adenovirus y el antígeno T de SV40 (57-58). Estas tres proteínas tienen la capacidad de transformar células de mamíferos y comparten la habilidad de interactuar con pRB, liberando E2F.

E7 puede ser dividida en tres regiones por comparación de secuencias con proteínas E7 de diversas cepas. Estas son llamadas CR1 y CR2 las cuales pertenecen al dominio N-terminal y la región CR3 que se encuentra en el dominio C-terminal, figura 1.6.





**Figura 1.6.** Alineación de las secuencias de cada dominio entre 4 cepas de HPV y las proteínas homólogas E1A y LT Ag. El dominio CR1 abarca los primeros 15 amino ácidos de la proteína E7, el CR2 abarca del amino ácido 17 al 37 y el CR3 el resto de la molécula. Debajo de cada alineación se indican con asterisco los residuos idénticos; con dos puntos yuxtapuestos los altamente conservados y con punto simple los de baja conservación. Con rojo sobre el dominio CR2 se identifica al motivo de unión a pRb y que corresponde a la secuencia LXCXE. Con azul sobre el dominio CR3 se identifican los pares de cisteínas involucrados en la coordinación del Zn.

La región CR1 de HPV 16 presenta alta homología de secuencia con una porción de la proteína E1A (ver figura 1.6), pero las funciones asociadas a éste son diferentes en ambas proteínas. El CR1 de E7 es fundamental para su actividad transformante ya que la eliminación de los primeros nueve aminoácidos o la mutación de la histidina 2 por prolina lleva a la pérdida total de la capacidad transformante (59). Este hecho resulta inesperado ya que de las más de cuarenta proteínas que pueden unir E7 ninguna lo hace por medio de esta región.

En la región CR2 se encuentra el motivo canónico LXCXE de unión a las denominadas *pocket proteins* y que comprenden a las proteínas pRB, p107 y p130. El motivo de unión a pRB es una secuencia corta de 5 o 6 aminoácidos que en E7 de la cepa HPV 16 comprende D<sub>21</sub>-L-Y-I-C-Y-E<sub>26</sub>. Esta secuencia consenso se encuentra en la mayoría de las proteínas de E7, en E1A de adenovirus y en el antígeno T de SV40. Este sitio no es el único responsable de la unión a pRB pero es el de más alta afinidad y donde reside la capacidad de unión diferencial a pRB que muestran las E7 de cepas de alto y bajo riesgo (60). Esta diferencia se la atribuye a la presencia de un residuo de ácido glutámico o aspartico en la posición 21 para las cepa de alto riesgo 16 y 18. En cambio, en las cepas de bajo riesgo, HPV6 y 11, poseen un residuo de glicina en la posición análoga. Se ha demostrado que si se muta esta glicina en E7 HPV 6 por un aspartico, esta se comporta como una proteína proveniente de una cepa de alto riesgo teniendo alta afinidad con pRB. En esta región también se encuentra el sitio de fosforilación por la proteína Casein Kinasa II (CKII), el cual comprende las serinas 31 y 32, las cuales se encuentran rodeadas de aminoácidos ácidos.

La región o dominio CR3 tiene la capacidad de coordinar un átomo de Zn por monómero de proteína mediante los motivos CXXC, este arreglo se encuentra conservado en la mayoría de los papilomavirus y solo guarda homología con la proteína E6 de HPV, donde se ha postulado que E6 podría haber surgido a partir de una duplicación génica de E7 ya que posee dos regiones CR3. Este dominio se relaciona con la estabilidad intracelular de la proteína y con su grado de oligomerización. El CR3 presenta un segundo sitio de unión a pRB y aunque el mismo es de baja afinidad, es estrictamente necesario para producir la liberación de E2F.

### **Características conformacionales de E7 en solución.**

En nuestro laboratorio se observó que E7 presenta una conformación de dímero extendido. El concepto de globular se define según la forma que la proteína adopta en solución y supone que la misma puede ser tratada como una esfera con un único radio hidrodinámico. De esta forma el radio hidrodinámico de una proteína es función de su peso molecular. En los experimentos de filtración por tamiz molecular se observó que el dímero de E7 que posee un peso molecular de 22 kDA le corresponde un peso molecular de una proteína globular de 46 kDA. Asimismo, se observó en los experimentos de movilidad electroforética que la proteína posee una movilidad anómala ya que la misma migra como una proteína del doble de su peso molecular (61). Estos experimentos sugirieron que E7 presenta una conformación extendida. El grado de extensión de esta conformación estaría determinado, en parte, por la gran densidad de grupos ácidos en el dominio E7N. Se ha observado que existe un apantallamiento de cargas por la presencia de GdmCl ya que se observó una compactación en la proteína (61).

En concordancia con los resultados expuestos se observó que E7 comparte propiedades con la familia de proteínas intrínsecamente desordenadas, *IDP (intrinsically disordered protein)*. Las proteínas denominadas intrínsecamente desordenadas o nativamente desplegadas se diferencian de las proteínas globulares por sus propiedades conformacionales en solución (62-63). Las características más importantes son:

- Poseen un radio hidrodinámico mayor al esperado para proteína globular de igual peso molecular.
- Ausencia aparente de estructura secundaria en base a los espectros de dicroísmo circular y RMN en soluciones neutras *in vitro*.

- Resistencia a la desnaturalización térmica.
- Poseen alto porcentaje de residuos cargados a pH 7.0 y su relación carga neta / hidrofobicidad es alta.

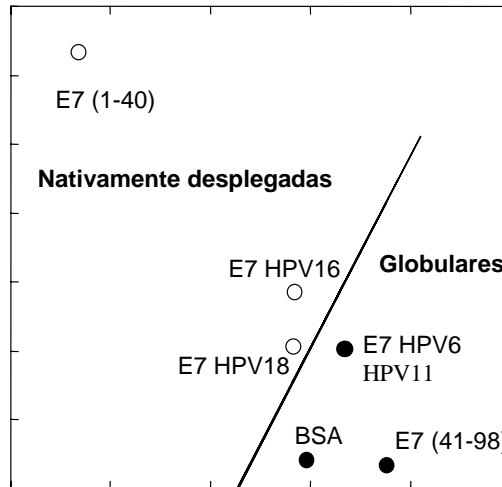
E7 HPV-16 posee todas estas características por lo que se define como *IDP* tanto desde el punto de vista teórico como experimental. La mayoría de las proteínas pertenecientes a esta familia son ejemplos de proteínas que interactúan con otras proteínas. La ausencia de estructura globular estable y compacta es una ventaja ya que al ser dinámica permite adaptabilidad a múltiples blancos celulares (64). E7 posee solo 98 aminoácidos e interacciona con más de 40 blancos celulares dado que la superficie de interacción promedio para proteína-proteína es de  $800 \text{ \AA}^2$  su conformación extendida expondría una mayor superficie de interacción (64). Esto es una ventaja en comparación a las proteínas globulares ya que para exponer la misma cantidad de superficie al solvente deben poseer una masa de 2 o 3 veces mayor (65).

Se puede evaluar para una determinada secuencia polipeptídica si esta pertenece a la familia de proteínas intrínsecamente desordenadas. Para ello se utiliza un algoritmo que le asigna un índice arbitrario obtenido al comparar secuencias de una familia de proteínas y compara la relación entre la carga neta e hidrofobicidad (63). Este modelo presenta dos regiones divididas por una recta en donde se define que la región por encima de ella se encuentran las proteínas que poseen alta relación carga neta / hidrofobicidad y que tiene alta probabilidad de carecer de estructura secundaria estable en condiciones fisiológicas, y por debajo, se encuentran las proteínas globulares (63), figura 1.7.

Una posible explicación a este comportamiento, es que los grupos cargados se repelen previniendo el colapso de la proteína y evitando así, su globularización. Una conformación extendida parece ser la mejor forma de acomodar múltiples residuos cargados en una secuencia lineal y mantenerla en solución, sin embargo las características intrínsecas de esta conformación no se conocen

Este modelo aplicado a E7 de distintas cepas, predice que no todas corresponden a proteínas nativamente desplegadas. Se observa que las E7 de las cepas de bajo riesgo HPV 11 y 6 se encuentran en la región de las proteínas globulares, mientras que las provenientes de las cepas de alto riesgo HPV16 y 18 pertenecen al grupo de las *IDP* (66). Si se analiza E7N de HPV16, E7(1-40), el cual está enriquecido en aminoácidos ácidos, éste cae claramente dentro del espacio de las proteínas *IDP*. Sin embargo el dominio E7C del HPV16, E7 (42-98), cae dentro del espacio de las

proteínas globulares. Se puede decir que HPV16 E7 es una proteína modular con dos dominios con propiedades fisicoquímicas totalmente diferentes.



**Figura 1.7:** Análisis de secuencia de distintas E7 según los algoritmos de predicción de secuencias nativamente desplegadas. El gráfico relaciona la hidrofobicidad media de una secuencia con la carga media de la proteína. La recta divide al gráfico en dos regiones, por encima de esta se encuentran las secuencias que corresponden a proteína nativamente desplegadas y por debajo de la recta, las proteínas globulares. E7 (1-40), corresponde a la secuencia de los 40 aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína E7 de HPV 16; E7 (41-98) corresponde a la secuencia de los 57 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína E7 de HPV 16 y BSA, a la secuencia de la albúmina bovina. Imagen extraída y adaptada de Alonso 2005 (67).

Este modelo es consecuente con la movilidad electroforética observada en las proteínas analizadas. Tanto para las cepas de alto riesgo (16 y 18) como para las de bajo riesgo (6 y 11) se conoce la movilidad electroforética de las proteínas E7 (68). La movilidad electroforética anómala es característica de las cepas de alto riesgo y esto correlaciona con la ubicación en el gráfico de la figura 1.9. Por otro lado las proteínas E7 de las cepas de bajo riesgo (11 y 6) poseen una movilidad electroforética normal sugiriendo que pertenecen al grupo de las proteínas globulares.

Aunque el número de proteínas analizadas es insuficiente para establecer una conclusión definitiva, vale mencionar que las E7 provenientes de cepas de alto riesgo pertenecen al grupo de las proteínas *IDP*, mientras que las de bajo riesgo pertenecen al grupo de las proteínas globulares.

### **Dominio N-terminal, E7N**

Como se explicó anteriormente E7N puede ser clasificado como IDP, y esto concuerda con el análisis biofísico desarrollado en nuestro laboratorio (69). Donde se demostró que E7N es un dominio aislado que no presenta un plegado compacto y cooperativo con una estructura secundaria y terciaria canónica. Sin embargo se ha observado, que este dominio regula muchas de las notables propiedades de E7 y puede ser considerado un dominio bien definido. Cabe destacar que este dominio posee una alta carga negativa que ya tiene un gran número de aminoácidos ácidos y un pI teórico de 3.5.

El espectro de dicroísmo circular de UV lejano de E7N muestra un espectro que se asemeja al de un péptido desordenado. No obstante, se ha demostrado que E7N posee flexibilidad conformacional en solución. La temperatura, la fosforilación y el pH alteran el espectro sustancialmente y sugieren la presencia de regiones con estructura del tipo poliprolina II, PII (69). Se ha observado también, por modificaciones del solvente, que posee la capacidad de sufrir transiciones de lámina- $\beta$  a  $\alpha$ -hélice.

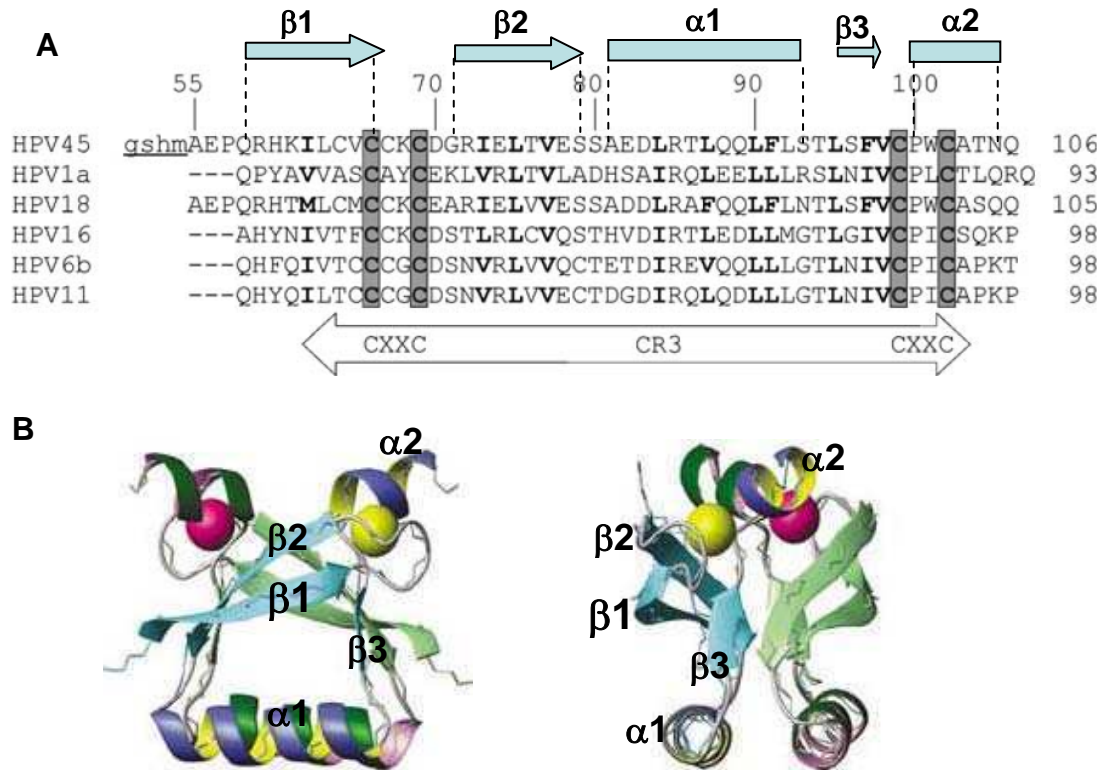
E7 fue descrita como una proteína de vida media corta y su N-terminal es esencial para la degradación por proteasoma (70). E7N cuenta con una secuencia PEST que puede estar relacionada con la degradación mediante fosforilación como sucede con otras proteínas (71), aunque esto todavía no fue demostrado para E7.

El N-terminal de E7 puede ser descrito como un dominio *IDP* o nativamente desplegado. Es un dominio estructural largo, cargado y plástico, es probable que estas características optimicen la interacción con los múltiples blancos celulares que posee la proteína.

### **Dominio C-terminal de E7**

Durante el transcurso de este trabajo de tesis se publicaron dos estructuras del dominio C-terminal o E7C. Una de ellas es la estructura de perteneciente a la cepa de alto riesgo HPV 45 (72) resuelta por resonancia magnética nuclear, RMN, y la otra, perteneciente a la cepa de bajo riesgo HPV 1A (73), resuelta por cristalografía de rayos X. Si se comparan las estructuras se observa que la desviación media cuadrada medida en la superposición de la cadena pesada de ambas estructuras es de 1.4 Å. Por otro lado, si se toma en cuenta que la alineación de secuencias de E7 en donde se observa el alto grado de conservación de E7C es de más de 40 % y que existe un 60% de homología entre las proteínas se puede sugerir que las estructuras obtenidas por

ambas técnicas es la adoptada por la mayoría de los dominios E7C, figura 1.7. A continuación se describe la estructura de E7C tomando como ejemplo la obtenida por RMN perteneciente a la cepa HPV 45, figura 1.8 B.



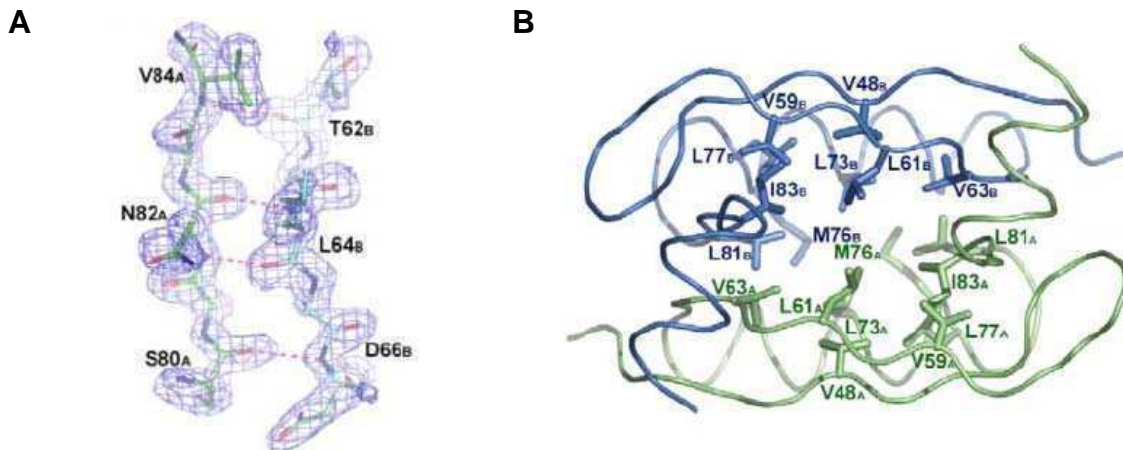
**Figura 1.8:** Alineación de secuencias y estructura de E7C. **A)** alineación de secuencias de algunas de las cepas de E7. Los residuos hidrofóbicos que forman el núcleo hidrofóbico de la interfaz dimérica se encuentra en negro. En gris se muestran las cisteínas que coordinan el Zn **B)** Esquema de la estructura de E7 HPV 45 resuelta por RMN (72), vista frontal y lateral. Los iones de Zn están representados en amarillo y rosa. Cada monómero que conforma la estructura está representado en diferentes colores, uno en la gama de los azules y el otro en la gama del verde.

E7C se pliega automáticamente en una estructura bien definida que coordina Zn y forma una topología  $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 1$ - $\beta 3$ - $\alpha 2$ , como se puede apreciar en la figura 1.6.  $\beta 1$  y  $\beta 2$  forman una lámina  $\beta$  antiparalela y retorcida, las mismas están unidas por 4 aminoácidos en el caso de HPV45. Continuando en secuencia, se encuentra  $\alpha 1$  que forma un ángulo recto con la cadena pesada y termina en una alargada lamina- $\beta$ , denominada  $\beta 3$ . Por último se encuentra una pequeña hélice,  $\alpha 2$ . Los motivos CXXC de coordinación de Zn, que se encuentran separados por 29 o 30 aminoácidos, están localizados en el loop que conecta a  $\beta 1$  con  $\beta 2$  y el carboxilo terminal de  $\alpha 2$ . La

coordinación de Zn esta dada por la cisteínas C66/69 y C99/102 para el caso de E7 HPV 45 y en el caso de E7 HPV 16 le corresponde a las cisteínas C58/61 y C91/94.

En el caso de la estructura de HPV 45 E7C, las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos I 62, I73, L75, V77, L84, L87, L90, F91, L95, F97 y V98, de cada monómero, forman un pequeño y plano núcleo hidrofóbico. La hélice  $\alpha 1$  de cada monómero participa en la dimerización de este dominio junto con la formación de dos laminas betas antiparalelas formadas entre la lamina  $\beta 2$  de uno de los monómeros y la lamina  $\beta 3$  del otro. Una superficie de  $1820 \text{ \AA}^2$  forma la interfaz dimérica.

El núcleo hidrofóbico también es observado en la estructura cristalográfica resuelta para HPV 1A E7C y esto es debido a la alta conservación en la secuencia de los aminoácidos hidrofóbicos presentes en el núcleo de dimerización, figura 1.9. En el caso del E7C de HPV 1A, se observa que dicho núcleo esta formado por V63 de  $\beta 2$ , L73, M76 y L77 de  $\alpha 1$ , y L81 y I83 de  $\beta 3$ . En esta misma estructura también se observa la formación de la lámina- $\beta$  antiparalela formada por  $\beta 3$  de un monómero con la  $\beta 2$  del otro. Por lo tanto en ambas estructuras se observa que el dímero queda estabilizado por un núcleo hidrofóbico formado aminoácidos hidrofóbicos altamente conservados de cada monómero.



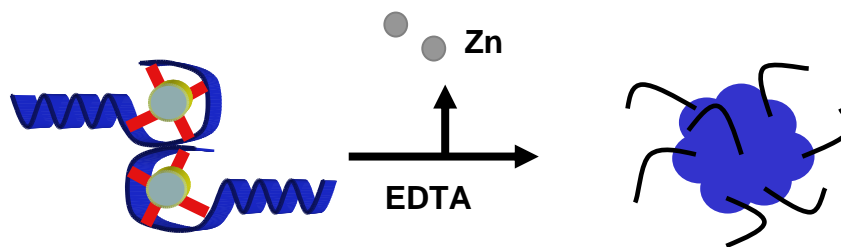
**Figura 1.9:** E7C HPV 1A. A) Densidad electrónica del núcleo hidrofóbico en donde se muestra la interacción entre la lámina  $\beta 2$  de uno de los monómeros con la lámina  $\beta 3$  de el otro monómero. Trazo  $C\alpha$  de E7C donde se indican los residuos hidrofóbicos que conformar el núcleo de dimerización. (73)

En el estudio por RMN, se observó que la remoción del Zn causa un despliegue del E7C, asegurando que el Zn es importante para mantener el estado plegado del dominio pero es un prerrequisito para la dimerización vía los contactos de la lámina- $\beta$

antiparalela e intermonomérica formada por  $\beta 2/\beta 3'$  y a través de la interacción por la cadena lateral del núcleo hidrofóbico.

### E7SOs

E7 presenta varios estados de oligomerización, por un lado se encuentra en equilibrio la especie dimérica con la monomérica con una constante de disociación  $K_D = 1 \mu\text{M}$  (74) y por el otro se presenta como un oligómero soluble y de alto peso molecular. En el laboratorio se ha demostrado estos oligómeros de alto peso molecular se forman al remover el Zn que coordinan las cuatro cisteínas del dominio E7C (75). La remoción del metal se realiza al incubar a la proteína con EDTA, figura 1.10. A estos oligómeros los hemos denominados E7SOs y no se encuentra en equilibrio con los otros estados de oligomerización de E7.



**Figura 1.10:** Esquema del ensamblado de E7SOs. Se muestra la especie inicial E7 dimérica, se libera el Zn por acción del EDTA y se ensambla en oligómero. Se esquematiza al dominio E7C (azul) como el dominio de oligomerización y a E7N expuesto al solvente (negro).

Se han demostrado que el proceso de ensamblado de E7SOs es ordenado y diferente de aquellos procesos de formación de agregados insolubles (75). La formación de E7SOs requiere de la interacción específica de los dominios carboxilo terminal de los monómeros/dímeros de E7, exponiendo E7N al solvente (76). Como E7C esta conservado entre las proteínas E7 de papilomavirus y no se ha encontrado homología de secuencia en otras proteínas, cabe la posibilidad de que esta propiedad de formar este tipo de oligómeros sea compartida por todas esta proteínas.

E7SOs comparten características de agregados amiloides ya que se une a los colorantes rojo congo y tioflavina T. Pero morfológicamente son diferentes ya que los E7SOs son esféricos, bien definidos y permanecen en solución al ser centrifugados. Los agregados amiloides son en su estado final de maduración fibras de longitudes



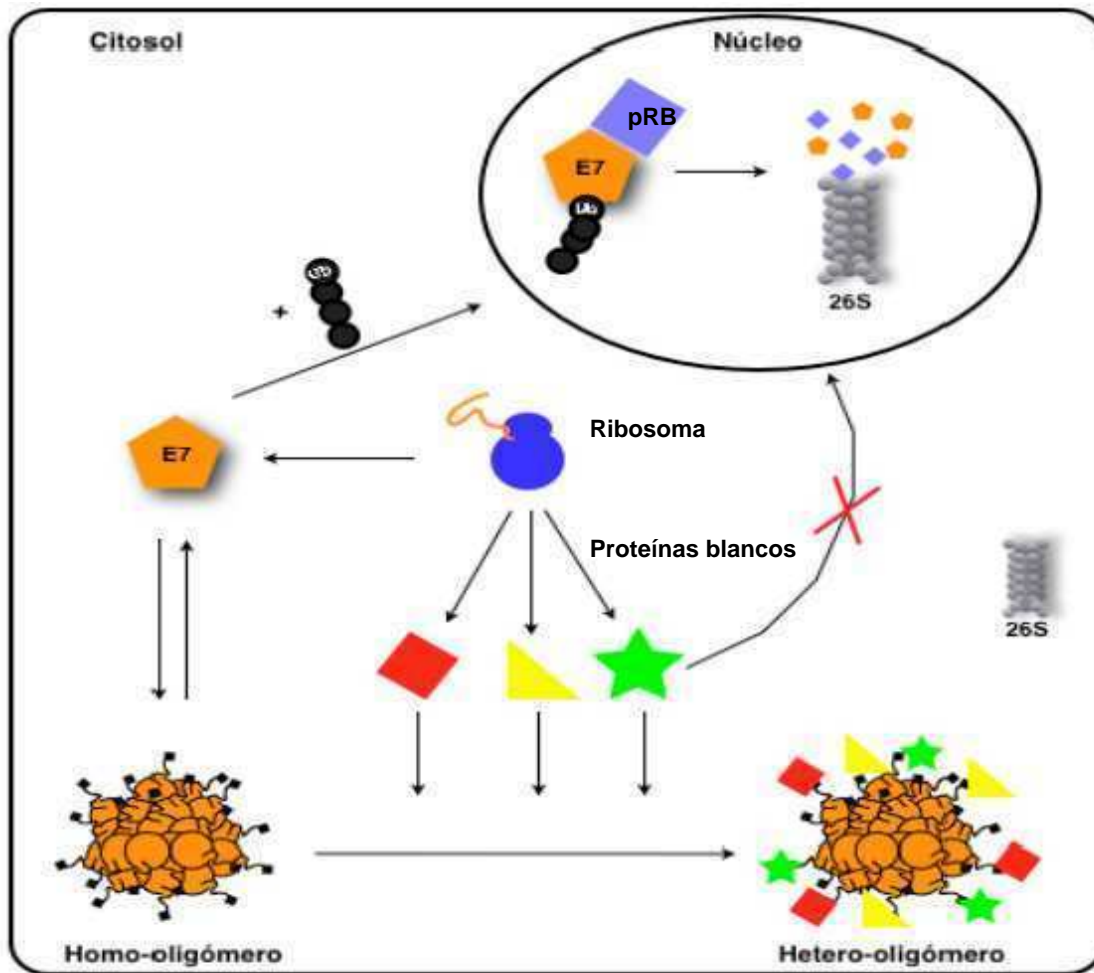
indefinidas y por lo tanto insolubles. Ambas estructuras comparte el tipo de estructura secundaria. Estudios realizados por difracción circular demostraron que la oligomerización de E7 ocurre con un gran incremento en la cantidad de hojas  $\beta$ .

Sea demostrado en nuestro laboratorio (76) que E7SOs y no E7<sub>2</sub> posee actividad chaperona del tipo *holdasa*. E7SOs tiene la capacidad de unir y prevenir la agregación de proteínas que se encuentran en el proceso de plegado o desplegado o en conformaciones cercanas a la nativa. Asimismo, no se ha observado unión a E7SOs cuando a las proteínas se encuentran en su estado nativo. En base al análisis de secuencias de los dominios de E7, se ha sugerido que el dominio E7C es el responsable de la actividad chaperona. Esto es debido a que esta actividad requeriría de regiones hidrofóbicas que interactúen con las especies proteicas en estado no nativo, las cuales también exponen regiones no hidrofóbicas. Estas regiones pertenecen al núcleo de dimerezación de E7. En el caso E7SOs, este oligómero presentaría algún arreglo estructural en que dichas regiones quedarían expuestas al solvente y por lo tanto accesibles a la interacción con proteínas mal plegadas. Es improbable que la actividad chaperona participe en mecanismos generales de plegamiento, debido a los bajos niveles de E7 en células infectadas no permitirían reacciones estequiométricas. Existen otros procesos en los que se necesita de la actividad chaperona, como la disociación de algunos complejos proteína-proteína y la degradación de proteínas a través de proteasoma (77-78), procesos en los cuales E7 está involucrada.

Estudios de localización de E7 en células realizados en el laboratorio (56), observaron la existencia de la especie E7SOs en líneas celulares transformadas por HPV-16, como CasKi y SiHa y en biopsias de tejidos cancerosos. Se observó que mientras que la especie E7SOs se halla en el citosol, E7 se encuentra mayoritariamente en el núcleo. Se observó, en este mismo trabajo que este oligómero tendría como función almacenar a E7.

La figura 1.11 describe un posible modelo del comportamiento de E7 dentro de la célula, publicada por nuestro laboratorio, Dantur *et al* (56), y reúne las hipótesis y conceptos analizados hasta el presente sobre la funcionalidad de los distintos estados de oligomerización de la proteína. Se puede observar en dicha figura el equilibrio monómero o dímero de E7 con E7SOs, observado *in vivo*. Por otro lado, se muestra la hipotética interacción de E7SOs con ciertos blancos celulares (representados en color verde, amarillo y rojo). Sugiriendo que la interacción de E7SOs con dichos blancos evita que estos lleguen al núcleo. Asimismo, se propone que la interacción con E7SOS

podría evitar la degradación de los mismos, mientras que, por ejemplo, la interacción de E7 con pRB degrada ambas proteínas vía ubiquitinación.



**Figura 1.11.** Esquema de los diferentes estados de oligomerización de E7 dentro de la célula. Figura extraída y modificada de Dantur et al (56). Se observa como la proteína dimérica o monomérica degrada a su blanco, en este caso pRB, mientras que E7SOs mantiene los blanco en el citosol.



## **2. Mecanismo de ensamblado de E7SOs**



Uno de los objetivos de esta tesis es el estudio y caracterización del autoensamblado de los oligómeros esféricos de alto peso molecular que forma E7 (E7SOs) al quitarle el Zn (75).

Se ha demostrado en nuestro laboratorio, que E7SOs tiene la capacidad de actuar como una chaperona del tipo holdasa (76). Esto no solo le confiere una función a dicha especie sino que demuestra la posibilidad que tiene la proteína de interactuar con numerosos blancos celulares aun cuando se encuentra en su estado oligomérico.

Por otro lado, se ha observado también en el laboratorio (56), que dichos oligómeros se localizan en el citosol de líneas celulares transformadas y en biopsias de tejidos cancerosos, mientras que la proteína dimérica o monomérica se localiza en el núcleo. Debido a la gran promiscuidad que tiene E7 de interactuar con diferentes blancos celulares citosólicos o nucleares, esta especie de E7 podría interactuar fuertemente con alguno de los blancos proteicos, conduciendo así a la transformación celular de la celular huésped.

En el mismo trabajo se observó que este oligómero podría funcionar de almacenamiento de E7. En las líneas celulares mencionadas anteriormente, tratadas bajo un inhibidor proteico, se observó que una vez degradada la E7 nuclear esta reaparecía. La proteína sería trasladada desde el citosol, donde se localizan los E7SOs, al núcleo. Manteniendo de esta forma E7 nuclear y su interacción con proteínas nucleares.

Por lo dicho anteriormente proponemos que el conocimiento del mecanismo de ensamblado de E7SOs puede llevar al control de su formación obteniéndose una potencial estrategia terapéutica.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo (75), demostraron que el ensamblado de E7SOs es ordenado, es una característica intrínseca de la secuencia aminoacídica de E7 y que requiere de la interacción del los dominios carboxilo terminal de la proteína. El proceso de autoensamblado comienza cuando el Zn estructural, que es coordinado por la cuatro cisternas que contiene el dominio c-terminal, es removido por un agente quelante como EDTA. Como ya se comentó en la introducción, E7SOs comparten homología con agregados amiloides en el tipo de estructura secundaria que los forman, que es el de lámina beta repetitiva. Es por esa razón que dichos oligómeros interactúan con colorantes Rojo Congo y tioflavina T. Pero el estado final de los mismos es diferente ya que los agregados amiloides en su estado final de maduración

se presentan como fibras de longitud indefinida mientras que E7SOs son esféricos y solubles.

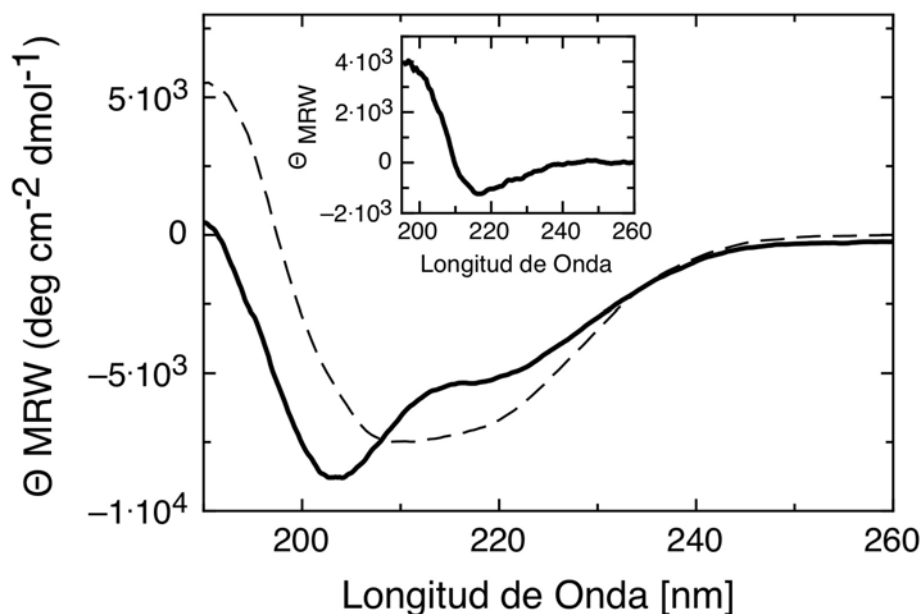
No existe hasta el momento un modelo concluyente en la interpretación del mecanismo de ensamblado de este tipo de especies. Algunos trabajos proponen que dicho mecanismo se puede modelar utilizando los modelos existentes en el ensamblado de cápsidas virales (79). A pesar que existe un amplio conocimiento de las estructuras de los virus icosaédricos a través de técnicas como la cristalografía de rayos X y la criomicroscopía electrónica, se conoce relativamente poco acerca de los mecanismos de autoensamblado. Este proceso, en general, involucra la formación de diferentes especies o intermediarios que aparecen con diferentes escalas de tiempo. Se dificulta separar experimentalmente cada evento y encontrar la técnica o sonda adecuada para la caracterización de cada etapa. Es por esa razón, que hasta el momento existen pocos modelos de ensamblado tanto para cápsidas virales como para oligómeros esféricos.

#### **Cinética del autoensamblado de E7SOs seguida por sondas espectroscópicas.**

En estudios anteriores se había analizado en forma preliminar la cinética de formación de los oligómeros a través de los cambios en la señal de triptofano de la proteína mutada E7 I93W (67). El ajuste mediante una función exponencial de esta cinética, como aproximación inicial, sugería que la misma contenía diferentes fases. Con el fin de poder separar y definir las fases o etapas de formación del oligómero, como así también las especies de E7 que intervienen en este proceso, se estudió la cinética de formación con diferentes sondas espectroscópicas a la proteína salvaje E7 HPV16. El análisis se diseñó de manera tal que pueda ser descrito según los cambios que se presenten en la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína, por separado. En principio las sondas se seleccionaron teniendo en cuenta las características conocidas de los E7SOs.

Luego de ser incubada con EDTA, E7 presenta cambios en su espectro de dicroísmo circular, *DC*. Los espectros de la proteína antes y después de ser tratada con EDTA se muestran en la figura 2.1. Se observa que la señal a 216 nm disminuye, mientras que la señal a 202 nm aumenta, lo cual indica que el estado final contendría mayor proporción de estructura ordenada. Con el objeto de evidenciar el tipo de estructura secundaria que adquiere esta especie, se muestra el espectro diferencia en

la figura insertada en la figura 2.1. Este reporta un aumento en lámina beta, ya que tiene un mínimo alrededor de 217 nm y un máximo alrededor de 195 nm.

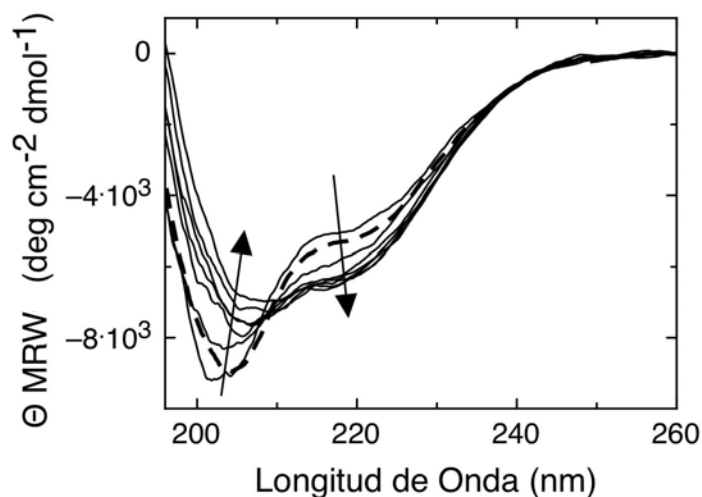


**Figura 2.1:** Espectro de dicroísmo circular de en el UV lejano E7. La línea continua corresponde a E7 y la línea cortada a E7SOs. La figura inserta corresponde al espectro diferencia entre E7 y E7SOs.

A partir de la de la información obtenida en los espectros y con el propósito de comenzar con el estudio cinético del autoensamblado de E7SOs, se tomaron los espectros de *DC* a diferentes tiempos una vez iniciada la reacción con EDTA (Figura 2.2). Se observó que existen dos longitudes de onda adecuadas para seguir la reacción a través del tiempo: a alrededor de 202 nm y alrededor de 216nm, ya que estas longitudes de onda presentan los máximos cambios en la estructura secundaria durante la cinética de ensamblado de los oligómeros. Por otro lado, en este análisis se observa un punto isodicroico alrededor de 209 nm, característico de un proceso de dos estados en equilibrio.

En el caso de la estructura terciaria y cuaternaria, se empleó la sonda intrínseca de la proteína y se monitoreó el comportamiento de la intensidad de fluorescencia de las tirosinas. Cabe mencionar que la proteína salvaje posee 4 tirosinas en su secuencia mientras que no posee triptófanos. Este análisis fue comparado con la cinética acompañada por la intensidad de fluorescencia del triptófano de la proteína mutante de triptofano E7I93W (67).



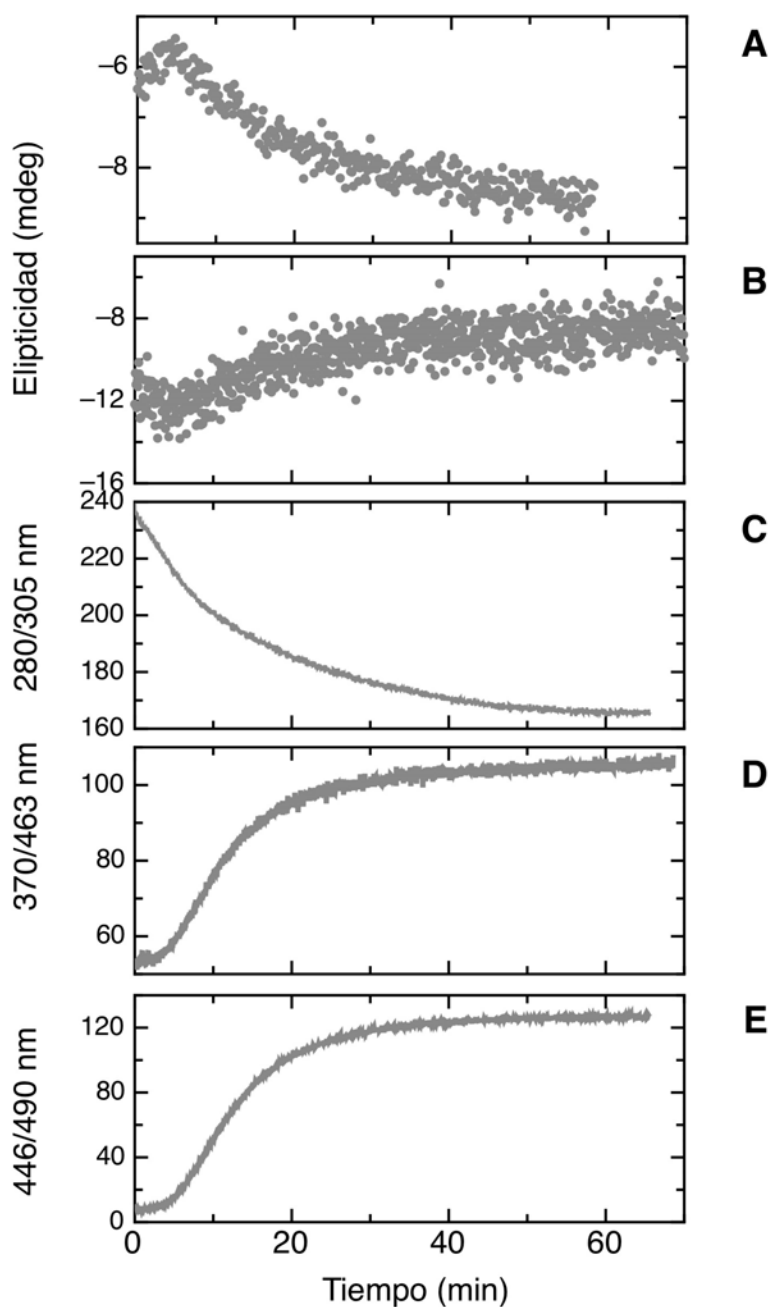


**Figura 2.2:** Espectro de DC a diferentes tiempos desde 3 minutos a 24 horas (línea continua) y el espectro de E7 antes de incubarse con EDTA (línea cortada). Las flechas indican las regiones con mayor cambio.

En este análisis se tuvo en cuenta que E7SOs, al poseer una estructura beta repetitiva, tiene la propiedad de interactuar con el colorante *Th T*. Dicho colorante presenta un aumento de intensidad de fluorescencia en el máximo a  $\sim 490$  nm, de hasta 10 veces en comparación de la señal de *Th T* en buffer acuoso. Por otro lado, se sabe también, que este oligómero interactúa con el colorante *ANS* ya que posee bolsillos hidrofóbicos en su conformación (76). El *ANS* aumenta su intensidad de fluorescencia cuando pasa de un medio polar a otro no polar. Los cambios en la intensidad de fluorescencia de ambos colorantes fueron medidos con el fin de estudiar los cambios en la estructura terciaria y cuaternaria. En la figura 2.3 se presentan las cinéticas monitoreadas por las sondas antes mencionadas.

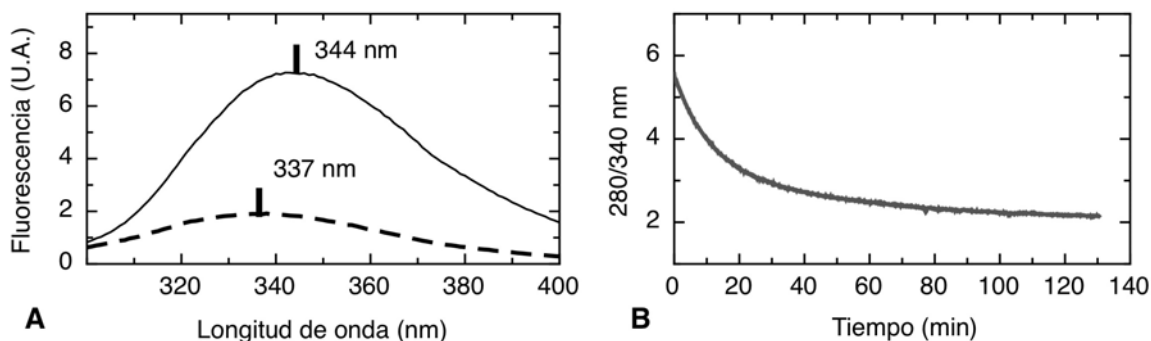
La cinética seguida por *DC* a 216 nm y a 202 nm muestra en ambos casos un comportamiento bifásico que ocurre en paralelo. En un primer momento la señal a 216 nm aumenta mientras que 202 nm disminuye y luego de transcurridos aproximadamente 280 segundos ambas señales cambian inversamente su comportamiento. La señal a 216 nm disminuye en forma exponencial mientras que la señal a 202 nm aumenta también exponencialmente. Esta segunda fase puede ser ajustada en ambos casos por una única función exponencial, la que se presenta con una similar velocidad aparente, indicando que los cambios observados transcurren en forma paralela. Este comportamiento bifásico representa el surgimiento de una especie intermediaria en la

reacción y se puede proponer que a dicha especie le correspondería una pérdida de estructura secundaria.



**Figura 2.3:** Cinética de ensamblado de E7SOs seguida por diferentes sondas. Los ensayos se realizaron a 15  $\mu$ M de E7, en 10 mM Fosfato pH 7, 1mM DTT y se utilizó 1 mM de EDTA para provocar la reacción. En los casos en donde se midieron los cambios de la intensidad de fluorescencia se especifica la longitud de onda de excitación y de emisión sobre el eje y de cada figura. **(A)** Cambios en la señal a 216 nm seguida por dicroísmo circular. **(B)** Cambios en la señal a 202 nm seguida por dicroísmo circular. **(C)** Fluorescencia intrínseca de tirosinas. **(D)** Por ANS. **(E)** Cinética seguida por Th T.

El cambio de la señal de intensidad de fluorescencia de Tyr muestra un comportamiento similar al obtenido al monitorear la intensidad de fluorescencia del Trp de la proteína mutante (ver figura 2.4B). La cinética en ambos casos puede ser simulada con más de una exponencial poniendo en evidencia la presencia de un proceso multifásico. En el caso de la fluorescencia del Trp (experimento extraído del trabajo de tesis del Dr Alonso (67)) se observa un corrimiento en el máximo del espectro de fluorescencia al ser comparado con el espectro de la proteína dimérica. Se puede observar de la figura 2.4 A la intensidad de fluorescencia del Trp 93 de E7SOs I93W disminuye y posee su máximo centrado en  $\sim 337$  nm, indicando que este fluoróforo se encuentra más protegido del solvente que la forma dimérica, la cual posee el máximo de emisión en  $\sim 344$  nm. De la curva de fluorescencia de Tyr se puede concluir que al atenuarse la intensidad de fluorescencia implica un ocultamiento de los fluoróforos. Los resultados obtenidos en ambos experimentos sugieren la formación de una estructura terciaria y/o cuaternaria compacta.



**Figura 2.4.** E7SOs formados por la mutante I93W E7. **(A)** Espectro de emisión de fluorescencia En línea entera E7 I93W y en línea partida E7SOs I93W. Con barras se indican los máximos de emisión. **(B)** Cinética de ensamblado de E7SOs I93W, monitoreando los cambios en la intensidad de fluorescencia del triptófano. La concentración de proteína utilizada fue de  $10 \mu\text{M}$  en la misma solución buffer que los experimentos antes mostrados:  $10 \text{ mM}$  fosfato de sodio pH 7.0 y  $1 \text{ mM}$  DTT. Las imágenes fueron extraídas del trabajo de Tesis realizado en nuestro laboratorio por el Dr Alonso (67)

Las cinéticas seguidas por los colorantes *Th T* y *ANS* presentan tres etapas bien distinguibles: un tiempo de retardo y luego un incremento de la señal hasta alcanzar un estado estacionario. Este tiempo retardo se lo denomina comúnmente fase *lag* y a la fase que preside se la denomina fase de elongación. Ambas sondas tiene un comportamiento paralelo a través del tiempo, ver figura 2.3 E y D. Esto significa que a medida que se forma la estructura de lámina beta repetitiva aumentan las regiones de bolsillos hidrofóbicos expuestos al solvente. En ambas curvas el ajuste por la función exponencial en la fase de elongación indico que se trataba de un proceso multifásico.

A partir de es estos resultados podemos proponer la existencia de un intermediario sin estructura beta repetitiva y sin superficies hidrofóbicas expuestas al solvente que se desarrolla en el tiempo de retardo. Luego, la presencia de este intermediario iniciaría la fase de elongación hasta llegar a un estado estacionario correspondiente a la finalización de la oligomerización, dando lugar a la especie E7SOs.

En la tabla 2.I, se comparan los tiempos de retardo y los tiempos medios de cada señal. Para el caso de *ANS* y *Th T* se tomó como tiempo de retardo hasta un cambio del 10% de la señal. En el caso de las señales seguidas por dicroísmo circular se tomó el punto medio en donde se produce el cambio en el comportamiento. Los tiempos medios fueron obtenidos por dos métodos. Por un lado, se ajustó a la segunda etapa con una función mono-exponencial y se obtuvo la velocidad aparente de la reacción, para luego obtener  $t_{1/2}$ . Como las curvas de *Th T*, *ANS* y fluorescencia de tirosinas presentan una comportamiento multifásico y el ajuste por una exponencial puede involucrar mucha incerteza en la obtención del  $t_{1/2}$ , se lo obtuvo también gráficamente como el tiempo en el cual la señal alcanza la mitad de su valor (ver tabla 2.I).

| Sonda  | Tiempo de Retardo (seg) | Tiempo <sub>1/2</sub> (seg) |
|--------|-------------------------|-----------------------------|
| ANS    | 211 ± 20                | 432/674*                    |
| Th T   | 160 ± 20                | 428/700*                    |
| Tyr    | 0                       | 678.6/558*                  |
| 202 nm | 280 ± 30                | 663                         |
| 216 nm | 289 ± 30                | 677.4                       |

**Tabla 2.I:** Tiempos característicos en la cinética de formación de E7SOs Los tiempos medios fueron obtenidos mediante el ajuste de una exponencial, los tiempos medios (\*) fueron obtenidos del tiempo en el cual se obtiene la mitad de la señal.

### **Cinética seguida por el método de dispersión de luz dinámica, DLS.**

Con el objetivo de analizar la progresión de eventos en el ensamblado de E7SOs, se midieron los cambios del diámetro hidrodinámico,  $D_h$  por dispersión de luz dinámica, DLS. Los experimentos se realizaron en las mismas condiciones que las cinéticas anteriormente presentadas. En primer lugar se tomaron las mediciones de diámetro del punto de partida de E7 obteniéndose un valor de  $6.8 \pm 0.8$  nm. Es

necesario mencionar que la proteína se encuentra en forma dimérica en la concentración en que se realizó el experimento (15  $\mu\text{M}$ ). También recordemos que no se trata de una proteína globular (61), puesto que su radio hidrodinámico es mayor al de una proteína globular de igual peso molecular.

Estudios realizados para predecir radios hidrodinámicos,  $R_h$ , de proteínas globulares y desplegadas (80) sugieren que la relación con el número de residuos de la cadena polipeptídica se encuentran relacionados como lo muestran las ecuaciones empíricas (2.1) y (2.2), donde N es el número de residuos y  $R_h$  esta dado en angstroms. Este modelo resulta del análisis a través de *PFM NMR* (Pulse field gradient por resonancia magnética nuclear) y concuerda con los radios medidos por las técnicas de *DLS*, *SANS* (small-angle neutron scattering) y *SAXS* (small-angle X-ray scattering). Este modelo es válido para proteínas de 56 a 760 aa en el caso de poseer un plegamiento globular y para péptidos o proteínas desplegadas si puentes de disulfuros desde 16 a 294 aa. Con esto podemos observar que el diámetro predicho para E7 de la ecuación 1 es de aproximadamente 4.38 nm, mientras que el valor medido por *DLS* es mayor ( $6.8 \pm 0.8$  nm) y esto corresponde a que el dominio N-termina de E7 es intrínsecamente desordenado. Por otro lado, si calculamos el valor de  $D_h$  que tendríamos con el monómero de E7 desplegado este es de aproximadamente 6 nm. Este último valor es más cercano al obtenido para E7 dimérica.

$$R_h = (4.75 \pm 1.11)N^{0.29 \pm 0.02} \quad (2.1)$$

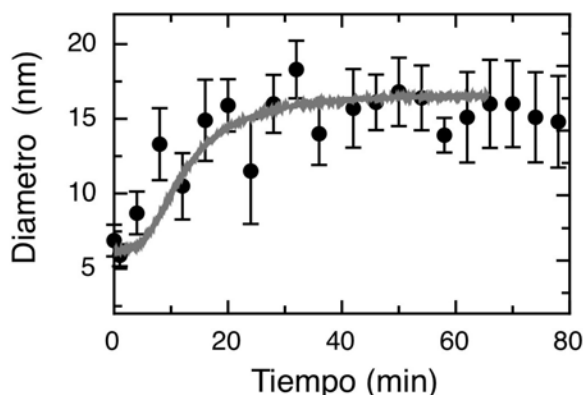
$$R_h = (2.21 \pm 1.07)N^{0.57 \pm 0.02} \quad (2.2)$$

La cinética de formación de E7SOs seguida por *DLS* se muestra en la figura 2.5. El experimento muestra que en los primeros minutos de la reacción el valor del diámetro se mantiene próximo al punto de partida y luego se incrementa hasta alcanzar el estado estacionario, al igual que en las curvas de *ANS* y *Th T* mostradas anteriormente. Se puede observar de superponer a la señal de *DLS* la curva de *Th T*, que la señal de fluorescencia es paralela con la señal de dispersión de luz. Este comportamiento sugiere que la formación de la estructura lámina beta repetitiva es paralela al ensamblado del oligómero.

Por otro lado, si tomamos los primeros puntos  $t = 1$  min y  $t = 4$  min, que se encuentran dentro del tiempo de retardo, y el promedio de ambos obtenemos los

siguientes diámetros hidrodinámicos:  $D_{h1min} = 5.9 \pm 0.7$  nm,  $D_{h4min} = 8.7 \pm 1.4$  nm y  $D_{hprom} \sim 7.3$  nm. En base a estos resultados y las consideraciones anteriores, no se puede determinar con precisión a que especie corresponde, ya que podría ser a un monómero desplegado o un dímero con una conformación diferente a la inicial. No obstante, se observa que la especie que surge en un primer momento posee un  $D_h$  que no difiere sustancialmente del diámetro inicial.

Por otro lado, el modo de medir una cinética por *DLS* obliga a tomar un número limitado de mediciones por punto, este límite está sujeto a la velocidad de la reacción. En este caso se toma una medición que promedia el diámetro de 10 mediciones, mientras que para medir un punto fijo como el caso del punto de partida E7 sin EDTA, esta medición se aumenta a 30 veces la cantidad de puntos a promediar. Esto sugiere que los valores obtenidos tienen una desviación estándar mayor a la del punto de partida y es otro paso limitante en la determinación del tamaño de la especie. Si podemos distinguir claramente el comportamiento de la reacción.



**Figura 2.5:** Cinética de ensamblado de E7SOs seguida por DLS (círculos negros) y por fluorescencia de tioflavina T.

A pesar de no poder definir con precisión la especie que se presenta en la fase de retardo, es posible descartar las que no están involucradas en la reacción. A partir de la ecuación 2.1 y para  $D_h$  menores a los obtenidos en el tiempo de retardo (primeros 4 minutos), se puede descartar la presencia de dímeros, trímeros y tetrámeros globulares como especie inicial en la reacción.

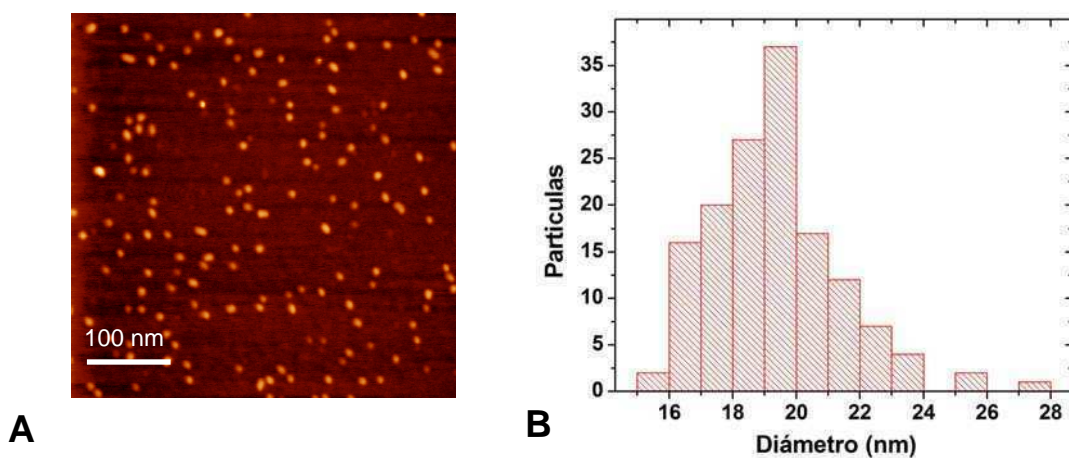
El diámetro de la especie del estado estacionario es de  $15.7 \pm 0.7$  nm y la distribución de diámetros de dicha medición muestra que estamos frente a una especie homogénea (figura no mostrada). Esta medición se realizó una vez alcanzado el estado

estacionario. Esta especie es estable, ya que las mediciones realizadas a las 48 hs de haber finalizado la reacción muestran valores dentro del intervalo mencionado. El valor de este diámetro supera ampliamente al rango en donde las ecuaciones empíricas 2.1 y 2.2 son válidas. Por lo tanto, este modelo deja de ser válido para esta conformación.

Con el fin de obtener una aproximación de la cantidad de E7 monoméricas que conforman el estado final, se utilizó la calibración que posee el equipo de medición (Zetasizer Nano Series) la cual relaciona el diámetro hidrodinámico con el peso molecular que le correspondería a una proteína globular con dicho diámetro. Para el diámetro medido ( $15.7 \pm 0.7$  nm), el peso molecular de una especie globular es de aproximadamente 420 kDa y le corresponde a aproximadamente 38 unidades de E7. Cabe destacar que se espera de este oligómero esférico, al igual que en una cápside viral, posea un centro vacío y todas las proteínas que lo conforman se ubiquen en la superficie periférica. No obstante, se podría pensar que este centro vacío es mucho más pequeño que el de una cápside viral ya que esta última posee un radio mayor al obtenido para E7SOs. Por lo tanto estas 38 unidades que conformarían a E7SOs serían un límite superior de cantidad de E7 monoméricas que componen al oligómero.

### Morfología de E7SOs

Debido a que existen discrepancias en con la dimensión de E7SOs al compararla con la publicada en el trabajo realizado en nuestro laboratorio (75), y como parte del estudio del mecanismo de ensamblado se utilizó la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM) para determinar la morfología y diámetro de estos oligómeros.



**Figura 2.6:** Morfología de E7SOs por AFM. (A) Imagen de E7SOs,  $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ . (B) E7SOs presenta un diámetro homogéneo de  $19 \pm 2$  nm según aproximadamente 150 partículas medidas.

En la figura 2.6 se muestran las imágenes correspondientes a una muestra de E7SOs (figura 5B). Esta técnica indica que E7SOs posee una morfología esférica y homogénea. El diámetro medio obtenido del análisis estadístico de diámetro de aproximadamente 150 partículas muestra que las partículas poseen un valor de  $19 \pm 2$  nm (figura 2.6 B). El valor obtenido por esta técnica coincide con el observado por *DLS* ( $15.7 \pm 0.7$  nm).

### **Base teórica de modelos para mecanismos de ensamblado**

El ensamblado de un oligómero esférico o de una cápside puede desarrollarse a través de múltiples reacciones elementales combinadas o fragmentadas en intermediarios de masa y forma variada. A pesar de la gran importancia en entender el ensamblado de una cápside viral poco se sabe de la físicoquímica involucrada en el proceso. *Adam Zlotnick* ha desarrollado modelos generales y simples que permiten describir el ensamblado de una cápside viral y es aplicable a cualquier polímero esférico (81-82). El ensamblado de una cápside o cualquier estructura cerrada o polímero esférico es un proceso de reacciones en cascada de bajo orden. Los modelos predicen una cinética de ensamblado de forma sigmoidea donde los intermediarios se formarían en un estado transiente llamado fase de retardo o *lag* que luego desaparecen para dar lugar a la especie final llegando a un estado estacionario. Este tipo de comportamiento es el que se observa también en el proceso de formación de fibras pero tiene algunas diferencias conceptuales que describiremos más adelante, ya que estos mecanismos difieren entre sí. El ensamblado de una cápside es un proceso que lleva a una estructura bien definida y cerrada con un número o cantidad de proteínas determinadas. En cambio, en el caso del crecimiento de una fibra, aunque esta tenga una estructura definida, no es cerrada y puede tener diferentes tamaños en cuanto al largo. Según *Caspar* (83) el proceso de ensamblado de estructuras cerradas o bien definidas podría estar regulado por un control propio o "*autostery*", con fluctuaciones entre estados competentes e incompetentes. A continuación se describen los dos modelos propuestos por *Zlotnick* (81-82), que son modelos simplificados desarrollados para el estudio del ensamblado de las cápsides virales del virus de la Hepatitis B, a su vez utilizados para estudiar el mecanismo de formación de la cápside de L1 HPV11 (84).



- **Modelo de equilibrio (EQ)**

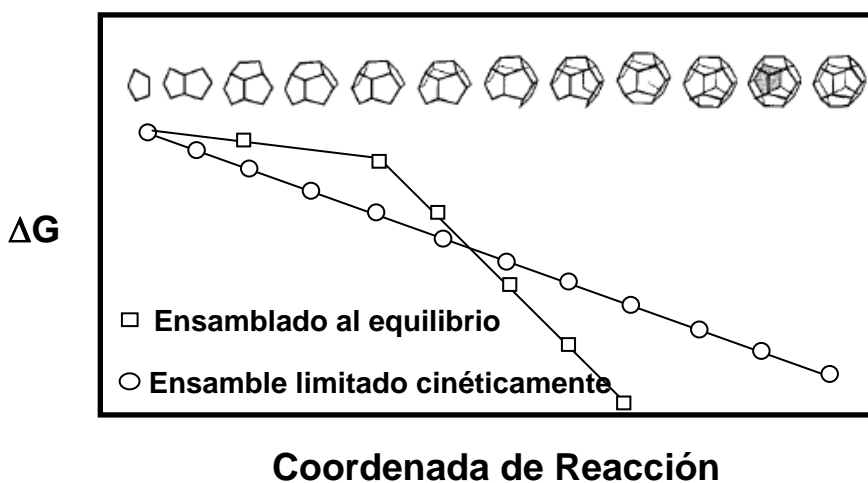
La cápside esta conformada por N subunidades idénticas. Una subunidad es definida como un bloque de construcción estable y en general es un oligómero proteico más pequeños. En este modelo no se consideran procesos de cooperatividad ni de nucleación. A su vez, todos los pasos en la reacción de ensamblado tienen la misma velocidad de reacción y todos los contactos intersubunidades tienen la misma energía de interacción relativamente débil (ver figura 2.7). Durante la reacción de ensamblado las concentraciones de los intermediarios acumulados son consumidas rápidamente dando lugar al producto final tanto sea una cápside como un oligómero. Solamente las subunidades y la cápside están presentes en concentraciones apreciables, dificultándose aislar los intermediarios experimentalmente. Las subunidades se asocian y se disocian en dichos intermediarios manteniendo una fuente de subunidades libres que permiten que la reacción pueda proseguir. Cada intermediario es diferente y en general más estable que su predecesor: En el último paso, la cápside ya formada, todas las subunidades están completamente ligadas en un estado de menor energía global.

En el marco cinético, el proceso de ensamblado esta gobernado por una cascada de reacciones biomoleculares o de bajo orden. La concentración de los primeros intermediarios o subunidades es muy baja, lo cual hace que aparezca una fase de retardo o fase *lag* característica del proceso y que disminuye según aumenta la concentración de subunidades. Durante la fase de retardo pequeños intermediarios son formados y progresivamente consumidos en la formación de intermediarios más grandes hasta que se acumula asintóticamente el producto final. El ensamblado es tratado como una reacción controlada por difusión, donde se asume que todas la velocidades de reacción,  $k_{on}$ , son del orden de  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , valor cercano al limite difusional para la asociación entre dos proteínas.

Este modelo es susceptible a trampas cinéticas, las mismas pueden ser el resultado de una alta concentración de proteína y/o una constante de asociación muy alta. En estas condiciones existen desviaciones en el camino cinético de ensamblado. La fase *lag* se acorta pero toma más tiempo llegar al estado estacionario. Y esto es debido a que los intermediarios de tamaño moderado se forman rápidamente dejando poca cantidad de subunidades libres necesarias para continuar con el ensamblado de la cápside. Esta rápida asociación de subunidades puede producir intermediarios defectuosos o *monster* que derivan en una especie final de tamaño y peso molecular diferente al encontrado en bajas concentraciones.

- **Ensamblado limitado cinéticamente (KL)**

Este modelo es derivado del modelo de equilibrio excepto que permite una alta energía de asociación y pasos no uniformes (con diferentes velocidades). Posee la misma cinética sigmoidea que el anterior. Este modelo es extremadamente robusto con respecto a la concentración de proteína. Las trampas cinéticas solo pueden ocurrir en condiciones extremas. Una de las estrategias utilizadas para evitar las trampas cinéticas es prevenir la iniciación temprana del ensamblado del oligómero o cápside incorporando un paso limitado cinéticamente dentro del ensamblado. Esto puede ser entendido como que los primeros pasos de la reacción pueden ser relativamente lentos o débiles y que el ensamblado debe seguir a través de estos primeros intermediarios (ver figura 2.7).



**Figura 2.7:** Ensamblado de un dodecaedro de subunidades pentagonales, utilizado a modo de ejemplo los modelos propuestos, figura extraída de Zlotnick 1999. Diagrama de energía libre de asociación. En el caso del modelo *EQ* todos los pasos tiene la misma velocidad de reacción. El modelo *KL* presenta diferentes niveles energéticos entre la fase de nucleación y la de elongación. Los círculos y los cuadrados presentan los diferentes niveles energéticos de los intermediarios del modelo *EQ* y *KL* correspondientemente. El espaciado entre puntos que se muestra es con el fin de comprender el diagrama y no esta realizado a escala.

Una explicación clásica de una cinética de muchas fases es en términos de un ensamblado de núcleo, donde la fase de retardo esta relacionada con la cinética de formación del núcleo. En este modelo existe otra explicación a esta fase *lag* o fase de retardo. La fase *lag* es el tiempo requerido para generar una concentración de intermediarios estable o estacionaria. Una vez que los intermediarios alcanzan el estado estacionario estos son los que inician la formación del oligómero esférico o cápside. Esta concentración es mantenida prácticamente constante a través de la mayor parte de

la reacción. Este estado estacionario intermediario puede ser repensado como el conducto hacia el ensamblaje del oligómero esférico y también se la denomina nucleación. Es muy importante mencionar, que parte del vocabulario utilizado en este modelo proviene de los modelos de polímeros, como la formación de un núcleo y la fase de elongación. En este sistema no existe un núcleo en el sentido que el mismo sirve como iniciador de la polimerización y se le suman a estas las subunidades que al final dan forma a la fibra. El concepto de núcleo es una concentración determinada de subunidades o intermediarios que dispara la reacción rápida de formación de oligómeros o cápsides. Lo mismo sucede con la fase de elongación, la cual denominamos a la fase en donde estas subunidades se unen en forma ordenada para formar al oligómero o cápside con una geometría esférica bien definida.

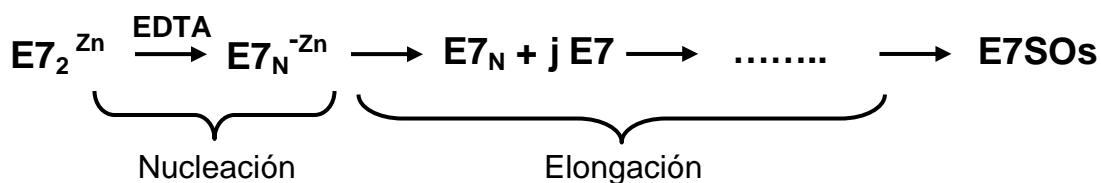
### Comparación y elección del modelo

Bajo un intervalo razonable de condiciones, los comportamientos previsible por ambos modelos son similares. Pero hay algunas características que permiten la determinación del modelo apropiado. Algunas de estas diferencias se muestran en la tabla 2.II.

|  | <b>E Q</b>                                  | <b>KL</b>                                |
|--|---|--|
| Nucleación                               | no es requerida                             | necesaria                                |
| Trampas cinéticas                        | susceptible                                 | resistente                               |
| Energía de asociación                    | baja  | sin restricciones                        |
| Estabilidad de la cápside                | relativamente inestable                     | sin restricciones                        |
| La relación con la concentración predice | orden de la reacción y tamaño de la cápside | orden de la reacción y tamaño del núcleo |

**Tabla 2.II:** comparación de los modelos de ensamblado EQ y KL.

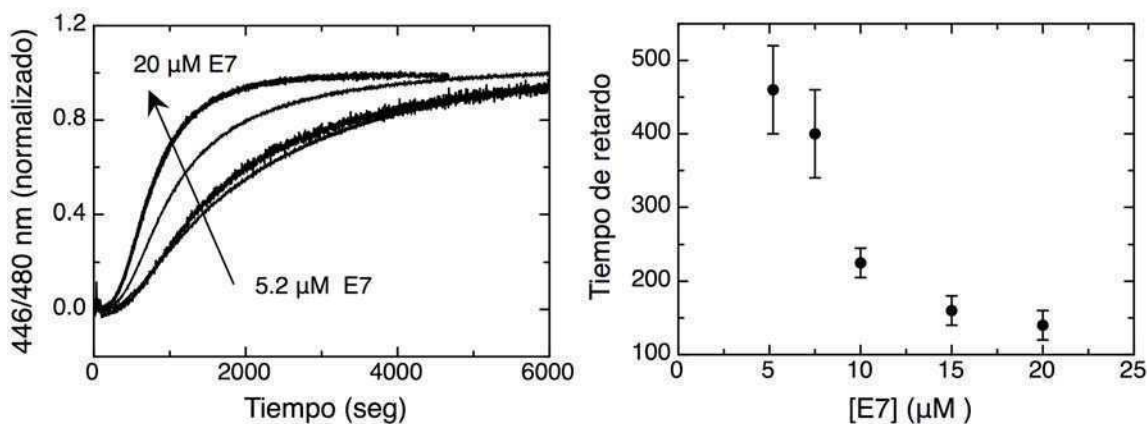
En la elección del modelo se tuvo en cuenta que no se han observado trampas cinéticas al variar la concentración de la proteína y la especie final es muy estable. Por estos motivos, en este trabajo se utilizó el modelo *KL*, para determinar la especie involucrada en la fase de nucleación y el orden de la reacción en la fase de elongación de la cinética de formación de E7SOs, el esquema se presenta en la figura 2.8.



**Figura 2.8:** Esquema que muestra la reacción de formación de E7SOs. N: molecularidad de la especie que forma el núcleo; j: se determina a partir del orden de la fase de elongación.

Con el fin de obtener la molecularidad de la especie de nucleación y el orden de la fase de elongación el modelo *KL* propone un análisis de las cinéticas a diferentes concentraciones que reporten el crecimiento del oligómero final. En el presente trabajo observamos que el cambio de la señal de tioflavina T es paralelo a la variación de radio hidrodinámico seguido por *DLS*. Esta fue la sonda elegida para el análisis de formación de E7SOs empleando el modelo *KL*. Es útil mencionar que esta sonda es comúnmente utilizada en el análisis de cinéticas de formación de amiloides (85).

Se descartó la posibilidad de utilizar las cinéticas por *DLS* debido a que el modelo requiere el análisis de la cinética de ensamblado a diferentes concentraciones y esto presenta severas limitaciones en el empleo de la técnica, ya que existe un límite inferior en concentración según el tamaño de la proteína. Por otro lado, la cinética por *DLS* presenta otra limitación ya que no se puede medir la señal en intervalos cortos de tiempo como requiere esta reacción.



**Figura 2.9:** (A) Cinética de formación de E7SOs seguida por fluorescencia de *Th T* a diferentes concentraciones. (B) Se muestra la fase de retardo en función de la concentración de proteína.

Como se puede observar en la figura 2.9, La cinética de ensamblado tiene una forma sigmoideal con una fase de retardo o “lag” seguida de un incremento rápido en la

polimerización que luego alcanza una meseta o estado estacionario. Tanto la fase de retardo como la velocidad con la que alcanza el estado estacionario son dependientes de la concentración. A mayor concentración, el tiempo de retardo es más corto y la velocidad de polimerización también aumenta.

### Determinación de la especie que conforma el núcleo

En el modelo *KL* la dependencia con la concentración de la especie final y la concentración de proteína libre (sin oligomerizar) esta dada por la ecuación 2.3. Esta relación es válida para un tiempo que se sitúa entre el tiempo de retardo y antes de alcanzar el estado estacionario. En dicha ecuación se define a  $c_1$  como una constante de proporcionalidad y  $c_2$  informa sobre el estado de oligomerización de la subunidad o molecularidad ( $N$ ) del intermediario o especie que forma el núcleo. Con el fin de determinar el coeficiente  $c_2$ , se ajusta linealmente el logaritmo de la concentración de oligómero versus el logaritmo de la proteína libre a diferentes tiempos en el intervalo que se sitúa una vez finalizado tiempo de retardo y antes de alcanzar el estado estacionario.

$$[E7SOs] = c_1 [E7libre]^{c_2} \quad (2.3)$$

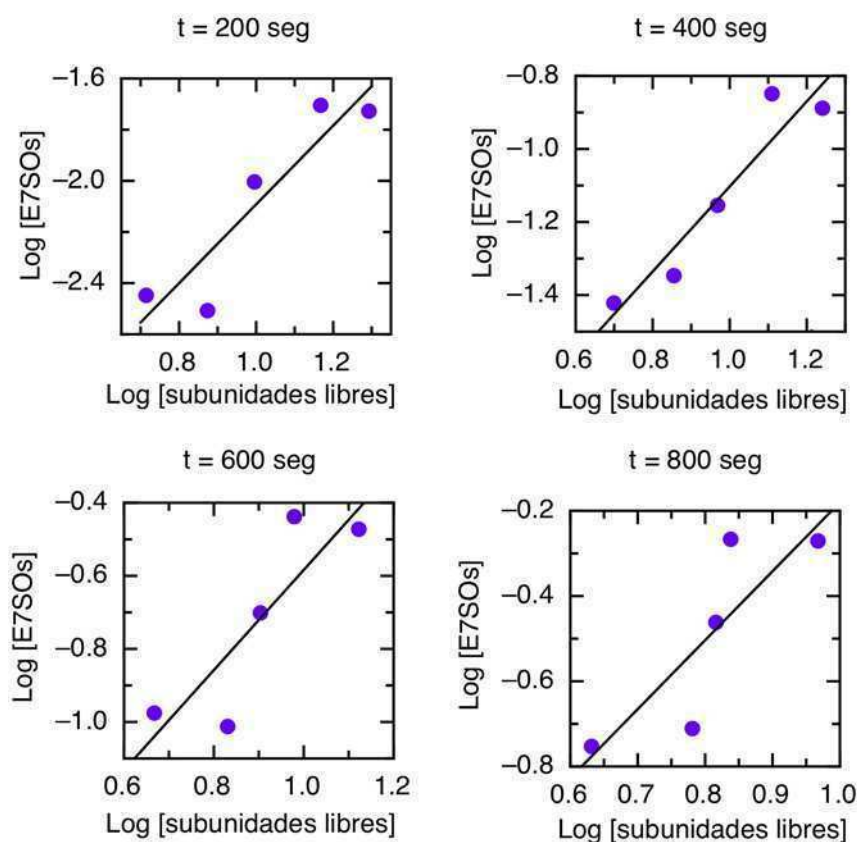
En este modelo se tiene en cuenta que cada núcleo una vez formado lleva rápidamente a la formación del oligómero. En otras palabras, los intermediarios que se forman entre la fase de nucleación o retardo y estado final son rápidamente consumidos. Por lo tanto, la tasa de oligómero formado la asumimos que es igual a toda la producción de núcleo. Una vez que pasa el tiempo *lag*, la concentración de oligómero rápidamente sobrepasa la concentración de los intermediarios entre el núcleo y el oligómero. Consideramos que asumir que la solución esta compuesta de oligómeros y proteína libre es una buena aproximación.

El número de moléculas de E7 involucrados en la especie existente en la nucleación, fue determinado de la pendiente del gráfico del logaritmo de la señal de fluorescencia de *Th T* en el intervalo de tiempo antes definido en función del logaritmo de la concentración de proteína libre. La señal de tioflavina es proporcional a la concentración de E7SOs formados y como concentración de proteína libre se utilizó la concentración de proteína total menos la señal de *Th T*, ver (2.4) y (2.5).

$$[E7SOs] \propto \text{señalThT} \quad (2.4)$$

$$[E7\text{libre}] \propto [E7]_{\text{inicial}} (1 - \text{señalThT}) \quad (2.5)$$

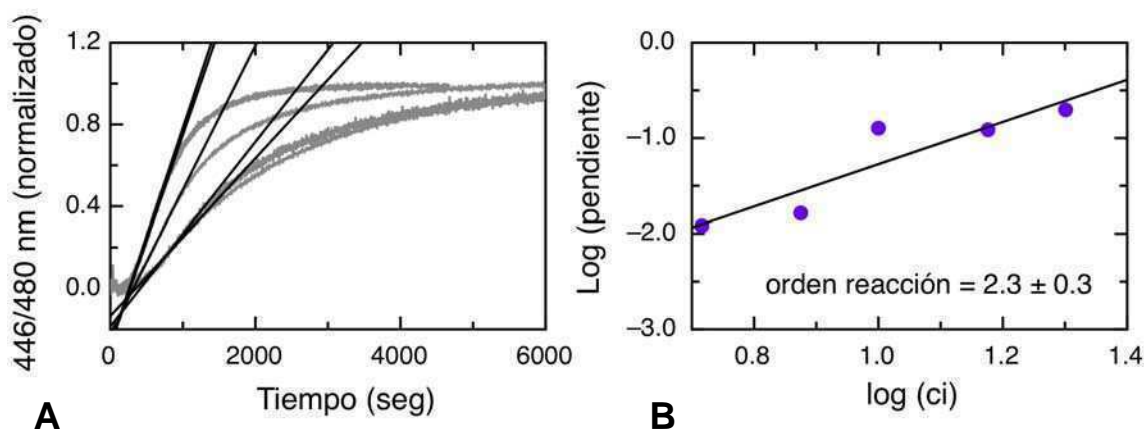
El rango de concertación de proteína en el cual se trabajó fue de  $5.2 \mu\text{M}$  a  $20 \mu\text{M}$ . En tiempo de retardo de estas concentraciones esta entre 150 a 300 segundos aproximadamente. Se tomaron 4 tiempos diferentes para realizar los ajustes en el intervalo de tiempo que se sitúa entre el tiempo de retardo y antes de alcanzar el estado estacionario, los mismos se muestran en la figura 2.10. Del mejor ajuste se obtuvo un valor de  $1.2 \pm 0.2$ , indicando que la especie monomérica producto sin Zn es la especie de nucleación del oligómero E7SOs. Si bien estos ajustes poseen mucho error, cada uno de ellos muestra valores centrados en aproximadamente  $N = 1$ , evidenciando que la subunidad inicial es el monómero sin Zn de E7.



**Figura 2.10.** Determinación de la especie que conforma el núcleo, para cuatro tiempos diferentes y cinco concentraciones diferentes de proteína inicial. La concentración de los oligómeros y de la proteína libre depende de la señal de fluorescencia de *Th T*. La pendiente de la recta predice el tamaño del núcleo, el mejor ajuste ( $t = 400 \text{ s}$ ) presentó una pendiente de  $1.2 \pm 0.2$

### Determinación del orden de la reacción de elongación

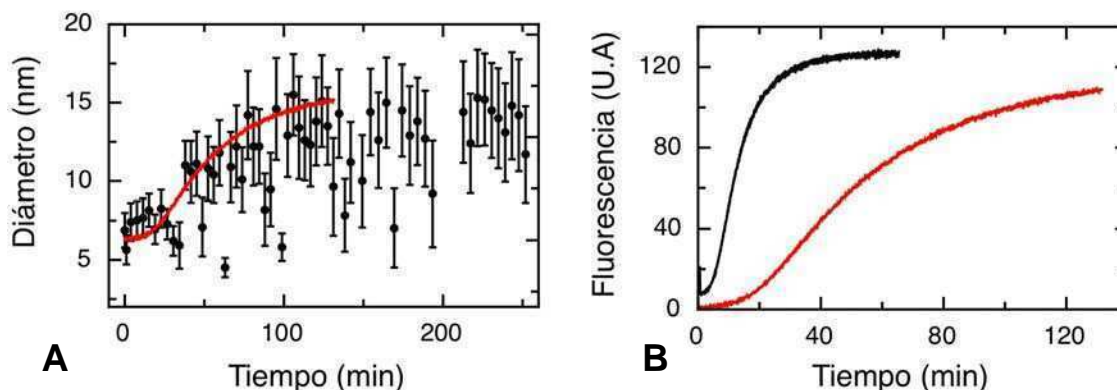
Para determinar el orden de la fase de elongación, se tomó la pendiente de la fase rápida o de elongación (ver figura 2.11 A). Luego se graficó el logaritmo de dicha pendiente versus el logaritmo de la concentración inicial de proteína, donde la pendiente de este ajuste determina el orden de la reacción (81, 86). Este análisis se realizó en el mismo rango de concentración que el análisis anterior (5.2  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ ). El valor obtenido de esta relación fue de  $2.3 \pm 0.3$ , indicando que el proceso de elongación es una reacción de segundo orden. El ajuste se muestra en la figura 2.11 B. Este resultado determina una rápida adición secuencial de E7, monomérica y sin Zn, al oligómero en formación como mecanismo de ensamblado de E7SOS.



**Figura 2.11.** Determinación del orden de la reacción de elongación. **(A)** Rectas obtenidas del ajuste lineal de la fase de elongación de cinéticas a diferentes concentraciones de proteína. **(B)** El orden de la reacción esta dado por la pendiente de la recta que ajusta al logaritmo de las pendientes de la fase rápida y el logaritmo de la concentración de la proteína involucrada en la reacción, en este caso es de  $2.3 \pm 0.3$ .

### Efecto de la temperatura en el ensamblado de E7SOs

Con el objetivo de disminuir la velocidad de la reacción para aislar la especie que conforma el núcleo y poder confirmar nuestra hipótesis, realizamos ensayos cinéticos a menor temperatura. Elegimos bajar la temperatura hasta 10° C y repetimos algunos de los experimentos descritos anteriormente. Medimos el aumento del diámetro a través del tiempo por *DLS* y la curva de fluorescencia de *Th T*, ambos ensayos se muestran en la figura 2.12. Nuevamente se confirma en estos experimentos, que el aumento de fluorescencia de *Th T* es paralelo al aumento del diámetro de la especie en formación.



**Figura 12:** Cinéticas a 10°C **(A)** seguida por fluorescencia de *Th T* y *DLS*. **(B)** Por fluorescencia de *Th T* a diferentes temperaturas.

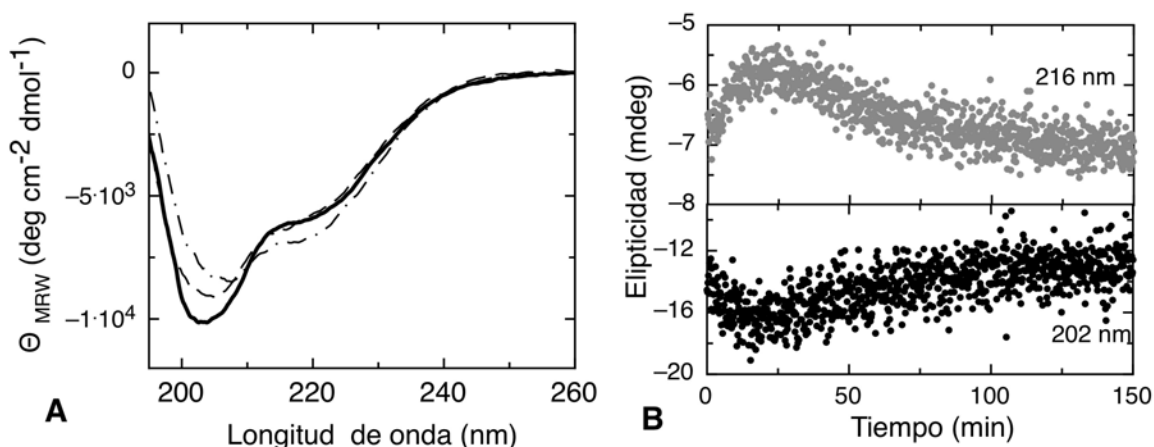
Como era predecible, se puede observar en los ensayos que se muestran en la figura 2.12, que tanto la fase de elongación como la fase de retardo son más largas a menor temperatura. El diámetro promedio medido por *DLS* en el tiempo de retardo es de  $7.3 \pm 0.8$  nm, en concordancia a lo observado a mayor temperatura. Como ya se comentó anteriormente, es muy difícil discernir a que especie de E7 corresponde. Recordemos que E7 posee su dominio N-Terminal intrínsecamente desordenado y esto le confiere una estructura de dímero extendido la cual posee un mayor radio hidrodinámico al que debería tener si se tratase de un proteína globular. El valor de diámetro de E7 en la fase de retardo no se aleja al obtenido para el dímero por esta técnica ( $6.9 \pm 0.8$  nm), ni al predicho por la ecuación empírica 2.2 para el monómero desplegado ( $\sim 6$  nm). La remoción del Zn que coordina la proteína a través del dominio globular de dimerización, C-Terminal, necesariamente implica la monomerización. Debido a la naturaleza extendida de E7, el valor del diámetro de la especie monomérica podría ser de alrededor de 6 nm, como predice la ecuación 2.2. De esta manera la especie monomérica podría no distinguirse de la especie dimérica.

Por otro lado, es muy difícil distinguir que otros intermediarios aparecen el ensamblado, ya que los puntos medidos en la fase de elongación poseen mucho error y rápidamente se alcanza el estado estacionario. La especie que se obtiene al final de la reacción, difiere en tamaño a la obtenida al realizarse a 25° C. Esta especie es menor, aproximadamente 13.7 nm, y esto le corresponde 29 unidades de E7 según la ecuación (2.1), mientras que la misma ecuación le asigna 38 unidades a E7SOs.

Continuando con el estudio cinético a 10° C, se acompañó la reacción midiendo por *DC* a 202 nm y 216 nm. Las curvas presentan el mismo comportamiento bifásico



que el observado a mayor temperatura. No obstante, la variación total de señal para el caso de la sonda a 216 es nula ya que la señal en el estado estacionario es la misma que en el punto de partida. Algo similar ocurre a 202 nm, pero en este caso la variación total es menor que a 25° C (ver figura 2.13 A). Los espectros de E7 previo a la incubación con EDTA y luego de finalizada la reacción no presentan cambios significativos. Se observa que el espectro final no reproduce el mismo comportamiento que en el caso de realizar la reacción a 25° C (ver figura 2.13 B). En otras palabras, el espectro del producto final de la reacción a 10° C no coincide con E7SOs. Por otro lado, si este producto final se incubaba a 25° C el espectro de *DC* no se asemeja al de E7SOs.



**Figura 13:** Espectros y cinética de E7 incubada con EDTA a 10°C. **(A)** Espectros de E7, en línea continua; E7, en línea cortada E7 EDTA al final de la reacción y en línea y punto: después de incubarla a 25°C. **(B)** cinética seguida a 202nm panel de abajo y 216 nm panel de arriba.

Con el fin de confirmar si el producto final de la reacción a 10° C es diferente que al realizarla a 25° C, se analizó la termoestabilidad de E7SOs en un rango de 5° C a 30° C (datos no mostrados). De esta forma se corrobora la posibilidad de que la estructura secundaria de E7SOs se vea afectada al bajar la temperatura a 10° C. Se observó que E7SOs es termoestable y reversible en el rango de temperatura medida.

Se puede concluir de estos experimentos que la especie final de la reacción con EDTA a 10°C difiere de E7SOs. Esta condición podría impulsar a que la reacción caiga en una trampa cinética y el oligómero final podría tener características diferentes a los E7SOs. Este tipo de condición, descenso de la temperatura, no invalida la elección del modelo *KL* en el estudio de ensamblado de E7SOs. Como se mencionó anteriormente, el modelo *KL* es adecuado para aquellas partículas resistente a trampas cinéticas

producto de cambios en la concentración inicial de proteína o de un fuerte aumento de la constante de asociación (81, 87).

## Discusión

El ensamblado de E7SOs posee un mecanismo ordenado, energéticamente favorable y reproducible, ya que posee una estructura estable y es morfológicamente uniforme. E7SOs es un oligómero esférico que comparte algunas características con las fibras amiloides; su estructura secundaria presenta un arreglo de lámina beta repetitiva y esto hace que interactúe con colorantes como el rojo Congo y la tioflavina T.

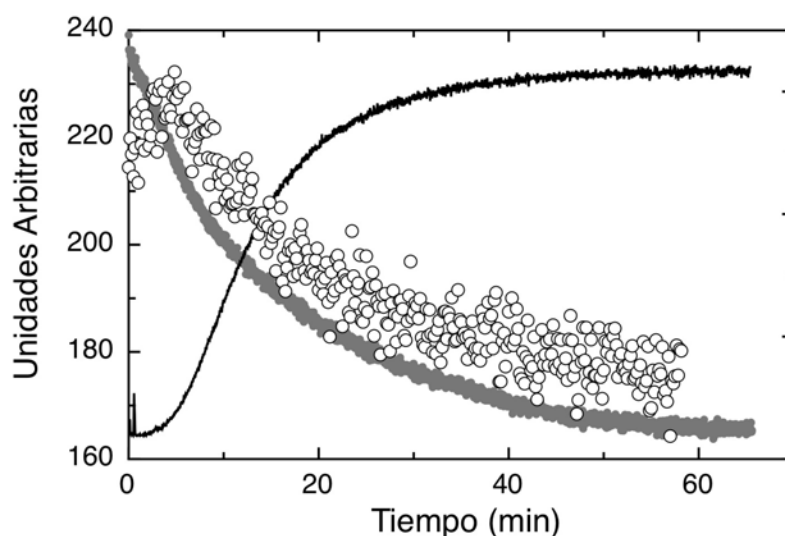
Con el fin de determinar los intermediarios y las diferentes fases presentes en el ensamblado de E7SOs, se realizaron cinéticas utilizando diferentes sondas espectroscópicas que reportaron distintos eventos estructurales y de conformación.

Los ensayos de cinética acompañada por cambios en la intensidad de fluorescencia de los colorantes ANS y Th T y los cambios en el diámetro monitoreado por DLS, pusieron en evidencia la existencia de diferentes fases dentro del ensamblado de E7SOs. Estas fases se pueden dividir en una fase de retardo, luego la fase de elongación y por último el estado estacionario. También se observó que los cambios reportados por dichas sondas eran paralelos, a pesar que cada una de ellas reportan eventos diferentes. Podemos concluir que los bolsillos hidrofóbicos, monitoreados por el colorante ANS, se forman según se desarrolla la estructura beta repetitiva, seguida por Th T. Este cambio estructural va acompañado por un aumento del diámetro de la especie en formación, como muestra la técnica de DLS.

Las cinéticas monitoreadas por DC mostraron que a las fases mencionadas anteriormente les correspondía a un arreglo en la estructura secundaria diferente. En el tiempo de retardo, se observó una posible pérdida de estructura secundaria consistente con la pérdida de estructura por remoción de Zn. Luego, en la etapa de elongación, ambas sondas reportaron la formación de la estructura lámina beta repetitiva. Por otro lado, el análisis de espectros a través del tiempo mostró un punto isodicroico sugiriendo que el ensamblado podría ser un proceso de dos estados al equilibrio.

Las cinéticas acompañadas por intensidad de fluorescencia de Tyr y Trp mostraron un comportamiento multifásico y ambas señales reportaron una compactación estructural.

Un esquema cinético de la reacción se muestra en la figura 2.14. En la misma se observa como se consume la especie inicial, reportado por la fluorescencia de Tyr, mientras crece la especie intermedia, seguida a 216 nm, que luego disminuye para formar el producto final. El desarrollo de E7SOs es expuesto con la curva de fluorescencia de *Th T*. Se puede observar que la fase de retardo que presenta la fluorescencia de *Th T* coincide con el aumento de la señal a 216 nm, mientras disminuye la fluorescencia de las Tyr. Esto sugiere que luego de conformarse el intermedio es consumido para formar el producto final, E7SOs. Este evento es representado por el descenso de la señal a 216 nm y la iniciación de la fase de elongación representada por la fluorescencia de *Th T*.



**Figura 2.14:** Cinética de formación de E7SOs. En gris se observa como disminuye el reactivo E7(dimérica), en círculos vacíos se muestra como aparece el intermedio y luego se consume para formar E7SOs. En negro se muestra la formación de E7SOs.

El ensayo por *DLS*, mostró que la especie final poseía un diámetro de aproximadamente 15 nm y el valor se mantenía estable a través del tiempo. El análisis realizado por microscopía de fuerza atómica corroboró este valor arrojando un valor de ~ 20nm.

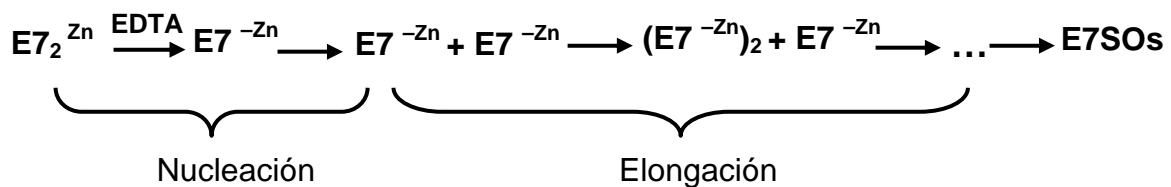
Por *DLS*, no se pudo determinar con precisión la especie de E7 presente durante el tiempo de retardo. Esto es debido a que la reacción es muy rápida en comparación a la cantidad de mediciones requeridas a una misma especie o en un mismo punto con el fin de minimizar el error. No obstante, se observó tanto en las cinética realizada a 25° C como a 10° C, que esta especie perteneciente al tiempo de retardo no presentaba un cambio significativo en su diámetro al ser comparada con la

especie inicial, E7 dimérica. Este resultado nos sugirió que el intermediario podría ser monomérico o dímérico, descartando oligómeros globulares pequeños (menores de cinco unidades de E7, según la ecuación 2.1). Estudios estructurales en solución por RMN del dominio CR3 de la cepa HPV45 (72) muestran el dominio se despliega al quitarle el Zn. Además, a partir de las estructuras (72-73) es evidente que el Zn es importante para mantener el plegado del CR3 y este es un prerrequisito para la dimerización. Por lo tanto, estos resultados sugieren que luego de remover el Zn la especie que origina la reacción sería el dominio monomérico de E7. Cabe destacar que la proteína E7 posee su dominio N-terminal intrínsecamente desordenado y esto le confiere características de una proteína extendida: su radio hidrodinámico es el doble del predicho a proteínas globulares de igual peso molecular. Este tipo de comportamiento nos sugiere que el dominio monomérico de E7 sin Zn podría presentar una estructura desplegada, con un radio hidrodinámico cercano al que posee un monómero desplegado de una proteína de igual peso molecular.

Poco se conoce acerca del mecanismo de ensamblado de oligómeros esféricos (81). Debido a su geometría se trató al estudio del ensamblado como si se tratara de una cápside viral (79). Para ello, se eligió el modelo *KL* desarrollado por Zlotnick para analizar el mecanismo de autoensamblado de E7SOs. Se tuvo en cuenta en la elección del modelo, que estos oligómeros son muy estables y no se han observado trampas cinéticas dependientes de la concentración. Dentro de este modelo, se pudo determinar el tamaño del núcleo utilizando un análisis clásico en donde la formación del núcleo muestra un orden de reacción aparente igual al número de subunidades que lo componen. Para este análisis se utilizaron las cinéticas que muestran los cambios en la fluorescencia de *Th T* a través del tiempo. El modelo predice que el núcleo está formado por la especie monomérica de E7. Este resultado coincide con lo observado en las curvas de *DLS* y con el hecho de que sería difícil que la estructura que sostiene al dímero permanezca en ausencia de Zn.

A partir del modelo se pudo determinar el orden de la fase de elongación. La misma se obtuvo de la pendiente de la recta que forma el logaritmo de las pendientes de la fase de elongación a diferentes concentraciones y el logaritmo de la concentración inicial de proteína. Este ajuste determinó que la fase de elongación es de orden dos. Esto sugiere que al formarse el monómero sin Zn con una estructura mayormente desplegada se inicia el ensamblado de E7SOs, donde se unen monómeros de E7 de

forma ordenada hasta formar el estado final. El mecanismo de ensamblado de E7SOs propuesto se muestra en la figura 2.15.



**Figura 2.15:** Esquema que muestra la reacción de formación de E7SOs. La especie monomérica sin coordinar Zn forma el núcleo de la reacción. La fase de elongación le corresponde una reacción de orden dos.

### **3. El dominio C-terminal de E7**



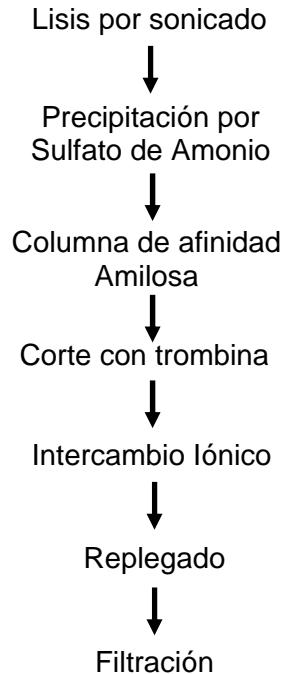
Uno de los objetivos de la presente tesis es el de estudiar el dominio C-terminal de E7 HPV 16 (E7C). Para esto, fue necesario poner a punto un protocolo de expresión y purificación, con el fin de obtenerlo soluble y con alto grado de pureza. Cuando se comenzó con el trabajo de tesis, no se conocía ninguna estructura de E7. Durante el transcurso del mismo se obtuvieron las estructuras de la proteína E7 de las cepas HPV 1A y HPV 45 (72-73) según se describió en la *Introducción*. El dominio E7C HPV 16 es un dominio estructural que consta de 58 aminoácidos y su estructura globular lo diferencia del dominio intrínsecamente desordenado N-terminal. Como se expuso en la *Introducción*, E7C es el dominio encargado de la dimerización formando un núcleo hidrofóbico y coordinando un átomo de Zn, por monómero, a través de cuatro cisteínas (figura 1.7 *Introducción*). El interés por la obtención y caracterización de dicho dominio radica en poder utilizarlo en el estudio de la oligomerización de E7, en el estudio con la interacción de blancos celulares tales como pRB, con la proteína E2 y en búsqueda de anticuerpos de E7 que reconozcan específicamente el dominio C-terminal.

### **Expresión y Purificación de HPV E7C**

Para expresar E7C en forma recombinante en *E.coli* se utilizó una construcción en la cual se fusionó dicho dominio a la proteína MBP, dando como producto MBP-E7C. Esta construcción es la que ya se había utilizando en E7 dando buenos resultados, ya que la misma se expresa soluble en el citoplasma bacteriano y con un alto rendimiento. Aunque la purificación se encuentra detallada en la sección de *Materiales y Métodos*, resumimos el procedimiento que fue puesto a punto. Los pasos de la purificación se encuentran esquematizados en la figura 3.1. El primer paso de la purificación es una precipitación con sulfato de amonio. El segundo, es el pasaje de la proteína de fusión MBP-E7C por la columna de afinidad amilosa. Se utiliza la capacidad de MBP de unir polisacáridos de amilasa para separarla del resto de las proteínas bacterianas. Luego de esta etapa, la muestra MBP-E7C queda con un alto grado de pureza y lista para someterla al corte con la proteasa trombina. Una vez que se escinde MBP de E7C, se utiliza una columna de intercambio iónico con el fin de separar estas proteínas. En la elección de dicha columna se tuvo en cuenta que: E7C posee menor carga iónica negativa que E7, que los puntos isoeléctricos teóricos de MBP y E7C son muy cercanos, alrededor de 6.0, y que E7C presenta agregación a pH cercanos al punto isoeléctrico teórico y a pH ácidos como pH 4.0 (esto se observó durante la puesta a punto del protocolo de purificación que la proteína). Es por estas razones se eligió la



resina de intercambio aniónico Mono Q donde el pasaje de la muestra se realiza a pH básico, en este caso pH 9.0. Al finalizar esta etapa obtenemos a E7C con un alto grado de pureza

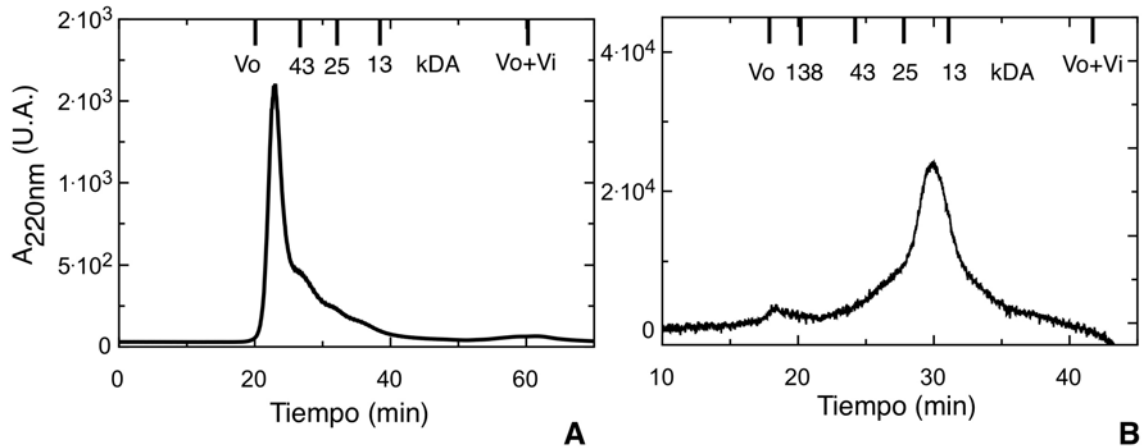


**Figura 3.1:** Esquema de la purificación de HPV 16 E7C

Otra observación pertinente, es la necesidad de incluir un paso de replegado en el protocolo de purificación. Ya se había observado en la purificación de E7 la necesidad de replegar a la proteína, sin este proceso se obtenían diferentes estados de oligomerización. En el caso de E7 HPV 16, cuando se pasa la muestra por una columna de filtración por tamiz molecular sin realizarle ningún paso de replegado, se observan tres picos correspondientes a diferentes estados de oligomerización. Uno de ellos se excluye de la columna y corresponde a los oligómeros E7SOs, otro a un posible tetramero y por último el dímero de E7. En el caso de E7C, se observó un único pico correspondiente a un oligómero de alto peso molecular, ver figura 3.2A. Este resultado diferente nos hizo pensar en la posibilidad de que este dominio tuviera más tendencia a oligomerizar que la proteína entera.

Se trató a E7C bajo las mismas condiciones de replegado que las de E7. Se la incubó con 6M de Urea y se la replegó dializándola en presencia de Zn y DTT, en la misma condición que para E7. De esta forma se observó un único pico de

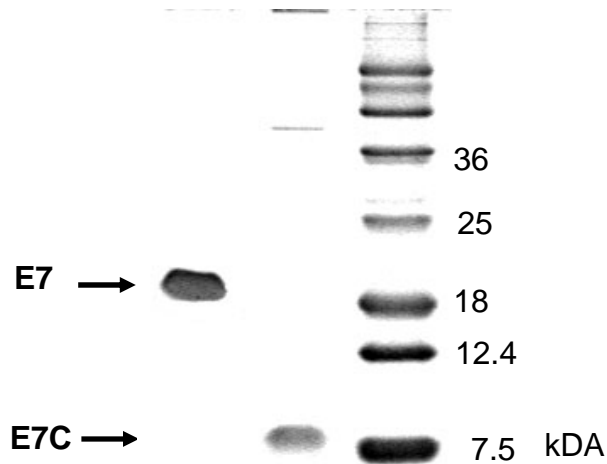
aproximadamente 13 kDA al pasarla por una columna de filtración por tamiz molecular, ver figura 3.2 B. Este dominio posee un peso molecular de aproximadamente 6500 kDA. Por lo tanto, podemos decir que E7C HPV16 se encuentra en forma dimérica.



**Figura 3.2:** Corridas de E7C antes y después del replegado con Urea realizadas en una columna de filtración por tamiz molecular, Superdex 75. **(A)** Columna preparativa E7C antes del tratamiento. Se observa un pico correspondiente a un oligómero de alto peso molecular. **(B)** Columna analítica, E7C luego de replegarla y de dializar en presencia de Zn y DTT. Se observa un pico correspondiente a la especie dimérica.

En la figura 3.3, se presenta el alto grado de pureza que posee la muestra, observado en un gel SDS-Page luego de finalizado el protocolo de purificación. Se observa en el mismo gel que E7C posee una movilidad electroforética acorde a su peso molecular. Este dominio posee una movilidad de aproximadamente 7.5 kDA mientras que su peso molecular es de aproximadamente 6.5 kDA. La pequeña diferencia de peso molecular puede ser atribuida a la falta de precisión de la técnica. En el mismo gel se sembró a E7 en donde se observa su migración anómala. La proteína de 11 kDA migra como una proteína de peso molecular de 18 kDA, figura 3.3. Este comportamiento se debe al aporte del dominio E7N, dominio intrínsecamente desplegado (69), acorde a lo expuesto en el capítulo *Introducción*. Este resultado observado en nuestro laboratorio (61) fue corroborado al observar que E7C posee una migración conforme a su peso molecular en un gel SDS-Page.

Por la técnica de espectroscopía de masa se corroboró el peso molecular del dominio en donde se observó una especie homogénea de 6521.37 kDA.



**Figura 3.3:** E7C y E7 en un gel SDS- Page 17%. Se puede observar un alto grado de pureza de la muestra E7C luego de finalizado el protocolo de purificación. En el mismo gel se observa la movilidad electroforética anómala que posee E7.

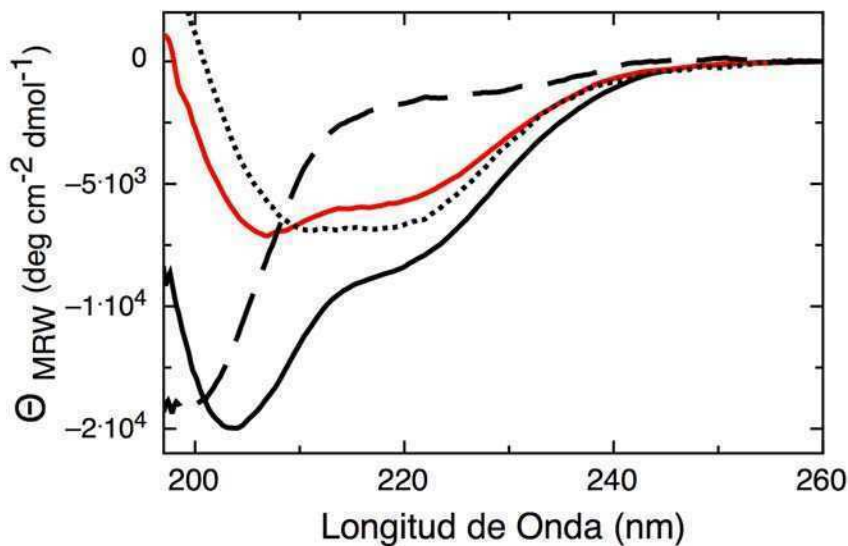
El dominio E7C posee el motivo de unión a Zn el cual consiste en dos repeticiones de motivo C-X-X-C separados de 29 aminoácidos (ver *Introducción*). La unión a Zn es importante para mantener el estado plegado del dominio, asimismo es un prerequisite para la dimerización. A modo de control de calidad de la purificación y del estado estructural de E7C HPV 16 se cuantificó el Zn que posee la proteína. El estudio de cuantificación de Zn se había puesto a punto en el laboratorio y se lo había utilizado en la caracterización de E7 (61). En el presente estudio se utilizó el mismo protocolo, este se detalla en el capítulo de *Materiales y Métodos*. Brevemente, el ensayo de cuantificación de Zn consiste en una reacción calorimétrica del complejo PAR:Zn de la muestra de E7C en comparación con una curva patrón a diferentes concentraciones de Zn. A través de este ensayo se determinó la presencia de un mol de Zn por mol de proteína, confirmando la dimerización de E7C.

### Estructura secundaria

Con el fin analizar la estructura secundaria de E7C se analizó el espectro de DC, figura 3.4. Se puede observar que E7C presenta un espectro dominado por hélice alfa, con dos mínimos: uno a 208 nm y otro en 220 nm. Esto concuerda con las estructuras resueltas las cuales mostraron que alrededor un 37% de aminoácidos conforman las hélices alfa y un 43% le corresponde a lámina beta (72-73). Es bueno mencionar que la

estructura hélice alfa posee mayor intensidad de *DC* que lámina beta y por esas razón es la estructura dominante del espectro. Por otro lado, el espectro de *DC* muestras que E7C le confiere estructura ordenada a la proteína entera acorde con los resultados obtenidos en el laboratorio (61).

En la misma figura se presentan los espectros de E7, E7N y el espectro diferencia. Se denomina espectro diferencia al que resulta de la resta entre el espectro de E7 y el espectro E7N. El espectro obtenido para E7C posee algunas diferencias con espectro diferencia observándose un posible ordenamiento de estructura en E7C en el contexto de la proteína entera.



**Figura 3.4:** Espectros de dicroísmo circular UV. E7 (línea negra continua), E7C (línea roja continua), E7N (línea negra cortada) y espectro diferencia (línea punteada). Los espectros se midieron a 10  $\mu$ M de proteína y a Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl y 2mM DTT

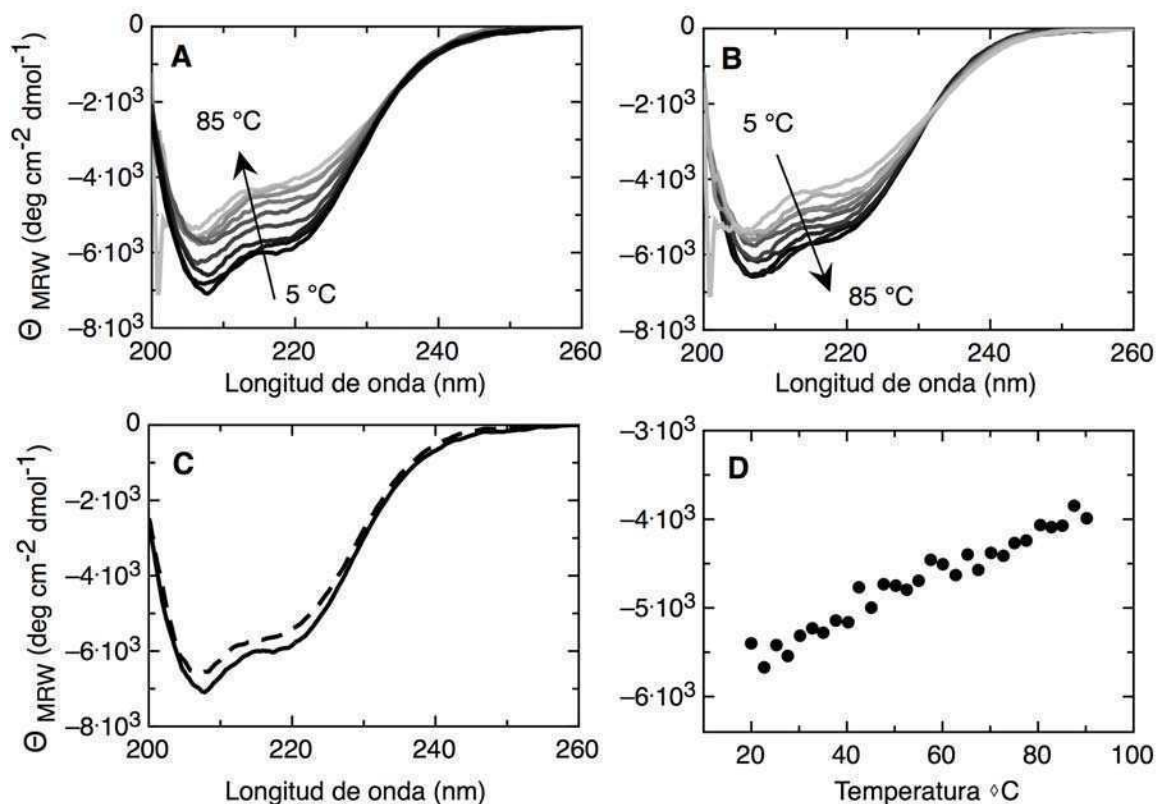
### Comportamiento en función de la temperatura

La estructura de una proteína se puede desestabilizar tanto por temperatura como por desnaturalización química, aunque la información que se obtiene de ambas experiencias es similar, los principios por los cuales se produce la pérdida de estructura son diferentes. Debido a que E7 presenta un comportamiento termorresistente (61), consideramos importante estudiar si este dominio conserva dicha propiedad. Para ello realizamos una curva de termodesnaturalización siguiendo los cambios de la elipticidad molar a 220 nm y tomando los espectros a diferentes temperaturas, la experiencia se muestra en la figura 3.5.

La elipticidad molar a 220 nm se relaciona con el tipo y cantidad de estructura secundaria de la proteína. Cuando una proteína globular es sometida a incrementos

graduales de temperatura, con frecuencia la misma se desnaturaliza cooperativamente dando una curva sigmoidea. El espectro de dicroísmo circular se modifica y la intensidad negativa de la elipticidad molar a 220 nm disminuye.

La curva de termodesnaturalización mostró un comportamiento no cooperativo ya que la misma no posee una curva sigmoidea (figura 3.5 D). Este resultado concuerda con el comportamiento observado en E7 (61). Por otro lado, en el mismo experimento no se observó que la termodesnaturalización llevara a una pérdida marcada en la cantidad de estructura secundaria de E7C. Esto fue observado al analizar los cambios que sufre el espectro de DC a diferentes temperaturas (figura 3.5 A). El aumento de la temperatura a 85 °C no alcanza a desplegar a la proteína. En dicha temperatura se observa que E7C posee una estructura secundaria ordenada, mostrando un espectro similar pero con menor intensidad que el obtenido a 5 °C. Esta característica indica que es una proteína termorresistente.



**Figura 3.5:** Termodesnaturalización de E7C. **(A)** Espectros de E7C cada 5 °C durante el aumento de temperatura de 5 a 85 °C. **(B)** Espectros de E7C cada 5 °C durante la disminución de temperatura de 85 a 5 °C. **(C)** Espectros antes y después de la termodesnaturalización. En línea continua el espectro de E7C sin ser perturbado y en línea cortada después de calentarlo y enfriarlo. **(D)** Curva de termodesnaturalización aumentando la temperatura desde 20 a 85 °C, seguida por DC lejano a 220 nm. En círculos negros E7C a 10  $\mu$ M y en círculos vacíos a 1  $\mu$ M. Los experimentos se realizaron a 10  $\mu$ M de proteína salvo donde se indica 1  $\mu$ M y a Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl y 2mM DTT.

Se tomaron los espectro de *DC* disminuyendo la temperatura, ver figura 3.5 B. Si se compara el espectro a 5 °C con el obtenido a la misma temperatura luego de calentar y posteriormente enfriar la muestra, se observa que estos espectros coinciden, figura 3.5 C. Este resultado indica que los cambios observados en el proceso de desnaturalización térmica son reversibles.

Estos resultados son consecuentes a la naturaleza modular que poseen los dominios E7C y E7N. Siendo E7C el dominio que le aporta la característica de resistencia a la desnaturalización térmica y su comportamiento reversible que posee E7.

Por otro lado, sugerimos que los cambios reversibles observados en los espectros de *DC* durante la termodesnaturalización se deban a la monomerización del dominio por la variación de la temperatura.

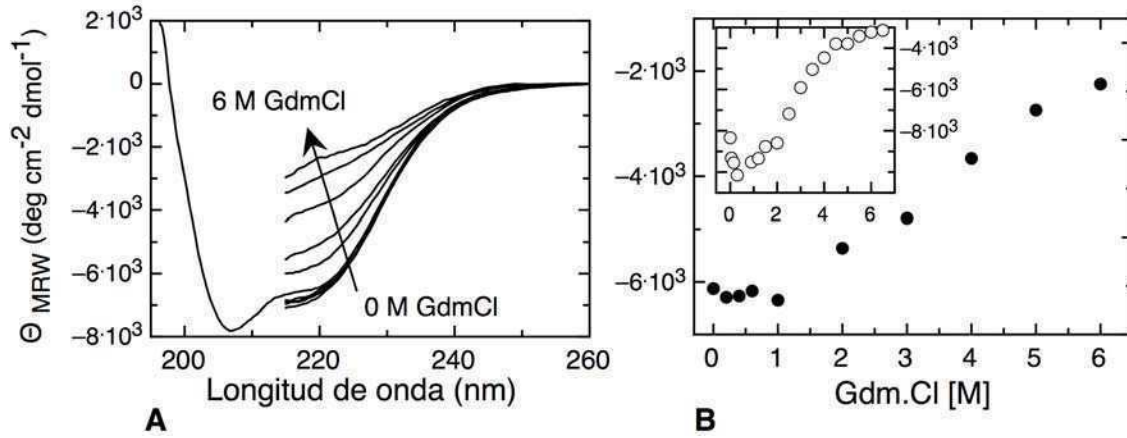
### **Desnaturalización química**

Con el fin de continuar con la caracterización del dominio, realizamos una curva de desnaturalización química con cloruro de guanidinio, Gdm-Cl. Para ello se incubó E7C a una concentración de 20  $\mu$ M con diferentes concentraciones del agente desnaturalizante en tubos separados y se lo dejó actuar aproximadamente durante 4 horas y durante toda la noche. Luego de ambas incubaciones se midieron los espectros de dicroísmo circular para observar la estructura remanente y se estudiaron los cambios a 220 nm, como se puede ver en la figura 3.6. Los espectros de las muestras incubadas durante toda la noche no muestran diferencia con los de las incubadas por aproximadamente 4 horas (datos no mostrados) lo que indica que la cinética de desnaturalización química ya había finalizado.

Se puede observar en la figura 3.6 A, que a altas concentraciones de Gdm-Cl E7C se despliega. Por otro lado, se observa en la figura 3.6 B, que este proceso de desplegado no es un proceso que involucre dos estados y presenta baja cooperatividad.

En la misma figura se compara el comportamiento de E7 con el mismo agente desnaturalizante (figura inserta en figura 3.6 B) En el caso de E7 se ha observado que a bajas concentraciones de Gdm-Cl se manifiesta un incremento en la estructura secundaria. Se sugirió que este aumento de estructura es consecuencia de una compactación que sufre el dominio N-terminal (61). En el caso de la proteína E7C, en el intervalo de 0 M hasta 1M de Gdm-Cl, no se reportan cambios en la estructura secundaria. Por lo tanto, en este experimento se corrobora que la compactación

estructural a bajas concentraciones de Gdm-Cl que sufre E7 es debido a la compactación de E7N.



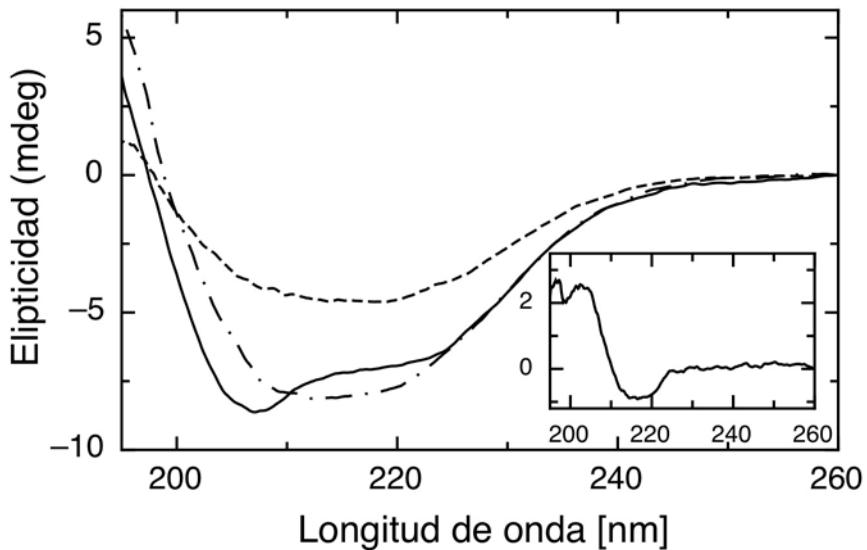
**Figura 3.6:** Desnaturalización de E7C por Gdm-Cl **(A)** espectros a diferentes concentraciones del agente desnaturalizante. La flecha indica el aumento el cambio espectral a medida que aumenta la concertación de Gdm-Cl desde 0 a 6 M. **(B)** Cambios a 220 nm en función de la concentración de Gdm-Cl. En círculos negros E7C, en círculos vacíos E7 (figura insertada).

### E7C, dominio de oligomerización de E7SOs

Ensayos realizados en el laboratorio con la proteína de fusión MBP-E7 mostraron que los oligómeros E7SOs presentan el dominio N-terminal de E7 expuesto al solvente (76). Además se ha comprobado que E7SOs mantiene la propiedad de interactuar con el blanco celular mejor descrito, la proteína pRB, ya que el principal sitio de unión principal se encuentra en E7N. Con esto se dedujo que el dominio C-Terminal es el dominio de oligomerización de E7SOs. A continuación abordamos el estudio de la capacidad de E7C de formar oligómeros por remoción del Zn una vez tratado con EDTA.

- **Cambios en la estructura secundaria**

Se incubó a E7C con EDTA en condiciones similares a las que se estudió la misma reacción en E7 descritas en el capítulo anterior (15  $\mu\text{M}$  de E7C a 25 °C en 10 mM Fosfato de sodio a pH 7.0, 1 mM DTT y 1 mM EDTA). Con el fin de estudiar el producto final de la reacción se midieron los espectros de *DC* luego de 3 hs de haber iniciado la reacción y a las 24 hs. En la figura 3.7 se muestran ambos espectros y se los compara con el espectro inicial de E7C.



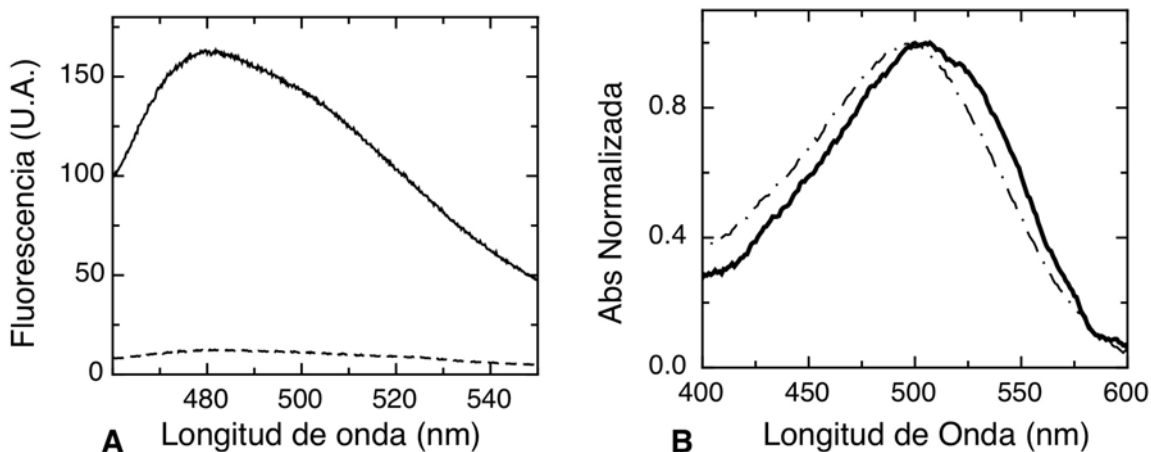
**Figura 3.7:** Espectros de dicroísmo circular de E7C. En línea continua se muestra el espectro de E7C. En línea cortada con punto se muestra el espectro de E7C + EDTA luego de 3 horas de iniciada la reacción y en línea entrecortada el de las 24 horas. Figura insertada, espectro diferencia entre los espectros de E7 y E7+EDTA.

Podemos observar que el dominio tratado con EDTA luego de 3 hs de haber iniciado la reacción un aumento del valor absoluto de la banda a  $\sim 220$  nm, disminuye la intensidad del mínimo a  $\sim 208$  nm y aumenta la señal a 195 nm. Con el objetivo de definir el tipo de estructura, se analizó el espectro diferencia entre las dos especies. Dicho espectro muestra un comportamiento correspondiente a estructura beta (figura insertada en la figura 3.7), ya que posee un mínimo a  $\sim 217$  nm y un máximo a  $\sim 195$  nm. Este comportamiento es el mismo al que se observó en E7 luego de remover el Zn, lo cual nos indica que E7C también tiene la capacidad de ordenarse en forma de lámina beta y que esto no requiere del dominio *IDP*, E7N. En la misma figura se puede observar el espectro correspondiente a las 24 hs de haber iniciado la reacción. Este espectro no presenta cambios en cuanto a la estructura secundaria, no obstante muestra una evidente pérdida de la señal. Esto indica que existe menor cantidad de proteína en solución, y puede ser debido a la agregación de la muestra durante este período de tiempo. Se puede concluir que la especie E7C sin Zn posee estructura lámina beta pero es inestable en solución, esto último difiere de E7.

Debido a que el producto final de la reacción de E7C con EDTA produce un aumento de lámina beta, nos preguntamos si esta nueva especie tiene la capacidad de unir a los colorantes rojo congo *RC* y *TH T* como sucede en el caso de E7SOs. En este



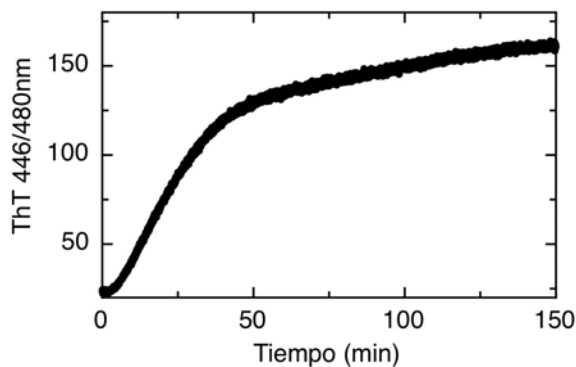
caso se realizaron ambos ensayos y se muestran en la figura 3.8. Es útil recordar que el RC sufre un corrimiento al rojo, en su forma unida posee un máximo de absorción en  $\sim 530$  nm, mientras que en su forma libre el máximo se encuentra a  $\sim 490$  nm.



**Figura 3.8:** Unión de los colorantes rojo congo y tioflavina T E7C con y sin EDTA. **(A)** Unión de *Th T*, en línea punteada E7C, en línea continua E7C con EDTA. **(B)** Unión a RC. línea cortada con punto E7C, en línea continua E7C con EDTA

En la figura 3.8 A se muestra el espectro de emisión de fluorescencia de *Th T* en presencia de E7C y en presencia de la especie que forma E7C luego de removerle Zn. Se puede observar que la señal de *Th T* en el caso de E7C tratado con EDTA aumenta dramáticamente con respecto a la de E7C sola. En el caso de RC, se percibe un corrimiento hacia el rojo en el espectro de absorbancia. Estas mediciones confirman la existencia de hojas betas repetitivas en E7C sin Zn.

Con el fin de estudiar la cinética, se analizó la unión de *Th T* a E7C a medida que transcurre reacción con EDTA, figura 3.9.



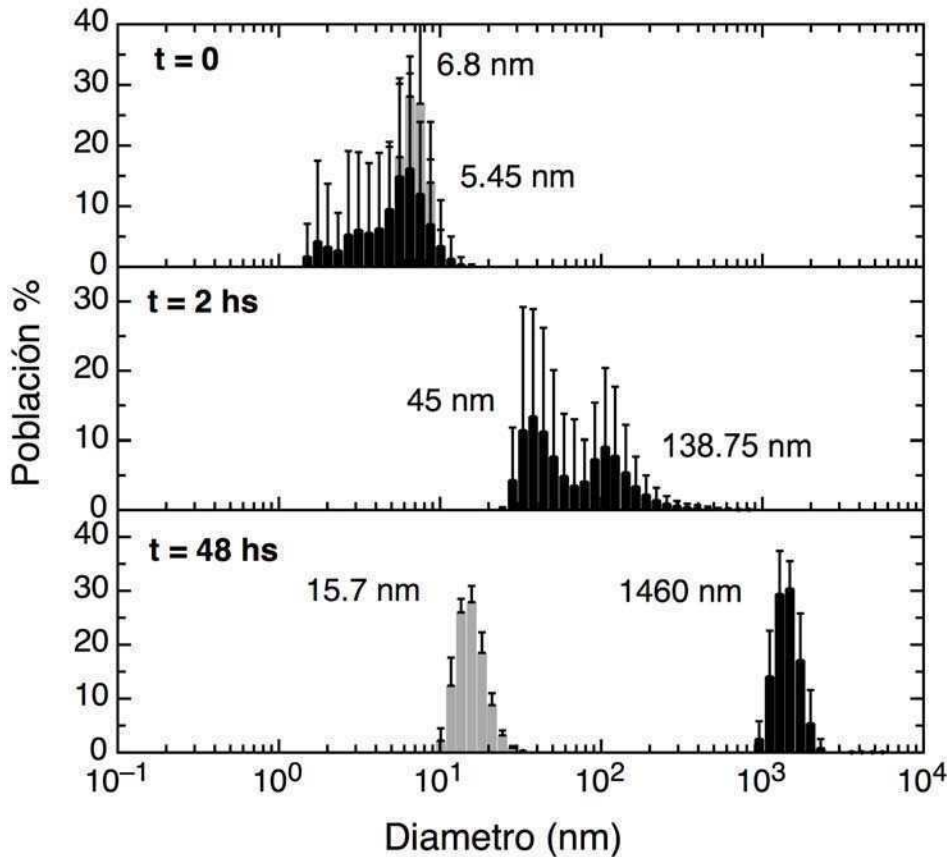
**Figura 3.9:** Cinética de E7C con EDTA seguida por fluorescencia de *Th T*. Se observa una fase de retardo seguida por la fase de elongación. La reacción no alcanza el estado estacionario.

En primer lugar, se observa un tiempo de retardo de aproximadamente 220 seg, que coincide con el tiempo de retardo medido para E7SOs (ver *Capítulo 2*), y luego la etapa comúnmente llamada de elongación, la cual presenta un  $t_{1/2} \sim 800$  seg. Por último, la tercera etapa, la señal no alcanza el estado estacionario indicando que la misma no ha terminado, ya que la fluorescencia continúa aumentando linealmente. Esta recta indica que los cambios estructurales continúan, este comportamiento es compatible con lo observado en los espectros de *DC* expuestos en la figura 3.7.

De estos experimentos se deduce que, al removerle el Zn a E7C, la proteína adquiere una estructura de lámina beta repetitiva. La cinética de formación de dicha estructura seguida por *Th T*, muestra que la misma posee un tiempo de retardo y una fase de elongación que no alcanza el estado estacionario. Los espectros de *DC* a diferentes tiempos muestran que la especie final de la reacción no es estable en el tiempo, la pérdida de señal del espectro a 24hs sugiere la existencia de merma de muestra en solución por agregación. Si se supone que la fluorescencia de *Th T* es paralela al aumento de tamaño (como lo observado en el *Capítulo 2*); se puede considerar que esta nueva especie sigue creciendo hasta alcanzar un estado insoluble. A continuación se detalla el estudio de la morfología del oligómero de E7C.

- **Estudio de morfología de E7C-EDTA a través de *DLS*.**

Con el fin de discernir el tamaño de las especies que dan lugar a la reacción realizamos un análisis por *DLS* durante diferentes tiempos. El diámetro determinado para E7C es de aproximadamente 5.45 nm. Este valor difiere del valor obtenido mediante la ecuación empírica (2.1) presentada en el *Capítulo 2*, la misma sugiere un diámetro de aproximadamente 3.76 nm. No obstante, se puede observar que la medición presenta un histograma no simétrico y con una desviación estándar de 2.26 nm que contempla el valor teórico obtenido por la ecuación (2.1), ver figura 3.10. Esto se debe a que para proteínas de este peso molecular el ensayo de *DLS* se encuentra en el límite inferior del recomendado y trae a como consecuencia la pérdida de precisión en la medición. Dicha medición se realizó a 15 $\mu$ M para poder compararla con los ensayos realizados para el proceso de oligomerización de E7.



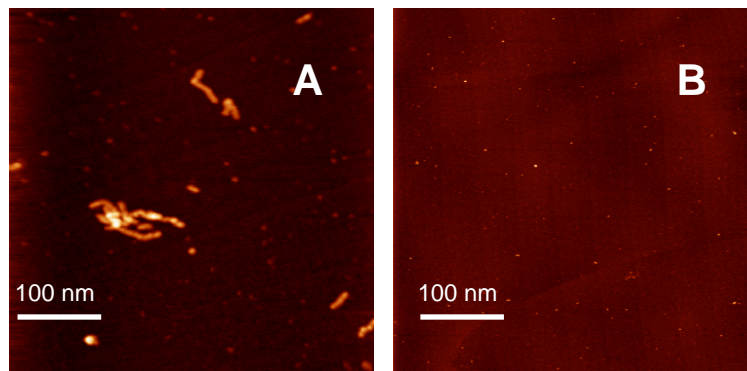
**Figura 3.10:** Medición del diámetro hidrodinámico de E7C por *DLS*. En el panel superior se muestra el diámetro de E7C en negro y se lo compara con el de E7. En el panel medio se muestra E7C-EDTA luego de aproximadamente 2 hs de incubación. En el panel inferior se presentan ambas proteínas tratadas con EDTA luego de transcurridas 48 hs. En negro E7C-EDTA y en gris E7SOs.

En el caso del dominio luego de haberlo incubado 2 horas con EDTA, se observó una muestra heterogénea con un aumento significativo del diámetro hidrodinámico. En la figura 3.10 se observan dos picos, uno alrededor de 45 nm y otro alrededor de 138 nm. Dado que no se conoce la morfología de estos oligómeros, no es posible atribuirle un peso molecular o el número de subunidades que los conforman. Solo se puede destacar que E7C forma grandes oligómeros heterogéneos luego de quitarle el Zn que coordina el dominio. Por último, en la medición de la muestra después de transcurridas 48 horas, se puede observar un aumento aún mayor del diámetro, figura 3.10 C. En esta última medición se agitó la muestra de manera tal que los agregados existentes quedarán en solución. Este ensayo confirma la presencia de material insoluble que podría tratarse de fibras tipo amiloide.

- **Microscopía de fuerza atómica (AFM) de E7C tratado con EDTA**

Con el fin de analizar la naturaleza de los oligómeros insolubles de E7C se utilizó AFM. Estudios llevados a cabo por esta técnica, muestran la existencia de diferentes tipos de estructuras o fibras que cumplen con las características de las fibras amiloides (88-89). De este conjunto heterogéneo de fibras se puede distinguir: oligómeros esféricos del tipo E7SOs, ii) oligómeros cilíndricos llamados *rod-like* (RL), iii) fibras con forma de gusano llamadas *worm-like* (WL) y por último, iv) fibras rígidas y de mayor longitud que las anteriores llamadas *long-straight* (LS). De esta última especie existen a su vez diferentes subtipos, sobre los que no vamos a entrar en detalle en este trabajo (89).

Para este ensayo se optimizó la concentración de proteína a medir utilizando la muestra de E7C con EDTA incubada aproximadamente 4hs con EDTA, en las mismas condiciones de buffer en que fueron medidas las muestras de E7SOs. Esta concentración resultó ser 2  $\mu$ M, 10 veces mayor que la elegida para E7SOs (ver *Materiales y Métodos*). Las imágenes de la muestra de E7C + EDTA a diferentes tiempos se muestran en la figura 3.11.

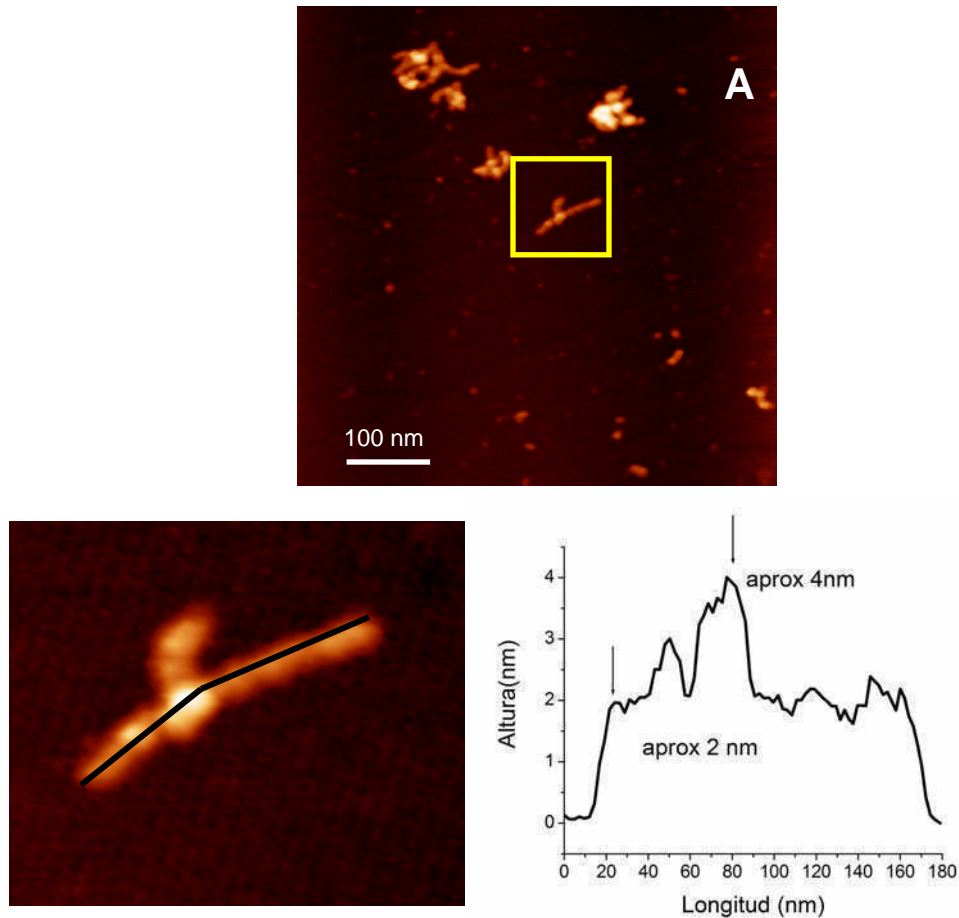


**Figura 3.11:** Morfología de E7C-EDTA a través de microscopía de fuerza atómica. **(A)** Imagen de E7C con 4 hs de incubación. **(B)** E7C-EDTA luego de 24hs.

En la figura 3.11 A, se muestra la imagen de E7C + EDTA luego de aproximadamente 4 hs de reacción. En dicha imagen se observan fibras que forma el domino luego de removerle el Zn. Estas fibras se las pueden clasificar como *worm-like*, en comparación con las descriptas (89).

Por último, en el caso de haber pasado 24hs, no se observa ninguna clase de fibra, ni oligómero. La muestra posiblemente presente agregados insolubles o fibras LS,

también insolubles, las cuales no fueron observadas en el muestreo realizado por esta técnica.



**Figura 3.12:** Análisis de imágenes de E7C-EDTA por *AFM* luego de 4 hs de incubación. **(A)** Imagen de E7C-EDTA 4hs, el cuadrado amarillo representa la zona a ampliar. **(B)** región ampliada de la figura B, en línea negra se realizó un corte para poder medir la altura de la fibra. **(C)** altura de la fibra según corte en B.

El análisis de las imágenes muestra que las fibras poseen un largo entre 50 y 150 nm aproximadamente, una altura de  $\sim 2$  nm y un ancho de  $14.9 \pm 1.6$  nm. Las mismas se encuentran aisladas o se presentan en bloques interactuando entre sí, como muestra la figura 3.12 A. En una ampliación de la imagen de la figura 3.12A se expone la interacción entre los *worm-like* (ver figura 3.12 B). Se observa en dicha imagen dos fibras unidas entre sí. El pico de mayor brillo que presenta la figura 3.12 B, posee el doble de la altura del que le corresponde a cada una de las fibras por separado, ver figura 12 C. Esta medición sugiere la existencia de una interacción o cruce de fibras, que forman los aglomerados de fibras que se presentan en las imágenes.

Con esto podemos concluir que la reacción con EDTA forma rápidamente fibras amiloides del tipo *worm-like*, a su vez estas fibras interactúan entre si formando agregados insolubles y de alto peso molecular. Estos resultados sugieren que este tipo de fibras no evolucionan hacia las fibras rígidas y extensas, *LS*.

## Discusión

En el presente capítulo se analizaron características conformacionales de E7C en solución. Previamente al inicio de la caracterización de E7C, se obtuvo la proteína químicamente pura y homogénea morfológicamente. Para ello, se desarrolló un protocolo de purificación y homogenización de la muestra de E7C. Debido a que E7 y E7C se expresan como proteína de fusión bajo el mismo vector dando como producto: MBP-E7C y MBP-E7, el protocolo de purificación se desarrolló en base al que previamente fue puesto a punto en nuestro laboratorio para E7 (61).

En el transcurso del desarrollo del protocolo de purificación, se observó que toda la muestra oligomeriza en oligómeros de alto peso molecular y de esta manera fue necesario adicionar un paso de replegado. Esto guarda homología con lo observado en nuestro laboratorio para E7. No obstante, en el caso de la proteína entera, la misma presenta una población más heterogénea de oligómeros, como dímeros, tetrámeros y oligómeros de alto peso molecular (E7SOs). De esta manera se concluyó que E7C posee una mayor predisposición a oligomerizar que E7 y esto puede significar que el dominio N-terminal definido *IDP* y con alta carga negativa le otorgue solubilidad a la proteína.

Se obtuvo el dominio E7C en su forma dimérica y se determinó que la muestra posee un mol de Zn por mol de proteína. Este metal se encuentra fuertemente unido al dominio. Por otro lado se confirmó que la migración anómala de E7 en un gel SDS-Page se debe al aporte de E7N.

El espectro de *DC* mostró un espectro predominantemente de hélice alfa, confirmándose que este dominio es el que le aporta estructura ordenada a E7. Por otro lado observamos que el denominado espectro diferencia posee mayor estructura ordenada que E7C. Por lo tanto, sugerimos que este ordenamiento podría deberse a que los aminoácidos que conforman a E7C y están próximos a E7N posean cierta movilidad estructural y se induzcan cambios estructurales al truncarse el dominio *IDP*.

Se observó que el proceso de termodesnaturalización no despliega a la proteína, ya que a alta temperatura (85° C) E7C presenta estructura secundaria ordenada. Este

comportamiento concuerda con la curva de termodesnaturalización medida, la cual no presenta un cambio cooperativo de desplegado de dos estados, como se observa comúnmente en un domino globular. Por otro lado, los cambios en la estructura secundaria observados con el aumento de temperatura son reversibles. Estos comportamientos con la temperatura coinciden con el observado en el laboratorio para E7 (61). Al poseer E7, dos dominios estructurales donde uno de ellos presenta una estructura intrínsecamente desordenada y el otro es globular, podemos concluir que es E7C el que le confiere el comportamiento observado con la temperatura. Por otro lado, podemos sugerir que los cambios observados en el espectro de *DC* durante el aumento de temperatura y la reversibilidad del proceso estén relacionados con la disociación del dominio.

La desnaturalización química por Gdm-Cl mostró, asimismo, un proceso poco cooperativo. Se obtuvo el estado desplegado de E7C a 6 M de Gdm-Cl. Aunque no se observó a que concentración de Gdm-Cl ocurre la monomerización de E7C, suponemos que este evento sucede durante la desnaturalización por dicho agente. Por otro lado, se confirmó que la compactación estructura que sufre E7, observada en nuestro laboratorio (61) es debida a la compactación de E7N.

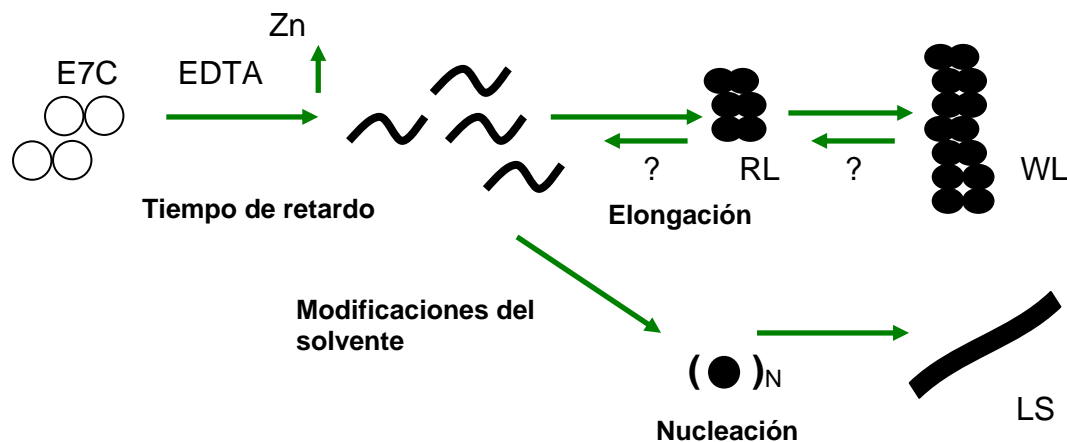
La mayoría de las proteínas pueden formar estructuras del tipo amiloide en condiciones apropiadas modificando los parámetros químicos y físicos del entorno (90). Sin embargo, algunas proteínas muestran una fuerte tendencia a formar estas estructuras, debido a su secuencia aminoácidica (91-92). En el caso de E7C, se observaron fibras del tipo amiloide al remover el Zn cuando la proteína es tratada con EDTA. El dominio presenta una ruta de oligomerización diferente a la observada para E7 cuando se remueve dicho metal (75).

Según la bibliografía (89) se clasificó a estas fibras amiloides como *worm-like*, y se observó bajo diferentes técnicas, que estas fibras interaccionan entre sí formando agregados insolubles. Se concluyó que los *WL* formados por E7C no conducen a la formación de fibras largas y rígidas, *LS*. Esta conclusión se sustenta en el trabajo de Gosla *et al* (88), realizado con la proteína  $\beta_2$ -microglubulina, en el cual demostraron que el camino de formación de *LS* es diferente que el de formación de *WL* o *RL*. En otras palabras, los *WL* o *RL* no son protofibras que luego llevan a la formación de *LS*. Mientras que la formación de *LS* es lenta (el en proceso dura varios días o meses) la formación de los *RL* o *WL* es mucho más rápida. La bifurcación del camino de ensamblado de fibras puede estar controlada por las condiciones de la solución. En el

mismo trabajo se postula que las fibras *LS* presentan el menor estado de energía libre pero tienen una barrera energética muy alta para la formación del núcleo (el por qué de estas características son hasta el momento desconocidas). En el caso de las fibras *RL* o *WL*, estas no poseen un estado de nucleación, la barrera energética durante la elongación son más bajas pero el estado final tiene un equilibrio cinético estable y un equilibrio termodinámico metaestable. Según las condiciones de solución estas barreras energéticas compiten y la proteína toma uno u otro camino.

Es importante destacar que para las fibras *RL* o *WL* no es requerido un proceso de nucleación. Si observamos la figura 3.9, donde se midió la cinética de formación de los *WL*, dicha curva presenta una fase de retardo. Esta fase de retardo, podría representar la formación de E7C sin Zn y no la formación de un oligómero intermediario a *WL* que actué de núcleo. Como ya se mencionó en el capítulo anterior, el dominio E7C sin Zn presentaría a una estructura mayormente desplegada y se encontraría en forma monomérica. El esquema del modelo sugerido se muestra en la figura 3.13.

Se puede concluir que E7C es un dominio de oligomerización. Los resultados obtenidos sugieren que la secuencia aminoacídica que posee la información para producir la oligomerización se encuentra ubicada en E7C. La formación de estructuras con características amiloides de E7 no involucra al dominio E7N.



**Figura 3.13:** Esquema de formación de fibras E7C. El tiempo de retardo es en este caso el tiempo en el que se remueve el Zn y E7C toma una estructura monomérica y desplegada. Luego transcurre la elongación en el cual se forma las primeras fibras pequeñas y luego se extiende hasta llegar a WL. Se presenta la ruta a LS según Gosla *et al* (88), en donde la bifurcación del camino de formación de fibras de tipo amiloide se debe a modificaciones en el solvente. Hasta el presente no se han observado fibras del tipo LS para E7C.





## **4. Interacción de E7 y el dominio E2C**

### **Parte I**



Otro de los objetivos de esta tesis fue el de constatar la hipótesis de la existencia de una interacción entre las proteínas del papilomavirus E2 y E7, y de esta manera poder estudiarla y caracterizarla.

La idea de que ocurriera este tipo de interacción surgió durante el estudio funcional de la proteína E7. Por un lado, se tuvo en cuenta la capacidad que posee E7 en interactuar con diferentes blancos celulares, en donde surgió la pregunta si esta proteína podría interactuar con alguna proteína viral. No se pensó al azar que dicha interacción sucediera con cualquiera de las proteínas del papilomavirus, sino con aquellas que se coexpresan o se localizan con E7. Por otro lado, esta hipótesis se hizo más evidente cuando se estudió la actividad chaperona holdasa de E7. En los experimentos realizados con E7SOs, con el fin de caracterizar dicha actividad, se trabajó con diferentes proteínas como Luciferasa o Citrato Sintetasa (75). Asimismo se realizaron algunos experimentos con el dominio C-terminal de E2, E2C, que es una proteína de estudio en nuestro laboratorio. Los ensayos realizados con E2C no arrojaron los mismos resultados que los observados con las proteínas antes mencionadas. Estas proteínas claramente evidenciaban la actividad chaperona holdasa que posee E7SOs. No obstante, en el caso de E2C, se observaba que existía agregación cuando la misma se encontraba en solución con E7SOs o E7. Estos resultados son la base de la hipótesis acerca de la existencia de una interacción entre estas dos proteínas. Partiendo de estos resultados, se comenzaron los estudios para poder constatarla.

Es importante mencionar, que cuando se comenzó con este trabajo no existía ninguna referencia bibliográfica que aportara evidencia de dicha interacción. Las publicaciones sobre este tema fueron realizadas por otro grupo de investigación durante el transcurso del presente trabajo (93-94).

### **La interacción de E7 con E2C en solución es sensible al pH y a la fuerza iónica.**

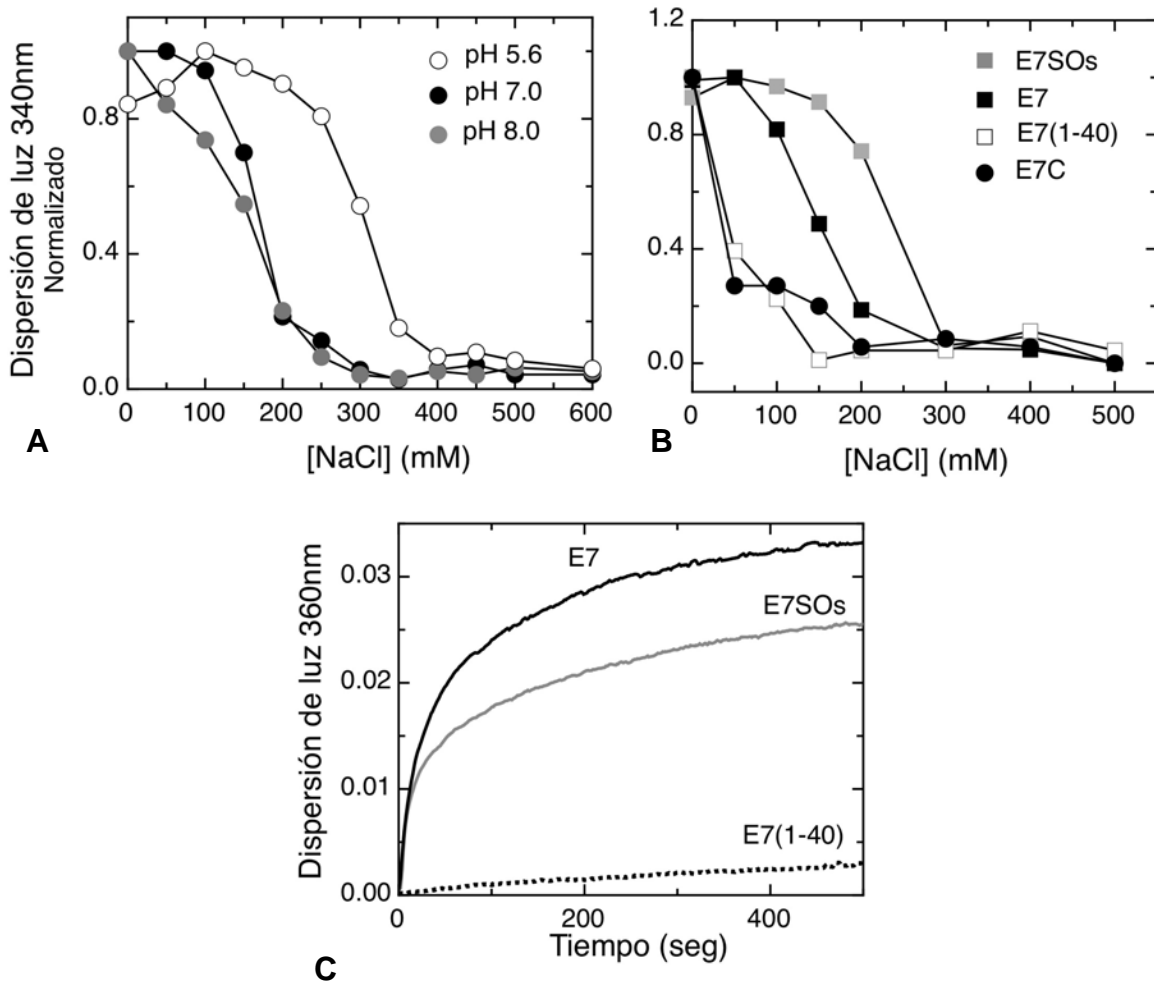
En los primeros experimentos en solución se observó que había una alta tendencia a la agregación entre E7 y E2C. Este comportamiento se había observado en el estudio de unión de E2C con su ADN específico (13), esta tendencia a la agregación se observada cuando la proteína se hallaba en exceso. Por lo tanto, la agregación observada presentó un indicio de la existencia de una interacción entre las proteínas. Con el fin demostrar la existencia de una interacción soluble y luego caracterizarla, se estudiaron diferentes condiciones que evitan la agregación. Se tuvo en cuenta el hecho

de que E7 es una proteína que contiene una alta carga negativa (p.I.= 4.0), mientras que E2C es básica (p.I.= 9.8). Se incubaron las proteínas en soluciones con diferente fuerza iónica y distinto pH. Para poder observar la agregación se midió la dispersión de luz absorbida por la solución, realizando ensayos de absorbancia a 340 nm 360 nm según el equipo utilizado (los experimentos se detallan en *Materiales y Métodos*).

Se observó que a medida que aumentaba la concentración de NaCl la dispersión de luz disminuía (ver figura 4.1). Asimismo se pudo observar que existe un punto de quiebre en donde, a partir de una determinada concentración de NaCl la agregación era mínima. Esta concentración es dependiente del pH. Este ensayo puso en evidencia que probablemente la interacción sea de naturaleza iónica, debido a la carga característica de ambas proteínas y al comportamiento frente a la variación de concentración de NaCl. Por otro lado se observó que la tendencia a la agregación es mucho más fuerte a pH 5.6 que a pH neutro (pH 7.0) o básico (pH 9.0). Esto último se tuvo en cuenta en la elección de la solución tampón para los siguientes experimentos.

Dado que en el laboratorio se cuenta, no sólo con la proteína E7, sino también con sus dominios estructurales por separado, se realizaron ensayos de turbidez en función de la concentración de NaCl con E7N, (en este capítulo también lo nombraremos como E7(1-40)), E7C y con el oligómero E7SOs. El experimento se muestra en la figura 4.1B y se lo compara con el comportamiento con E7. Se observa un comportamiento similar entre E7 y E7SOs y una menor tendencia a la agregación de los dominios. La agregación observada entre cualquiera de los dominios de E7 y E2C es de menor cantidad cuando la concentración de sal es nula y disminuye a una concentración de sal menor que la necesaria para la proteína E7 o para E7SOs.

Con el fin de verificar la presencia de agregación a bajas concentraciones de ambas proteínas, se realizaron curvas de cinética de dispersión de luz absorbida a una concentración de 100 nM de cada una de las proteínas, sin fuerza iónica y a pH neutro. En este experimento se observó que E7SOs y E7 presentan agregación al interactuar con E2C, mientras que para E7(1-40) es significativamente mucho menor.



**Figura 4.1:** Dispersión, absorbancia 340 nm. **(A)** 3 μM E2C y 3 μM E7 a diferentes pHs y concentración de NaCl **(B)** Diferentes especies de E7 a 3 μM y 3 μM **(C)** Cinética de agregación a 100nM de cada una de las proteínas.

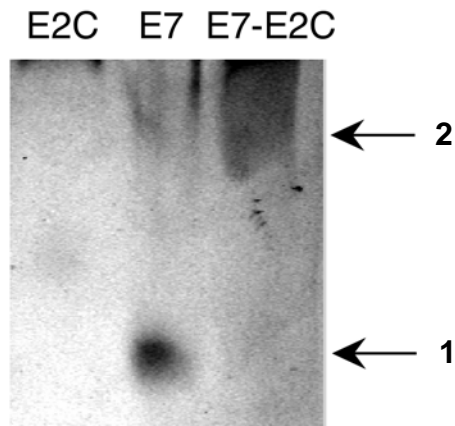
### Unión específica entre E2C y E7 determinada en ensayos en geles

Hasta el momento solo se sabía que ambas proteínas al interactuar en solución agregaban y que esta agregación es evitada por la fuerza iónica. Nos preguntamos si cuando no se observaba agregación había interacción proteína-proteína, y si la misma era específica.

En principio se realizaron ensayos de filtración por un tamiz molecular con el fin de poder obtener una evidencia física de la interacción. Debido al compromiso entre la fuerza iónica y la agregación y sumado a que E2C interactuar con la resina de filtración utilizada (superdex), no fue posible obtener un resultado repetitivo y concluyente. Al interactuar E2C con la resina fue necesario aumentar la concentración de NaCl de manera tal que el aumento de la fuerza iónica disminuía la interacción entre

proteínas, sumado a que una filtración por columna es de por sí un proceso disociativo. Debido a estos inconvenientes descartamos los ensayos y nos avocamos a obtener una evidencia física de la formación de complejo E2C-E7 por medio de geles nativos de movilidad electroforética *EMSA* y ensayos de *far western blot*.

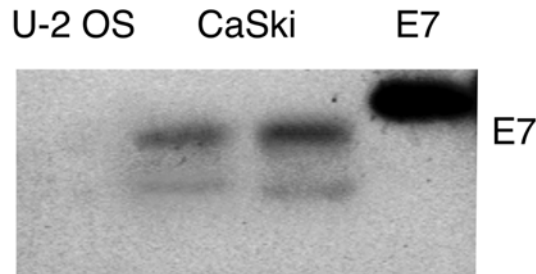
En el caso del gel nativo, *EMSA*, se sembró en calles separadas E2C, E7 y el complejo E7-E2C. Como se puede ver en la figura 4.2, la banda de E2C no está presente en el gel. Como se mencionó anteriormente, la proteína posee un punto isoeléctrico básico muy elevado (pI 9.8) y no puede migrar dentro del gel ya que en la condiciones del experimento las proteínas migran debido a su carga negativa. La banda perteneciente a E7 se observa claramente en el gel y el complejo E2C-E7 se observa como una banda ancha. Esto es consecuencia al pI de E2C y a las condiciones disociantes de la técnica.



**Figura 2:** EMSA que muestra la Interacción E2C-E7. En la primer calle se sembró E2C la cual no entra al gel debido a su p.I., en la segunda calle se sembró E7, la banda respectiva se señala con una flecha (1). En la última calle se sembró el complejo E2C-E7, se puede observar que desaparece la banda correspondiente a E7 y se observa una banda muy ancha en una posición diferente a la banda correspondiente a E7, esta banda se la asocia al complejo, también se señala con una flecha (2).

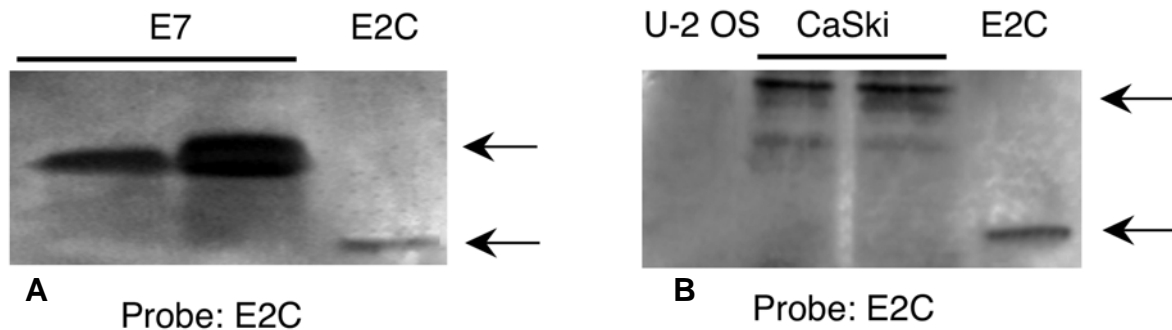
Por otro lado, se realizaron experimentos de *far western blot* tanto E7 recombinante y E7 expresada en líneas celulares transformadas con HPV16 como la línea celular Caski. En primer lugar se realizó un ensayo de *western blot* para confirmar la presencia de E7 en un lisado celular de Caski, usando como control negativo otro lisado celular de una línea que no fue transfectada con HPV, en este caso U2-OS. A modo de control positivo, se utilizó E7 recombinante (ver figura 4.3). Con el fin de detectar a E7 se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-HPV16 E7 M1 desarrollado en el laboratorio. Es bueno mencionar, que la movilidad electroforética en un SDS-Page es

diferente para la proteína E7 endógena que para la recombinante y esto puede ser atribuido a modificaciones post-traduccionales. En este ensayo se confirmó la presencia de E7 endógena en la línea celular CasKi, asimismo no se observó la presencia de E7 en la línea celular no transfectada con el genoma de HPV 16.



**Figura 4.3:** Identificación de E7 endógena en línea CasKi y recombinante a través de la técnica de Western blot de. En la primera calle se sembró el lisado celular de la línea U2-OS como control negativo, en la segunda y tercer calle se sembraron diferentes cantidades de un lisado celular de la línea CasKi (5 y 10  $\mu$ g respectivamente), en donde se detecta E7 endógena; las diferentes bandas se deben a modificaciones post-traduccionales. En la última calle se sembró E7 recombinante (10 ng). Se utilizó al anticuerpo monoclonal M1.

Se realizaron dos ensayos de far western blot en dos geles SDS-Page diferentes. En uno de ellos se sembró E7 recombinante y en el otro los lisados celulares mencionados anteriormente. En ambos casos se sembró E2C recombinante como control positivo. Se incubaron los geles con E2C y se reveló con un anticuerpo monoclonal anti-E2C desarrollado también en el laboratorio. El anticuerpo anti-E2C reconoció a la proteína E2C en las bandas de la proteína E7, ver figura 4.4. En este experimento se observó la formación del complejo E2C-E7, tanto en E7 recombinante como en el caso de E7 endógena de la línea celular CasKi.



**Figura 4.4:** Interacción de E2C-E7 analizada a través de la técnica de far Western blot **(A)** Interacción de E2C con E7 recombinante. En las dos primeras calles se sembró E7 a dos concentraciones diferentes (5 y 10 ng respectivamente) y en la última calle se sembró E2C como control positivo. Se incubó la membrana con E2C y se reveló con anti-E2C. **(B)** Interacción de E2C recombinante con E7 endógena. En la primer

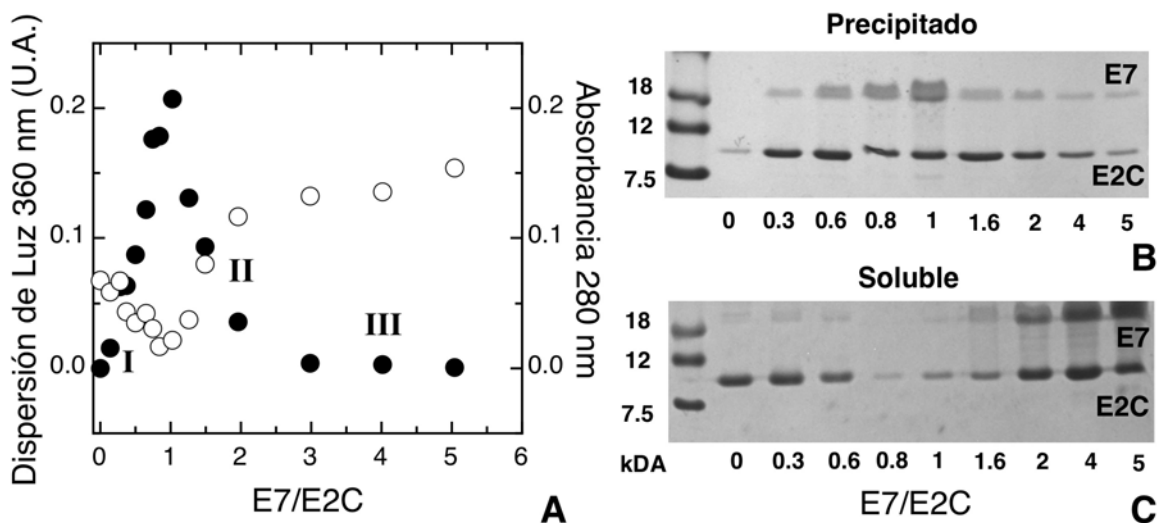


calle se sembró un lisado celular de U2-SOs como control negativo, en las dos calles siguientes se sembró el lisado celular de la línea CasKi la cual posee E7 endógena, en la última calle se sembró E2C como control positivo. La membrana se incubó con E2C y se reveló anti-E2C.

Con estos resultados se corroboró la hipótesis que postulaba la existencia de una interacción específica entre E7 y el represor de su transcripción, E2C.

### La agregación depende de la concentración relativa entre ambas proteínas.

Con el objetivo de encontrar alguna relación estequiométrica con la agregación, realizamos un experimento de dispersión de luz a una concentración fija de E2C, y variando la concentración de E7. Este experimento se realizó a 0 M de NaCl y en tubos separados. Se incubaron ambas proteínas y se acompañó la cinética de agregación midiendo dispersión de luz a 360 nm. Se tomaron los valores alcanzados en el estado estacionario por dicha señal. Seguidamente se centrifugó cada uno de los tubos, con el fin de retirar a los agregados de la solución, y se midió la proteína remanente en solución a 280 nm. Para ello se midió la absorbancia a 280 nm. Las medidas de dispersión de luz en el estado estacionario y la absorbancia de la proteína remanente se muestran en la figura 4.5 A. Cabe recordar que E7 no posee triptofanos, por lo que la señal a 280 nm esta relacionada con la cantidad de E2C que permanece en solución ya que la misma posee 4 triptofanos por dímero.



**Figura 4.5:** Interacción E2C-E7 a diferentes concentraciones de E7 y sin variar E2C (2 $\mu$ M), ensayo realizado en tubos separados. **(A)** Dispersión a 360nm (círculo negro), una vez que la muestra alcanzó el estado estacionario y absorbancia a 280nm (círculos vacíos) del soluble que queda remanente en la solución luego de la centrifugación. Las estequiometrías I,II y III se analizaron por *DLS*, ver figura 4.6**(B)** Gel SDS-Page de los precipitados obtenidos luego de centrifugar las muestras. **(C)** Gel SDS-Page del soluble luego de centrifugar a las muestra. El ensayo se realizó a 20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 2 mM de DTT.

En este experimento se observó que la agregación depende de la concentración relativa entre ambas proteínas. Se observa un comportamiento frente a la concentración de proteínas que consta de tres regímenes diferentes, figura 4.5. Cuando la relación de concentración  $[E7]/[E2C]$  es menor a 1, la agregación aumenta hasta llegar a la relación  $[E7]/[E2C] = 1$ , donde alcanza el máximo. Luego de este punto la agregación comienza a disminuir hasta que llega a una relación  $[E7]/[E2C] = 2$ . A partir de este punto y en adelante no se observa agregación. La señal de absorbancia a 280 nm reporta un comportamiento especular con respecto a la señal a 360 nm. La misma presenta un mínimo en el punto de máxima agregación y se mantiene estable luego de la relación  $[E7]/[E2C] = 2$ , reportando que la proteína permanece en solución. El aumento lineal de la señal a 280 nm luego de este punto, se debe a la absorbancia de las tirosinas que comienza a contribuir conforme aumenta la concentración de E7.

Es útil mencionar, que la concentración de E2C es la concentración de E2C dimérica mientras que la de E7 es la monomérica. Esta denominación se utilizará durante todo el capítulo. Esto es debido a que la constante de disociación del dímero de E2C es del orden de los picomoles (37) mientras que para E7 es el orden de 1  $\mu\text{M}$  (ver apéndice), esta última se corroborará al final del presente capítulo.

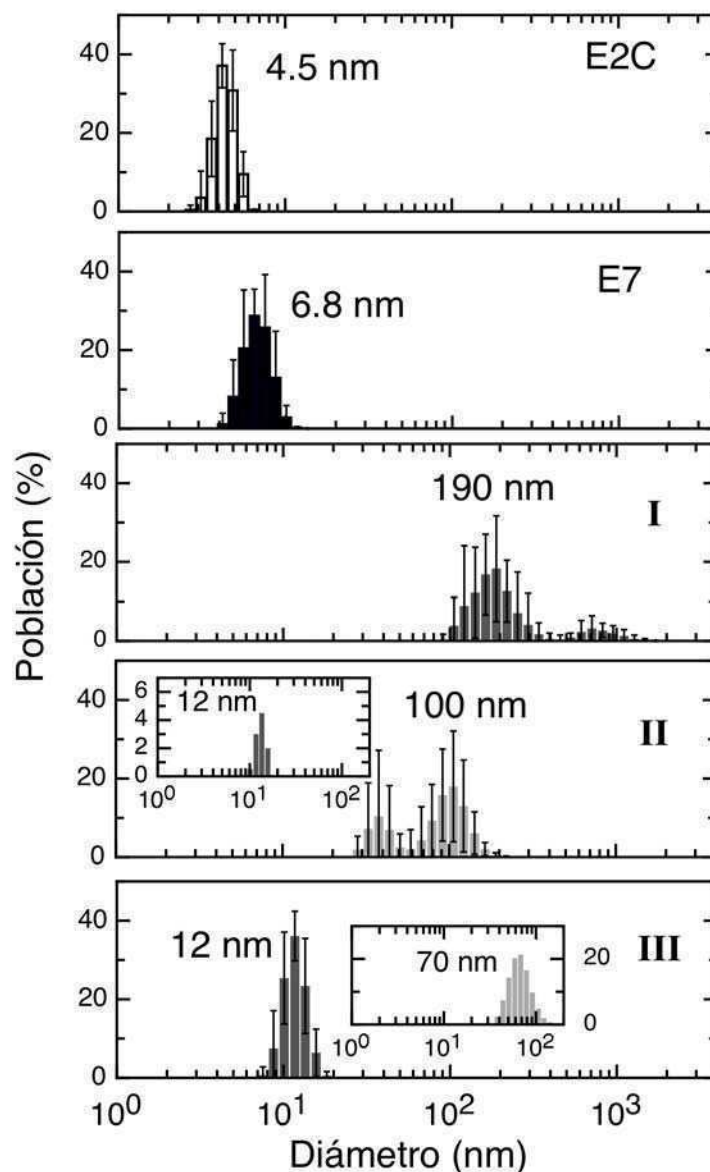
Con el fin de complementar los ensayos espectroscópicos, se realizaron ensayos por medio de geles SDS-Page. Se sembró en un gel SDS-Page el precipitado obtenido luego de centrifugar cada uno de los tubos de la curva antes mencionada. Por otro lado, se sembró en un gel SDS-Page diferente, la proteína remanente en solución. Estos experimentos se muestran en la figura 4.5 B y C. El comportamiento con la concentración relativa de proteínas es el mismo que el observado con la técnica de dispersión de luz y absorbancia a 280 nm.

### **Diferentes estados de oligomerización analizados por DLS**

Con el objetivo de estudiar el tipo de agregado o complejo que esta presente en los regímenes antes mencionados se utilizó la técnica de *DLS*. En primer lugar se caracterizaron las proteínas por separado en las mismas condiciones del experimento anterior. El diámetro hidrodinámico obtenido para E2C fue de 4.5 nm y para E7 fue de 6.8 nm, acorde al comportamiento intrínsecamente desordenado que posee E7 observado por otras técnicas y ya discutido en los capítulos anteriores.

Con el fin de estudiar los regímenes en la interacción se tomaron 3 condiciones diferentes: (I) en una relación  $[E7]/[E2C]$  menor a 1, exceso de E2C, (II)  $[E7]/[E2C] = 2$  y

por último (III)  $[E7]/[E2C]$  mayor a 2, en exceso de E7. Los resultados se muestran en la figura 4.6.



**Figura 4.6:** Comportamiento de E2C-E7 a diferentes relaciones de concentración analizado por *DLS*. El panel de arriba muestra la distribución del diámetro de 10  $\mu\text{M}$  E2C, el panel siguiente le corresponde a 10  $\mu\text{M}$  E7 **I**) En exceso de E2C,  $[E7]/[E2C]$  menor a 1, 10  $\mu\text{M}$  E2C y 4  $\mu\text{M}$  de E7 **II**)  $[E7]/[E2C] \sim 2$ , 10  $\mu\text{M}$  E7 y 4  $\mu\text{M}$  de E2C **III**) En exceso de E7  $[E7]/[E2C]$  mayor a 2, 10  $\mu\text{M}$  E7 y 3  $\mu\text{M}$  de E2C. Los diámetros medios aproximados se muestran en cada panel. Las figuras insertas en cada panel corresponden a un análisis de la distribución de partículas restringido a una región fija. El ensayo se realizó a 20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 2 mM de DTT.

En exceso de E2C, condición (I), se observó la presencia de agregados blancos visibles de un radio hidrodinámico aproximadamente de 1-2  $\mu\text{m}$  (no se muestran los

resultados). Luego de una centrifugación rápida con el fin de separar a las especies insolubles de la solución se pudo medir heteroligómeros de aproximadamente 190nm. En la figura 4.6 I, se observa una distribución bimodal, donde uno de los picos se encuentra centrado en 190 nm y corresponde a heteroligómeros solubles. La otra especie presente posee un diámetro hidrodinámico mayor y corresponde a agregados/oligómeros insolubles que no han sido removidos por la centrifugación. Con esto concluimos que el exceso de E2C con respecto a E7 lleva mayormente a agregados insolubles, los que denominamos, AI.

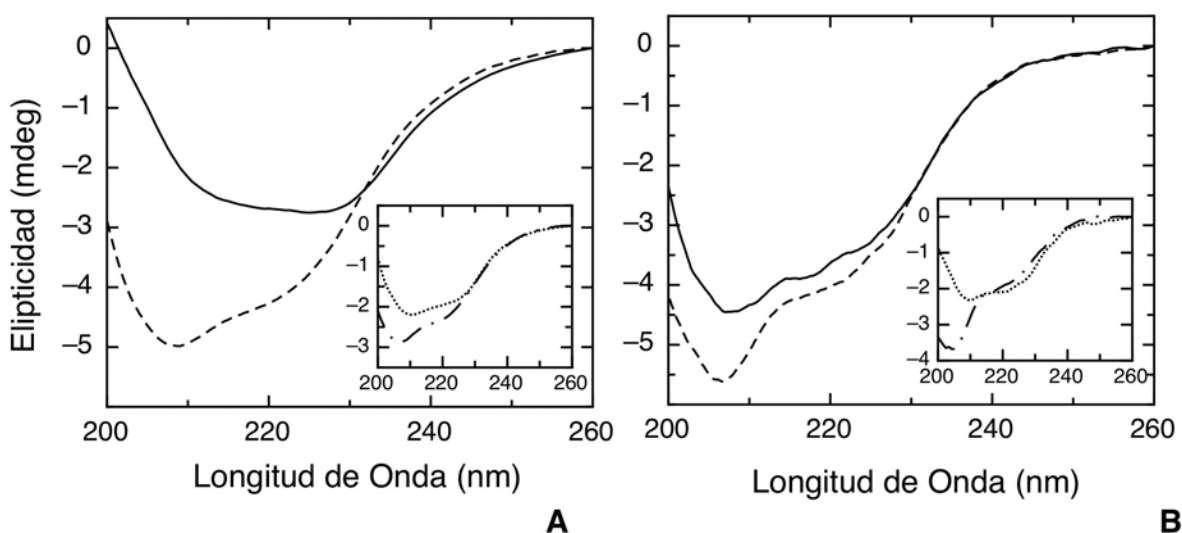
En la segunda condición, (II)  $[E7]/[E2C] = 2$ , se observaron 2 tipos de poblaciones diferentes alrededor de los 40 y 100 nm. A estas especies la denominamos oligómeros heterogéneos solubles, E2E7Os. En la última condición, en exceso de E7, se observó una distribución bien definida con un diámetro hidrodinámico alrededor de 12 nm, a esta especie la definimos como complejo E7-E2C, E7E2Cx, que posee alta solubilidad.

En cada una de las mediciones se realizó un análisis restringido a determinadas regiones, con el fin de encontrar pequeñas poblaciones de partículas que se encuentren en equilibrio con la población mayoritaria. Como se puede observar en las figuras insertas dentro de la figura 4.6, en el caso de la condición (II), encontramos un pequeña población distribuida alrededor de 12 nm. En el caso (III) se observó una pequeña población alrededor de los 70nm de diámetro hidrodinámico. Esto significa que los complejos u oligómeros presentes en diferentes regímenes se encuentran en equilibrio entre sí.

En resumen, se hallaron tres posibles regímenes o comportamientos en la interacción E2C-E7 dependientes de la relación entre las concentraciones de ambas proteínas. Si se presenta un exceso de E2C sobre E7, la interacción lleva a la formación de agregados insolubles, AI. A medida que la concentración de E7 aumenta surgen oligómeros solubles, E2E7Os con diámetro hidrodinámico menor que los AI. Si la concentración de E7 continúa aumentando y supera al doble de la concentración de E2C, estos oligómeros disminuyen aún más su diámetro hasta obtener una población bien definida y altamente soluble denominada E7E2Cx. Además, las especies E2E7Os y E7E2Cx se encuentran en equilibrio.

### Caracterización de las especies por medio de dicroísmo circular

Con el fin de determinar los cambios que tienen lugar en la estructura secundaria de los oligómeros que forman la interacción E2C-E7, se realizaron espectros de *CD*. Para ello se analizó el espectro en el máximo punto de agregación, donde la relación entre la concentración de proteínas es de  $[E7]/[E2C] = 1$  y cuando ésta es de  $[E7]/[E2C] = 2$ . Como se puede ver en la figura 4.7, en ambos casos los espectros de las muestras que contienen la mezcla de ambas proteínas difieren sustancialmente con el espectro suma de cada una de las proteínas medidas individualmente. Esto indica un cambio en la estructura secundaria debido a la interacción entre las proteínas.



**Figura 4.7:** Espectros de dicroísmo circular UV lejano de los diferentes estados de oligomerización que forma la interacción E7-E2C con diferente relación en la concentración de proteínas. **A)**  $[E7]/[E2C] = 1$ , se utilizó:  $[E7] = [E2C] = 2 \mu\text{M}$  **B)**  $[E7]/[E2C] = 2$ , en este caso  $[E2C] = 2 \mu\text{M}$  y  $[E7] = 4 \mu\text{M}$ . En ambos casos la línea continua corresponde a la muestra que contiene ambas proteínas (espectro resultante de la interacción). La línea cortada corresponde al espectro suma de los espectros de cada una de las proteínas por separado. En los insertos de cada figura, la línea punteada corresponde al espectro de E2C a  $2 \mu\text{M}$  y la línea cortada con punto al espectro de E7 a la concentración correspondiente según la experiencia.

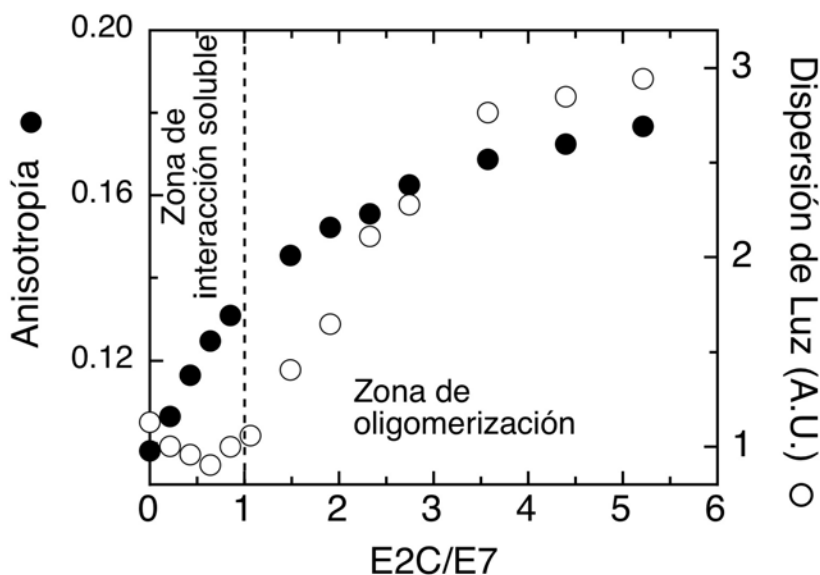
Es importante notar que el cambio en el mínimo y en el máximo en cada complejo no sólo difiere al de los espectros suma sino que difieren entre sí. Esto sugiere que los cambios en la estructura secundaria de cada complejo u oligómeros son diferentes entre sí.

Las diferencias entre los espectros, en cuanto a señal absoluta, podrían estar indicando una pérdida de la muestra por agregación pero los cambios de la posición de las bandas de dicroísmo circular inequívocamente confirman cambios conformacionales.

### Estequiometría y constante de disociación de E7E2Cx

Una de las motivaciones en el análisis de esta interacción fue la de determinar la estequiometría del complejo soluble observado, E7E2Cx, y su constante de disociación. Para ello se realizaron curvas de titulación con E2C manteniendo fija la concentración de E7. Como ya mencionamos anteriormente, E7 es una proteína que no posee triptofanos mientras que E2C posee 4 por dímero. Cabe mencionar que no se observaron cambios en la fluorescencia de triptófano cuando se realizó la titulación inversa (resultados no mostrados). Por este motivo, se procedió a buscar otra sonda que reportara la interacción. Se unió covalentemente isotiocianato de fluoresceína (FITC) a E7, obteniéndose E7-FITC (se detalla en *Materiales y Métodos*). Con este fluoróforo se monitorearon los cambios de anisotropía de fluorescencia durante la titulación con E2C.

Con el fin de evitar la agregación y solo obtener al complejo E7E2Cx en solución, se realizaron las curvas de titulación en una solución tampón que contenía 100 mM NaCl. Para determinar la presencia de oligómeros, se acompañó a la titulación con la técnica de dispersión de luz en paralelo con los cambios de anisotropía. Este ensayo se muestra en la figura 4.8.

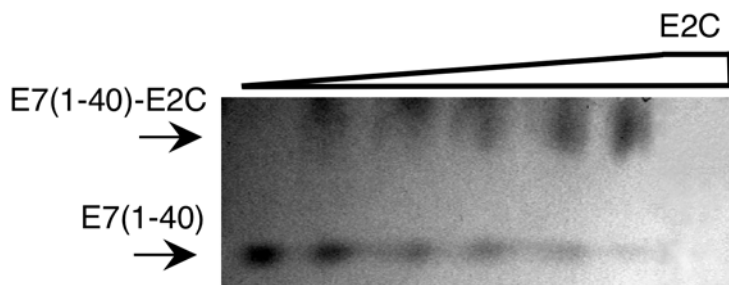


**Figura 4.8:** Titulaciones de anisotropía de fluorescencia y dispersión de luz de E7-FITC con E2C. La curva de círculo negro corresponde a los cambios de anisotropía de E7-FITC al ser titulada con E2C. Los círculos blancos corresponden a los cambios de la dispersión de luz a 500 nm. Las titulaciones se realizaron a 200 nM de E7-FITC en solución tampón: Tris-HCl pH 8.0, 2 mM de DTT y 100 mM NaCl.

Los cambios de ambas señales muestran la presencia de diferentes complejos. En principio, la señal de dispersión de luz permanece constante conforme aumenta la señal de anisotropía indicando la formación de un complejo soluble. La dispersión de luz aumenta más allá de una relación de concentraciones de proteína, E2C:E7, es aproximadamente 1. Este aumento de dispersión de luz alcanza una meseta en aproximadamente 4 veces en la relación de concentraciones. Este comportamiento sugiere que la formación de un complejo soluble, que es reportada por la anisotropía con los primeros puntos de la curva, es seguida por la formación de oligómeros solubles o agregados reportados por ambas técnicas. En otras palabras, no es posible separar la formación de los diferentes complejos y poder obtener una relación estequiométrica para E7E2Cx y su constante de disociación.

#### Determinación de la región de E7 que interacciona con E2C

Considerando la dependencia con la fuerza iónica de la interacción y la naturaleza básica de E2C, se planteó como hipótesis, que el dominio N-terminal estaría involucrado en la interacción, ya que E7N le confiere la mayor carga negativa a E7. Con el fin de confirmar esta hipótesis, se realizó un *EMSA* para demostrar la interacción. Se sembró diferentes muestras en el gel, donde se incubó E7(1-40) a una concentración fija y concentraciones crecientes de E2C. Como control, se sembró E2C sin E7(1-40).

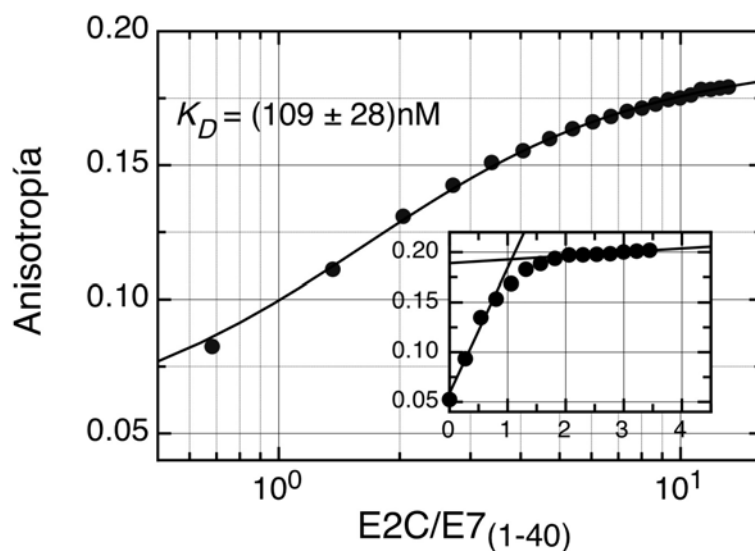


**Figura 4.9:** Gel nativo que demuestra la interacción entre E7(1-40) y E2C. E7(1-40) (20  $\mu$ M) fue incubada con diferentes concentraciones de E2C (0,5 ,10 ,15 ,20 y 30  $\mu$ M). E2C sola se sembró en la última calle, la proteína no migra dentro del gel debido a su naturaleza básica. En la primera calle se sembró al péptido E7(1-40). En las otras calles se sembró al complejo E7(1-40)-E2C, con cantidades crecientes de E2C. El complejo E7(1-40)-E2C se indican con una flecha y con otra fecha se indica la banda correspondiente al péptido E7(1-40). El ensayo se realizó a 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl y 2 mM DTT.

En la figura 4.9, se puede apreciar que a medida que aumenta la concentración de E2C la banda correspondiente al complejo E2C-E7(1-40) comienza va aumentando gradualmente. Con este experimento se presenta una evidencia física en la formación de complejo E2C-E7(1-40), confirmando que esta región está directamente involucrada

en la interacción. Por otro lado, se realizó otro ensayo en donde se utilizó al péptido E7N de la cepa del papilomavirus bovino de la cepa1, E7N-BPV1. Se realizó un experimento similar al que se muestra en la figura 4.9, en donde se sembró a E7N-BPV1 y la muestra con E2C y E7N-BPV1. En dicha experiencia no se observó la banda perteneciente al complejo E2C-E7N-BPV1 (datos no mostrados).

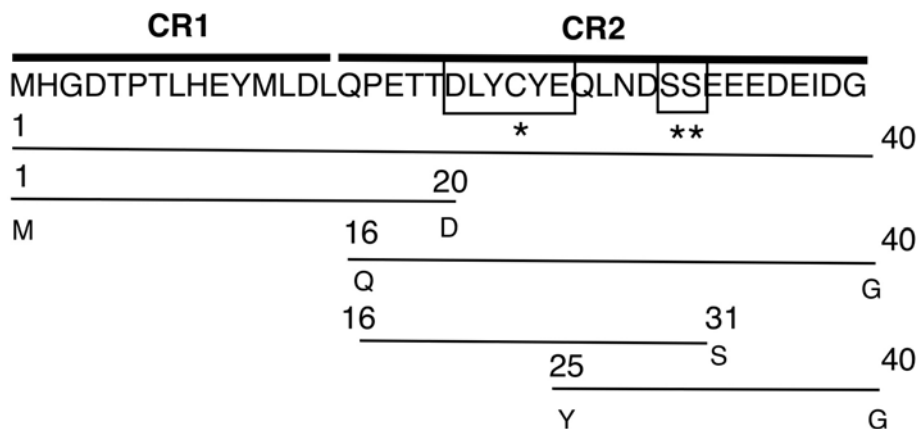
Como fue expuesto previamente, este complejo presenta muy poca tendencia a formar agregados, de esta manera se propuso estudiarlo en solución. Los ensayos que se muestran a continuación fueron realizados en 50mM de NaCl con el fin evitar la agregación. Con el objetivo de obtener la constante de disociación,  $K_D$ , y la estequiometría del complejo, se realizaron curvas de titulación con E2C a diferentes concentraciones de E7(1-40). Se midieron los cambios de anisotropía de fluorescencia utilizando como sonda el fluoróforo FITC, unido al amino terminal del péptido, E7(1-40)-FITC. La estequiometría de unión observada fue de un E7(1-40) por monómero de E2C (ver figura 4.10). Los datos fueron ajustados a un modelo de unión simple, asumiendo una estequiometría 1:1 (ver ecuación 7.10, *Materiales y Métodos*), dicho ajuste se realizó con el fin de obtener la constante de disociación del complejo,  $K_D$ . Se observó una coincidencia en el valor de  $K_D$  de las mediciones independientes realizadas a diferentes concentraciones del ligando fijo, obteniéndose  $K_D = 109 \pm 28$  nM, En la figura 4.10 se muestra una titulación a un determinada concentración de E7(1-40)-FITC a modo de ejemplificar la experiencia.



**Figura 4.10** Curvas de titulación con E2C a E7(1-40)-FITC (100 nM). Se muestran los cambios de la anisotrópica de fluorescencia de FITC, se ajustó a un modelo de unión 1:1 (línea continua). La figura inserta muestra la estequiometría 1 a 1, donde se utilizó E7(1-40)-FITC (1000 nM). Las mediciones se realizaron a 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl y 2 mM DTT.



Con el fin de acotar la región de interacción dentro del dominio N-terminal, se trabajó con varios péptidos pertenecientes a E7N, todos ellos unidos covalentemente con FITC en su amino terminal. Para la elección de los mismos se tuvo en cuenta en primer lugar dividir a E7(1-40) según las regiones CR1 y CR2, las cuales son regiones bien conservadas (ver *Introducción*). De esta forma se trabajó con los péptidos E7(1-20) que contiene la región CR1 y E7(16-40) que posee la región CR2. Dentro de CR2 se encuentra el motivo de unión a pRB formado por la secuencia LXCXE y la zona altamente ácida que tiene un alto índice en secuencia PEST y el sitio de fosforilación por Casein Kinasa II de E7 (D<sub>30</sub>-**S-S**-E-E-E-D-E<sub>37</sub>). Para dividir estas dos regiones se usó el péptido E7(16-31) y el E7(25-40). Las secuencias aminoacídicas de cada péptido se encuentran esquematizadas en la figura 4.11 y las  $K_D$  de unión a E2C se encuentran en la tabla 4.I.

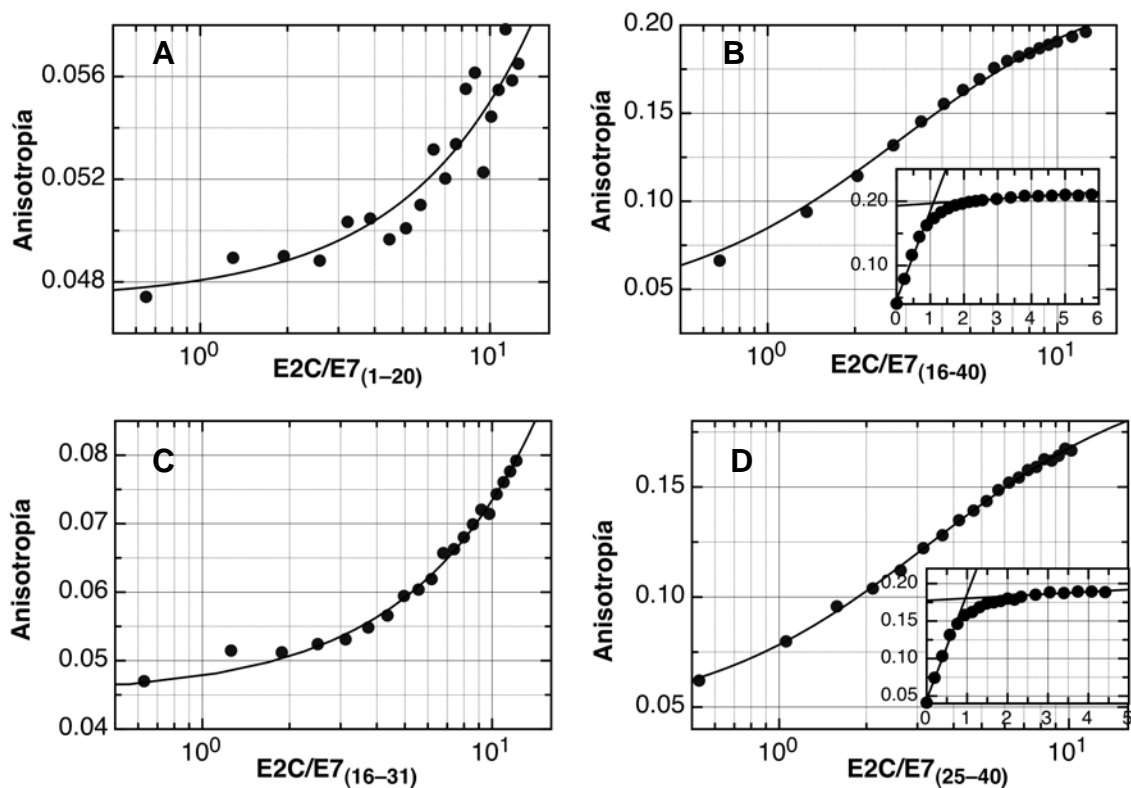


**Figura 4.11:** Secuencia de E7N y esquema de los péptidos utilizados para hallar la región de interacción dentro de dicho dominio. \* Indica el motivo de unión a pRB y \*\* las dos serinas que pueden ser fosforiladas por CKII.

| Peptido de E7 HPV16 | $K_D$ (nM)                  |
|---------------------|-----------------------------|
| 1-40                | $109 \pm 28$                |
| 1-20                | $> 2.3 \times 10^4$         |
| 16-40               | $203 \pm 23$                |
| 16-31               | $(6.3 \pm 0.4) \times 10^3$ |
| 25-40               | $278 \pm 20$                |

**Tabla 4.I:** Se exponen las  $K_D$  obtenidas para cada péptido.

Como resultado de este análisis se determinó que el péptido E7(25-40), el cual contiene la mayor cantidad de aminoácidos ácidos, posee la región de unión a E2C; siendo la  $K_D = 278 \pm 20$  nM. En la figura 4.12 se presentan las curvas de titulación realizadas con los péptidos de E7N.

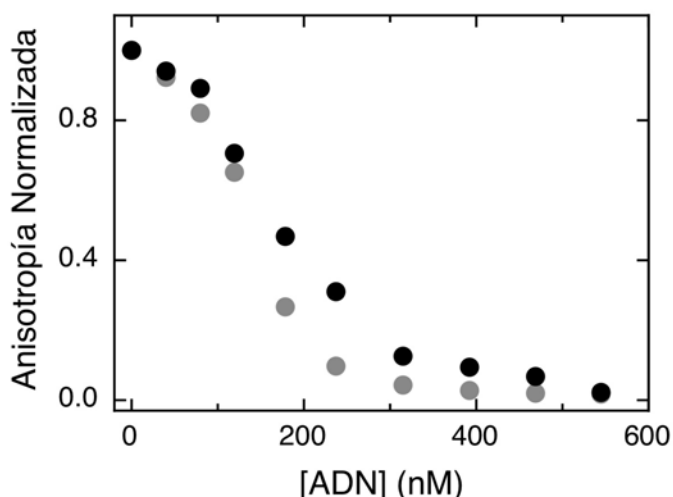


**Figura 4.12:** Mapeo de la región de interacción de E7N. Curvas de titulación con E2C a diferentes péptidos del dominio. Las curvas muestran los cambios de la anisotrópica de fluorescencia de FITC, las mismas fueron ajustadas a un modelo de unión 1:1 (línea continua). **(A)** E7(1-20)-FITC 1000 nM, **(B)** E7(16-40)-FITC 100 nM, estequiometría 1 a 1. **(C)** E7(16-31)-FITC 1000 nM **(D)** E7(25-40)-FITC 100 nM, estequiometría 1 a 1. Todas las mediciones se realizaron a 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl y 2 mM DTT.

### Desplazamiento de E7 de E2C-E7 por el ADN específico a E2.

Debido a que E2C es represor de la transcripción de E7 y E6, nos preguntamos si existía una competencia entre la formación del complejo E2C-E7 y la interacción de E2C con su ADN específico. Para ello se realizó la siguiente experiencia, se incubó tanto al complejo E2C-E7-FITC como a E2C-E7(1-40)-FITC y se realizó una titulación con el ADN doble cadena del sitio específico de interacción de E2. Se monitorearon los cambios de la anisotropía de fluorescencia de FITC. Es útil mencionar que en ausencia de ADN la anisotropía del complejo E2C-E7-FITC o E2C-E7(1-40)-FITC es máxima. A

medida que la concentración de ADN aumenta durante la titulación, la anisotropía disminuye hasta llegar a al estado basal que le corresponde tanto al péptido como a la proteína libres. Esto se puede observar en la Figura 4.13, en donde la señal esta normalizada. Se puede concluir que la unión del ADN específico a E2C desplaza a E2C del complejo formado con E7, indicando que la hélice de unión de E2C esta involucrada en la interacción con E7.



**Figura 4.13:** Desplazamiento de E7 y E7N de los complejos que forman con E2C por titulación del ADN específico de E2C. E2C-E7 círculo gris y E2C-E7N círculo negro.

#### **Mutaciones en la hélice de unión al ADN alteran la formación del complejo E2C-E7**

Luego de observar una competencia con el ADN y sabiendo la naturaleza iónica de la interacción, se consideró a la hélice de unión a ADN, conservada en todos los papilomavirus, como región candidata de interacción con E7N, ya que ésta es altamente básica. Se analizaron diferentes mutantes sitio-dirigidas (47) de dicha hélice en la unión con E7(1-40)-FITC, siguiendo los cambios de anisotropía de fluorescencia. Los resultados se muestran en la tabla 4.II. Observamos que la mutación lisina 297 por alanina (K297A) disminuye la afinidad con un cambio en la energía libre respecto de la E2C salvaje de  $1,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Sin embargo, si se reemplaza al mismo residuo por arginina (K297R) se estabiliza la unión. La mutación del residuo no cargado tirosina 301 por alanina (Y301A) tiene un mínimo efecto sobre la unión, mientras que la doble mutante K297A/Y301A causa una desestabilización del complejo. Si aplicamos el principio del ciclo de mutantes dobles (95), en donde la suma de las energías libres de mutaciones individuales es igual al de la doble mutante; en este caso resulta que la interacción no es aditiva. Cuando esto ocurre se dice que la interacción es cooperativa y

dado que la mutante doble posee menor afinidad con E7N la interacción es negativamente cooperativa.

Finalmente, se consideró la posibilidad de que el péptido que comprende a la hélice de unión de E2C ( $\alpha$ 1-E2C) podría interactuar con E7(1-40). Es importante decir que dicho péptido contiene todos los residuos que forman la hélice de unión pero sólo posee un 10% de la estructura secundaria y una unión débil al ADN específico. Se realizaron experimentos de cambios de anisotropía y *DC*, sin embargo, en ninguno de ellos se encontró evidencias que confirmen la interacción entre dichos péptidos (datos no mostrados). Este resultado indica que la conformación de la hélice de unión en el contexto del dominio E2C es requerida en la unión a E7, como en el caso de la interacción E2C-ADN (96).

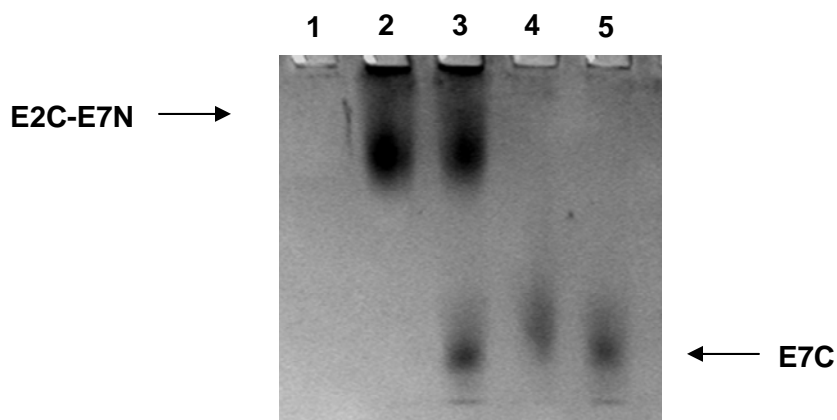
| <b>E2C mutation</b> | <b><math>K_D</math><br/>(nM)</b> | <b><math>\Delta\Delta G^a</math><br/>(kcal/mol<sup>-1</sup>)</b> |
|---------------------|----------------------------------|--|
| wt                  | 109 ± 28                         | 0  |
| K297A + Y301A       | 6098 ± 610                       | 2.4 ± 0.2  |
| K297A               | 756 ± 76                         | 1.1 ± 0.2  |
| K297R               | 52 ± 5                           | -0.4 ± 0.2   |
| Y301A               | 159 ± 20                         | 0.2 ± 0.2  |

**Tabla 4.II:**  $K_D$  de cada una de las mutantes.  $\Delta\Delta G$  utilizados el  $\Delta G$  de la E2C salvaje.

### **Interacción de E2C con el dominio E7C**

Luego de concluir con el estudio de la interacción de E2C con E7N, se estudió la posibilidad de que el dominio E7C presentara otra región de interacción con la proteína. Se continuó con el mismo régimen de caracterización. Con el fin de evidenciar la interacción entre proteínas se utilizó la técnica de *EMSA*. Se sembró en un gel nativo la muestra con ambas proteínas y a cada una de ellas por separado. En este experimento no se observó una banda correspondiente al complejo E2C-E7C. Sin embargo, si se compara la intensidad de la banda correspondiente a E7C, en la calle donde solo se sembró esta proteína y la calle donde se sembraron ambas proteínas, se observa que la

misma disminuye. Este experimento arroja evidencias indirectas de la interacción entre E7C y E2C. Es útil mencionar que, como ya se comentó anteriormente, debido a que E2C posee un pI básico y dadas las condiciones del experimento, E2C no está presente en el gel. Por otro lado, E7C no posee la misma carga negativa que E7, como se expuso en el capítulo 3, el pI teórico de la misma es de 6.4. Por lo tanto, el complejo resultante podría poseer una carga total positiva y de esta manera presentaría la misma dificultad de E2C al migrar a través del gel. Otra posibilidad es que la interacción E2C-E7C sea más débil comparada con E2C-E7(1-40) y debido a las condiciones disociativas de la técnica no se pueda observar dicho complejo.



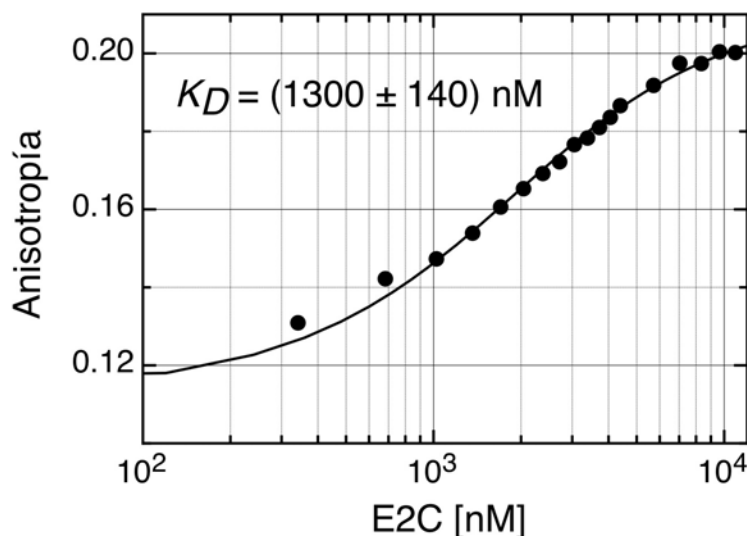
**Figura 4.14:** Gel nativo donde se sembraron los complejos E2C-E7N y E2C-E7C. En la calle 1 se sembró E2C, la misma no migra dentro del gel. En la calle 2 se sembró el complejo E2C-E7N. En la calle 3 se sembró al complejo E2C-E7N y E7C, donde se observa la banda correspondiente al complejo E2C-E7N y la banda correspondiente a E7C, no se evidencia la interacción de E7C con E2C. En la calle 4 se sembró al complejo E2C-E7C, solo se observa la banda correspondiente a E7C. En la calle 5 se sembró E7C.

En el mismo experimento se realizó un ensayo de competencia entre E7N y E7C con E2C. La figura 4.14 muestra que utilizando esta técnica no se pudo determinar si existe competencia entre dominios. Asimismo, no se observa la presencia de una banda que indique la existencia de otro complejo en el que participen ambos dominios.

#### Titulación de E7C-FITC con E2C

Con el fin de obtener más evidencias de la interacción E2C-E7C se realizaron ensayos de titulación monitoreando los cambios en la anisotropía de fluorescencia de FITC. Para ello, se unió covalentemente el fluoróforo fluoresceína al dominio E7C, E7C-FITC (la reacción se expone en *Materiales y Métodos*). Se realizaron entonces, curvas de titulación de E7C-FITC con E2C, con el objeto de encontrar la estequiometría del complejo y poder calcular la constante de disociación. Para abordar este estudio se

realizaron titulaciones a diferentes concentraciones de E7C-FITC. Se ajustaron las curvas con el modelo de unión 1:1, utilizado anteriormente, en este caso suponemos que la unión es de un dímero de E2C con un dímero de E7C. La constante de disociación obtenida fue de  $1300 \pm 140$  nM, figura 4.15.



**Figura 4.15:** Curvas de titulación de E7C-FITC con E2C, se midieron los cambios en la anisotropía de fluorescencia. A) Titulación a 1000 nM de E7C-FITC B) Titulación a 100 nM de E7C-FITC. Las constantes de disociación se exponen en la figura, las mismas varían dependiendo de la concentración del dominio E7C.

Cabe destacar que la proteína E7 presenta una constante de disociación monómero:dímero del orden de  $\sim 1 \mu\text{M}$  (ver *Apéndice*). Dada las características estructurales de E7, suponemos la constante de disociación monómero:dímero de E7C es del mismo orden. A diferencia del estudio de la interacción con E7N, en este caso el equilibrio de dimerización podría influir en la formación del complejo E2C-E7C (se observaron algunos cambios en la  $K_D$  obtenida experimentalmente dependientes de la concentración de E7C). Estos experimentos son tan solo un primer abordaje al estudio de este complejo y se continuará trabajando en el laboratorio en su caracterización.

## Discusión

El primer indicio que ponía en evidencia la interacción de E2C con E7 era que ambas proteínas agregaban cuando se encontraban en la misma solución y esta agregación era fuertemente dependiente de la fuerza iónica. Teniendo en cuenta que en la interacción de E2C con su ADN específico existen procesos de oligomerización/agregación dependientes de la fuerza iónica y a leves modificaciones del solvente (58), y por otro lado, que ambas proteínas tienen la capacidad de

oligomerizar, se continuó caracterizado la interacción, ya que estos resultados sugerían que la propiedad de oligomerización/agregación era inherente a estas proteínas. Entonces se planteó que esta agregación se debería a que durante la interacción se formaran heterooligómeros con alta tendencia a agregar, los cuales tenían una alta dependencia de la fuerza iónica indicando la naturaleza electrostática de la interacción. Esta agregación fue observada aun en concentraciones bajas de ambas proteínas (0.1  $\mu\text{M}$ ) en donde E7 se encontraría mayormente como monómero. Esto mismo se observó para los E7SOs y en mucho menor grado para E7N y E7C.

Se observaron tres regímenes en la interacción de estas proteínas según la concentración relativa entre ellas. En exceso de E2C se obtienen agregados insolubles, IA. Cuando  $[\text{E7}]/[\text{E2C}]$  es aproximadamente 2 se observa el heterooligómero soluble, E2E7Os, y cuando E7 se encuentra en exceso se observa al complejo E7E2Cx de 12 nm de diámetro hidrodinámico. Por otro lado, se observó en la condición en donde se obtenían los E2E7Os que se podía distinguir una pequeña población de E7E2Cx y viceversa, indicando un posible equilibrio entre estas especies. Estos resultados sugieren fuertemente que un pequeño exceso de cualquiera de las moléculas puede modificar el equilibrio hacia los grandes complejos insolubles o solubles E7E2Cx bien definidos, y por lo tanto, establece un mecanismo de ajuste altamente sensible en el equilibrio entre las dos proteínas.

Debido a la dependencia con la fuerza iónica que se observó en los estudios de oligomerización/agregación se concluyó que dicha interacción tendría una naturaleza electrostática. Dado que E7N posee una gran cantidad de aminoácidos con carga negativa, se investigó la posibilidad de que en este dominio existiera la región de unión. De esta manera se encontró la región de unión dentro del péptido E7(25-40), el cual contiene la zona altamente ácida.

La primera evidencia de la participación de la hélice de unión a ADN de E2C en la interacción con E7 fue el desplazamiento del complejo E2C-E7 por el ADN específico. A partir de este resultado se estudiaron diferentes mutantes en la hélice de unión a ADN, donde se observó un impacto directo en la interacción con el E7 dominio N-terminal. El cambio de un aminoácido no cargado como ser la mutante K297A o la doble mutante K297A + Y301A disminuye gravemente su afinidad. Cabe mencionar que aunque el ADN y E7 comparten aproximadamente el sitio de unión, la naturaleza de las interacciones es diferente. Esto puede deducirse del hecho de que las mutaciones en la hélice de E2C son aditivas y en el caso de la interacción con E7 estas mutaciones

muestran una positiva cooperatividad de  $0.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Además, el cambio de un residuo básico como Arginina aumenta significativamente la afinidad por el ADN ( $\Delta\Delta G - 0.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), mientras que el un reemplazo similar causa una drástica desestabilización en la unión al ADN ( $\Delta\Delta G +3.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), debido al impedimento estérico causado por el voluminoso grupo guanidinio de la arginina, mientras que esto no ocurre en la unión a E7. Otra conclusión fue que el péptido que corresponde a la hélice de interacción con el ADN no se une con E7. Esto indica que la interacción el posicionamiento de la hélice en una conformación en el contexto de toda la arquitectura de dominio, como es el caso de la interacción de ADN (96). Esto habla de un nivel de especificidad que no puede implicar simplemente la interacción solamente electrostática.

Por otro lado, el comportamiento de oligomerización/agregación que se observó al variar la concentración relativa entre las proteínas, sugirió la posibilidad de que existiera otro sitio de unión en E7. Estudios preliminares mostraron la existencia de una interacción entre E2C y E7C. El trabajo de caracterización de dicha interacción se profundizará en el futuro en nuestro laboratorio. El hecho de la existencia de un sitio de interacción secundaria no es sorprendente, ya que E7 es considerada una proteína “promiscua” debido al gran número de proteínas que interaccionan con ella. LA existencia de este segundo sitio de interacción podría explicar la oligomerización observada en el presente trabajo.





## **5. Interacción de E7 y el dominio E2C**

### **Parte II**

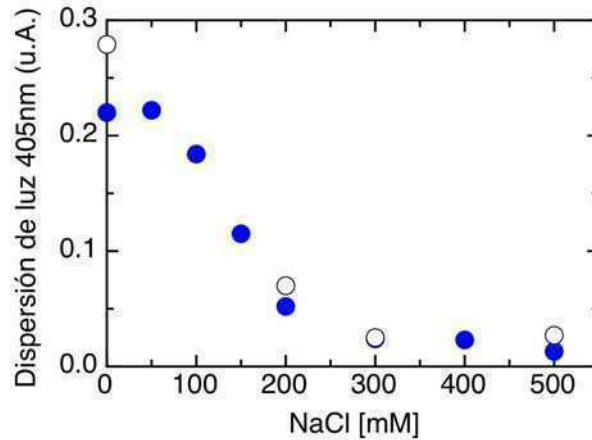


Se observó en el laboratorio que en condiciones de pH y temperatura compatibles con el medio celular, y a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de proteína, E2C forma fibras del tipo amiloide cuando es incubada a bajas concentraciones de TFE (7.5-30%)(97). Este cambio en el solvente produce un cambio conformacional que lleva a la formación de especies oligoméricas con estructura beta repetitiva, las que posteriormente se desarrollan en forma de fibras del tipo worm-like, *WL*. En el mismo trabajo se observa que el ADN específico evita la formación de estas especies. En base a esto, se propuso que la desestabilización de la hélice de unión específica a ADN es el iniciador de la ruta de oligomerización. Asimismo, como ya se discutió en capítulos anteriores, la proteína E7 tiene la capacidad de oligomerizar formando E7SOs con características del tipo amiloide. Conociendo la capacidad de formar especies con estructura beta repetitiva que poseen ambas proteínas y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la primer etapa del análisis de la interacción E2C-E7 (expuestos en el capítulo anterior), surgió la idea de estudiar la naturaleza de los heteroligómeros formados por ambas proteínas y su repercusión en la ruta de formación de fibras amiloides observadas para E2C. Nos preguntamos si la interacción de ambas proteínas favorecía o impedía la formación de fibras amiloides de E2C.

### **Efecto del NaCl en la oligomerización de E2C-E7**

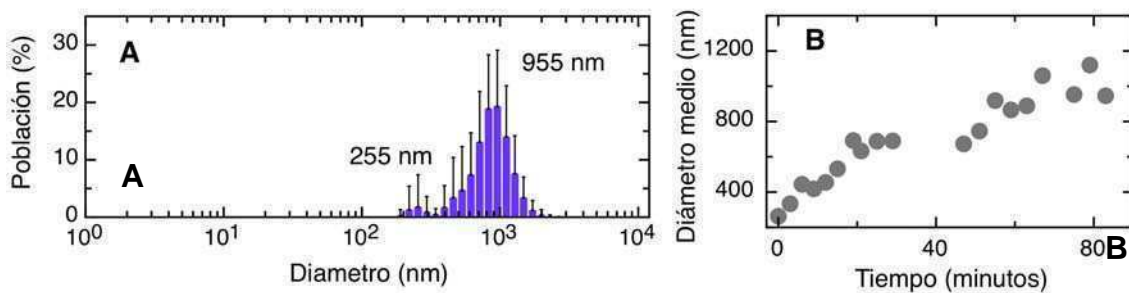
Con el fin de estudiar bajo diferentes técnicas, la posible vía de formación de fibras amiloides de los oligómeros solubles que forman E2C y E7, fue necesario utilizar mayores concentraciones de proteína de las utilizadas en el capítulo anterior, donde se realizó la caracterización de la interacción. En dicho capítulo se discutió que tanto el exceso de E7 sobre E2C, como la fuerza iónica evitan la formación de agregados insolubles. Por estos motivos la primera parte del estudio consistió en la puesta a punto de las condiciones óptimas para estudiar el efecto de la interacción en la ruta amiloide. Se tomó como concentración apropiada para realizar los experimentos que se describen a continuación, 10  $\mu\text{M}$  de cada una de las proteínas y se eligió la estequiometría  $[\text{E2C}]/[\text{E7}]=1$  para comenzar con el estudio (es útil recordar que en el presente trabajo se utiliza la concentración dimérica de E2C mientras que en el caso de E7 se utiliza la concentración monomérica). Esta estequiometría es la que presenta mayor cantidad de *AI* en la condición sin a baja fuerza iónica. Como consecuencia de esto, se analizó la concentración necesaria de fuerza iónica con la que se debía trabajar para evitar la formación de los *AI* en concentraciones de proteína mencionadas. Con el fin de

seleccionar la condición de NaCl apropiada realizamos nuevamente un ensayo de dispersión de luz variando la concentración de la sal. En la figura 5.1 se muestra este resultado (a 10  $\mu\text{M}$ ) junto con el realizado a menor concentración de proteína (3  $\mu\text{M}$  cada una).



**Figura 5.1:** Agregación en función de la concentración de NaCl por dispersión de luz a 405nm. Los círculos rellenos pertenecen a la mezcla de E2C y E7 a 3  $\mu\text{M}$  para cada una de las proteínas y los círculos vacíos a la mezcla de ambas proteínas a 10  $\mu\text{M}$ . Todas las condiciones se realizaron en 20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 2 mM DTT.

Del ensayo se puede determinar que a partir de 300 mM NaCl no se observan agregados insolubles. Por otro lado, con el fin de asegurarse que esta fuerza iónica no inhiba la interacción, se utilizó la técnica de *DLS* para verificar la presencia de oligómeros solubles. Los resultados de esta experiencia se muestran en la figura 5.2.



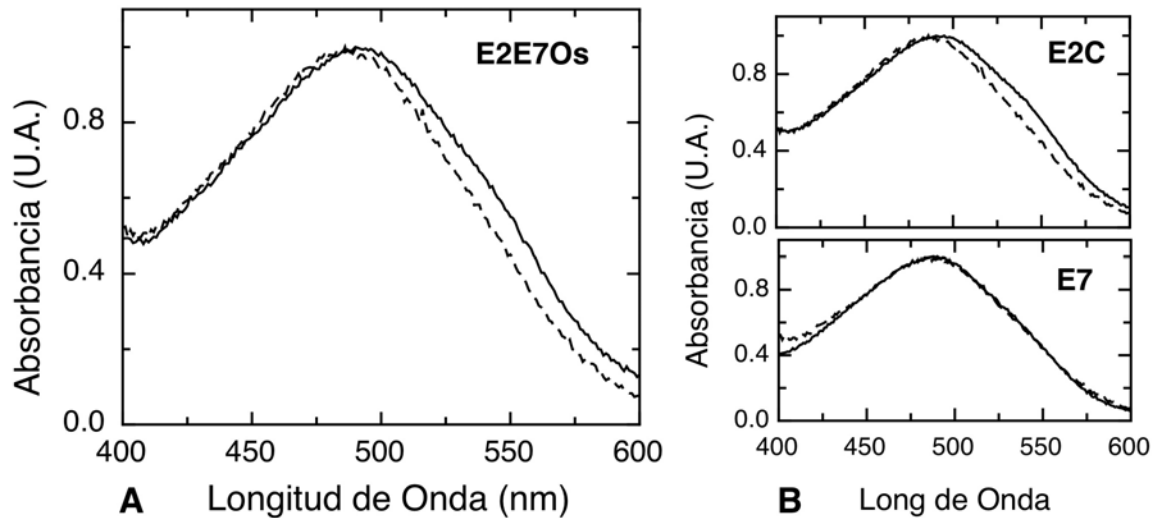
**Figura 5.2:** DLS E2C-E7 10  $\mu\text{M}$  de cada una de las proteínas en 300 mM NaCl. **(A)** Oligómeros E2C-E7 se muestran en la figura los diámetros medios de la distribución luego de incubarlos durante 2 hs. **(B)** Cinética de formación de los oligómeros, en las mismas condiciones.

En esta experiencia se pudo concluir que la condición de fuerza iónica elegida no inhibe la interacción entre proteínas, ya que se observa oligómeros de gran diámetro, de  $\sim 900$  nm. No obstante los mismos se mantienen en solución a través del tiempo

(datos no mostrados). En la figura 5.2B se muestra la cinética de formación de los oligómeros es más lenta en esta condición que en el caso sin NaCl (dato no mostrados). Se puede concluir que a una relación de concentraciones  $[E2C]/[E7]=1$  en presencia de 300 mM de NaCl se obtienen heteroligómeros del tipo E2E7Os. Esta condición es utilizada en los experimentos que se describen a continuación.

### Unión de E2E7Os a rojo congo

Con el objetivo de estudiar la naturaleza de estos oligómeros, nos preguntamos si los mismos poseían características del tipo amiloide. Se estudió la formación de estructuras beta repetitiva a través de la tinción por rojo congo de los oligómeros E2C-E7. Se observó un pequeño cambio en máximo del espectro de absorbancia de E2C y un cambio de igual magnitud en el espectro de E2CE7Os, ver figura 5.3.



**Figura 3:** Espectro de absorbancia de tinción con Rojo Congo normalizado. **(A)** Línea continúa espectro de tinción con Rojo Congo de los oligómeros E2C-E7, línea cortada espectro de tinción con Rojo Congo del buffer. **(B)** Panel superior: línea continúa espectro de tinción con Rojo Congo para E2C Panel inferior: línea continúa espectro de tinción con Rojo Congo para E7. En ambos casos la línea punteada corresponde al buffer.

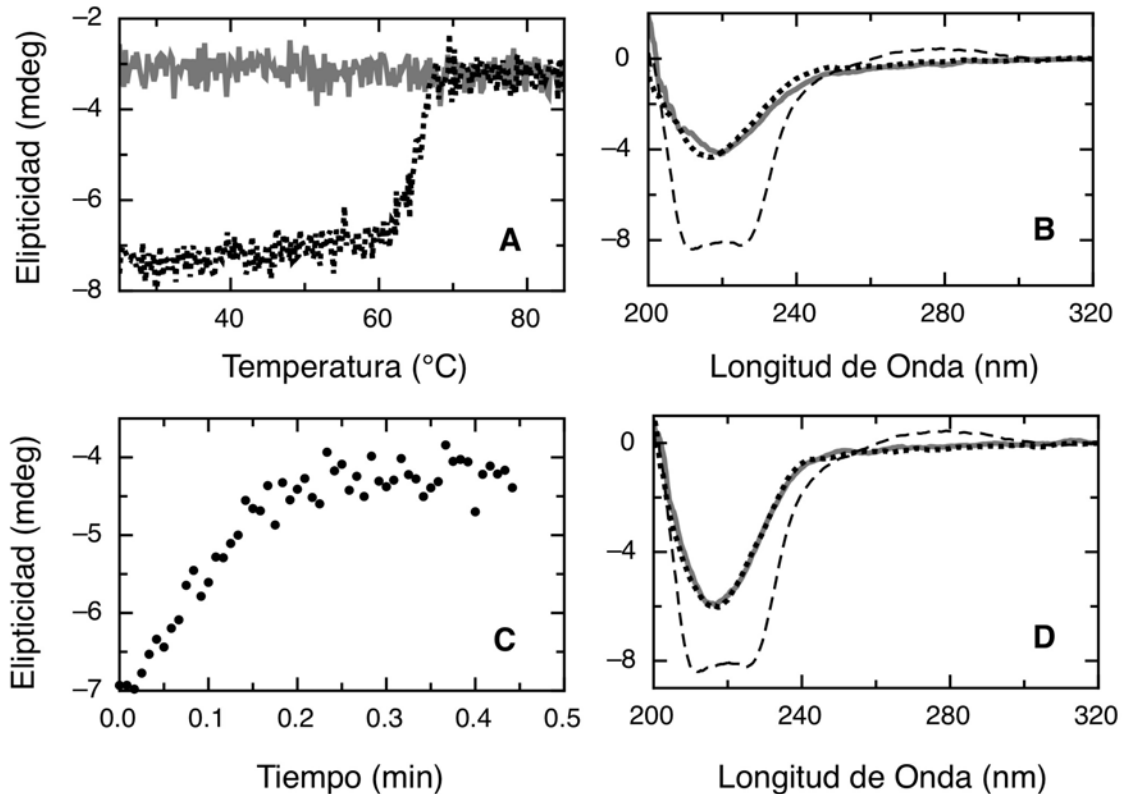
Dado que E2C no presenta una estructura del tipo beta repetitiva, este cambio en el espectro de E2E7Os es provocado solo por la presencia de la proteína E2C y no por los oligómeros E2E7SOs. Este mismo ensayo se realizó para los oligómeros E2E7Os formados en el medio sin NaCl donde se observó el mismo comportamiento (no se muestra la figura). Por lo tanto, descartamos la posibilidad de que E2E7Os posea características del tipo amiloide.

### Formación amiloides de E2C por aumento de temperatura

Se observó en el laboratorio, que tanto la desestabilización conformacional producida por bajas concentraciones del solvente *TFE* (97) o la ocasionada por el aumento de la temperatura (datos no publicados) producen la formación de fibras del tipo *worm-like* en la proteína E2C. El presente estudio se comenzó por analizar los cambios conformacionales de E2E7Os producidos por el solvente *TFE* por ser esta la vía de formación de amiloides de E2 estudiada en más detalle. Se observó durante dicho análisis que este solvente produce cambios estructurales en E7 (no se muestran los datos). Al ser E7 una proteína termorresistente y al no estar caracterizadas las modificaciones inducidas por *TFE*, se concluyó que la perturbación térmica era la adecuada para el estudio de la formación de especies con estructura beta repetitiva a partir de los oligómeros E2E7Os.

Antes de exponer el estudio de los cambios conformacionales producidos a E2E7Os por el aumento de la temperatura, se muestran los resultados obtenidos para E2C. Con el fin de no introducir una nueva variable a la interacción E2C-E7 todos los experimentos se realizaron a pH 8.0. Se monitorearon los cambios por *DC* a longitud de onda fija (225 nm). La desestabilización de la estructura de E2C por aumento temperatura se realizó mediante dos métodos. Por un lado, se realizó una curva de termodesnaturalización aumentando la temperatura desde 25 °C a 85 °C y luego se midieron los cambios de la curva de retorno, este análisis se muestra en la figura 5.4 A y B. Se observó que el cambio de estructura comienza a partir de los 60 °C y luego se estabiliza a aproximadamente 70 °C. El espectro final del calentamiento muestra un cambio de estructura secundaria a lámina beta con un mínimo en 219 nm. La curva inversa, en donde disminuye la temperatura, muestra que la reacción es irreversible y el espectro a 25°C permanece prácticamente invariante con respecto al de 85 °C.

Por otro lado, se realizó una curva de cinética a temperatura constante, donde se incubó a la proteína a 60 °C y se midieron los cambios a 225 nm, ver figura 5.4 C. La especie que se obtiene al final de la perturbación térmica presenta un espectro de lámina beta, ver figura 5.4 D. Se puede concluir que la reacción conduce al mismo cambio estructural que el observado en la termodesnaturalización.



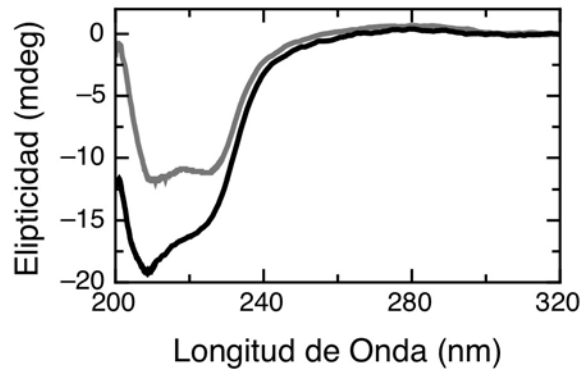
**Figura 5.4:** Perturbación térmica de E2C medida por DC. **(A)** En línea punteada, aumento de temperatura desde 25°C a 85°C a una velocidad de 3°C por minuto; en línea gris y continua disminución de temperatura desde 85°C a 25°C. Ambas curvas presenta los cambios de intensidad a 225 nm. **(B)** En línea cortada espectro de E2C a 25 °C, en línea continua y gris espectro de E2C a 85 °C y línea punteada espectro de E2C a 25°C luego a haberlo aumentado la temperatura hasta 85 °C. **(C)** Cinética a temperatura constante, 60°C, seguida a 225 nm **(D)** En línea cortada espectro de E2C a 25 °C, en línea continua y gris espectro de E2C a 60 °C una vez que alcanzó el estado estacionario y línea punteada espectro de E2c a 25°C luego a haberlo tratado a 60°C.

Se realizaron cinéticas a diferentes temperaturas con el fin de hallar la temperatura mínima para perturbar el sistema e iniciar la ruta amiloide, esta temperatura fue de 55 °C (datos no mostrados). Si la perturbación se realiza a una temperatura mayor que la mínima se tiene un efecto cinético de aceleración del proceso.

### Termodesnaturalización del complejo E2E7Os

En el capítulo anterior se había observado que el espectro de DC de los heterooligómeros formados por ambas proteínas son diferentes a los espectros obtenidos de la suma de los espectros de las proteínas medidos por separado, figura 4.7. Esta misma característica se observó para E2E7Os en las condiciones de fuerza iónica y concentración de proteína en que se realizó el presente estudio, ver figura 5.5.

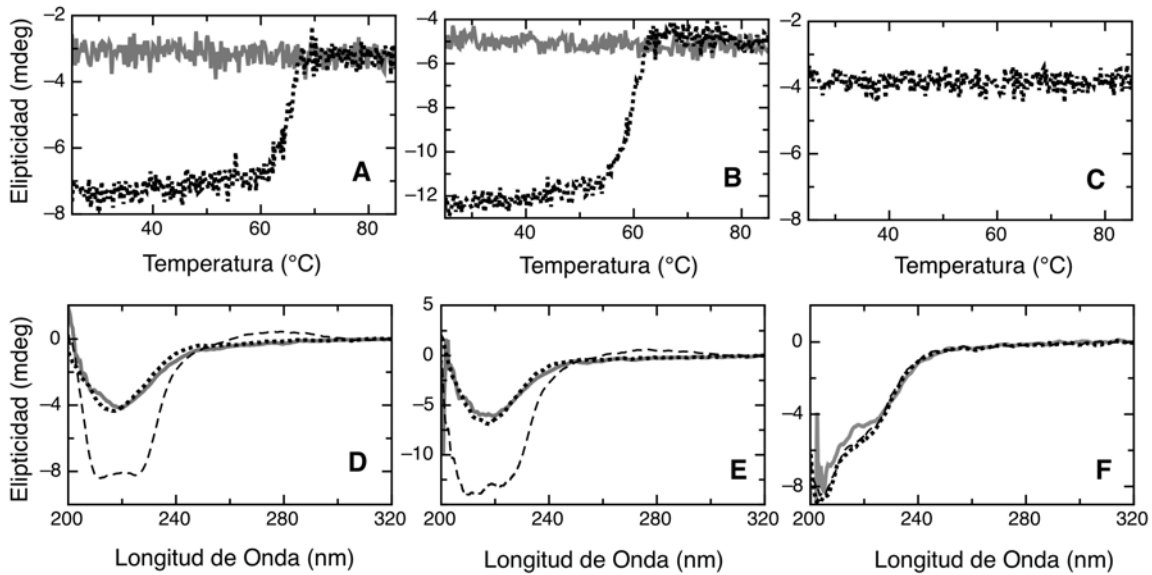




**Figura 5.5:** Espectros de DC. En línea gris espectro de E2E7SOs a  $[E2C]/[E7]=1$  y en línea negra espectro suma de los espectros de la proteínas medidos por separados. Las muestras se midieron a 20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 2 mM DTT y 300 mM de NaCl.

Se realizó una curva de termodesnaturalización del heterooligómero E2E7Os y a las proteínas por separado siguiendo los cambios de intensidad de DC a 225 nm. Se observó que los cambios en la estructura secundaria de E2E7Os, debido al aumento de temperatura, comienzan a una temperatura menor que los observados en E2C sola, ver figura 5.6 A y B. La temperatura media de la reacción obtenida para E2C sola es de aproximadamente 64 °C, mientras que para E2E7Os es de aproximadamente 59°C. Por otro lado, el espectro final de la reacción muestra que los oligómeros adquieren una estructura lámina beta, como sucede con E2C, figura 5.6 D y E. Asimismo, esta especie permanece invariable al disminuir la temperatura. El corrimiento de la temperatura media de la reacción hacia una temperatura menor indicaría que la interacción entre las proteínas aumenta la tendencia de la formación de una especie con estructura lámina beta.

Se puede observar en la figura 5.6 C y F que este tratamiento térmico no modifica la estructura secundaria de E7, como era de esperar ya que la misma es una proteína térmicamente resistente. No se observa cambios en el espectro de DC que indique un cambio conformacional.

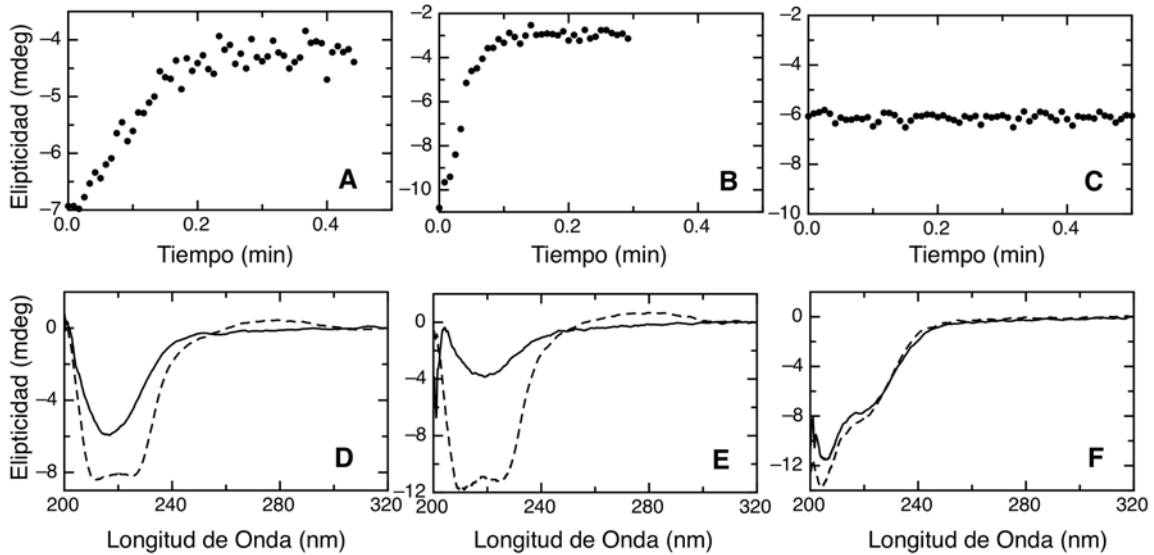


**Figura 5.6:** Termodesnaturalización (A) E2C (B) E2CE7Os y (C) E7. En línea punteada, aumento de temperatura desde 25°C a 85°C a una velocidad de 3°C por minuto; en línea gris y continua disminución de temperatura desde 85°C a 25°C. Los cambios fueron monitoreados por CD a 225 nm. Espectros de DC (D) E2C, (E) E2E7Os y (F) E7. En línea cortada espectro a 25 °C, en línea continua y gris espectro a 85 °C una y línea punteada espectro a 25°C después de la termodesnaturalización.

### Cinética a temperatura constante del complejo E2E7Os.

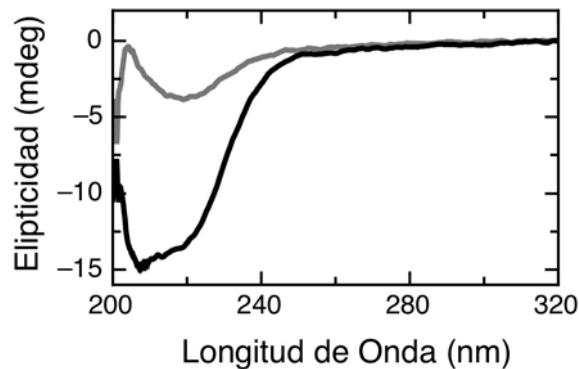
A partir de los resultados obtenidos en las curvas de termodesnaturalización, se realizó una curva de cinética a temperatura constante a E2E7Os. Dicha curva se realizó tanto para los heterolímeros como para las proteínas por separado. Se eligió una temperatura de 60 °C para realizar el experimento.

Las cinéticas realizadas a las proteínas se muestran en la figura 5.7 A, B y C. Se observa que la cinética de E2E7Os llega al estado estacionario en un tiempo menor que en el caso de E2C sola, figura 5.7 A y B. Por otro lado, la experiencia muestra que tanto E2E7Os como E2C presentan una estructura lámina beta una vez finalizado el tratamiento térmico, figura 5.7 D y E. En la misma figura y a modo de control, se presenta el mismo tratamiento para E7 sola observándose, una vez más, su característica termorresistente, figura 5.7 C y F. De esta experiencia se puede concluir que esta perturbación térmica conduce más rápidamente a una estructura lámina beta a E2E7Os que a E2C sola. Por lo tanto, tanto la termodesnaturalización como la cinética, producen los mismos cambios estructurales en las muestras analizadas.



**Figura 5.7:** Cinética a 60 °C monitoreada por DC. (A) E2C (B) E2E7Os (C) E7. Se midió la intensidad a 225 nm. (D) Espectros final e inicial de E2C (E) Espectros final e inicial de E2E7Os (F) Espectros final e inicial de E7. En todos los casos: en línea cortada espectro a 25 °C, en línea continua espectro a 60 °C.

Por otro lado, se comparó el espectro obtenido luego de la perturbación térmica de E2E7Os con el espectro suma. En este caso el espectro suma se define como el espectro que resulta de la suma de los espectros de las proteínas E2C y E7 luego de tratarlas a 60 °C por separado. Se observa en la figura 5.8 que no existe coincidencia entre los espectros. Esto indica que la interacción entre ambas proteínas produce un efecto en la estructura secundaria luego del calentamiento.

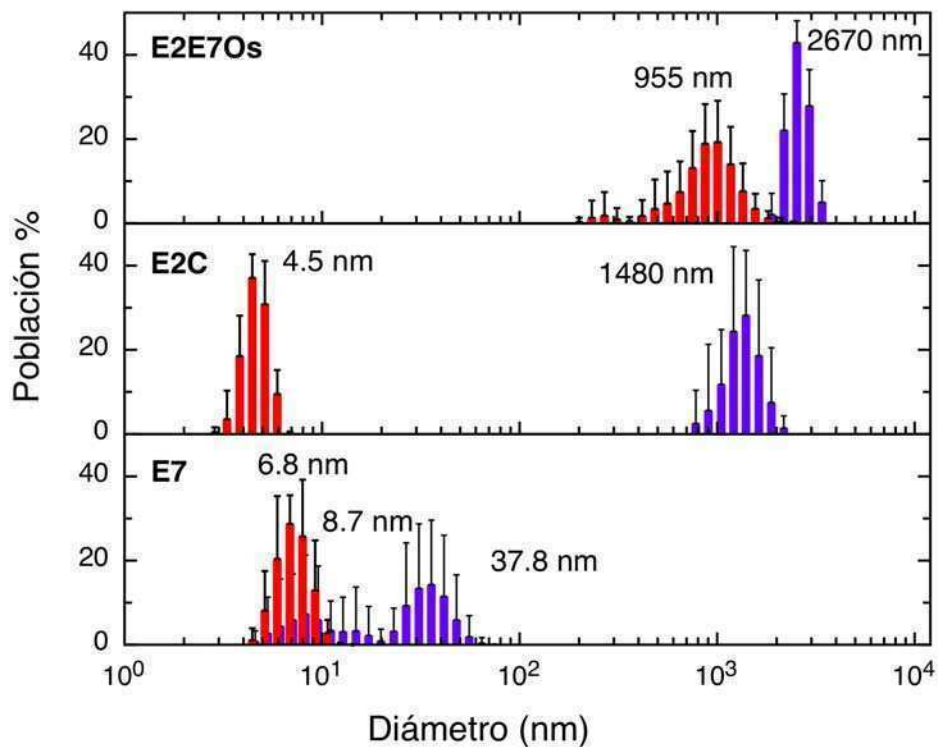


**Figura 5.8:** Espectros de DC. En línea gris espectro de E2E7Os una vez que finalizada la perturbación térmica a 60°C. En línea negra espectro suma de los espectros de las proteínas medidos por separado, luego de que ambas fueron perturbadas térmicamente a 60°C.

### Caracterización de la especie E2E7Os tratada a 60 °C

Continuando con la caracterización de la especie oligomérica que se obtiene al desestabilizar a las proteínas con la temperatura, se estudió las características de los

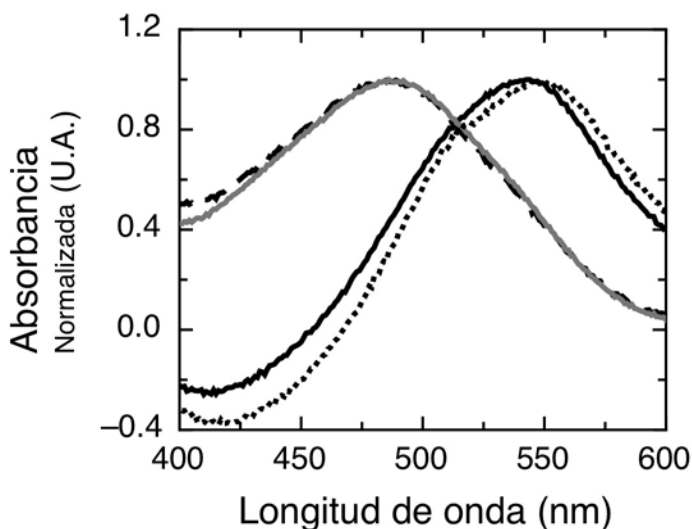
mismos por la técnica de *DLS*. En la figura 5.9 se observan los diámetros hidrodinámicos para la muestra E2E7Os y de las proteínas por separado luego de la perturbación térmica. En primer lugar, de esta experiencia podemos destacar E2E7Os aumenta su diámetro hidrodinámico al ser perturbada térmicamente. El diámetro hidrodinámico de la especie E2E7Os a 60°C es de aproximadamente 2600 nm, figura 5.9, mientras que el inicial es de aproximadamente 900 nm, figura 5.2 A. En segundo lugar se observa que la especie formada al calentar E2E7Os a 60 °C posee un diámetro mayor al se obtiene al realizar el mismo tratamiento con E2C sola. E2C presenta a 60°C un diámetro hidrodinámico de aproximadamente ~1500nm. Cabe recordar, que en el análisis de los datos obtenidos por *DLS* se empleó el modelo de esfera rígida, con lo cual se obtiene un diámetro hidrodinámico equivalente para las partículas estudiadas; por lo tanto, si estas partículas no son esféricas, este no es un parámetro geométrico sino difusivo. A través de esta técnica no es posible conocer la morfología de la especies, solo se puede obtener la información de la variación de tamaño entre las mismas. Este resultado sugiere que estas especies son diferentes aunque no se conoce la morfología.



**Figura 5.9:** *DLS* de E2C-E7, E2C y E7 tratadas a 60 °C (azul) y sin tratar (rojo). Se muestran los diámetros medios aproximados en cada una de las muestras.

En el caso de E7 sola, se pueden distinguir dos picos, uno con un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 8.7 nm, que representaría a la proteína dimérica, y el otro con algún tipo de oligomerización. La especie oligomérica aquí medida no es objeto de nuestro estudio y su tamaño difiere notoriamente de los oligómeros aquí estudiados.

Se analizó la propiedad de unir al colorante rojo congo de ambas proteínas y de E2E7Os luego del tratamiento térmico. Se puede observar que tanto E2E7Os luego de ser tratado a 60 °C como E2C bajo el mismo tratamiento presentan una estructura de lámina beta repetitiva, ver figura 5.10. Se observa un cambio en el máximo de absorbancia de aproximadamente 60 nm. Este comportamiento no es observado en el caso de E7.

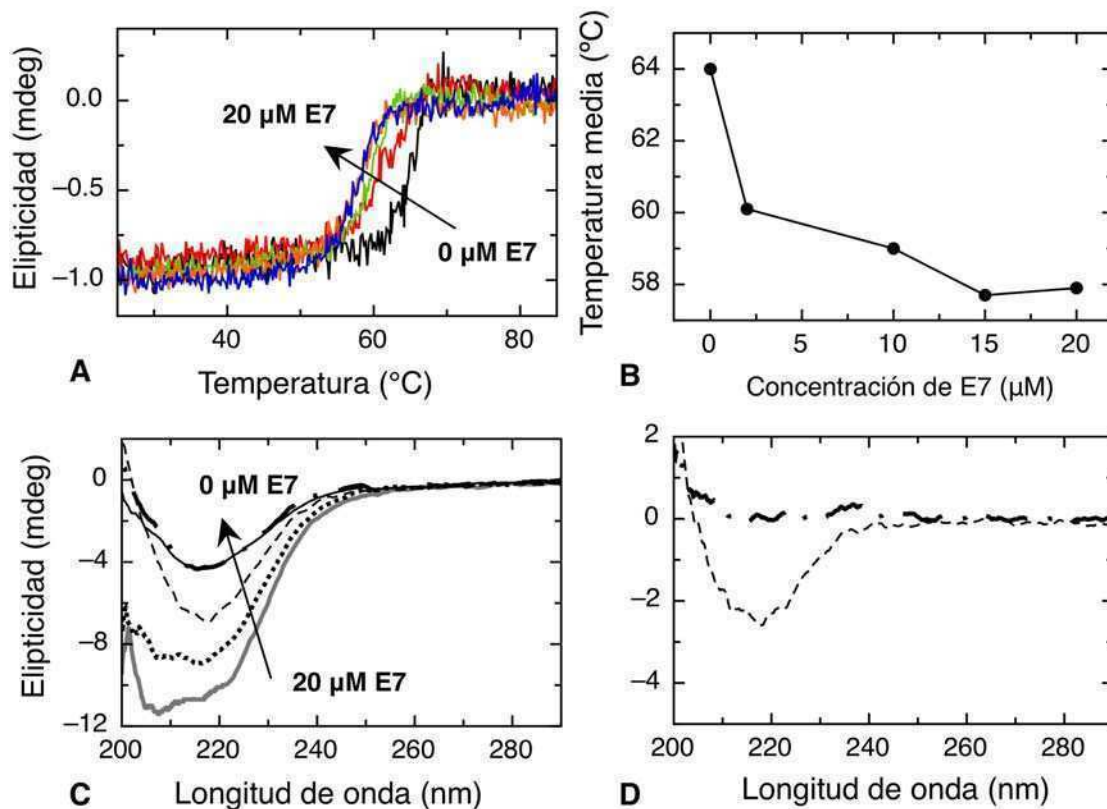


**Figura 5.10:** Espectros de unión con rojo congo, todas las muestras han sido calentadas a 60 °C durante 30 minutos. Línea cortada buffer, en gris E7, en negro E2E7Os y en línea punteada E2C.

### Termodesnaturalización a diferentes estequiometrías del complejo E2E7Os

En el capítulo anterior se observó la presencia de diferentes estados de oligomerización en función de la concentración relativa entre las proteínas. A partir de esta observación, nos preguntamos cual es el comportamiento de la termodesnaturalización de los oligómeros obtenidos a diferentes estequiometrías. Para responder esta pregunta se realizaron cinéticas en las mismas condiciones de concentración de E2C (10  $\mu\text{M}$ ) y a diferentes concentraciones de E7, todas en 300 mM de NaCl. Se eligió una condición subestequiométrica (2  $\mu\text{M}$  de E7) y dos condiciones sobreestequiométricas (15  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  de E7). Los resultados se muestran en la figura 5.11, donde se puede observar que todas las curvas, monitoreadas a 225 nm, poseen el

mismo comportamiento, figura 5.11A. En la misma figura, se comparó las curvas de termodesnaturalización de todas las estequiometrías junto con la de E2C sola. Se observó que en todos los casos en donde están ambas proteínas, la curva comienza a ascender la señal a una temperatura menor que el caso de E2C sola. LA temperatura media de la reacción disminuye conforme aumenta la concentración de E7, figura 5.11 B. La mínima temperatura corresponde a la de una estequiometría  $[E2C]/[E7] = 1.5$  (15  $\mu\text{M}$  de E7), luego alcanza el estado estacionario.



**Figura 5.12:** Termodesnaturalización del complejo E2C-E7 a diferentes estequiometrías. **(A)** Curvas de termodesnaturalización del complejo a E2C constante 10  $\mu\text{M}$  y variando la concentración de E7. En negro E2C 10  $\mu\text{M}$  0  $\mu\text{M}$  E7, en rojo E2C 10  $\mu\text{M}$  2  $\mu\text{M}$  E7, en verde E2C 10  $\mu\text{M}$  10  $\mu\text{M}$  E7, en naranja E2C 10  $\mu\text{M}$  y 15  $\mu\text{M}$  E7 y en azul E2C 10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  E7. **(B)** Temperatura media de la curva de termodesnaturalización en función de la concentración de E7. **(C)** Espectros finales de cada una de las muestras luego de la perturbación térmica, en línea continua E2C, en línea cortada con punto rojo E2C 10  $\mu\text{M}$  2  $\mu\text{M}$  E7, en línea cortada E2C 10  $\mu\text{M}$  10  $\mu\text{M}$  E7, en línea punteada E2C 10  $\mu\text{M}$  y 15  $\mu\text{M}$  E7 y en línea continua y gris E2C 10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  E7. **(D)** Espectros diferenciales. A los espectros presentados en **(C)** de las condiciones se les restó el espectro que se obtuvo de perturbar térmicamente E2C sin E7. En línea con raya y punto el espectro diferencia de la condición E2C 10  $\mu\text{M}$  2  $\mu\text{M}$  E7 y línea cortada el espectro diferencia de la condicho E2C 10  $\mu\text{M}$  10  $\mu\text{M}$  E7

Los espectros luego de la perturbación térmica muestran un aumento de la estructura lámina beta, figura 5.11. Asimismo, se observa que a medida que aumenta la concentración de E7 el espectro se modifica por el aporte de esta proteína. Con el fin de profundizar el análisis se restó a los espectros de los heterooligómeros, perturbados térmicamente y formados a diferentes estequiometrías de E7, el espectro de E2C a 60 °C. A estos espectros los denominaremos espectros diferencia y se muestran en la figura 5.11 D. Se puede concluir que en el caso de la relación E2C 10  $\mu$ M : 2  $\mu$ M E7 y E2C sola, los espectros son idénticos. No obstante, en el caso de E2C 10  $\mu$ M : 10  $\mu$ M E7 el estado final luego de la perturbación térmica difiere del caso de E2C ya que posee mayor estructura beta. Esto indicaría que los estados finales son diferentes, pudiendo significar que el estado final se trataría de un oligómero con características amiloides formado por ambas proteínas. En los casos sobreestequimétricos el análisis es más complicado, pues las diferencias espectrales podrían deberse a que el exceso de E7 no conforme el oligómero o el estado final sea diferente (datos no mostrados).

### Discusión

En el presente capítulo se estudió como se modifica la ruta de formación de amiloides de la proteína E2C al interactuar con E7. Como se mencionó anteriormente la proteína E2C posee la capacidad de formar fibras amiloides del tipo *curly* o *worm like* al incubarla a bajas concentraciones de TFE (97) o al ser perturbada térmicamente (resultados no publicados).

En el capítulo anterior se observó que existían diferentes regímenes de oligomerización dependientes de las concentraciones relativas de las proteínas E2C y E7 cuando las muestras se encontraban en un medio sin fuerza iónica. Estos regímenes estaban dados por especies oligoméricas que permanecían en solución como los E2E7Os y otras que eran insolubles. Con el fin de abordar el presente estudio, se propuso analizar la ruta de formación de amiloides del oligómero soluble E2E7Os. Se eligió la estequiometría de unión de 1:1, y dado que a esta relación estequiométrica el heterooligómero no es soluble en un medio sin fuerza iónica, se buscó la concentración de NaCl que evitara la agregación. Por lo tanto se trabajó con 300 mM de NaCl en todos los estudios descriptos.

Con el fin de caracterizar a la especie inicial, se analizó el espectro de DC y se estudió la unión al Rojo Congo. Se demostró que los heterooligómeros, E2E7Os, no

poseen características de tipo amiloide ya que no presentaron el típico espectro de lámina beta por *DC* y tampoco se observó unión al colorante mencionado. .

Dado que E7 es una proteína termorresistente y que la perturbación con el agente *TFE* mostró cambios en la estructura secundaria de la misma (datos no mostrados), se eligió a la perturbación térmica como la adecuada en el estudio de la ruta de formación de amiloides. En el caso de la proteína E2C, se realizaron curvas de termodesnaturalización y cinéticas a 60 °C, ambos procedimientos indicaron la formación de la misma especie final. Por lo tanto, resultó indistinta la utilización de cualquiera de los dos tratamientos en la formación de fibras de E2C. Al realizar dichas perturbaciones térmicas al heteroligómero E2E7Os se observó la formación de especies con estructura secundaria beta repetitiva. Asimismo, aunque no se conoce la morfología de esta especie, se observó que la misma presenta un aumento en el diámetro hidrodinámico al compararla tanto con el oligómero inicial como con las fibras de E2C sola. Estos resultados sugieren que la especie final podría ser un oligómero de características amiloides y de morfología diferente al observado para E2C.

Por otro lado, se observó que la interacción con E7 favorece la formación de amiloides. Dado que se determinó que la temperatura media aparente es menor en el caso de la especie formada por las dos proteínas que cuando E2C está sola y se observó que el heteroligómero requiere menor tiempo de incubación que el requerido por la proteína E2C sola. Las termodesnaturalizaciones a diferentes concentraciones de E7, mostraron que a medida que ésta aumenta la temperatura media aparente disminuye hasta alcanzar el estado estacionario. Los espectros de *DC* realizados a los estados finales pusieron en evidencia que la especie final de E2C sola es diferente a la alcanzada por E2E7SOs en una estequiometría 1:1.

Cabe destacar que los resultados aquí presentados son parte de un análisis inicial en el estudio de la repercusión que posee la interacción de E2C con E7 y la ruta de formación de amiloides. No obstante se puede concluir que la proteína E7 favorece la formación de amiloides de E2C. Por otro lado, todavía no se conoce la morfología de la especie con características amiloides que se observa en E2E7Os al ser perturbado térmicamente. Con el fin de obtener mayor información sobre morfología de estas especies es necesario poder caracterizar a las mismas bajo alguna técnica de microscopía. Por otro lado, un estudio detallado de diferentes morfologías obtenidas por perturbación térmica de la proteína E2C monomerizada, *E2C single chain*, se está



llevando acabo en nuestro laboratorio (Delarolle *et al*, manuscrito en redacción) y será comparado y relacionado con el presente estudio aquí detallado.

## **6. Discusión General**



### **Mecanismo de oligomerización y formación de amiloides de E7**

El dogma del plegado de las proteínas, basado en el trabajo de Christian Anfinsen hace 50 años atrás (98), propone que la información requerida para el plegado de una proteína se encuentra en su estructura primaria. Sin embargo muchas proteínas son afectadas por ciclos de plegado y desplegado dentro de la célula debido a una gran cantidad de factores como por ejemplo: traslados a través de una membrana, interacción con otras proteínas, secreción celular o exposición a situaciones de estrés celular como cambios de pH o temperatura. Durante estos procesos muchas proteínas sufren cambios en su estructura y el desplegado de la misma es un evento con grandes probabilidades. Por otro lado, el proceso de plegado es un proceso rápido del orden de los milisegundos, en el cual la estructura proteica recorre un número de intermediarios hasta llegar al estado final, que en rigor no es homogéneo sino una colección de estados conformacionales, ya que las estructuras son dinámicas.

La consecuencia de una falla durante este proceso origina proteínas mal plegadas. A pesar de que existen un gran número de controles dentro de las células que aseguran que las proteínas adquieran un estado de plegamiento funcional, existen numerosos eventos que llevan a un mal plegado de las mismas y éstas no alcanzan el estado final sino que se obtienen intermediarios. Estos intermediarios pueden exponer residuos hidrofóbicos al solvente los cuales interaccionan con otros intermediarios obteniéndose agregados. Cuando esto ocurre la proteína se aleja de su camino habitual de plegado y toma otra ruta la cual es relativamente lenta (en orden de los segundos) y dirigida por las interacciones hidrofóbicas entre los estados intermediarios. Este mecanismo puede dar lugar a dos caminos: uno es la interacción en forma desordenada que tiene como producto la formación de agregados amorfos y la otra es ordenada la cual puede formar fibras tipo amiloide (99). La célula posee una maquinaria para degradar los agregados amorfos mientras que las fibras amiloides son resistentes a la degradación por proteasas y a la desnaturalización por agentes químicos. Como consecuencia de la alta resistencia a la degradación que poseen las fibras, éstas permanecen en la célula dando lugar a diferentes enfermedades. Existen un gran número de proteínas desplegadas que inician el camino de formación de amiloides (100). Estos agregados están asociados a diferentes enfermedades como Alzheimer, Parkinson, Huntington, etc (101-103).

El mecanismo de ensamblado de estas fibras es hasta el momento objeto de estudio y existe un gran número de bibliografía que lo describe. Se ha descrito que la

formación de amiloides es un proceso lento, ordenado y de nucleación dependiente, donde proteínas desplegadas se asocian formando un oligómero estable denominado núcleo. La adición secuencial de proteínas parcialmente plegadas a este núcleo forma una estructura fibrilar insoluble. Este mecanismo de polimerización por nucleación fue el primer modelo descrito por Prusiner en 1991(104).

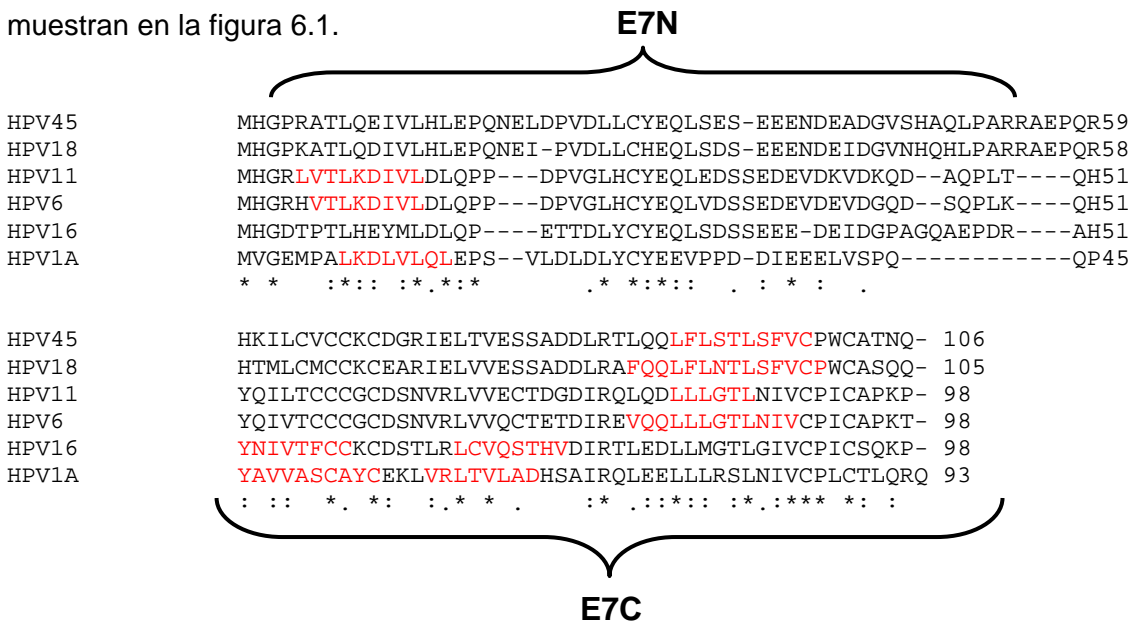
Hoy en día se han propuestos otros mecanismos, los estudios biofísicos realizados a la formación de fibra de la región C-terminal de la proteína de levadura *Sup35* observaron una inconsistencia con la teoría de nucleación (105-106). En dichos estudios se demostró que la formación de fibras se podía dividir en dos eventos. El primero era la formación de oligómeros de morfología esférica los cuales eran formados por la adición de monómeros mal plegados y la segunda etapa consistía en la formación de las fibras por adición secuencial de dichos oligómeros. Se propuso que el mecanismo de elongación consistía en una agregación coloidal lineal. Otro trabajo realizado con la proteína fosfoglicina quinasa (*PGK*) (107) demostró que el mecanismo de formación de fibras se inicia a partir de desplegar al monómero de la proteína bajo una concentración determinada de NaCl y a pH ácido, dicho monómero forma oligómeros por adición secuencial de los mismos, que luego se unen entre sí para desarrollar la fibra. Cabe destacar que la morfología de las fibras obtenidas para *Sup 35* como para *PGK* es del tipo *worm-like*. Esto es consistente con lo observado por Gosal *et al* (88), para la proteína  $\beta_2$ -microglobulina, en donde las diferentes morfologías de fibras amiloides están relacionadas con las diferentes rutas de agregación. En dicho trabajo, como se explicó anteriormente, también se propone que la morfología del tipo *worm-like* no esta asociada con la formación de un núcleo y demuestran que dichas fibras no son protofibra de fibras largas y rígidas, *LS*, ya que poseen caminos energéticamente diferentes.

A través del modelo de ensamblado de oligómeros esféricos propuesto por Zlotnick (81-82) y del análisis realizado a las cinéticas por diferentes sondas, en el presente trabajo de tesis se concluyó que el mecanismo de ensamblado de E7SOs no es un mecanismo núcleo dependiente. El mismo consta de una fase inicial de retado, la cual está asociada a la formación de una concentración determinada de un monómero sin Zn de E7, con una estructura mayormente desplegada. A esta fase de retardo le sigue la fase de elongación, en la cual se forma el oligómero por adición secuencial y ordenada de monómeros.

Por otro lado proponemos que el mecanismo de ensamblado de las fibras *worm-like* de E7C es similar al de E7SOs. El ensamblado se inicia con la formación de una concentración determinada de E7C sin Zn, monomérica y mayormente desplegada. Este monómero se une a otros monómeros también en forma secuencia y ordenada formando oligómeros que luego se unen entre sí formando fibras.

De estos resultados podemos concluir que la proteína E7 HPV 16, en las condiciones estudiadas, posee una ruta interrumpida hacia la formación de fibras amiloides. El dominio E7N, el cual se encuentra expuesto al solvente (76), le otorga solubilidad a E7SOs impidiendo que estos interaccionen entre sí con el fin de formar una estructura fibrilar.

Asimismo, concluimos que la secuencia aminoacídica que posee la información para producir la oligomerización se encuentra ubicada en E7C. Por lo tanto, se realizó un análisis a través de un algoritmo que predice la probabilidad de formar un agregado con estructura beta repetitiva según la secuencia aminoacídica de una cadena polipeptídica desplegada y da información acerca de la región con mayor probabilidad dentro de dicha cadena. En este estudio se utilizó el programa TANGO (<http://tango.crg.es>) donde se analizó las secuencias de seis proteínas E7, tres pertenecientes a cepas de bajo riesgo (HPV 1A,6 y 11) y tres pertenecientes a cepas de alto riesgo (HPV 16, 18 y 45) donde se incluyó la cepa en estudio. Los resultados se muestran en la figura 6.1.



**Figura 6.1** Alineación de secuencias de E7. En rojo se marcan la región con mayor probabilidad de formar agregados que contengan estructura beta repetitivo si la proteína se encuentra desplegada. Debajo de cada alineación se indican con asterisco los residuos idénticos; con dos puntos yuxtapuestos los altamente conservados y con punto simple los de baja conservación

Se puede observar que en los casos de las cepas de alto riesgo la secuencia con mayor probabilidad de formar agregados con estructura beta repetitiva se encuentra en el dominio E7C mientras que en las cepas de bajo riesgo existen dos regiones: una en E7N y la otra en E7C. Este resultado correlaciona con el análisis bioinformático realizado por *Uversky (66)*, donde concluyó que las E7 provenientes de cepas de alto riesgo pertenecen al grupo con mayor estructura intrínsecamente desordenadas que las de bajo riesgo. Dado que la región *IDP* se encuentra en el dominio E7N de las proteínas analizadas, podemos sugerir la siguiente hipótesis: las proteínas E7 de las cepas de alto riesgo poseen la ruta de formación de amiloides interrumpida obteniéndose los oligómeros E7SOs. Estos oligómeros mantienen activas sus características funcionales, pudiendo interactuar con los blancos celulares y actuar como almacenamiento de E7 promoviendo su capacidad transformante. Mientras que las E7 provenientes de cepas de bajo riesgo tendrían más probabilidad de formar fibras, estructurado el dominio E7N. De esta manera la proteína E7 permanecería silenciada dentro de la célula perdiendo gran parte de su funcionalidad.

### **Interacción E2C E7**

Los papilomavirus han evolucionado para hacer uso de la maquinaria de replicación celular a través de mecanismos complejos y eficientes, controlando el ciclo celular de la célula huésped y de esta forma generando nuevas células infectadas (*108*). Existen tres proteínas principalmente involucradas en este aspecto: las dos oncoproteínas E6 y E7 que están directamente involucradas en el control de la proliferación celular y el factor de transcripción E2 que no solo regula la transcripción de estas proteínas sino que también regula la replicación del genoma del papilomavirus (*13, 109*). Con el fin de generar un ciclo productivo los papilomavirus requieren un epitelio estratificado, a partir de la capa de células basales, en donde las oncoproteínas son expresada, hasta las capas granulares externas, en donde las proteínas tardías son expresadas y se ensamblan en maduras cápsides. En este escenario la célula huésped no solo cambia su ambiente intracelular en los procesos de diferenciación, incluyendo factores tales como el pH y el potencial redox, sino también los niveles de proteínas virales. La variación de la expresión de las proteínas a través de epitelio estratificado causaría que la cantidad relativa de cada proteína cambie permitiendo diferentes tipos de interacciones entre las mismas. Durante este proceso la proteína E2 puede regular la

proliferación celular por interacción directa con E6 y E7 así como cambiar los niveles de expresión (93, 109-110).

Las proteínas E2 y E7 comparten muchas características ya que provienen del mismo genoma viral y se transcriben en la misma célula huésped, donde comparten la temporalidad de expresión, la localización y la regulación de la transcripción viral por elementos de dicha célula. Estas características proporcionan la base de la especificidad de la interacción entre estas proteínas, además de la afinidad submicromolar. Es importante destacar, que a pesar de la larga lista de blancos celulares que ha sido asignada para E7, no se encuentra en la bibliografía otros trabajos que estudien en detalle y usando a las proteínas con alto grado de pureza algunas de las interacciones propuestas para E7, como se realizó en el presente trabajo de tesis. El único caso excluyente es el estudio de la interacción con pRB (111).

En el presente trabajo de tesis se pudo constatar la hipótesis de la interacción entre las dos proteínas del papilomavirus de la cepa 16, E2C y E7. Dicha interacción presenta tres regímenes diferentes en los cuales se observa tres especies diferentes de oligómeros formados por ambas proteínas. A estos heterooligómeros les corresponden diferentes tamaños y solubilidad según la concentración relativa de ambas proteínas. Estas especies se encuentran en equilibrio y se observó que el exceso de E7 proporciona el surgimiento de oligómeros de 12 nm de diámetro hidrodinámico y soluble, E7E2Cx; mientras que en exceso de E2C se obtuvo oligómeros de mayor tamaño e insolubles. Como conclusión de estas observaciones se propone que este desplazamiento debido a la concentración relativa de ambas proteínas muestra la existencia de un mecanismo de ajuste altamente sensible entre dichas proteínas.

Asimismo se pudo confirmar la hipótesis acerca de la naturaleza iónica de la interacción. Se observó que la región de interacción se encuentra en E7N (dominio enriquecido en aminoácidos básicos) y que se encuentra involucrada en la interacción hélice de unión al ADN de E2C (de naturaleza básica).

Luego de realizar una búsqueda de la menor región de interacción con diferentes péptidos del dominio N-terminal, se obtuvo que el sitio de unión se encuentra en la región enriquecida por aminoácidos ácidos y es el péptido E7(25-40). En esta región no sólo se encuentra la zona altamente ácida teniendo un alto índice en secuencia PEST (+8.7) sino también en sitio de fosforilación por Casein Kinasa II de E7 (D<sub>30</sub>-**S-S**-E-E-E-D-E<sub>37</sub>). A pesar que no está específicamente determinado para E7, el motivo PEST está frecuentemente relacionado con la degradación de proteínas



mediada por proteasoma en proteínas de corta vida media y con estructura extendida como E7 (74).

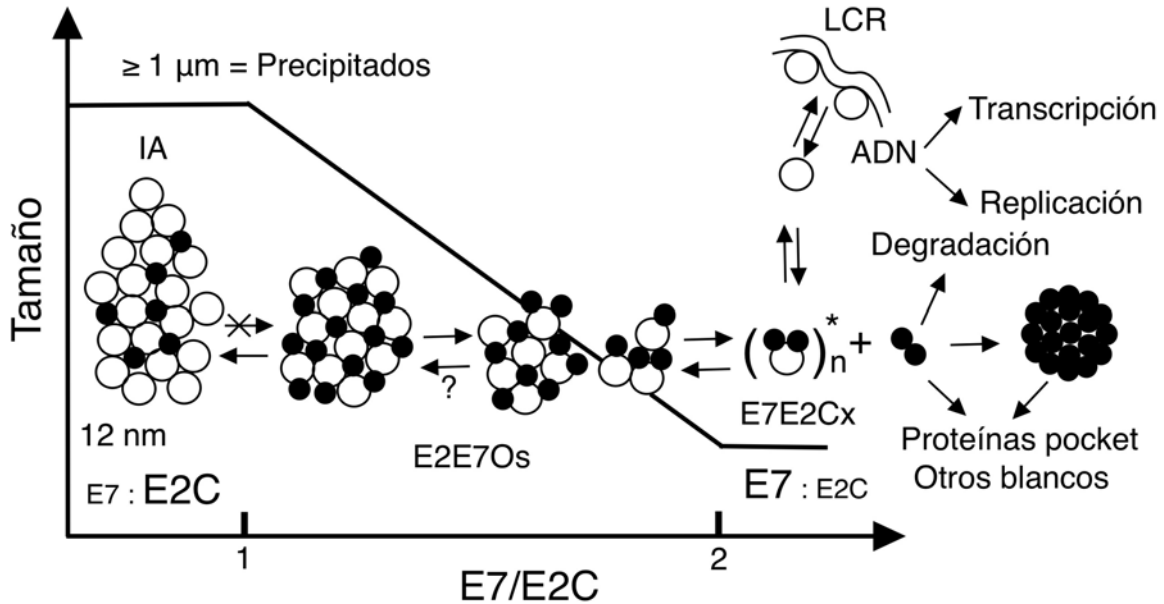
Durante el transcurso de este trabajo fueron publicados dos trabajos (93-94) que no solo confirman la interacción de estas proteínas sino que también muestran las consecuencias de la interacción *in vivo*. En el primer trabajo publicado se menciona que E2 interacciona con el dominio C-terminal de E7 (93). En el presente trabajo de tesis, no solo se halló el sitio de unión en el dominio N-terminal sino que también se observó que el dominio E7C interactúa con E2C. La marcada tendencia a la oligomerización-agregación y el diferente comportamiento de la proteína entera podría deberse a la existencia de estos dos sitios de interacción. Una consecuencia directa en la interacción, observada *in vivo* (93), es la estabilización de E7 por E2C. Esto podría deberse a que E2 estaría bloqueando el motivo PEST contenido en E7 e interfiriendo la degradación de esta. Otra explicación a este comportamiento podría ser a que E2 esté secuestrando a E7 a un complejo más estable. Otro resultado observado también *in vivo* es la disminución de la degradación de pRB (93). El sitio de unión a pRB (L22-Y-C24-Y-E26) se encuentra cerca al sitio de interacción con E2C; esto sugiere que estas interacciones podrían estar compitiendo. Otra vía de competencia puede estar reaccionada con el secuestro de E7 por E2C a un complejo estable y de esta manera podría debilitarse la capacidad de E7 de interactuar con pRB.

La interacción con la especie oligomérica E7SOs todavía no ha sido caracterizada. En este estudio se observó que la interacción de E2C con esta especie presenta agregación la cual es evitada a una dada concentración de fuerza iónica. Por otro lado, debido a que en el laboratorio se demostró que E7SOs expone el dominio N-terminal al solvente y dado que la región de interacción con E2C se encuentra en dicho dominio, suponemos que la especie oligomérica de E7 posee la capacidad de interaccionar con E2C. No obstante se realizaran en el futuro y en nuestro laboratorio la caracterización de esta interacción.

La interacción de estas proteínas y el ajuste fino propuesto y ejercido por los cambios de los niveles de ambas proteínas a lo largo del ciclo infectivo podrían proveer un mecanismo de regulación ya sea para controlar la represión transcripcional de los oncogenes o degradación por exceso de E7. De esta manera si se mantienen los niveles adecuados de E7 la proliferación descontrolada de la célula huésped. En esta hipótesis el mecanismo de ajuste de los niveles de proteína favorecería el ciclo de vida del virus.

Asimismo, se puede suponer que: una vez que la transcripción de los genes tempranos comienza, los niveles de ambas proteínas aumentan gradualmente. En esta instancia E2 reprimiría la transcripción de E7 manteniendo los niveles de la misma bajos. Por otro lado, el proceso de diferenciación celular involucra que las células infectadas migren hacia las capas superiores del epitelio y de esta forma, los factores de la célula huésped podrían afectar el equilibrio entre la transcripción y la degradación de E2 y E7. Un aumento de los niveles de expresión de E7 causa la entrada a fase S a través de la interacción con pRB y otras proteínas *pocket*. No obstante, los niveles de E7 son estrictamente controlados en un nivel que permite entrar a fase S pero no iniciar la proliferación descontrolada de las células, algo que sería perjudicial para el ciclo de vida del virus. En este contexto los niveles de E2 podrían comenzar a decaer por la interacción directa con E7. De esta manera se podría acumular E7 en el citosol formando la especie oligomérica E7SOs (56). La proteína E2 se continuaría sintetizando y se mantendría en el citosol donde sería secuestrada por E7SOs, previniendo así la represión de E7 y E6. En consecuencia los niveles de las oncoproteínas E7 y E6 subirían aún más, estableciendo las condiciones necesarias para que ocurra la inserción del genoma viral al genoma de la célula huésped. Esto último trae como consecuencia la proliferación descontrolada de la célula. Se puede concluir que la interacción entre estas proteínas puede producir la relocalización de las mismas y regular o modificar sus funciones. Este modelo propuesto se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos *in vivo* recientemente publicados (94, 97). Para constatar el modelo propuesto, es necesario realizar estudios de la relocalización celular de E2, evaluar la interacción E2-E6, determinar la localización de E2, E7 y E6 en diferentes etapas del ciclo viral dentro de la célula huésped, como así también cuantificar los niveles de las mismas. Por último, se puede decir que tanto la secuestro de E2 o la formación de heterooligómeros insolubles, como así también la relocalización de dicha proteína podría disminuir la replicación del ADN viral.

Un esquema en donde se sintetiza las implicancias biológicas de esta interacción se representa en la figura 6.2.



**Figura 6.2:** Modelo del mecanismo de ajuste fino en la interacción E2C-E7. En negro E7 monomérica y en blanco E2C dimérica.

### Ruta amiloide de E2C

Un estudio recientemente realizado en diferentes organismos, desde bacterias hasta humanos, demostró que ciertas amiloides poseen características funcionales que no están ligadas a situaciones patológicas o enfermedades (112). A pesar que hasta el momento no existe una evidencia de la relevancia biológica que esta estructura cuaternaria pueda tener en el ciclo viral del HPV, su implicancia funcional o efecto, ya sea directamente o como una reacción secundaria, no debe ser descartado. El equilibrio entre la conformación nativa de E2C y oligómeros con estructura lámina beta repetitiva requiere solo de un pequeña perturbación del medio (97). Por otro lado, se ha observado que la proteína grandes cantidades de E2 asociadas a lo largo de las fibras del huso mitótico en diferentes fases de la mitosis, sugiriendo algún grado de polimerización de la proteína (113).

Estudios recientes demostraron que la formación de heteroligómeros entre proteínas que forman amiloides y alguna de sus mutantes o péptidos, inhiben la formación de dichas fibras. Se observó, por ejemplo, que la proteína A $\beta$ 42 asociada al mal de Ahzheimer, forma heteroligómeros con péptidos pertenecientes al C-terminal de la misma, que inhiben la formación de amiloides (114). Por otro lado, este mismo resultado

se observó en el estudio de la formación de heteroligómeros entre la proteína  $\alpha$ A-cristalin de la presenil catarata y su mutante G98R (115).

En el presente trabajo de tesis demostramos que la interacción con E7 favorece la ruta amiloide característica de E2C, formándose agregados del tipo amiloide a partir de los heteroligómeros que conforman ambas proteínas.

En nuestro laboratorio se observó que la interacción de E2C con el ADN específico estabiliza la hélice de unión y esto inhibe la ruta amiloide de la proteína (Diana). En el presente trabajo de tesis, demostramos que la hélice de reconocimiento a ADN se encuentra involucrada en la interacción con E7. Por otro lado, como se comentó anteriormente, los estudios realizados con mutantes sito dirigidas de dicha hélice demostraron que la naturaleza de las interacciones es diferente. En el caso de la interacción con ADN las mutaciones resultaron ser aditivas (47) mientras que para la interacción con E7 presenta cooperatividad negativa. Por lo tanto, dado que la interacción con E7 favorece dicha ruta, nosotros proponemos que los cambios estructurales involucrados en la interacción podrían desestabilizar a la hélice de reconocimiento de E2C desplazando el equilibrio hacia las especies oligoméricas/agregados con estructura beta repetitiva.



## **7. Materiales y Métodos**



### **Clonado, expresión de E7 y E7C HPV 16**

Las proteínas E7 y E7C HPV 16 fueron clonadas después del C-terminal de la proteína MBP, en el vector p-MAL c2 bajo el promotor fuerte Ptac (New England Biolabs) entre los sitios Bam H1 y Hind III. Entre MBP y las proteínas se encuentra un sitio de corte específico de la proteasa trombina. El corte con esta proteasa deja dos amino ácidos más (serina y glicina) antes del primer amino ácido correspondiente a E7 o E7C, tales amino ácidos no interfieren con ninguna propiedad de las proteínas. La secuencia y la construcción de este vector fueron confirmadas por secuenciación de DNA.

Esta construcción se utilizó para transformar bacterias *E.coli* de la cepa TB1. Las células fueron crecidas a 37 °C en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina hasta llegar a una DO 600 nm de 0.5-0.6, estas bacterias se indujeron por el agregado de IPTG a 0.4 mM de concentración final y se cosecharon después de 12 hrs de incubación, por centrifugación. El protocolo de expresión y purificación de E7 se realizó según lo publicado y desarrollado en nuestro laboratorio (61).

### **Purificación de E7 y E7C**

Las células, luego de ser cosechadas, fueron resuspendidas en buffer de lisis A, 50 mM Tris-HCl, pH 7.7, 0.15 M NaCl, 1 mM 2-mercaptoetanol, 1mM PMSF, 1 mM EDTA, lisadas por sonicación y separadas del material insoluble por centrifugación, ya que la proteína se expresa en forma soluble. El sobrenadante se precipita en frío (4 °C) agregando sulfato de amonio sólido al 80%, se centrifuga y el precipitado resultante se resuspende y se dializa contra buffer B: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM 2-mercaptoetanol, 1mM PMSF, 1 mM EDTA. Las proteínas de fusión se purifica utilizando una columna de amilosa (New England Biolab) previamente equilibrada en el mismo buffer. Las proteínas se eluyen con buffer B conteniendo 15 mM de maltosa. Debido a que la resina tiene baja capacidad efectiva de unión, el percolado debe someterse a esta columna repetidas veces.

Con el fin de obtener E7 y E7C se debe cortar la proteína de fusión con trombina (Sigma), para esto se dializan las muestras contra buffer de corte que contiene 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM 2-mercaptoetanol, 10 µM sulfato de zinc, se agrega CaCl<sub>2</sub> a 2.5 mM concentración final y trombina hasta una relación 1/300 g/g (masa de trombina/ masa de proteína) y se incuba durante 2hrs a 37 °C. La reacción se



detiene por el agregado del inhibidor de serin proteasa, PMSF, a 1 mM de concentración final e incubando la muestra por 15 minutos.

- **E7**

En el caso de E7, la proteína se dializa contra buffer C, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM 2-mercaptoetanol y se agrega urea sólida hasta 8.0 M final, se carga en una columna de intercambiador aniónico Q-Hyper D (Biossepra) equilibrada en buffer C más 6.0 M de urea. E7 se eluye utilizando un gradiente lineal de sal hasta llegar a una concentración de 0.8 M NaCl todo en buffer C con 6.0 M de urea. Según este protocolo MBP no interactúa con la resina y E7 se recupera principalmente en tres fracciones entre 0.25 M y 0.6 M de NaCl, la pureza de estos tres picos debe ser confirmada no solo por SDS-PAGE, sino también, en su contenido de ácidos nucleicos midiendo espectros de absorbancia, una vez eliminada la urea.

El proceso de eliminar la urea de las muestras de E7 determina en gran medida la heterogeneidad de la proteína nativa, y se realiza de la siguiente manera: se agrega 5 mM de DTT y 20  $\mu$ M sulfato de zinc a cada una de las fracciones en urea de E7 recuperadas del intercambio iónico y se incuban 1 hora a temperatura ambiente. Luego se las dializa contra buffer de replegado: 30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM 2-mercapto etanol, 2  $\mu$ M sulfato de zinc. Se obtiene mayormente la especie dimérica de E7 ( E7<sub>2</sub> ), unos 10 mg de proteína pura por litro de cultivo.

El paso final es siempre una filtración en tamiz molecular en una columna Superdex 75 (Amersham-Pharmacia). Para esto la proteína replegada, se dializa contra 10 mM buffer fosfato de sodio pH 7.0, 1 mM DTT y se concentra. Se inyecta en una Superdex 75 preparativa equilibrada en el mismo buffer y se obtiene E7 homogéneamente pura.

- **E7C**

En el caso de E7C, luego de ser cortada la proteína de fusión la muestra se dializa contra buffer C' (20mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl y 2 mM 2-mercaptoetanol) para ser pasado a través de una columna de intercambio aniónica Source-Q (Amersham-Pharmacia) equilibrada con el mismo buffer. E7C se eluye de la columna utilizando un gradiente lineal de NaCl hasta llegar a un concentración de 0.6 M NaCl. Al final de este proceso la proteína se encuentra en un 90 % pura debiendo elimina aun la proteína MBP-E7C que queda si corta y se eluye a la misma concertación de NaCl que E7C. Como se observo que este dominio, E7C, al igual que la proteína entera presenta varios estados de oligomerización. Es necesario, entonces, someter a la misma a

proceso de desplegando y plegado con el agente desnaturalizante químico Gdm-Cl a una concentración 6M incubándolo durante 1 h a 4 °C. Luego se la dializa contra buffer D (20mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 2  $\mu$ M SO<sub>4</sub>Zn y 1 mM 2-mercaptoetanol) y se le agrega 20  $\mu$ M SO<sub>4</sub>Zn y 5 mM DTT a la solución a dializar, de esta forma se obtiene la especie dimerica de E7C. Luego se concentra a la proteína y se realiza un paso de filtración en tamiz molecular en una columna Superdex 75 (Amersham-Pharmacia). Para esto a la proteína replegada se le agrega NaCl con una concentración final de 200 mM y se la inyecta en la columna Superdex preparativa equilibrada en el mismo buffer. E7C dimerica se eluye como una proteína de globular de radio hidrodinámico de aproximadamente 12 kDa y se la obtiene en mas de un 95 % de pureza por SDS-Page.

### **Expresión y purificación de E2C**

Se utilizó el protocolo de purificación y expresión que ya había sido desarrollado en nuestro laboratorio (ferreiro 2000 y Mok 1996), el mismo se detalla a continuación.

E2C fue clonada en el vector ptz18u obteniéndose ptzE2C, esta construcción se utilizó para transformar bacterias E.coli BL21(DE3). Las células fueron crecidas a 37 °C en medio 2TY con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina hasta llegar a una DO 600 nm de 0.5-0.6, estas bacterias se indujeron por el agregado de IPTG a 0.4 mM de concentración final y se cosecharon después de 16 hrs de incubación, por centrifugación. Luego se resuspendieron en buffer de lisis (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.6 M NaCl, 1 mM EDTA y 10 mM 2-mercaptoetanol). La suspensión es sonicada dos veces a 0 °C y centrifugada a 3000 g por 20min. Al sobrenadante que contiene la fracción soluble de E2C, se le agregó sulfato de amonio 60% y se la incubó a 4 °C con agitación durante 16 hs. El precipitado se colectó por centrifugación y se resuspendió en buffer: 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.6 M NaCl y 2 mM 2-mercaptoetanol. La fracción soluble se sembró en una columna de heparina (BioSeptra, Villeneuve la Garenne, Francia) previamente equilibrada en 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.6 M NaCl y 2 mM 2-mercaptoetanol. La columna fue lavada con al menos 5 volúmenes del mismo buffer y eluída con un gradiente iónico lineal de hasta 2 M NaCl. Las fracciones conteniendo E2C mayormente pura (aproximadamente 85%) entre 0.9 y 1.1 mM NaCl, fueron juntadas y dializadas contra dos cambios de volúmenes de buffer: 10 mM Acetato de Sodio pH 5.6, 0.2 M NaCl y 1 mM DTT. Luego, la muestra fue concentrada por ultracentrifugación y fue filtrada por un tamiz molecular Superdex 75 (Amersham-Pharmacia) donde E2C eluye como un pico único de 18-20 kDa. El procedimiento rinde aproximadamente 40 mg por

litro de cultivo, con más de un 97% de pureza. La proteína fue guardada a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  luego de congelarla rápidamente en  $\text{N}_2$  líquido.

### **Determinación de la concentración de proteína**

La proteína E2C posee residuos triptófanos y tirosinas en su secuencia aminoacídica, por lo tanto se determinó su concentración espectrofotométricamente a 280 nm utilizando el coeficiente de absorción calculado según (81 diego tesis).

En el caso de las proteínas E7 y E7C, las mismas no poseen residuos triptofanos por lo tanto la concentración por el método espectrofotométrico es poco confiable. Asimismo, al ser una metaloproteína las bandas de absorción de transferencia de carga metal-tiolato interfieren en la medición. Por otro lado, se observó en nuestro laboratorio (67) que la técnica de Bradford subestima la concentración de E7 ya que la misma muestra propiedades de tinción particulares debido a su naturaleza ácido. Por otro lado, se observó también en nuestro laboratorio y durante la puesta a punto del protocolo de E7C, que dicha técnica subestimaba la concentración de E7C. En este caso el patrón usado en la técnica, la proteína BSA, difiere bastante del peso molecular de E7C y esto produce un error sistemático.

De esta manera se utilizó la técnica de determinación de concentración de enlace amídico por absorbancia a 220 nm en solución ácida, 1% v/v de HCl. Este protocolo fue puesto a punto en nuestro laboratorio para la proteína E7 (67) y luego se utilizó en el presente trabajo de tesis para E7C. El método utiliza una curva patrón con la proteína C12. Esta proteína consta de 64 aa, por lo tanto contiene 63 enlaces peptídicos. El ensayo se realiza por triplicado tomando en promedio de las mediciones.

### **Determinación de la concentración de Zn**

La cuantificación de metales, en este caso Zn, en E7C se realizó espectrofotométricamente utilizando absorbancia a 500 nm que posee el complejo formado entre el agente PAR (4-(2-piridilazo)resorcinol) y el metal (116). Este protocolo fue puesto a punto en el laboratorio (67) para la proteína E7 y fue utilizado en el presente trabajo de tesis para E7C.

Brevemente, el agregado de PAR es insuficiente para desplazar el Zn que coordinan las 4 cisteínas de E7C. Para ello es necesario agregar PMPS a la reacción, dado que el mismo libera el metal al interactuar con las cisteínas. Es necesario que la solución buffer este libre de tioles libres, para ello es necesario dializar a la muestra

contra una solución buffer sin DTT. La reacción se realiza en 10 mM Fosfato de sodio pH 7.0, 0.1 mM PAR y 0.1 M PMPS. La relación absorbancia-metal se obtiene de realizar una curva a diferentes concentraciones de Zn (Sigma) en las mismas condiciones que la proteína (10 mM Fosfato de sodio pH 7.0, 0.1 mM PAR y 0.1 M PMPS).

### **Péptidos Sintéticos**

Todos los péptidos correspondiente al dominio amino terminal E7, E7N, y el péptido  $\alpha$ 1-E2C fueron sintetizados en el servicio de síntesis de la universidad de Yale. Purificados por HPLC fase reversa y confirmada su secuencia por espectrometría de masa. Los péptidos fueron disueltos en agua a pH 8.0 y la cuantificación de los mismos se realizó por absorbancia a 276 nm y 220 nm in HCl. El péptido  $\alpha$ 1-E2C contiene los residuos 289-307 de la proteína E2 HPV16 pertenecientes a la hélice de reconocimiento con el ADN cuya secuencia es: LKGDANTLKCLRYRFKKHA. El último residuo de la secuencia fue mutado, cambiando la cisteína por alanita con el fin de evitar reacciones redox entre las cisteínas.

### **Unión covalente con Isotiocianato de fluoresceína (FITC)**

Las proteínas E7 y E7C y los péptidos sintéticos correspondientes a la región E7N fueron unidos covalentemente con el fluoróforo isotiosianato de fluoresceína, (*FITC*, Sigma n<sup>o</sup>: F-3651). La reacción de acoplamiento se realizó agregando 1.5 mg/ml de FITC a 1mg/ml de proteína o péptido en 50 mM Carbonato de Sodio pH 10 en el caso de las proteínas y en 50 mM Carbonato de Sodio pH 8.0 y a 1mM DTT en ambos casos. Las reacciones se dejaron incubadas a temperatura ambiente durante, 3hs en el caso de los péptidos y durante 1h en el caso de las proteínas. Luego fueron detenidas con 50 mM Tris-HCl pH 8.0. La fluoresceína remante fue removida de las muestras mediante una columna de tamiz molecular PD10 (General Electric) en con 50 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM DTT.

En el caso de E7, E7C y los péptidos E7(1-40) y E7(16-40), las muestras fueron filtradas por una columna de tamiz molecular Superdex 75 (Amersham-Pharmacia). La concentración de los péptidos y las proteínas fueron realizadas por el ensayo colorimétrico Bradford utilizados péptidos y proteínas sin el fluoróforo. La concentración de *FITC* fue determinada por absorbancia a 492 nm. En estos caso se obseó que las muestras estaba en más de un 80% marcadas. En el caso de las proteínas E7-FITC y

E7C-FITC se seccionaron a las proteínas con el protocolo de corte con la proteasa Tripsina que fue desarrollado en nuestro laboratorio (67). Los péptidos resultantes fueron analizados por espectroscopía de masa donde se observó que el fluoróforo se encontraba unido mayormente al extremo amino terminal de las proteínas y en menor medida a la lisina 97. Los péptidos E7(1-40)-FITC y E7(16-40)-FITC también fueron analizados por espectroscopia de masa donde se observó que FITC se encontraba unido al amino terminal de los mismos.

En el caso de los péptidos E7(1-20), E7(16-31) y E7(25-40) todos marcados con FITC, fueron purificados por una columna de fase reversa en HPLC. En donde se separó a los péptidos acoplados con el fluoróforo de los no acoplados. La concentración de dichos péptidos marcados se realizó mediante absorbancia 492 nm. Las muestra fueron analizadas por espectroscopía de masa observándose que el fluoróforo se encontraba acoplado en el amino terminal de los péptidos.

### **Oligonucleótido sintético**

Se utilizó el oligonucleótido doble cadena con 18 bp que contiene la secuencia de reconocimiento de E2C, la cual se ubica en la posición 35 del genoma de HPV 16. El mismo fue obtenido de mezclando cantidades equimolares de oligonucleótidos simple cadenas y complementarios entre 10 y 30  $\mu$ M. La reacción de apareamiento de las hebras se realizó en 10 mM Bis-Tris HCl pH7.0 y 50 mM NaCl incubando durante 5 minutos a 95 °C y enfriado lentamente hasta 25 °C durante 16 hs. Luego se observó mediante un gel nativo de poliacrilamida la efectividad del proceso donde no se obtuvo cadenas simples detectables. El nucleótido simple cadena fue adquirido comercialmente de IDT (International DNA Technologies).

### **Dispersión de luz dinámica**

Las mediciones de *DLS* fueron realizadas en un Zetasizer Nano S (Malvern Instrument). La solución solvente se indica en cada caso. En todos los casos las proteínas fueron filtradas previamente antes de medir con un filtro Ultrafree-MC microcentrifuge filtros (Millipore) de 0.22  $\mu$ m de tamaño de poro. En los casos que se midieron mezclas de proteínas, las mismas fueron filtradas y luego mezcladas. En los casos de E7 y E7C con EDTA, se filtraron las proteínas y luego se agregó el EDTA para iniciar la reacción.

Para las mediciones de diámetros hidrodinámicos de las proteínas, se tomaron las medidas de manera automática donde el equipo determinó en cada ensayo la cantidad de mediciones a realizar en base a la señal de la muestra.

Para el caso de las cinéticas, la cantidad de mediciones fue elegida manualmente. Cuando se mantuvo la temperatura constante en  $25 \pm 0.1$  °C, se tomo un promedio de 6 mediciones por punto, dejándose un espacio temporal de 1 min entre cada punto con un total de 20 puntos medidos a diferentes tiempos. En el caso que la temperatura se mantuvo a en  $10 \pm 0.1$  °C, se tomó un promedio de 10 mediciones por punto, dejándose un espacio temporal de 1 min entre cada punto con un total de 40 puntos medidos a diferentes tiempos.

### Dicroísmo Circular

Los espectros de dicroísmo circular fueron tomados promediando entre 5 a 10 espectros para cada muestra. Se utilizó el equipo Jasco J-810 (Nikota Japón). La temperatura se mantuvo constante en  $25 \pm 0.1$  °C con un controlador peltier, las excepciones se indican en cada caso. Para los espectros de proteínas en la región de UV lejano, se calculó la elipticidad media por residuo utilizando la ecuación 7.1.

$$MRW = m \text{ deg} / (10 * L * [M] * np) \quad (7.1)$$

Donde mdeg es la señal medida, L el paso de luz (en cm), M la concentración de proteína en mol y np el número de enlaces.

Las termodesnaturalizaciones fueron realizadas calentado las muestras 25°C a 85°C (la excepciones se indican en cada caso) a una velocidad de 3°C por minuto tomando en cada punto la señal a 220 nm. El proceso de enfriamiento se realizó a la misma velocidad.

Las cinéticas fueron realizadas a temperatura constante monitoreando la señal a 220 nm, 216 nm y 202 nm (se indica en cada caso) cada 10 segundos.

### Ensayos de fluorescencia

- **Cinéticas**

Las curvas de cinética presentadas en los capítulos 2 y 3, fueron realizadas en un espectrofluorímetro Jasco J, arreglado en geometría “L” (Nikota Japón). Las curvas se realizaron siguiendo los cambios de la intensidad de fluorescencia de diferentes

sondas: *Tyr*, *Th T* y *ANS*. En todos los casos se realizaron curvas a diferentes concentraciones de proteína pero manteniendo fijo los parámetros del equipo para cada sonda (voltaje de la fotomultiplicadora y ancho de banda del haz de excitación y de emisión). De esta manera se pudieron comparar los cambios de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de la proteína. Los experimentos se realizaron a manteniendo la temperatura constante con un controlador peltier, a  $25 \pm 0.1$  °C y a  $10 \pm 0.1$  °C (se indica en cada caso). Las longitudes de onda de excitación y variaron según el fluoruro y se indican en caso. En todos los casos se tomó el espectro antes de iniciar la reacción y luego que la misma había alcanzado el estado estacionario. La señal colectada fue la del máximo cambio de intensidad observado en cada fluoróforo. Todas las cinéticas fueron realizadas por duplicado, en buffer 10 mM Fosfato de Sodio pH 7.0 y 1 mM DTT. En todos los casos la reacción se inició con 1mM EDTA. Las cinéticas con *Th T* fueron realizadas manteniendo constante la concentración de dicho fluoróforo (15  $\mu$ M) y variando la concentración de proteína. Las cinéticas con *ANS* se realizaron a 60  $\mu$ M de concentración de fluoróforo.

- **Curvas de titulación**

Los ensayos de titulación, expuestos en el capítulo 4, fueron realizados en un espectrofluorímetro Aminco Bowman Series 2, arreglado en geometría "L" (Spectronic Co. Rochester, NY, EEUU).

Las curvas de titulación se realizaron diluyendo los reactivos marcados con *FITC* a la concentración deseada. Se realizaron en buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl y 2 mM DTT. Todas las titulaciones se llevaron a cabo agregando pequeñas cantidades de ligando variable (entre 2 y 10  $\mu$ l) a una cubeta de ligando fijo. Se homogenizó la solución desplazando y succionando con una pipeta automática al menos medio volumen del total, 3 veces. Se dejó equilibrar la muestra por dos minutos y se tomó la medición correspondiente. En ningún caso la dilución del ligando fijo superó un 10% del volumen total. Los datos de intensidad de fluorescencia se corrigieron linealmente según la dilución. ). La temperatura se mantuvo constante en  $20 \pm 0.1$  °C con un controlador peltier.

Dado que el fluoróforo utilizados fue *FITC*, se excitó al mismo a 490 nm con un ancho de banda de 4 nm y se colectó la emisión a 520 nm. El ancho de banda de la emisión se modificó según la concentración de la sonda utilizándose 4 nm o 8 nm. Las curvas de fluorescencia de anisotrópicas se realizaron utilizando polarizadores lineales y colectando las intensidades verticales y horizontales a las longitudes de onda antes

mencionadas. Para cada punto de la curva de titulación se realizaron entre 5 o 15 mediciones, donde se tomó el promedio de estas. Con estas mediciones se calculó la anisotropía según la ecuación 7.2 (117) y la intensidad total de fluorescencia según la ecuación 7.4 (117)

$$r = \frac{I_{vv} - G \cdot I_{vh}}{I_{vv} + 2 \cdot G \cdot I_{vh}} \quad (7.2)$$

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \quad (7.3)$$

$$I_T = I_{||} + 2I_{\perp} \quad (7.4)$$

Donde  $I$  representa las intensidades de fluorescencia y los sufijos representan las posiciones de los polarizadores. El factor  $G$ , factor de corrección (117), fue calculado en cada punto ya que esto minimiza la desviación estándar de los datos.

### Modelo aplicado para determinar la $K_D$ en la interacción E2C-E7

El modelo utilizado en la interacción de E2C con cualquiera de los péptidos pertenecientes a E7N o en la interacción con E7C, se detalla a continuación.



Donde  $P$  es la concentración de E2C,  $D$  es la concentración de alguna especie (péptido o dominio) de E7 y  $PD$  la concentración del complejo formado. La concentración de proteína total se puede escribir como:

$$P_T = P + PD \text{ y } D_T = D + PD$$

Se define la constante de disociación como:

$$K_D = \frac{P * D}{PD}$$

De esto se deduce que la concentración del complejo  $PD$  para cada punto será:

$$PD = \frac{1}{2} * (P_T + D_T + K_D) + \left( (P_T + D_T + K_D)^2 - (4 * P_T * D_T) \right) \quad (7.5)$$

Por otro lado en las curvas de titulación se monitorearon los cambios en la anisotropía de fluorescencia,  $r$ , reportados por el fluoróforo FITC unido al ligando fijo, (péptidos pertenecientes a E7N o E7C). La señal medida se puede escribir como se muestra en la ecuación 7.6.



$$r = r_D * f_D + r_{PD} * f_{PD} \quad (7.6)$$

Donde  $r$  es la anisotropía total medida,  $r_D$  es la anisotropía de la proteína o péptidos libre y  $r_{PD}$  es la anisotropía del complejo. Las fracciones de proteína libre o complejo están dadas por  $f_D$  y  $f_{PD}$  respectivamente, las mismas se pueden escribir como:

$$f_D = \frac{D}{D_T} = \frac{D_T - PD}{D_T} \quad (7.7) \quad \text{y} \quad f_{PD} = \frac{PD}{D_T} \quad (7.8)$$

Reescribiendo la ecuación 7.6 en términos de las ecuaciones 7.7, 7.8 y 7.5, se obtiene:

$$r = r_D + (r_D - r_{PD}) * \frac{1}{2} \left( (P_T + D_T + K_D) + \sqrt{(P_T + D_T + K_D)^2 - (4 * P_T * D_T)} \right) \quad (7.9)$$

La ecuación 7.9 se puede reescribir en la ecuación 7.10 con los parámetros utilizados en los ajustes de las curvas de titulación. De estos ajustes se determinó la  $K_D$ , donde  $x$  es la variable que representa la concentración total de E2C.

$$r = r_{libre} + \frac{\Delta r}{2} \left\{ (x + [E7] + K_D) - \left[ (x + [E7] + K_D)^2 - 4 * [E7] * x \right]^{0.5} \right\} \quad (7.10)$$

Las curvas de titulación fueron realizadas a diferentes concentración de ligando fijo y por duplicado. Las  $K_D$ s obtenidas en cada ajuste fueron promediadas dando como resultado los valores presentados en el capítulo 4, se tomó como error la desviación estándar del conjunto de mediciones obtenidas.

En el caso de las curvas de titulación realizadas al péptido E7(25-40) se observaron cambios importantes en la intensidad de fluorescencia y se necesitó corregir la anisotropía según (117). Para ello se calculó el valor de  $f_{PD}$  que en estos casos se reescribe como:

$$f_{PD} = \frac{r - r_i}{(r - r_i) + (I_\infty / I_0)(r_f - r)} \quad (7.11)$$

Donde  $r$  es la anisotropía medida,  $r_i$  la anisotropía inicial del péptido libre y  $r_f$  la anisotropía final cuando la curva llegó a la saturación.  $I_\infty$  es la intensidad de fluorescencia final (en la saturación de la curva) e  $I_0$  la intensidad inicial del péptido libre. Las magnitudes  $I_\infty$  y  $r_f$  fueron obtenidas realizando curvas a diferentes concentraciones de E7(25-40) hasta llegar a la condición saturante. La ecuación (7.11) se igualó con la ecuación (7.8) y se ajustó las curvas de titulación con la ecuación (7.12).

$$f_{PD} = \frac{1}{2[E7]} \left[ ([E7] + K_D + x) - \sqrt{([E7] + K_D + x)^2 - 4x[E7]} \right] \quad (7.12)$$

### Dispersión de luz absorbida

Los experimentos de dispersión de luz absorbida se realizaron en diferentes equipos. En el caso los de los experimentos realizados en el estudio agregación de E2C-E7 a diferentes concentraciones de NaCl (*Capítulos 4 y 5*), se utilizó el equipo Bio-Rad 550 microplate reader. Todas las muestras se incubaron en placas de 96 posillos y se midió la absorbancia a 340 nm. Dichas placas posee un tratamiento para evitar la adhesión de proteínas a la superficie, Corning nonbinding surface.

Las cinéticas de agregación E2C-E7 fueron realizadas en un espectrofotómetro Jasco UV (Nikota Japón) a 360 nm.

### Ensayos de retardo en la movilidad electroforética

Los ensayo *EMSA* fueron realizados en geles de poliacrilamida al 6 % conteniendo 2 % de glicerol , 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 190 mM Glicina y 2 mM DTT. Los geles se corrieron refrigerados manteniendo fija la corriente en 5 mA y durante aproximadamente 2hs. Los geles nativos fueron teñidos con *coomasi blue*.

Las concentraciones de las muestras se variaron en cada caso y se utilizó como buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl y 2 mM DTT. En el ensayo de interacción E2C-E7N se incubó en tubos separado, una concentración fija de E7N (20  $\mu$ M) con diferentes concentraciones de E2C (0, 5, 10, 15, 20 y 30  $\mu$ M). En los casos de E2C-E7 y E2C-E7C se eligió una estequiometría 1:1, de aproximadamente 25  $\mu$ M de cada una de las proteínas.

### Líneas celulares e inmunodetección

- **Cultivo celular**

Las células CasKI HPV-16 positivas derivadas de cancer cervical humano y las células osteosarcoma humano, U2-OS, HPV negativas fueron adquiridas a American Type Culture Collection (ATCC). Las células CasKi fueron mantenidas en medio RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen) con 10 % FBS; las células U2-OS fueron crecidas en medio McCoy (GIBCO, Invitrogen) con 10 % FBS.

- **Inmunodetección**

**A) Western Blot**

Las células ( $\sim 5 \times 10^6$ ) fueron lisadas durante 30 min en solución CHAPS fro (1 % CHAPS en PBS, 2 mM  $MgCl_2$ , 50  $\mu M$  MG132, 2 mM DTT, 2 mM PMSF y mezcla de inhibidores de proteasas de Sigma). Los extractos celulares fueron centrifugados a baja velocidad y el precipitado nuclear fue resuspendido en el mismo buffer de lisis y sonificado durante 5 segundos. Luego de centrifugar las muestras a máxima velocidad, la segunda fracción se juntó con la primera y se determinó la concentración total de proteínas utilizando reactivo de Bradford. Cinco o diez microgramos de lisado total de células y 10 ng de las proteínas recombinantes purificadas HPV16 E7 o HPV16 E2C fueron separadas en un gel SDS-PAGE con 15% de poliacrilamida. Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana Hybond de bifluoruro de polivinileno (PVDF) de Amersham Bioscience. Las membranas fueron bloqueadas durante toda la noche a 4 °C en buffer Tris salino (TBS) conteniendo 3% de sero albúmina bovina (BSA) y posteriormente incubadas durante 1,30 hs a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal M1 anti E7 (diluido 1/500 en TBS con 0,25% de BSA y 0,1% de Tween 20). Se utilizó un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rabanita (HRP). Las membranas fueron analizadas con un sistema de detección quimioluminiscente (ECL plus, Amersham).

**B) Far Western Blot**

Las proteínas recombinantes purificadas HPV16 E7 y HPV16 E2C, y los lisados de las células CasK1 HPV-16 y U2-OS, fueron separados en un gel de SDS-PAGE y transferidos a una membrana PVDF. La membrana fue bloqueada durante toda la noche a 4 °C en TBS conteniendo 2% de BSA, lavada y posteriormente hibridizada con E2C purificada (5 $\mu g$ /mL diluída en 25 mM Tris-HCl 7,5 de pH, 0,25 % de BSA y 0,05 % de Tween 20) durante 2 hs a temperatura ambiente. Luego de lavar las muestras extensivamente, la proteína E2C unida fue detectada incubando la membrana con un anticuerpo monoclonal de ratón anti E2C. Las bandas correspondientes a las proteínas fueron visualizadas luego de incubar las membranas con anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a HRP y reveladas con ECL.

**Microscopía de fuerza atómica**

En los experimentos de microscopía de fuerza atómica se utilizó TM-AFM en presencia de nitrógeno seco en un NanoScope III Multimode AFM (Digital Instruments-Veeco, CA) con un barredor piezoeléctrico modelo E cuyo máximo rango lateral de barrido es de 12  $\mu\text{m}$ . Las imágenes de 256 x 256 pixels o 512 x 512 pixels fueron capturadas a una velocidad de barrido de 0.5 a 1 Hz, con un tamaño de barrido entre 0.5 a 2.0  $\mu\text{m}$ . Las imágenes fueron procesadas para sacar la pendiente del background usando el software del NanoScope. La altura, el ancho medio a la mitad de la máxima altura (FWHM) de las diferentes moléculas se midió usando el software del WSxM. En el análisis de los cortes transversales, las mediciones de FWHM fueron usadas como una compensación de primer orden para las distorsiones sistemáticas introducidas por la geometría cónica de la punta.

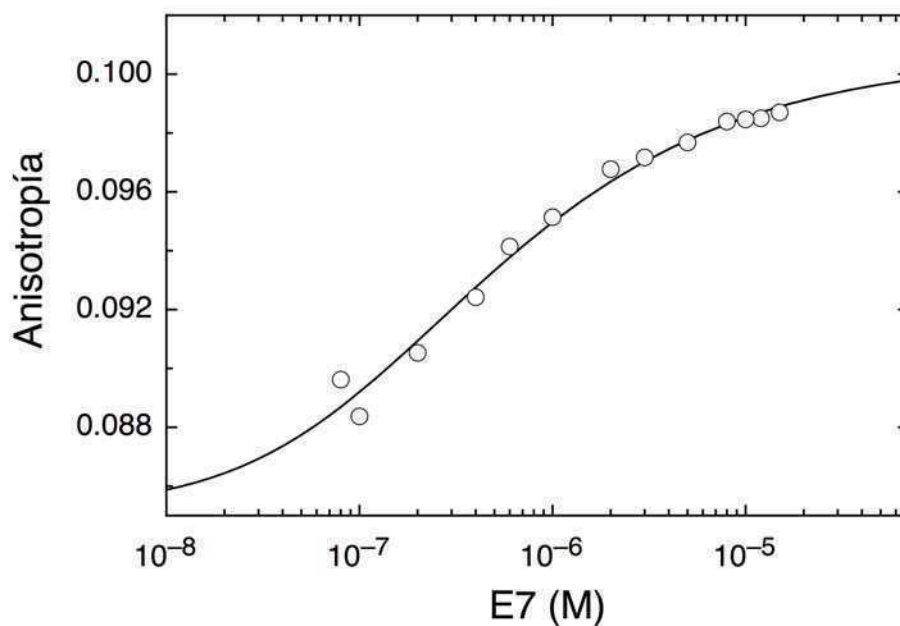


## **Apéndice**



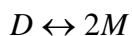
### Equilibrio monómero-dímero de E7

El equilibrio monómero-dímero de la proteína E7 HPV 16 ya había sido estudiada por ultracentrifugación obteniéndose una constante de disociación de aproximadamente  $1\mu\text{M}$  (74). Debido a que existente algunas diferencias de las  $K_D$  obtenidas a través de diferentes técnicas se midió dicha constante en nuestro laboratorio, utilizando la técnica de anisotropía de fluorescencia. Para ello se trabajó con la proteína marcada con FITC. Se comenzó midiendo la anisotropía de una concentración determinada de E7 alrededor de  $20\mu\text{M}$  y se diluyó la muestra tomando en cada punto el valor de la anisotropía hasta llegar a una concentración de aproximadamente  $0.1\mu\text{M}$ , figura I.



**Figura I:** Cambios de anisotropía según varía la concentración de E7. Estos cambios están relacionados al disociación del dímero de la proteína conforme disminuye la concentración de la misma. La línea continua es el ajuste por un modelo de dos estados el cual predice una  $K_D \sim 0.4\mu\text{M}$ .

La curva por dilución se ajustó a un modelo de dos estados:



$$y \quad [D] = \frac{[M] - [P]}{2} \quad (1.1)$$

donde :



$$K_D = \frac{[D]}{[M]^2} \quad (1.2)$$

La señal medida se puede escribir como:

$$r = r_M f_M + r_D f_D \quad (1.3)$$

Donde  $r$  es la anisotropía medida,  $r_M$  es la anisotropía del monómero,  $f_M$  es la fracción del monómero,  $r_D$  es la anisotropía de dímero y  $f_D$  es la fracción de la especie dimérica.

La concentración del monómero se puede escribir como:

$$[M] = \frac{1}{4} \left( -K_D + \sqrt{K_D^2 + 8.P.K_D} \right) \text{ donde } P \text{ es la concentración de proteína total.}$$

A partir del modelo se obtuvo para E7 un constante de  $K_D = 0.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ , la cual es del mismo orden que la observada por ultracentrifugación (74).

Durante la experiencia se tuvo en cuenta que la señal de la fotomultiplicadora del espectrofotómetro fue modificándose conforme disminuía la señal a medir. Por otro lado, fue imprescindible cambiar de cubeta ya que se comenzó con una cubeta de 250  $\mu\text{l}$  y se terminó la medición con una cubeta de 3000  $\mu\text{l}$ . En los puntos en donde se cambió de cubeta se midió en ambas cubeta a la misma concentración de proteína con el fin de solapar los puntos y corregir de los defectos que pudieran introducir las cubetas. Cada medición se promedió 20 veces y se calculó el factor G por separado.

## Referencias



1. Ciuffo, G. (1907) Innesso positivo con filtrato di verruca volgare, *Giom Ital. Mal. Venereol.* 48, 12-17.
2. Shope, R. E., and Hurst, E. W. (1933) Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology, *J Exp Med* 58, 607-624.
3. de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., and zur Hausen, H. (2004) Classification of papillomaviruses, *Virology* 324, 17-27.
4. Tindle, R. W. (1999) *Vaccines for Human Papillomavirus Infection and Anogenital Disease*, Austin, Texas.
5. Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005) Global cancer statistics, 2002, *CA Cancer J Clin* 55, 74-108.
6. Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2001) Estimating the world cancer burden: Globocan 2000, *Int J Cancer* 94, 153-156.
7. Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R., and Shah, K. V. (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group, *J Natl Cancer Inst* 87, 796-802.
8. Khan, N. C., Thanh, H. T., Berger, J., Hoa, P. T., Quang, N. D., Smitasiri, S., and Cavalli-Sforza, T. (2005) Community mobilization and social marketing to promote weekly iron-folic acid supplementation: a new approach toward controlling anemia among women of reproductive age in Vietnam, *Nutr Rev* 63, S87-94.
9. Howley, P. M. (1996) *Fields Virology*, third edition ed., Raven Publishers, Philadelphia.
10. Lowy, P. M. H. a. D. R. (2001) Papillomavirus and their replication, In *Fields Virology* (Howley, P. M., Knipe, D. , Ed.), pp 1777-1803.
11. Lima, L. M., and Prat Gay, G. d. (1997) Conformational changes and stabilization induced by ligand binding in the DNA-binding domain of the E2 protein from human papillomavirus, *J Biol Chem* 272, 19295-19303.
12. Howley, P. (2001) Papillomaviruses and their replication., In *Fields Virology* (Knipe, D., and Howley, P., ed., Eds.), Lippincot Williams and Wilkins., Philadelphia.
13. Prat Gay, G. d., Gaston, K., and Cicero, D. O. (2008) The papillomavirus E2 DNA binding domain, *Front Biosci* 13, 6006-6021.
14. Romanczuk, H., Thierry, F., and Howley, P. M. (1990) Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters, *J Virol* 64, 2849-2859.
15. Thierry, F. (2009) Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma, *Virology* 384, 375-379.
16. Demeret, C., Yaniv, M., and Thierry, F. (1994) The E2 transcriptional repressor can compensate for Sp1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter, *J Virol* 68, 7075-7082.
17. Dong, G., Broker, T. R., and Chow, L. T. (1994) Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements, *J Virol* 68, 1115-1127.
18. Dostatni, N., Lambert, P. F., Sousa, R., Ham, J., Howley, P. M., and Yaniv, M. (1991) The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex, *Genes Dev* 5, 1657-1671.
19. Bertelsen, B. I., Steine, S. J., Sandvei, R., Molven, A., and Laerum, O. D. (2006) Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia:

- frequent PIK3CA amplification and AKT phosphorylation, *Int J Cancer* 118, 1877-1883.
20. Birrer, M. J., Hendricks, D., Farley, J., Sundborg, M. J., Bonome, T., Walts, M. J., and Geradts, J. (1999) Abnormal Fhit expression in malignant and premalignant lesions of the cervix, *Cancer Res* 59, 5270-5274.
  21. Baker, T. S., Newcomb, W. W., Olson, N. H., Cowser, L. M., Olson, C., and Brown, J. C. (1991) Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction, *Biophys J* 60, 1445-1456.
  22. Mohr, I. J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E. J., MacPherson, P., and Botchan, M. R. (1990) Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator, *Science* 250, 1694-1699.
  23. Ustav, M., and Stenlund, A. (1991) Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames, *EMBO J* 10, 449-457.
  24. Dowhanick, J. J., McBride, A. A., and Howley, P. M. (1995) Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein, *J Virol* 69, 7791-7799.
  25. Hwang, E. S., Riese, D. J., 2nd, Settleman, J., Nilson, L. A., Honig, J., Flynn, S., and DiMaio, D. (1993) Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene, *J Virol* 67, 3720-3729.
  26. Massimi, P., Pim, D., Bertoli, C., Bouvard, V., and Banks, L. (1999) Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53, *Oncogene* 18, 7748-7754.
  27. Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A., and Howley, P. M. (1987) Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines, *J Virol* 61, 962-971.
  28. McBride, A. A., Romanczuk, H., and Howley, P. M. (1991) The papillomavirus E2 regulatory proteins, *J Biol Chem* 266, 18411-18414.
  29. McBride, A. A., Byrne, J. C., and Howley, P. M. (1989) E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 510-514.
  30. Hegde, R. S., Grossman, S. R., Laimins, L. A., and Sigler, P. B. (1992) Crystal structure at 1.7 Å of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target, *Nature* 359, 505-512.
  31. Hegde, R. S., and Androphy, E. J. (1998) Crystal structure of the E2 DNA-binding domain from human papillomavirus type 16: implications for its DNA binding-site selection mechanism, *Journal of molecular biology* 284, 1479-1489.
  32. Dell, G., Wilkinson, K. W., Tranter, R., Parish, J., Leo Brady, R., and Gaston, K. (2003) Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and a non-oncogenic human papillomavirus, *J Mol Biol* 334, 979-991.
  33. Kim, S. S., Tam, J. K., Wang, A. F., and Hegde, R. S. (2000) The structural basis of DNA target discrimination by papillomavirus E2 proteins, *J Biol Chem* 275, 31245-31254.
  34. Liang, H., Petros, A. M., Meadows, R. P., Yoon, H. S., Egan, D. A., Walter, K., Holzman, T. F., Robins, T., and Fesik, S. W. (1996) Solution structure of the

- DNA-binding domain of a human papillomavirus E2 protein: evidence for flexible DNA-binding regions, *Biochemistry* 35, 2095-2103.
35. Veeraraghavan, S., Mello, C. C., Androphy, E. J., and Baleja, J. D. (1999) Structural correlates for enhanced stability in the E2 DNA-binding domain from bovine papillomavirus, *Biochemistry* 38, 16115-16124.
  36. Nadra, A. D., Eliseo, T., Mok, Y. K., Almeida, C. L., Bycroft, M., Paci, M., Prat Gay, G. d., and Cicero, D. O. (2004) Solution structure of the HPV-16 E2 DNA binding domain, a transcriptional regulator with a dimeric beta-barrel fold, *J Biomol NMR* 30, 211-214.
  37. Mok, Y. K., Prat Gay, G. d., Butler, P. J., and Bycroft, M. (1996) Equilibrium dissociation and unfolding of the dimeric human papillomavirus strain-16 E2 DNA-binding domain, *Protein Sci* 5, 310-319.
  38. Mok, Y. K., Bycroft, M., and Prat Gay, G. d. (1996) The dimeric DNA binding domain of the human papillomavirus E2 protein folds through a monomeric intermediate which cannot be native-like, *Nat Struct Biol* 3, 711-717.
  39. Prat Gay, G. d., Nadra, A. D., Corrales-Izquierdo, F. J., Alonso, L. G., Ferreira, D. U., and Mok, Y. K. (2005) The folding mechanism of a dimeric beta-barrel domain, *Journal of molecular biology* 351, 672-682.
  40. Foguel, D., Silva, J. L., and Prat Gay, G. d. (1998) Characterization of a partially folded monomer of the DNA-binding domain of human papillomavirus E2 protein obtained at high pressure, *J Biol Chem* 273, 9050-9057.
  41. Mok, Y. K., Alonso, L. G., Lima, L. M., Bycroft, M., and Prat Gay, G. d. (2000) Folding of a dimeric beta-barrel: residual structure in the urea denatured state of the human papillomavirus E2 DNA binding domain, *Protein Sci* 9, 799-811.
  42. Lima, L. M., Foguel, D., and Silva, J. L. (2000) DNA tightens the dimeric DNA-binding domain of human papillomavirus E2 protein without changes in volume, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14289-14294.
  43. Ferreira, D. U., and Prat Gay, G. d. (2003) A protein-DNA binding mechanism proceeds through multi-state or two-state parallel pathways, *Journal of molecular biology* 331, 89-99.
  44. Hines, C. S., Meghoo, C., Shetty, S., Biburger, M., Brenowitz, M., and Hegde, R. S. (1998) DNA structure and flexibility in the sequence-specific binding of papillomavirus E2 proteins, *Journal of molecular biology* 276, 809-818.
  45. Hou, S. Y., Wu, S. Y., and Chiang, C. M. (2002) Transcriptional activity among high and low risk human papillomavirus E2 proteins correlates with E2 DNA binding, *J Biol Chem* 277, 45619-45629.
  46. Ferreira, D. U., Lima, L. M., Nadra, A. D., Alonso, L. G., Goldbaum, F. A., and Prat Gay, G. d. (2000) Distinctive cognate sequence discrimination, bound DNA conformation, and binding modes in the E2 C-terminal domains from prototype human and bovine papillomaviruses, *Biochemistry* 39, 14692-14701.
  47. Ferreira, D. U., Dellarole, M., Nadra, A. D., and Prat Gay, G. d. (2005) Free energy contributions to direct readout of a DNA sequence, *J Biol Chem* 280, 32480-32484.
  48. DeLano, W. L. (2002) Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges, *Curr Opin Struct Biol* 12, 14-20.
  49. Wells, J. A. (1991) Systematic mutational analyses of protein-protein interfaces, *Methods Enzymol* 202, 390-411.
  50. Boyer, S. N., Wazer, D. E., and Band, V. (1996) E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway, *Cancer Res* 56, 4620-4624.

51. Jones, D. L., Thompson, D. A., and Munger, K. (1997) Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis, *Virology* 239, 97-107.
52. Jewers, R. J., Hildebrandt, P., Ludlow, J. W., Kell, B., and McCance, D. J. (1992) Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes, *J Virol* 66, 1329-1335.
53. Narisawa-Saito, M., and Kiyono, T. (2007) Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins, *Cancer Sci* 98, 1505-1511.
54. Fiedler, M., Muller-Holzner, E., Viertler, H. P., Widschwendter, A., Laich, A., Pfister, G., Spoden, G. A., Jansen-Durr, P., and Zwerschke, W. (2004) High level HPV-16 E7 oncoprotein expression correlates with reduced pRb-levels in cervical biopsies, *Faseb J* 18, 1120-1122.
55. Greenfield, I., Nickerson, J., Penman, S., and Stanley, M. (1991) Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 11217-11221.
56. Dantur, K., Alonso, L., Castano, E., Morelli, L., Centeno-Crowley, J. M., Vighi, S., and de Prat-Gay, G. (2009) Cytosolic accumulation of HPV16 E7 oligomers supports different transformation routes for the prototypic viral oncoprotein: the amyloid-cancer connection, *Int J Cancer* 125, 1902-1911.
57. Phelps, W. C., Yee, C. L., Munger, K., and Howley, P. M. (1988) The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A, *Cell* 53, 539-547.
58. Barbosa, M. S., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J. T., Lowy, D. R., and Vousden, K. H. (1990) The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation, *Embo J* 9, 153-160.
59. Brokaw, J. L., Yee, C. L., and Munger, K. (1994) A mutational analysis of the amino terminal domain of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein, *Virology* 205, 603-607.
60. Helt, A. M., and Galloway, D. A. (2003) Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins, *Carcinogenesis* 24, 159-169.
61. Alonso, L. G., Garcia-Alai, M. M., Nadra, A. D., Lapena, A. N., Almeida, F. L., Gualfetti, P., and Prat-Gay, G. D. (2002) High-risk (HPV16) human papillomavirus E7 oncoprotein is highly stable and extended, with conformational transitions that could explain its multiple cellular binding partners, *Biochemistry* 41, 10510-10518.
62. Uversky, V. N. (2002) What does it mean to be natively unfolded?, *Eur J Biochem* 269, 2-12.
63. Uversky, V. N., Gillespie, J. R., and Fink, A. L. (2000) Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions?, *Proteins* 41, 415-427.
64. Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 197-208.
65. Fink, A. L. (2005) Natively unfolded proteins, *Curr Opin Struct Biol* 15, 35-41.
66. Uversky, V. N., Roman, A., Oldfield, C. J., and Dunker, A. K. (2006) Protein intrinsic disorder and human papillomaviruses: increased amount of disorder in E6 and E7 oncoproteins from high risk HPVs, *J Proteome Res* 5, 1829-1842.

67. Alonso, L. G. (2005) Caracterización bioquímica de la oncoproteína E7 del papilomavirus humano cepa 16, In *Tesis Doctoral*, p 93.
68. Sang, B. C., and Barbosa, M. S. (1992) Single amino acid substitutions in "low-risk" human papillomavirus (HPV) type 6 E7 protein enhance features characteristic of the "high-risk" HPV E7 oncoproteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 8063-8067.
69. Garcia-Alai, M. M., Alonso, L. G., and Prat Gay, G. d. (2007) The N-terminal module of HPV16 E7 is an intrinsically disordered domain that confers conformational and recognition plasticity to the oncoprotein, *Biochemistry* 46, 10405-10412.
70. Shi, Z., Woody, R. W., and Kallenbach, N. R. (2002) Is polyproline II a major backbone conformation in unfolded proteins?, *Adv Protein Chem* 62, 163-240.
71. Rechsteiner, M., and Rogers, S. W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis, *Trends Biochem Sci* 21, 267-271.
72. Ohlenschlager, O., Seiboth, T., Zengerling, H., Briese, L., Marchanka, A., Ramachandran, R., Baum, M., Korbas, M., Meyer-Klaucke, W., Durst, M., and Gorlach, M. (2006) Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7, *Oncogene* 25, 5953-5959.
73. Liu, X., Clements, A., Zhao, K., and Marmorstein, R. (2006) Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor, *J Biol Chem* 281, 578-586.
74. Clements, A., Johnston, K., Mazzarelli, J. M., Ricciardi, R. P., and Marmorstein, R. (2000) Oligomerization properties of the viral oncoproteins adenovirus E1A and human papillomavirus E7 and their complexes with the retinoblastoma protein, *Biochemistry* 39, 16033-16045.
75. Alonso, L. G., Garcia-Alai, M. M., Smal, C., Centeno, J. M., Iacono, R., Castano, E., Gualfetti, P., and Prat Gay, G. d. (2004) The HPV16 E7 viral oncoprotein self-assembles into defined spherical oligomers, *Biochemistry* 43, 3310-3317.
76. Alonso, L. G., Smal, C., Garcia-Alai, M. M., Chemes, L., Salame, M., and Prat Gay, G. d. (2006) Chaperone holdase activity of human papillomavirus E7 oncoprotein, *Biochemistry* 45, 657-667.
77. Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D., and Schmidt, M. (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity, *Nat Cell Biol* 1, 221-226.
78. Lee, C., Schwartz, M. P., Prakash, S., Iwakura, M., and Matouschek, A. (2001) ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal, *Mol Cell* 7, 627-637.
79. Endres, D., and Zlotnick, A. (2002) Model-based analysis of assembly kinetics for virus capsids or other spherical polymers, *Biophys J* 83, 1217-1230.
80. Deborah K. Wilkins, S. B. G., Véronique Receveur, Christopher M. Dobson, Jonathan A. Jones, and Lorna J. Smith. (1999) Hydrodynamic Radii of Native and Denatured Proteins Measured by Pulse Field Gradient NMR Techniques.
81. Zlotnick, A., Johnson, J. M., Wingfield, P. W., Stahl, S. J., and Endres, D. (1999) A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly, *Biochemistry* 38, 14644-14652.
82. Zlotnick, A. (1994) To build a virus capsid. An equilibrium model of the self assembly of polyhedral protein complexes, *J Mol Biol* 241, 59-67.
83. Caspar, D. L. (1980) Movement and self-control in protein assemblies. Quasi-equivalence revisited, *Biophys J* 32, 103-138.



84. Casini, G. L., Graham, D., Heine, D., Garcea, R. L., and Wu, D. T. (2004) In vitro papillomavirus capsid assembly analyzed by light scattering, *Virology* 325, 320-327.
85. Yoshiike, Y., Minai, R., Matsuo, Y., Chen, Y. R., Kimura, T., and Takashima, A. (2008) Amyloid oligomer conformation in a group of natively folded proteins, *PLoS One* 3, e3235.
86. Prevelige, P. E., Jr., Thomas, D., and King, J. (1993) Nucleation and growth phases in the polymerization of coat and scaffolding subunits into icosahedral procapsid shells, *Biophys J* 64, 824-835.
87. Zlotnick, A., and Stray, S. J. (2003) How does your virus grow? Understanding and interfering with virus assembly, *Trends Biotechnol* 21, 536-542.
88. Gosal, W. S., Morten, I. J., Hewitt, E. W., Smith, D. A., Thomson, N. H., and Radford, S. E. (2005) Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid, *J Mol Biol* 351, 850-864.
89. Kad, N. M., Myers, S. L., Smith, D. P., Smith, D. A., Radford, S. E., and Thomson, N. H. (2003) Hierarchical assembly of beta2-microglobulin amyloid in vitro revealed by atomic force microscopy, *J Mol Biol* 330, 785-797.
90. Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G., and Dobson, C. M. (1999) Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3590-3594.
91. Chiti, F., Taddei, N., Bucciantini, M., White, P., Ramponi, G., and Dobson, C. M. (2000) Mutational analysis of the propensity for amyloid formation by a globular protein, *Embo J* 19, 1441-1449.
92. Wright, C. F., Teichmann, S. A., Clarke, J., and Dobson, C. M. (2005) The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins, *Nature* 438, 878-881.
93. Gammoh, N., Grm, H. S., Massimi, P., and Banks, L. (2006) Regulation of human papillomavirus type 16 E7 activity through direct protein interaction with the E2 transcriptional activator, *J Virol* 80, 1787-1797.
94. Gammoh, N., Isaacson, E., Tomaic, V., Jackson, D. J., Doorbar, J., and Banks, L. (2009) Inhibition of HPV-16 E7 oncogenic activity by HPV-16 E2, *Oncogene* 28, 2299-2304.
95. Carter, P. J., Winter, G., Wilkinson, A. J., and Fersht, A. R. (1984) The use of double mutants to detect structural changes in the active site of the tyrosyl-tRNA synthetase (*Bacillus stearothermophilus*), *Cell* 38, 835-840.
96. Wetzler, D. E., Gallo, M., Melis, R., Eliseo, T., Nadra, A. D., Ferreira, D. U., Paci, M., Sanchez, I. E., Cicero, D. O., and de Prat Gay, G. (2009) A strained DNA binding helix is conserved for site recognition, folding nucleation, and conformational modulation, *Biopolymers* 91, 432-443.
97. Wetzler, D. E., Castano, E. M., and Prat Gay, G. d. (2007) A quasi-spontaneous amyloid route in a DNA binding gene regulatory domain: The papillomavirus HPV16 E2 protein, *Protein Sci* 16, 744-754.
98. Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains, *Science* 181, 223-230.
99. Dobson, C. M. (2003) Protein folding and misfolding, *Nature* 426, 884-890.
100. Ecroyd, H., and Carver, J. A. (2008) Unraveling the mysteries of protein folding and misfolding, *IUBMB Life* 60, 769-774.
101. Selkoe, D. J. (2004) Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Nat Cell Biol* 6, 1054-1061.
102. Selkoe, D. J. (2003) Folding proteins in fatal ways, *Nature* 426, 900-904.

103. Temussi, P. A., Masino, L., and Pastore, A. (2003) From Alzheimer to Huntington: why is a structural understanding so difficult?, *EMBO J* 22, 355-361.
104. Prusiner, S. B. (1991) Molecular biology of prion diseases, *Science* 252, 1515-1522.
105. Serio, T. R., Cashikar, A. G., Kowal, A. S., Sawicki, G. J., Moslehi, J. J., Serpell, L., Arnsdorf, M. F., and Lindquist, S. L. (2000) Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant, *Science* 289, 1317-1321.
106. Xu, S., Bevis, B., and Arnsdorf, M. F. (2001) The assembly of amyloidogenic yeast sup35 as assessed by scanning (atomic) force microscopy: an analogy to linear colloidal aggregation?, *Biophys J* 81, 446-454.
107. Modler, A. J., Gast, K., Lutsch, G., and Damaschun, G. (2003) Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers--a novel pathway of amyloid formation, *J Mol Biol* 325, 135-148.
108. Munger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M., and Huh, K. (2004) Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis, *J Virol* 78, 11451-11460.
109. Hamid, N. A., Brown, C., and Gaston, K. (2009) The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins, *Cell Mol Life Sci*.
110. Grm, H. S., Massimi, P., Gammoh, N., and Banks, L. (2005) Crosstalk between the human papillomavirus E2 transcriptional activator and the E6 oncoprotein, *Oncogene* 24, 5149-5164.
111. Chemes, L. B., Sanchez, I. E., Smal, C., and de Prat-Gay, G. (2010) Targeting mechanism of the retinoblastoma tumor suppressor by a prototypical viral oncoprotein. Structural modularity, intrinsic disorder and phosphorylation of human papillomavirus E7, *FEBS J* 277, 973-988.
112. Fowler, D. M., Koulov, A. V., Balch, W. E., and Kelly, J. W. (2007) Functional amyloid--from bacteria to humans, *Trends Biochem Sci* 32, 217-224.
113. Dao, L. D., Duffy, A., Van Tine, B. A., Wu, S. Y., Chiang, C. M., Broker, T. R., and Chow, L. T. (2006) Dynamic localization of the human papillomavirus type 11 origin binding protein E2 through mitosis while in association with the spindle apparatus, *J Virol* 80, 4792-4800.
114. Fradinger, E. A., Monien, B. H., Urbanc, B., Lomakin, A., Tan, M., Li, H., Spring, S. M., Condron, M. M., Cruz, L., Xie, C. W., Benedek, G. B., and Bitan, G. (2008) C-terminal peptides coassemble into Abeta42 oligomers and protect neurons against Abeta42-induced neurotoxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14175-14180.
115. Singh, D., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao Ch, M. (2007) Mixed oligomer formation between human alphaA-crystallin and its cataract-causing G98R mutant: structural, stability and functional differences, *J Mol Biol* 373, 1293-1304.
116. Hunt, J. B., Neece, S. H., and Ginsburg, A. (1985) The use of 4-(2-pyridylazo)resorcinol in studies of zinc release from Escherichia coli aspartate transcarbamoylase, *Anal Biochem* 146, 150-157.
117. Lakowicz, J. R. (1999) *Principles of fluorescence spectroscopy*, New York.