

TESIS DOCTORAL

Estudio molecular | Molecular
de las células de | study of

glioblastoma multiforme

tratadas con el | cells treated with the
adenovirus oncolítico | oncolytic adenovirus

Delta-24-RGD

Andrea González Morales

Pamplona-Iruña, 2019

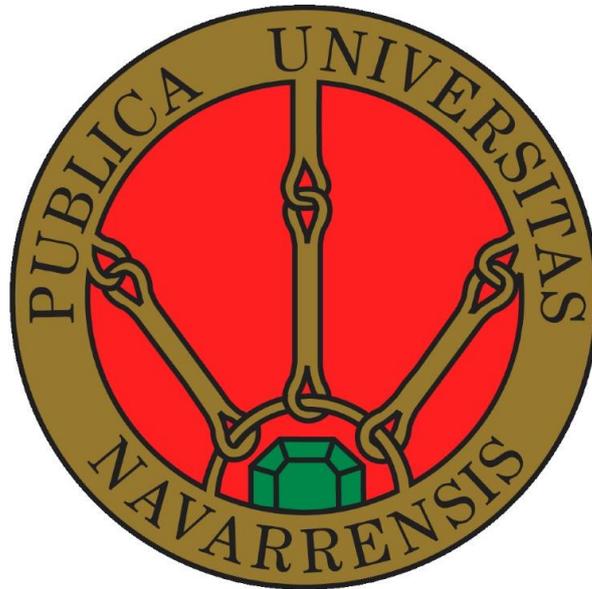
upna

Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

Diseño de portada: **Unidad de Comunicación y Diseño de Navarrabiomed**

Universidad Pública de Navarra

Facultad de Ciencias de la Salud



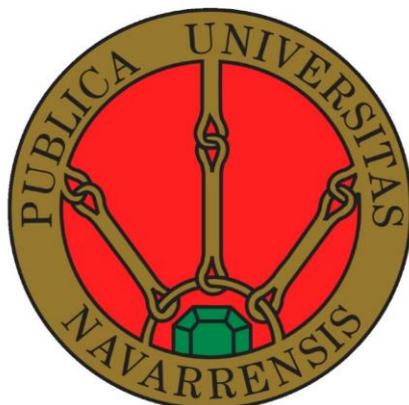
Estudio molecular de las células de glioblastoma multiforme tratadas con el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD

Tesis Doctoral
Andrea González Morales
Pamplona, 2019



Universidad Pública de Navarra

Facultad de Ciencias de la Salud



Estudio molecular de las células de glioblastoma multiforme tratadas con el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD

Los doctores Enrique Santamaría Martínez y Joaquín Fernández Irigoyen, informan que la presente memoria de tesis doctoral elaborada por Andrea González Morales ha sido realizada bajo su dirección y cumple con las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de doctor.

Y para que así conste firman la presente en Pamplona, a 13 de marzo de 2019.

Dr. Enrique Santamaría

Dr. Joaquín Fernández



A mis padres, Cecilio y Maribel.

Agradecimientos

No es fácil resumir en unas líneas lo agradecida que estoy a todas las personas que de una u otra manera han hecho que esta tesis doctoral sea una realidad, y espero no dejarme a nadie.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, los Drs. Enrique Santamaría y Joaquín Fernández, por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí. Muchas gracias por toda vuestra paciencia y ayuda, no solo a nivel científico. Agradezco los consejos que me habéis dado a lo largo de estos años, y especialmente en la última etapa de la tesis.

Me gustaría también agradecer a mi tutor de tesis, el Dr. Ignacio Encío, su orientación en diferentes cuestiones y su continua disponibilidad.

Esta tesis surge gracias a la colaboración con el grupo de Terapias avanzadas para tumores sólidos pediátricos, del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Quiero agradecer a la Dra. Marta Alonso y al Dr. Marc García su implicación y disponibilidad en la realización de los experimentos.

Quisiera agradecer a la Universidad Pública de Navarra (UPNA), el haberme permitido disponer de financiación para poder realizar esta tesis doctoral gracias a las ayudas de contratos pre-doctorales.

En cualquier trabajo son muy importantes las personas con las que lo compartes. Yo he tenido la suerte de hacerlo con Mercedes, Karina, Irene e Irazu. Muchas gracias por todo vuestro apoyo, ayuda, y sobre todo por el buen ambiente que hemos creado y las risas que compartimos, y que hacen que los días en el trabajo pasen volando. Pero también tengo que deciros que me ha hecho muy feliz compartir con vosotras planes fuera del laboratorio, ya sea yendo al cine, de comidas y cenas con sus consecutivos bailoteos, de juevintxo, resolviendo los misterios de una *scape-room*, sobreviviendo a una invasión zombi, o descubriendo Bochum, Cádiz, Santander, Todelo, Santiago y Madrid.

No olvido al resto de personas que forman Navarrabiomed, y con las que he compartido muy buenos momentos, especialmente en las comidas navideñas y preSanfermineras.

Muchísimas gracias a María por hacerme una portada tan bonita y ayudarme con tanta paciencia con la resolución de las imágenes de la tesis.

Gracias a Paula por estar siempre tan dispuesta a ayudarme, y por los truquillos que me has dado sobre cómo escribir la discusión, y que me vinieron de perlas.

Sin embargo, que yo haya podido hacer esta tesis doctoral se lo debo especialmente a mis padres. Ellos no solo se han esforzado para darme la mejor educación posible, sino que siempre me han animado a disfrutar de la vida, probar cosas nuevas, y siempre nos han puesto a mi hermana y a mí por delante de sus intereses y sueños. Gracias mamá por tener tanta paciencia conmigo, por respetar mis decisiones, por tu apoyo, y en estos años de tesis, por hacer que las maletas de los domingos haya que moverlas con grúa. Gracias papá por entenderme, por tus ánimos, consejos, tu apoyo incondicional y tu confianza en mí cuando yo no la tenía. No hay un solo día que no te eche de menos.

Por supuesto no puedo olvidarme de mi hermana. La verdad que no sé expresar adecuadamente lo importante que eres para mí, y lo importante que son tus conversaciones. Siempre buscas el lado positivo a cada situación e inevitablemente acabas contagiándome.

Si hay una persona que me ha apoyado durante estos años de tesis ha sido Oscar. Muchas gracias por estar siempre ahí sin excepción, por desvelarte conmigo, por escucharme, aconsejarme y comprenderme. También te doy las gracias por traer a casa a Pimienta, que también me ha ayudado mucho en la escritura de la tesis. Por supuesto tengo que agradecer a Mariaje toda su preocupación y su cariño por mí, además de sus innumerables *tuppers*, que me han solucionado más de un día las comidas y las cenas.

Índice

<u>Introducción</u>	4
1. Las células gliales y el glioma	6
2. Glioblastoma multiforme (GBM)	7
2.1. Estructura	7
2.2. Causas y factores de riesgo	7
2.2.1. Alteraciones genéticas.....	7
2.2.2. Edad y género	8
2.3. Síntomas	9
2.4. Diagnóstico y clasificación	9
2.5. Tratamientos estandarizados	10
3. El microambiente tumoral	12
4. Empleo de virus oncolíticos en los tratamientos antitumorales	14
4.1. Los adenovirus	15
5. Adenovirus Delta-24-RGD (DNX-2401)	19
5.1. Generación del adenovirus Delta-24-RGD	19
5.2. Tratamiento del glioblastoma con el adenovirus Delta-24-RGD ..	20
6. Proteómica en oncólisis adenoviral	24
6.1. Ciencias ómicas	24
6.2. Proteómica y su uso como herramienta de estudio	25
6.2.1. Espectrometría de masas	26
6.3. Proteómica en el estudio del glioblastoma	32
6.4. Proteómica en el estudio de la oncólisis adenoviral	32
<u>Objetivos</u>	35
<u>Material y Métodos</u>	38
1. Materiales	39
1.1. Muestras biológicas	39
1.1.1. Línea celular de glioblastoma U87	39
1.1.2. Adenovirus oncolítico Delta-24-RGD	40
1.1.2.1. Producción del adenovirus Delta-24-RGD	40
1.1.2.2. Infección de las células de glioblastoma U87	40

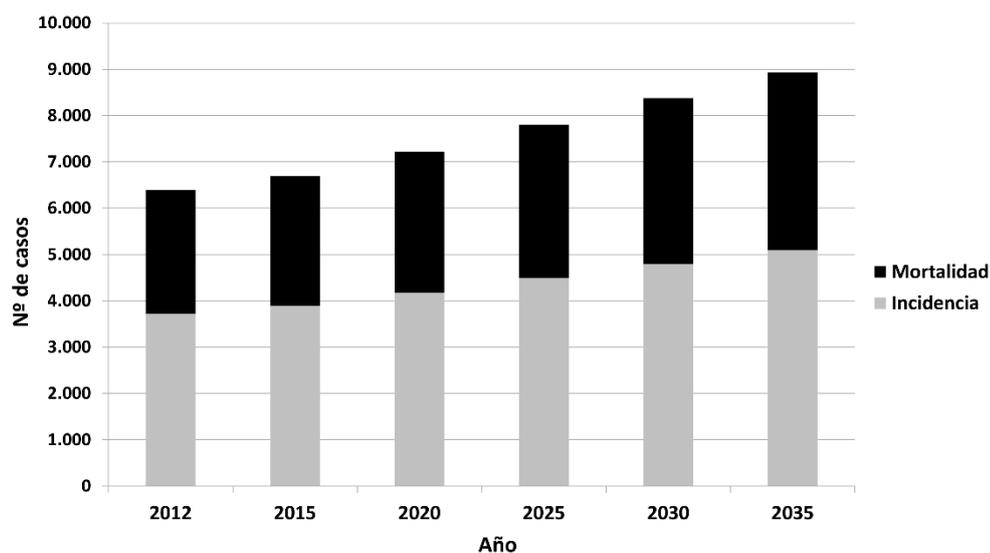
1.2.Reactivos	42
1.3.Tampones	43
1.4.Equipos	43
2. Análisis proteómico	44
2.1. Extracción de proteínas	44
2.1.1. Obtención del proteoma celular total	44
2.1.2. Obtención del proteoma subcelular	44
2.2. Análisis del proteoma	45
2.2.1. iTRAQ	45
2.2.2. Label-free	46
2.2.3. Espectrometría de masas	47
2.3. Análisis bioinformático	49
2.3.1. Identificación y cuantificación de proteínas	49
2.3.2. Funcionalidad	51
2.4. Inmunodetección (Western-blot)	52
2.5. Arrays de proteínas	54
2.5.1. Análisis del secretoma	54
2.5.2. Análisis de fosforilación de quinasas y factores de transcripción	55
2.5.3. Análisis estadístico de los arrays de proteínas	57
<u>Resultados</u>	59
1. Cambios en el fosfoproteoma de las células de glioblastoma tras la adhesión e internalización del adenovirus Delta-24-RGD	60
2. Alteraciones en el proteoma de las células de glioblastoma durante la replicación del ADN del adenovirus oncolítico Delta-24-RGD	61
2.1. Caracterización de los cambios proteostáticos mediante proteómica subcelular	61
2.2. Estudio de las alteraciones funcionales producidas por el adenovirus Delta-24-RGD en las células de glioblastoma	66
2.3. Moduladores de la alteración proteómica inducida por el adenovirus Delta-24-RGD	70

2.4. Modulación selectiva de rutas de supervivencia por parte del adenovirus Delta-24-RGD	73
3. Alteraciones del proteoma de glioblastoma durante la autofagia inducida tras la infección con el adenovirus Delta-24-RGD	76
3.1. Alteraciones funcionales producidas por la infección con el adenovirus Delta-24-RGD en las células de glioblastoma U87 a las 48hpi	78
3.2. Alteración específica de rutas de supervivencia durante la autofagia inducida por el adenovirus Delta-24-RGD	79
4. Modulación del proteoma extracelular de las células de glioblastoma durante la infección con el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD	85
<u>Discusión</u>	90
<u>Conclusiones</u>	109
<u>Perspectivas de futuro</u>	112
<u>Abreviaturas</u>	117
<u>Bibliografía</u>	121
<u>Anexos</u>	145

Introducción

El glioblastoma multiforme (GBM), también conocido como glioblastoma, representa aproximadamente el 50% de los gliomas malignos diagnosticados en la edad adulta ¹⁻³, y es uno de los tipos de cáncer más agresivos que existen. Este tumor se caracteriza por un crecimiento descontrolado, invasión difusa del tejido y neurodegeneración ⁴⁻⁷, haciendo que la esperanza de vida media de los pacientes, pese a ser tratados, sea aproximadamente de 15 meses ⁸.

Según el proyecto Globocan, perteneciente a la Asociación Internacional de Registros de Cáncer (más conocida por las siglas inglesas IARC), en 2012 se dieron en el mundo 256.213 nuevos casos de tumores cerebrales y del sistema nervioso central (SNC). Concretamente, en España se estima que se produjeron alrededor de 3.717 nuevos casos, y se prevé que su incidencia se incremente hasta aproximadamente 5.092 nuevos casos en 2035 (**Gráfica 1**). Pese a las estimaciones de la IARC (Incidencia 2015: 3.889 casos), la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), ese mismo año registró una incidencia de tumores del SNC ligeramente superior (4.042 casos) ⁹.



Gráfica 1: Estimación de la incidencia y mortalidad en España de tumores cerebrales y del SNC.

Datos: GLOBOCAN 2012 (IARC)-27.08.2018

1. Las células gliales y el glioma

Las células gliales constituyen aproximadamente un 50% de la masa cerebral humana ^{10,11}, y su mayor diferencia con respecto a las neuronas, es que no participan directamente en la sinapsis y señalización eléctrica. Su papel principal es como soporte estructural del sistema nervioso, además de soporte metabólico, ayudando de este modo a mantener la homeostasis del medio ^{12,13}, y posibilitando el correcto funcionamiento neuronal ^{14,15}.

Existen diferentes tipos de células gliales, cada una de ellas con funciones muy distintas en el sistema nervioso. Los oligodendrocitos, que constituyen el 45-75% de las células gliales del SNC ¹¹, depositan mielina alrededor de los axones de algunas neuronas. En el sistema nervioso periférico (SNP), las células encargadas de elaborar la mielina son las células de Schwann. Los astrocitos representan el 19-40% de las células gliales del SNC ¹¹, y desarrollan funciones muy diversas. Sirven como soporte estructural o metabólico al ambiente neuronal, contribuyen en la reparación y regeneración neuronal, forman parte de la barrera hematoencefálica (BHE) y captan y almacenan neurotransmisores, aislando así la sinapsis ^{16,17}. La microglía constituye aproximadamente un 10% de las células gliales del SNC ¹¹, y son los macrófagos más abundantes y estudiados de este sistema. Otras células que se encuentran formando parte de la glía son los ependimocitos, que se encargan principalmente de la producción del líquido cefalorraquídeo (LCR), y las células satélite, que tienen variedad de funciones, algunas de ellas muy similares a los astrocitos ¹⁸.

Se conocen como gliomas a los tumores que se originan a partir de células gliales ³, ya sea de un solo tipo (astrocitoma, oligodendroglioma o ependimoma) o de un

conjunto de ellas, a los que se denominan gliomas mixtos. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a cada uno de estos gliomas en diferentes grados de malignidad atendiendo a sus características histológicas y moleculares o genéticas¹⁹. Este último criterio se ha comenzado a usar recientemente, lo que ha permitido establecer subtipos dentro de la gradación de los tumores, permitiendo un diagnóstico y un tratamiento mucho más preciso y específico.

2. Glioblastoma multiforme (GBM)

2.1. Estructura

El GBM es un astrocitoma muy heterogéneo donde se pueden encontrar células tumorales con diferentes grados de malignidad. Al igual que ocurre con otros tipos de tumores sólidos, su estructura también es muy heterogénea (razón por la que recibe el nombre de multiforme). El crecimiento del GBM conlleva la formación dentro del tumor de zonas de hipoxia que evolucionan a áreas necróticas²⁰⁻²³. Alrededor del tumor se encuentran células no tumorales, ya sean astrocitarias o de otro tipo, que constituyen el microambiente del tumor.

2.2. Causas y factores de riesgo

2.2.1. Alteraciones genéticas

El 90% de los casos de GBM se producen *de novo*, a los que se conocen como GBM primarios y suelen darse en pacientes mayores de 50 años³. El GBM secundario, mucho menos frecuente, resulta de la progresión de un tumor de bajo grado (grado I o II) previo²⁴, que suele manifestarse en pacientes más jóvenes³. A pesar de que ambos tipos de GBM tienen unas características histopatológicas similares, presentan distintas anomalías moleculares, y diferentes rutas de señalización alteradas^{3,25-27}. Una de las variaciones moleculares más comunes es la amplificación del gen EGFR

(*Epidermal growth factor receptor*), que se da en el 40% de los casos de GBM primario²⁸. Esta amplificación suele conllevar mutaciones, siendo la más frecuente la delección de la región de los exones del 2 al 7, generando la variante EGFRvIII²⁹. Estudios de asociación del genoma completo (más conocidos por las siglas inglesas GWAS), han relacionado un aumento en el riesgo de desarrollar gliomas de alto grado, con la variación hereditaria de una región que contiene el gen CDKN2B (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*), en el cromosoma 9p21, y en dos SNPs (*Single nucleotide polymorphism*) de RTEL1 (*Regulator of telomere elongation helicase 1*)³⁰.

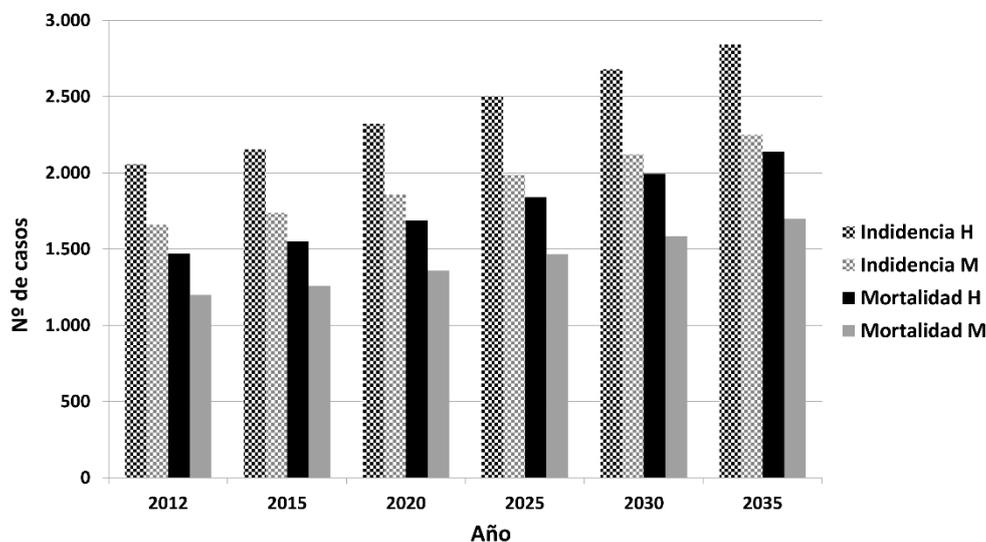
Las diferentes poblaciones celulares que forman el tumor presentan distintas anomalías genéticas. Esto hace que, pese a que el diagnóstico de todos los tumores sea glioblastoma, su tratamiento con terapias moleculares específicas deba ser revisado y amoldado a cada caso. Por esta razón, recientemente la OMS ha subdividido cada uno de los grados de malignidad de los gliomas, atendiendo también a alteraciones genéticas³¹.

2.2.2. Edad y género

Pese a que el GBM también se da en niños, su incidencia es mucho menor que en adultos, siendo el 7-9% de los tumores pediátricos diagnosticados del SNC³²⁻³⁴. En adultos, el GBM suele producirse entre los 45 y 70 años. Por consiguiente la edad es uno de los factores que influyen en la aparición del GBM.

Hoy en día se desconoce la relación que guardan el género y la incidencia de GBM. No obstante, se ha observado que el GBM y los tumores relacionados con el SNC, son más frecuentes en hombres que en mujeres (**Gráfica 2**)^{35,36}. Estudios apuntan que hay una relación sexo-dependiente de los mecanismos moleculares que

se encuentran alterados en estas células tumorales ³⁷. Además, dependiendo del grado de necrosis tumoral (alto o bajo), y del sexo del paciente, la esperanza de vida varía ³⁷.



Gráfica 2: Estimación de la incidencia y mortalidad en España de tumores cerebrales y del SNC en hombres (H) y mujeres (M). Datos: GLOBOCAN 2012 (IARC)-27.08.2018

2.3. Síntomas

Los síntomas del GBM son muy diversos. Debido a la presión intracraneal que el tumor ejerce, produce en los pacientes dolores de cabeza, náuseas y vómitos. A su vez, los pacientes experimentan trastornos neurofisiológicos, trastornos en la visión y deficiencia motora. Otros síntomas están relacionados con la psicología y comprenden cambios de humor, irritabilidad, delirios y depresión ^{38,39}.

2.4. Diagnóstico y Clasificación

Actualmente, disponemos de herramientas no invasivas como la tomografía computarizada (TC/TAC) o la imagen por resonancia magnética (IRM), que permiten localizar de forma muy precisa al tumor. Una vez que el tumor ha sido localizado, el neurocirujano realiza una biopsia para que el paciente pueda ser diagnosticado correctamente por un neuropatólogo, y tratado en consecuencia.

Hoy en día se emplean criterios histológicos como la atipia nuclear, la actividad mitótica (proliferativa), el grado de vascularización y el de necrosis ⁴⁰, junto con criterios moleculares como por ejemplo la mutación en IDH (*Isocitrate dehydrogenase*) ¹⁹, que es entre otros, un factor que influye de manera positiva en la esperanza de vida de los pacientes ^{19,41}.

La OMS establece para el astrocitoma cuatro grados de malignidad, y dentro de cada uno de ellos diferentes subgrupos ³¹. Los astrocitomas de grado I y II (astrocitoma pilocítico y difuso, respectivamente), son considerados gliomas de bajo grado, ya que se caracterizan por un crecimiento relativamente lento, y el paciente tiene una esperanza de vida media de 7-8 años ^{2,3}. Por otro lado, los grados III (astrocitoma anaplásico) y IV (GBM), son considerados gliomas de alto grado, ya que crecen más rápidamente, produciendo progresivamente neurodegeneración y por último la muerte del paciente, cuya esperanza de vida tras el tratamiento es actualmente de 2-5 años para los tumores anaplásicos y 9-15 meses para el GBM ^{2,3,8}.

2.5. Tratamientos estandarizados

El tratamiento estandarizado para los pacientes de GBM consiste en una primera intervención quirúrgica para eliminar la masa tumoral. Este es un paso crítico, puesto que hay que eliminar el máximo volumen tumoral sin dañar las funciones cerebrales. El volumen residual es uno de los factores que posiblemente modulan la esperanza de vida de los pacientes ^{42,43}. Posterior a la cirugía, se sigue un tratamiento con radioterapia y quimioterapia con Temozolomida (TMZ) concomitante y adyuvante, que ha probado ser la combinación más eficaz para aumentar la calidad y esperanza de vida de los pacientes ⁴⁴⁻⁴⁶. La TMZ alquila/metila el ADN generalmente en las posiciones N⁷ o O⁶ de las guaninas. Esta metilación daña al ADN e induce citotoxicidad

en la célula, al inhibir la progresión del ciclo celular. Sin embargo, muchos GBM suelen desarrollar resistencia, lo que hace que la esperanza de vida de los pacientes se vea comprometida. Esta resistencia se debe principalmente a la actividad de la enzima reparadora del ADN AGT (*O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase*), codificada por el gen MGMT (*O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase*)^{47,48}. Las células tratadas con TMZ inducen la expresión de MGMT y una parada en el ciclo celular en la fase G₂-M, usada para la reparación de su ADN. Así, la metilación (represión) de la región promotora del gen MGMT es otro de los factores que influyen en la esperanza de vida media de los pacientes.

Por otro lado, el GBM es un tumor altamente recurrente, originándose de nuevo a 1-2cm de la localización original⁴⁹. Esto puede deberse, en parte, a su alta heterogeneidad celular. Además, la hipótesis de las células madre tumorales (CMT) propone que dentro de esta población celular, existen células multipotentes que se caracterizan por la expresión de marcadores de células madre, su capacidad de autorrenovación, diferenciación multilineal, y el restablecimiento del tumor después de la cirugía⁵⁰⁻⁵⁴. Adicionalmente, estas células son resistentes a la radiación y a la quimioterapia^{55,56}. Estas pueden ser algunas de las razones por las que el tumor vuelve a aparecer, pese a haberse eliminado el mayor volumen posible.

Actualmente se investiga el modo de sensibilizar a estas células a la radiación⁵⁷ y la quimioterapia⁵⁸, y existen un gran número de ensayos clínicos cuyo propósito es probar combinaciones de diferentes dosis de radiación y/o quimioterápicos (ej. NCT01062399; NCT02344355; NCT01478854). Pero no existe un tratamiento estandarizado para el GBM recurrente. Las opciones incluyen una nueva intervención quirúrgica para eliminar la masa tumoral seguida de radioterapia, tratamientos con

anticuerpos monoclonales (ej. Bevacizumab, Cetuximab) y/o quimioterapia (Ej. Irinotecan, RAD001, Carmustina, Tenipósido). Sin embargo la supervivencia media de estos pacientes es de tan solo 6 meses³. Hay una gran variedad de estudios y ensayos clínicos que han estudiado las posibles combinaciones de estos tratamientos para discernir cuál es el camino más adecuado a seguir. Pese a que en algunos de ellos se han obtenido resultados alentadores⁵⁹⁻⁶², en otros, los niveles de hemotoxicidad o la tasa de complicaciones derivadas, han sido mayores que los beneficios obtenidos^{63,64}.

3. El microambiente tumoral

Las células tumorales se encuentran en contacto con otras no malignas como fibroblastos, células de los vasos sanguíneos, ganglios linfáticos o del sistema inmune, constituyendo el microambiente tumoral (MAT). En teoría, las células del sistema inmune pueden eliminar estas células tumorales mediante un proceso conocido como vigilancia inmunológica⁶⁵. Anteriormente se pensaba que en el SNC no podía producirse una respuesta inmune debido a la BHE, la falta de drenaje linfático y la actuación de la microglía. Sin embargo, estudios más recientes indican que los leucocitos pueden trasladarse al SNC sin necesidad de que la BHE se encuentre alterada⁶⁶⁻⁶⁸, y que además el SNC dispone de sistema linfático^{69,70}. Por otro lado, los gliomas de alto grado presentan generalmente una BHE más permeable^{20,71,72} y necrosis tumoral. A su vez, las células del GBM secretan diferentes citoquinas y factores de crecimiento capaces de reclutar a las diferentes células del sistema inmune. De esta manera, la alteración de la BHE, junto con la expulsión de antígenos procedentes de la necrosis, y las citoquinas y factores de crecimiento secretados al medio, explican en parte, el alto número de células dendríticas (CD), macrófagos M2, microglía, *natural killers* (NKT) y linfocitos T, que se encuentran alrededor del tumor

^{40,68,73-79}. La respuesta inmune antitumoral más efectiva es la respuesta citotóxica y su principal componente son los linfocitos T citotóxicos (CD8+). Estas células reconocen péptidos antigénicos mediante sus receptores TCR (*T-cell receptor*), y amplifican la respuesta al interactuar con otras células inmunes, como las presentadoras de antígenos (CPA). Las CPAs producen péptidos y proteínas asociadas a tumores que se presentan a los linfocitos T mediante los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) I y II.

No obstante, los pacientes de GBM presentan de forma local y sistémica, un sistema inmune deficiente, especialmente relacionado con la inmunidad mediada por células. Esto se debe a que las células de GBM secretan diferentes biomoléculas como citoquinas y quimioquinas (ej. IL-6, CSF-1, IL-10, IL-11, LIF, OSM ⁸⁰⁻⁸⁵), factores de crecimiento (ej. VEGF ⁸⁶⁻⁸⁸, TGF- β ⁸⁰), enzimas inflamatorias y metaloproteasas de matriz (ej. MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14 ⁸⁹⁻⁹¹), que modifican las propiedades físicas y químicas del tejido, además de alterar la función de otras células en su beneficio. De esta forma las NKT, las células derivadas de mieloides supresoras (MDSC), macrófagos M2 o linfocitos T reguladores (Treg) que se encuentran en el MAT, suprimen la función de las células T citotóxicas ^{92,93}, y promueven la infiltración del glioma mediante la producción de variedad de citoquinas y factores de crecimiento ^{79,92,94,95}. Las células tumorales también expresan MHC I en su superficie, sin embargo disminuyen su expresión para no ser detectadas por el sistema inmune ⁹⁶. De esta forma el MAT queda en las condiciones idóneas para facilitar el crecimiento y la expansión tumoral.

Por lo tanto, la escasa permeabilidad de la BHE junto con la inmunosupresión del MAT, contribuyen a que el tratamiento del GBM sea un reto para la inmunoterapia ⁹⁷.

No obstante, recientemente un estudio *in vivo* en un modelo xenógrafo de GBM, ha conseguido que los linfocitos T traspasen con mayor facilidad la BHE, entren en contacto con las células tumorales, y se produzca una remisión completa del tumor y una mayor supervivencia ⁹⁸. Sin embargo, estos resultados son todavía preliminares, y se debe investigar más sobre su seguridad y efectividad, antes de poder aplicarse en la clínica.

4. Empleo de virus oncolíticos en los tratamientos antitumorales

El tratamiento de tumores con virus oncolíticos es una de las clases de terapia que se usan actualmente. Generalmente, estos virus son modificados para infectar y replicarse selectivamente en las células tumorales, aunque algunos de ellos presentan un tropismo natural por ellas ⁹⁹. Su empleo como agentes terapéuticos en el tratamiento del GBM resulta muy atractivo, ya que los tumores del SNC no suelen desarrollar metástasis, por lo que pueden usarse de manera local. Por otro lado, además de infectar a las células tumorales, pueden a su vez inducir la muerte de las CMT ²¹. A parte de la oncólisis directa y la producción de proteínas tóxicas ¹⁰⁰, el uso de virus en los tratamientos antitumorales se ve reforzado por la estimulación del sistema inmune ⁹⁹. La función principal del sistema inmune es detectar rápidamente, impedir la acción, y finalmente eliminar al virus que ha infectado la célula. La replicación viral dentro de las células tumorales, hace que la célula hospedadora produzca una serie de respuestas que conllevan la producción de citoquinas ¹⁰¹, patrones moleculares asociados a patógeno (PMAP) ^{102,103} y patrones moleculares asociados a daño (PMAD) ^{104,105}, que atraen hacia el MAT a las células del sistema inmune, y facilitan el reconocimiento de antígenos asociados a tumor (AAT) ^{99,104,105}, produciéndose de este modo una respuesta antiviral y antitumoral. De esta manera,

existen una gran variedad de estudios preclínicos y clínicos que usan diferentes tipos de virus para tratar el GBM ^{99,106}.

4.1. Los adenovirus

Los adenovirus (Adv) (familia *Adenoviridae*) son virus de tamaño medio (70-100nm), sin envoltura (desnudos), cuyo material genético, una doble hélice lineal de ADN de 30-40kb, se encuentra dentro de una nucleocápside icosaédrica ^{107,108}. Esta cápside la componen tres proteínas mayoritarias (II, III y IV) y cinco minoritarias (IIIa, IVa2, VI, VIII y IX) ¹⁰⁸⁻¹¹² (**Figura 1**). El hexón (proteína II) es el componente principal de la cápside del adenovirus. Cada una de las 20 caras que forman el icosaedro está compuesta por trímeros de la proteína II que forman los hexones. 12 hexones forman cada una de las 20 caras del icosaedro ¹⁰⁸. Los vértices del icosaedro están ocupados por unas unidades denominadas pentones, que resultan de la unión no covalente de una base pentónica (5 proteínas III) y una fibra (trímero de la proteína IV) ^{108,112,113}. La fibra posee tres dominios: cola, eje o dominio fibroso y cabeza. Los pentones son clave en la unión e internalización del adenovirus en la célula hospedadora ¹¹⁴. En la mayoría de adenovirus humanos la infección depende, en primera instancia, de la interacción de los receptores coxackie (CAR-Coxackie adenovirus receptor) de la célula hospedadora, con el dominio C-terminal de la cabeza de la fibra del adenovirus ¹¹⁵. Posteriormente, se produce la interacción entre el motivo RGD (Arg-Gly-Asp) de la base pentónica del adenovirus y las integrinas $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha5\beta1$ y $\alpha M\beta2$ ¹¹⁶⁻¹¹⁸ de la célula, lo que conlleva la internalización del adenovirus mediante endocitosis, la protección de las células frente a apoptosis ¹¹⁹, y la expresión de citoquinas proinflamatorias ¹²⁰. Tan pronto como se produce la unión del adenovirus a la célula, se desencadena la activación de la señalización celular mediante los receptores

celulares y las proteínas citosólicas ¹²¹. A su vez, la célula provoca cambios en la estructura del adenovirus y estimula la liberación del genoma adenoviral ¹²¹.

Las proteínas codificadas por el genoma adenoviral se clasifican en dos grupos, tempranas y tardías, dependiendo de si se expresan antes o después de la replicación del ADN adenoviral ¹²². Los transcritos tardíos codifican para las proteínas estructurales que forman la cápside del adenovirus (II, III, IIIa, IV, VI, VIII, IX) ¹¹², o bien pueden encontrarse en la cápside envolviendo y condensando el ADN adenoviral (VII) ¹²³. Un caparazón de la proteína tardía V cubre el complejo VII-ADN ^{124,125}, separándolo de la cápside externa. Por último Mu (m), que se sintetiza como proteína precursora (pre-Mu), es escindida por una proteínasa codificada por el adenovirus hasta su forma madura ¹²⁶ (**Figura 1**). Se cree que pre-Mu interacciona y ayuda a condensar fuertemente el ADN viral dentro de la cápside, y la escisión de pre-Mu puede servir para relajar parcialmente esta estructura antes de su entrada en el núcleo ¹²⁷. Por otro lado, las proteínas tempranas (*early*) E1a, E1b, E3 y E4, codifican para las proteínas que se requieren para transactivar otras regiones del genoma viral, modificar el entorno de la célula infectada, alterar la respuesta inmune o, como la proteína E2, codificar las proteínas directamente implicadas en la replicación del ADN adenoviral ¹¹². Tanto la replicación del ADN adenoviral como el ensamblaje de los viriones descendientes ocurren dentro del núcleo celular ^{112,128}. La replicación comienza aproximadamente a las 7 horas posteriores a la infección (hpi). Los viriones comienzan su ensamblaje alrededor de 24hpi, y continúan aumentando en abundancia hasta las 48 o 72hpi ¹²⁹.

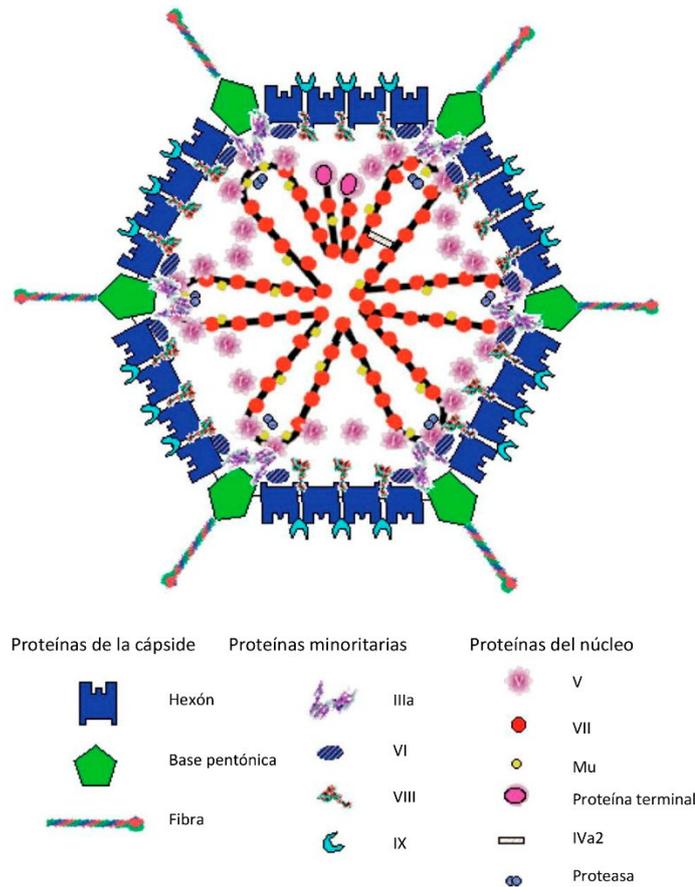


Figura 1: Estructura y composición proteica del adenovirus. Figura adaptada de *Russell et al. 2009*

La proteína pRB (*Retinoblastoma*) es una fosfoproteína crítica para la regulación del ciclo celular ^{130,131}, y junto con sus proteínas reguladoras (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (p16INK4a), *cyclin-dependent kinases 4 y 6* (CDK4, CDK6) y *cyclin D1*), interacciona con proteínas claves en esta regulación ^{6,132}. En diferentes tipos de tumor, incluyendo el GBM, es frecuente encontrar esta ruta de señalización alterada ^{6,20,132}. La entrada no programada en la fase S del ciclo celular puede deberse a la inactivación mutacional del gen *RB* o de sus proteínas reguladoras ¹³³, a alteraciones epigenéticas, o a la sobreexpresión de estas últimas ¹³³. Por ejemplo, cuando pRB se encuentra hipofosforilada, está unida al factor de transcripción celular E2F ¹³⁴, inhibiendo su actuación e impidiendo la transcripción de genes esenciales para la mitosis y la progresión del ciclo celular desde el punto de control G1/S. Pero

los niveles de fosforilación de pRB aumentan conforme la célula se aproxima a la fase S del ciclo, y esta fosforilación hace que pRB pierda su función represora. De esta forma E2F queda liberada y realiza su función como factor de transcripción ¹³¹, induciendo a las células a la progresión hacia la fase S del ciclo celular. Diferentes tipos de virus, incluyendo los adenovirus, inducen la entrada en la fase S del ciclo celular a las células que infectan, y el mantenimiento de una pseudo-fase S mediante la detención del ciclo celular en G2/M ¹³⁵⁻¹³⁸. La proteína viral E1A compete con E2F por la unión de la pRB ¹³⁹. De esta forma, E2F queda liberada y por consiguiente activada, produciéndose la progresión a la fase S del ciclo celular. Esto permite al adenovirus replicarse, a la vez que induce muerte celular programada por autofagia en las células que infecta, para finalmente liberar su progenie adenoviral mediante la lisis celular ^{21,140-142}.

La fosfoproteína celular p53 (*Cellular tumor antigen p53*), en respuesta a diversos tipos de estrés celular, participa en diferentes procesos antiproliferativos como la inducción de apoptosis. Las infecciones virales son un tipo de estrés celular, y de este modo, la célula infectada activa su mecanismo de muerte celular programada por apoptosis, impidiendo así que el virus se replique e infecte a otras células ¹⁴³⁻¹⁴⁷. Por esta razón, otra de las proteínas adenovirales tempranas, la E1B-55KDa, se une a la proteína p53 e impide su acción ^{148,149}. Asimismo, la expresión de p53 está regulada positivamente por el complejo que forma la proteína CBP (*CREB binding protein*) y p300 (*Histone acetyltransferase p300*) ¹⁵⁰⁻¹⁵³. Pero el adenovirus tiene más formas de evitar la apoptosis temprana. La proteína viral E1A presenta una región de unión a miembros de la familia proteica CBP/p300, que impide que el complejo se forme y por lo tanto inhibe la activación de p53 ¹⁵⁰.

El conocimiento de estas interacciones ha llevado a diseñar adenovirus con deleciones en su genoma en relación con las proteínas E1A y E1B. Así se consigue que los adenovirus queden condicionados a replicarse solamente en células que tengan alteradas la rutas de señalización de RB o p53 ¹⁵⁴.

5. Adenovirus Delta-24-RGD (DNX-2401)

5.1. Generación del adenovirus Delta-24-RGD

Pese a que no se conocen en profundidad las alteraciones genéticas que dan lugar a los gliomas malignos, se sabe que la pRB o sus proteínas reguladoras, se encuentran alteradas en un amplio porcentaje de gliomas malignos ^{6,132}. Esta ruta de señalización es crítica en el control el ciclo celular y su alteración implica desregulación del ciclo, un crecimiento anormal de las células, y la progresión al fenotipo maligno que presentan la mayor parte de los tumores. Por esta razón, una de las estrategias terapéuticas más comunes consiste en modificar genéticamente la proteína adenoviral E1A. Esta proteína tiene dominios de unión con las proteínas p300/CBP, pRB y proteínas relacionadas con la pRB ^{155,156}.

El Delta-24-RGD (DNX-2401) es un adenovirus oncolítico tipo 5 (Adv5) modificado para aumentar su tropismo por las células tumorales, mejorar su capacidad infectiva y la capacidad de replicarse en células cancerígenas con la ruta de señalización de pRb alterada ¹⁵⁷. La selectividad o especificidad tumoral se adquiere mediante la deleción de 24 pares de bases (pb) en el gen E1A, en la región dónde se une la pRb (pb: 923-946), originándose el adenovirus Delta-24 ⁴⁹. Esta modificación hace que el adenovirus se replique eficientemente en células con la ruta de pRb alterada, mientras que no lo hará en células normales (sanas) ^{138,157}. Por otro lado, la infección de las células tumorales depende de la unión del adenovirus a sus receptores CAR ¹¹⁵ y su

internalización mediante las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ ¹¹⁶. Sin embargo, las células de GBM, al igual que otras células cancerígenas ¹⁵⁸, expresan unos niveles muy bajos de estos receptores ^{157,158}, y altos niveles de las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ ^{21,157,159,160}. De este modo, para mejorar el tropismo del adenovirus, se modificó su fibra añadiendo el motivo ACDCRGDCFCG (RGD-4C) en el bucle HI de la cabeza ¹⁶¹, dando lugar al adenovirus Delta-24-RGD. Este péptido se une fuertemente a ambas integrinas ^{162,163} y funciona como receptor primario. De esta forma se consigue una infección independiente de CAR, aumentando de este modo la capacidad infectiva y citopática del Delta-24 en distintos tipos de células tumorales ^{157,161}.

5.2. Tratamiento del glioblastoma con el adenovirus Delta-24-RGD

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la eficacia del adenovirus Delta-24-RGD en el tratamiento de diferentes tumores, incluyendo el GBM. Los primeros experimentos quisieron probar la capacidad infectiva y citopática que otorgaba la modificación de la fibra. Estudios *in vitro* de diferentes tipos de células tumorales (adenocarcinoma de pulmón, cáncer de próstata y glioblastoma), demostraron que el adenovirus Delta-24-RGD infecta y se propaga más eficientemente, produciendo mayor citopaticidad en las células tumorales de lo que lo hace el adenovirus Delta-24 ^{157,161}. Los estudios preclínicos se han realizado principalmente en ratones atímicos xeno-injertados con células tumorales humanas, a los que se trató con inyecciones intratumorales de los adenovirus (Delta-24 y Delta-24-RGD). Ambos tratamientos aumentaron la esperanza de vida de los animales. No obstante, el tratamiento con el adenovirus Delta-24-RGD consiguió una remisión completa del tumor, y triplicó la esperanza de vida que otorga el tratamiento con adenovirus Delta-24 ¹⁵⁷. Otros estudios han observado que las células tumorales infectadas mueren mediante muerte

celular programada por autofagia ^{140,164,165}, y las partículas víricas se expanden de forma centrífuga y exponencial dentro de la masa tumoral ¹⁵⁷, infectando a nuevas células y produciendo la disminución del volumen tumoral.

Además de su capacidad lítica, diferentes estudios han demostrado que la eficacia de la viroterapia en el tratamiento de tumores depende de la respuesta inmune del hospedador ¹⁶⁶. Los pacientes con GBM suelen presentar un sistema inmune suprimido. Esto se debe a cambios de algunas células inmunitarias a un fenotipo maligno, que contribuye a inhibir la actividad de otras células del sistema inmune ^{92,93}. Sin embargo, estudios *in vitro* y pre-clínicos, han demostrado que esta inmunosupresión puede revertirse en gran medida por la terapia vírica con el adenovirus Delta-24-RGD. Se ha observado que la infección del adenovirus activa el sistema inmune innato promoviendo, por ejemplo, un cambio en el fenotipo de los macrófagos pro-tumorales M2 hacia M1 ¹⁶⁷, e induciendo la creación de un microambiente pro-inflamatorio ^{105,167}. La activación del sistema inmune innato desencadena a su vez la activación del sistema inmune adaptativo ^{105,168,169}. A esta activación también contribuye la lisis celular producida por el adenovirus, puesto que facilita la presentación de antígenos a las células inmunitarias ^{105,168,169}.

A principios de 2018, *Lang F et al.* publicaron los resultados de la fase I de un ensayo clínico donde 37 pacientes diagnosticados con gliomas malignos recurrentes, fueron tratados con inyecciones intratumorales del adenovirus Delta-24-RGD (DNX-2401) ¹⁷⁰. Los pacientes fueron divididos en 2 grupos. Con el primer grupo se quiso evaluar la seguridad y la respuesta de los pacientes a 8 niveles de dosis diferentes del adenovirus Delta-24-RGD. El segundo grupo se usó para investigar su mecanismo de acción, por lo que 14 días tras el tratamiento adenoviral, el tumor fue extraído, y a los

pacientes se les dio una nueva dosis del adenovirus. El 72% de los pacientes del primer grupo experimentaron una reducción del tumor, y un 20% de ellos sobrevivió más de 3 años. Sin embargo, la esperanza media de vida con independencia de la dosis de adenovirus, fue de 9,5 meses. Al igual que se observó en los ensayos preclínicos, el adenovirus se expandió de forma centrífuga dentro del tumor, diferenciándose 3 zonas (zona 1: necrosis producida por el adenovirus, zona 2: replicación activa del adenovirus, y zona 3: células de la periferia sin infectar). Alrededor del tumor se pudo observar un aumento de la inflamación y del número de linfocitos. De esta forma quedó demostrado que el tratamiento con el adenovirus Delta-24-RGD provoca la lisis de las células tumorales, seguido de una respuesta inmune anti-tumoral.

Debido a que los tratamientos de radioterapia y quimioterapia se encuentran dentro del tratamiento estándar para el GBM, otros estudios han analizado el efecto que tiene la combinación de estos tratamientos junto con el adenovirus Delta-24-RGD. Gracias a ellos sabemos que existe una sinergia al combinar el adenovirus Delta-24-RGD con radioterapia ¹⁷¹, o con los quimioterapéuticos TMZ ⁴⁷ y Everolimus (RAD001) ¹⁷².

Por otro lado, el conocimiento de las interacciones de las proteínas virales con las de la célula hospedadora, ha dado lugar al diseño de virus capaces de replicarse exclusivamente en las células tumorales. Partiendo del adenovirus modificado Delta-24, se crearon otros adenovirus además del Delta-24-RGD. Estos han probado su eficacia en mayor o menor medida en el tratamiento del GBM.

- El adenovirus Delta-24-RIVER (*Delta-24-Retargeted Infectivity Via EGFR*) es un adenovirus modificado para infectar las células de GBM de una forma independiente de CAR. Para ello usa el epítipo extracelular único de la mutación

EGFRvIII (células que expresan EGFRvIII) ^{173,174}. Su efecto ha sido testado tanto *in vitro* como *in vivo*, y se ha demostrado que este adenovirus se replica con mayor eficiencia en las células que presentan la mutación EGFRvIII, y que aumenta la supervivencia de ratones xeno-injertados con células de glioblastoma U87-ΔEGFR ¹⁷⁴.

- El adenovirus ICOVIR abarca las modificaciones del Delta-24-RGD además de la inclusión de elementos sensibles a E2F1 como promotor ectópico para E1A ¹⁷⁵. Este adenovirus ha probado su eficacia y especificidad en modelos animales ¹⁷⁶, pero presenta una serie de obstáculos relacionados con su biodistribución y propagación intratumoral ¹⁷⁷.

- Al igual que el anterior, el Delta-24RGDOX (DNX-2440) es un adenovirus que abarca las modificaciones del Delta-24-RGD, además de expresar el coestimulador del sistema inmune OX40L. Al igual que el Delta-24-RGD, este adenovirus atrae a los linfocitos a la zona tumoral e induce muerte celular inmunogénica ¹⁷⁸. Recientemente se ha iniciado un ensayo clínico fase I (NCT03714334) donde este adenovirus se está empleando frente a GBM recurrente, con el objetivo de evaluar la seguridad de la terapia.

- El ONYX-015 es un adenovirus cuya replicación está condicionada por el estado de la proteína pro-apoptótica p53. Esta proteína se une a la proteína viral E1B-55KDa y queda inhibida, impidiéndose así la apoptosis celular y permitiendo que el virus pueda replicarse en la célula, y finalmente lizarla e infectar a las células de su alrededor ¹⁷⁹. En una amplia mayoría de células tumorales, la proteína p53 se halla mutada y la ruta apoptótica alterada. La delección de E1B-55KDa en el adenovirus ONYX-015, le permite replicarse en las células tumorales con la ruta de p53 alterada,

pero no en las sanas. A pesar de que ha demostrado ser una terapia segura, el ONYX-015 no es un tratamiento muy eficaz para tratar el glioma ¹⁸⁰.

6. Proteómica en oncólisis adenoviral

6.1. Ciencias ómicas

En los últimos años, gracias a los avances logrados en el campo de la biología y la bioinformática, se ha desarrollado una visión más global de los procesos biológicos. Esto se debe al reciente desarrollo de las ciencias o tecnologías ómicas. El sufijo -oma, significa “conjunto de”. Gracias a las tecnologías ómicas se alcanza una visión holística de las moléculas que forman una célula, un tejido o el organismo completo. Por ello, la adición de este sufijo a los diferentes campos de la biología, cubre las nuevas aproximaciones, más globales y masivas del estudio de cada uno de ellos (ADN-genómica, ARN-transcriptómica, proteínas-proteómica y metabolitos-metabolómica). Las diferentes ómicas pueden integrarse y complementarse (**Figura 2**), surgiendo lo que se denomina biología de sistemas ¹⁸¹.

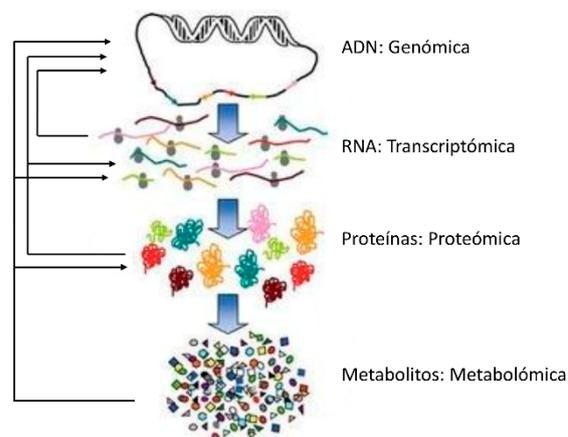


Figura 2: Esquema de las diferentes aproximaciones ómicas. Esquema donde se representan las diferentes ciencias ómicas y cómo todas ellas pueden integrarse y complementarse en un estudio de biología de sistemas. Figura modificada de Goodacre, R. *Metabolomics* (2005).

Una de las grandes diferencias con respecto a las aproximaciones más tradicionales es el momento en que se establece la hipótesis. El planteamiento más

clásico a la hora de hacer un experimento requiere el establecimiento de una hipótesis que intenta ser probada usando diferentes técnicas o tecnologías. Sin embargo las ómicas permiten invertir este proceso. A través de la enorme cantidad de datos y los resultados que estos generan, se pueden establecer las hipótesis que posteriormente serán validadas mediante otras técnicas ¹⁸².

6.2. Proteómica y su uso como herramienta de estudio

Marc Wilkins, en 1994, definió y acuñó el término proteoma ¹⁸³. Este término engloba al conjunto de proteínas que se expresan en una célula, tejido u organismo concreto, en un tiempo determinado ^{184,185}. Gracias al proyecto del genoma humano, se estima que el ser humano tiene entre 19.587 y 20.245 genes codificantes de proteínas ¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Sin embargo, el número de proteínas humanas es mucho mayor que el de genes codificantes. Esto se debe al *splicing* alternativo (presente en aproximadamente un 93% de los genes humanos ¹⁸⁹), los SNPs, las mutaciones, los errores en la traducción, y/o las diferentes modificaciones postraduccionales (MPT) ¹⁹⁰. Cada una de las variaciones moleculares de una proteína se denomina proteoforma ¹⁹¹, e influye en la actividad y función de la proteína. Debido a las diferentes combinaciones de estas variaciones, una proteína puede presentar multitud de proteoformas ¹⁹⁰. Así, se conoce como proteómica al análisis global de un conjunto de proteínas, y resulta extremadamente útil para comprender en profundidad cómo funciona un sistema biológico ¹⁹². A su vez, el proteoma es muy dinámico, puesto que se ve alterado por perturbaciones externas y cambios en la expresión génica, que definen el estado funcional del organismo de estudio y su fenotipo ¹⁸⁵. El proteoma asociado a un fenotipo concreto, se define como un proteotipo ¹⁸⁵. La mayoría de enfermedades se deben a múltiples factores que suelen manifestarse a través de

cambios en los niveles de expresión, MPT y función de las proteínas ^{185,193}. Por otro lado, uno de los objetivos de las terapias farmacológicas, es interferir específicamente en la actividad de una o varias de las proteínas alteradas en la enfermedad y sus rutas de señalización ¹⁹⁴. De este modo los estudios proteómicos resultan extremadamente útiles a la hora de caracterizar una patología, como es por ejemplo el cáncer, y establecer potenciales dianas terapéuticas.

6.2.1. Espectrometría de masas

La mayoría de técnicas usadas para el análisis de las proteínas en un sistema biológico, solo permiten analizar una o unas pocas proteínas al mismo tiempo. Sin embargo, la espectrometría de masas posibilita identificar de manera específica y cuantificar con precisión, casi cualquier proteína expresada en una célula o tejido, además de identificar y localizar las diferentes MPT que las proteínas puedan tener ^{185,195,196}. De esta manera, se consigue generar un conocimiento más profundo del sistema biológico que se está estudiando, que a su vez puede combinarse con otros estudios ómicos. Por esta razón, la espectrometría de masas es la herramienta central en los análisis proteómicos.

Existen dos métodos diferentes para analizar las proteínas mediante espectrometría de masas. Uno de ellos, conocido como “*top-down*”, estudia las proteínas como entidades intactas ¹⁹⁷. Sin embargo, el análisis “*botton-up*” está mucho más extendido, ya que su flujo de trabajo y análisis computacional resulta mucho más manejable ¹⁸⁵ (**Figura 3**). En este último, las proteínas una vez extraídas son digeridas mediante una o varias proteasas, generándose péptidos de diferentes tamaños. Una de las proteasas más usadas es la tripsina, que corta las proteínas en el extremo

carboxilo terminal de sus residuos de lisina (Lys) y arginina (Arg), dando lugar a los denominados péptidos trípticos. Antes de su análisis con el espectrómetro de masas, los péptidos son separados mediante cromatografía líquida en fase reversa, que se encuentra acoplada al espectrómetro de masas (LC-MS: *Liquid chromatography mass spectrometer*). La capacidad y la resolución de la cromatografía están relacionadas con la longitud de la columna, el tamaño de la partícula y la longitud del gradiente ¹⁹⁸. Hoy en día se suele usar cromatografía líquida de fase reversa C18, nano-flujo y presión ultra-alta ¹⁹⁹. Por otro lado, si la muestra es muy compleja, es recomendable realizar un fraccionamiento previo adicional mediante un procedimiento ortogonal ¹⁹⁹. El objetivo del fraccionamiento es hacer que las proteínas minoritarias no queden enmascaradas por las mayoritarias, y que de este modo puedan ser identificadas y cuantificadas con mayor facilidad ^{200,201}. Tras su elución del HPLC (*High performance liquid chromatography*), los péptidos son ionizados y transferidos a fase gaseosa mediante electro-spray (ESI: *Electrospray ionization*). El ESI puede producir iones de diferentes cargas. En el caso de los péptidos trípticos, estos suelen cargarse doble o triplemente ²⁰². El espectrómetro de masas mide la relación masa/carga (m/z) de los iones (nivel MS). Algunos de estos iones se seleccionan atendiendo a ciertas características, para ser fragmentados mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Dependiendo de la técnica de fragmentación, el tamaño de los péptidos y los aminoácidos que los componen, se obtendrán diferentes tipos de iones. La disociación inducida por colisión (CID: *Collision-induced dissociation*) junto con el uso de una energía de colisión baja (<100 eV), produce la fragmentación aleatoria del péptido por el enlace peptídico, dando lugar a los iones de la serie "b" (protón en el N-terminal) e iones de la serie "y" (protón en el C-terminal) ^{202–205}. Gracias a esta fragmentación, los

péptidos pueden ser identificados al comparar sus espectros de fragmentación (secuencia de aminoácidos) con diferentes bases de datos de secuencia de proteínas^{190,196,203,206}. La presencia de una proteína en la muestra se deduce de la identificación de sus péptidos, en un proceso conocido como “inferencia de proteínas”^{207,208}. Estas identificaciones son validadas estadísticamente, generalmente mediante el uso de bases de datos señuelo (*decoy*) donde los espectros de fragmentación obtenidos se comparan con ellas para estimar la tasa de falsas identificaciones (FDR: *False discovery rate*)^{209–211}. Esta base de datos aleatorizada se genera a partir de la base de datos de referencia, invirtiendo la secuencia de sus aminoácidos. Los espectros de buena calidad se emparejan fácilmente con su correspondiente secuencia en la base de datos original. Sin embargo, conforme la calidad de los espectros comienza a disminuir, este emparejamiento se vuelve más aleatorio, llegando a asociar algunos de estos espectros con identificaciones de la base de datos señuelo. De esta manera, el FDR determina el número de falsos positivos que se aceptan en una lista de proteínas identificadas, siendo el valor más habitual $FDR < 1\%$.

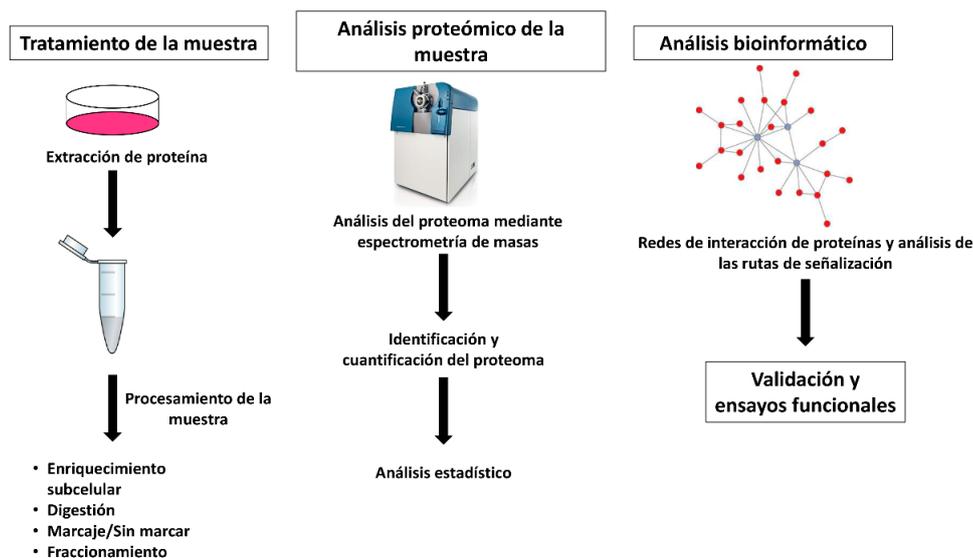


Figura 3: Flujo de trabajo convencional para el análisis proteómico mediante espectrometría de masas.

Existen diferentes metodologías complementarias de cuantificación de proteínas mediante espectrometría de masas. Se puede usar una aproximación libre de marcaje (conocida como *label-free*) o las muestras pueden ser marcadas químicamente. En la estrategia *label-free* la cuantificación se hace a través del recuento espectral, la intensidad de señal de los péptidos detectados (nivel MS), y/o el área cromatográfica del pico de elución. Si se quiere comparar los niveles de proteínas específicas entre las distintas muestras, es esencial obtener un buen alineamiento entre los diferentes cromatogramas. En el caso del marcaje, los péptidos resultantes de la digestión proteica son marcados químicamente de manera diferencial en cada una de las muestras. Una vez marcadas, las muestras se juntan y se analizan simultáneamente mediante espectrometría de masas. Los espectros de fragmentación permitirán identificar las diferentes proteínas, y los marcajes químicos la cuantificación de las mismas entre las diferentes muestras. Esto posibilita que la cuantificación sea independiente de la cromatografía, un tiempo total de experimentación menor, además de reducir las variaciones técnicas, lo que proporciona mayor potencia estadística¹⁹⁹. Existen distintos tipos de marcaje. Las muestras pueden ser marcadas *in vivo* mediante el uso de diferentes marcajes metabólicos. Sin embargo estos tipos de marcajes son caros²¹³, además de estar restringidos a cultivos celulares^{214,215} y algunos modelos *in vivo*^{216–218}. Por otro lado, una vez extraída la proteína, esta puede ser marcada mediante isótopos químicos. Dentro de este grupo, la tecnología iTRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantification*) usa un marcaje isobárico. Esto quiere decir que todos los marcajes aportan la misma masa al péptido (**Figura 4**), y que por tanto los mismos péptidos de diferentes muestras, tendrán la misma masa en el espectrómetro de masas (nivel MS). El marcaje iTRAQ permite marcar hasta 8

muestras diferentes, que posteriormente podrán agruparse en un *pool*, y de esta forma ser analizadas en un único análisis. La cuantificación y diferenciación de las muestras marcadas se hace a nivel MS/MS. Al fragmentarse los péptidos por el enlace peptídico se genera la información de su secuencia de aminoácidos. En paralelo, la fragmentación de la etiqueta isobárica, da lugar a iones reporteros con m/z específicas de cada uno (113-119 y 121 m/z), cuya señal es proporcional a la abundancia relativa del péptido en cada muestra. Por otro lado, el agrupamiento de las muestras no solo permite reducir el tiempo de experimentación y las variaciones técnicas, sino que ayuda a aumentar la cobertura del proteoma caracterizado. El análisis conjunto de las muestras produce una adición de los iones precursores únicos (péptidos) a nivel MS que hace que los péptidos que tengan una baja abundancia en algunas muestras, y que con la metodología *label-free* quedarían enmascarados por los más abundantes, puedan ser identificados y cuantificados. Además, el *pool* de muestras marcadas puede fraccionarse, lo que también puede contribuir a aumentar la cobertura del proteoma. Sin embargo, la aproximación iTRAQ puede subestimar la tasa de cambio de las proteínas ^{219,220} debido al co-aislamiento de los iones precursores ^{221,222}. Esto ocurre cuando en la selección del precursor, co-eluyen péptidos de la misma m/z , y se fragmentan todos ellos. De esta manera, los iones precursores adicionales, generan en el espectro MS/MS etiquetas isobáricas, que se suman a las del péptido de interés, subestimando las diferencias cuantitativas entre las muestras. Este fenómeno puede paliarse mediante fraccionamientos previos ^{201,220}, y/o un doble método de aislamiento (MS3) ²²³.

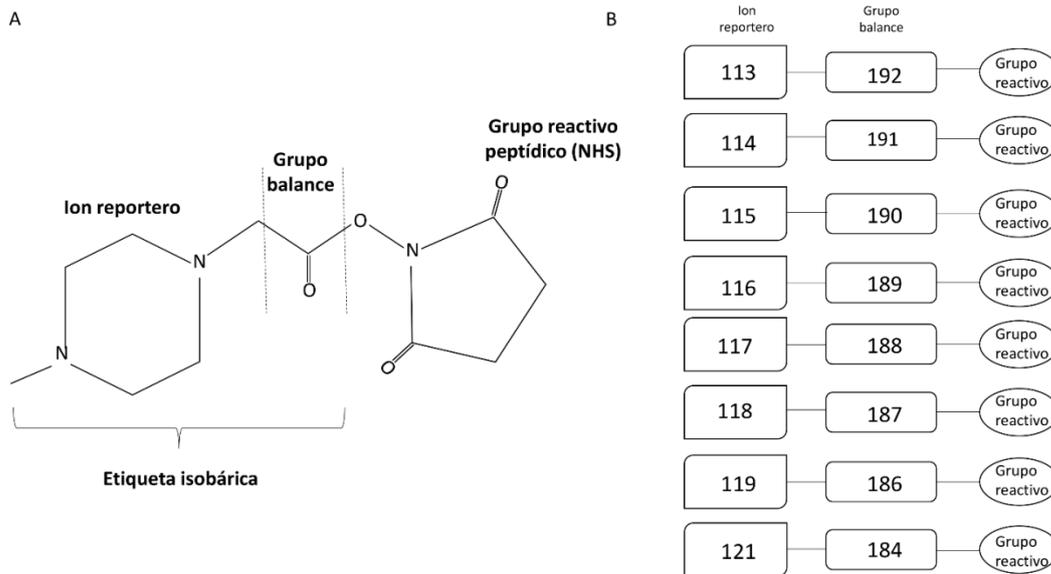


Figura 4: Esquema las etiquetas isobáricas utilizadas en iTRAQ. A) Esquema de la etiqueta isobárica de iTRAQ. B) Representación de los valores de los iones reporteros y el grupo balance de un iTRAQ 8-plex

Tras la obtención de los datos del espectrómetro de masas, para la identificación y cuantificación de las proteínas presentes en cada muestra, se utilizan diferentes motores de búsqueda ²²⁴. Una vez obtenidos estos datos, herramientas bioinformáticas como Ingenuity® Pathway Analysis (IPA), STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) o DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) resultan indispensables para interpretar el significado biológico de los mismos ²²⁵. Estas herramientas se apoyan en la literatura, en otros experimentos ómicos o en la estructura de las proteínas, para establecer redes de interacción entre las proteínas que encontramos en las muestras biológicas en estudio (**Figura 3**). Además, el software IPA, propone potenciales proteínas (*hubs*) que podrían verse desreguladas atendiendo a las alteraciones en los niveles de expresión de otras proteínas de la muestra. De esta forma, proporciona nuevos candidatos para incrementar el conocimiento biológico del sistema experimental.

6.3. Proteómica en el estudio del glioblastoma

La caracterización molecular de los gliomas, especialmente el GBM, es clave tanto para el diagnóstico, elección de tratamiento y pronóstico de los pacientes de forma más temprana y precisa, como para el desarrollo de terapias más específicas y eficientes contra el tumor. Los estudios proteómicos contribuyen de manera significativa a estos objetivos al permitir caracterizar las rutas de señalización alteradas, y el potencial descubrimiento de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas.

Con estos objetivos, diferentes grupos de investigación han caracterizado el proteoma de los gliomas mediante diferentes aproximaciones proteómicas, y a diferentes niveles (líneas celulares, modelos animales, biopsias de pacientes y fluidos corporales). Además también han estudiado las variaciones en el proteoma producidas por ciertos tratamientos contra el tumor. En la **Tabla suplementaria 1**, se encuentran resumidos algunos de los estudios proteómicos que se han llevado a cabo en astrocitoma en la última década, junto con los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

6.4. Proteómica en el estudio de la oncólisis adenoviral

La mayoría de estudios proteómicos sobre infecciones adenovirales han intentado caracterizar en profundidad el proteoma de estos adenovirus²²⁶⁻²³¹, y de este modo entender mejor el ciclo adenoviral. Otros estudios se han enfocado en establecer las interacciones que se producen entre las proteínas del adenovirus y las de la célula hospedadora, y por lo tanto comprender qué rutas de señalización se ven alteradas. La aproximación más utilizada para este tipo de estudios consiste en una inmunoprecipitación o una purificación por afinidad de la proteína de interés, seguida

de la identificación de las proteínas que la acompañan mediante LC-MS/MS. En los últimos años este tipo de estudios han ido en aumento (**Tabla suplementaria 2**).

Por otro lado, la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas en tándem, requiere de la previa existencia de una base de datos fiable que permita obtener el mayor número de identificaciones posibles con la máxima confianza. En el caso de los virus, si sus genomas no están caracterizados completamente, las identificaciones y la dinámica de sus proteomas no pueden ser estudiadas en profundidad. En 2012 *Evans et al.* superaron esta barrera mediante la metodología PIT (*Proteomics informed by transcriptomics*). Este grupo analizó los cambios en el proteoma y transcriptoma de las células de cáncer cervical HeLa, infectadas con un Adv5 a las 8 y 24hpi ²³². Para el ensamblaje *de novo* del transcriptoma se empleó el método Trinity (tres módulos de software: Inchworm, Chrysalis and Butterfly) ²³³, y estas “proteínas PIT” se utilizaron como base de datos en el motor de búsqueda MaxQuant para la identificación de los datos obtenidos mediante LC-MS/MS. A su vez, el análisis permitió examinar la estabilidad de las proteínas después de la transcripción e identificar cuáles de ellas eran degradadas por efecto del adenovirus (dianas de la ubiquitina ligasa), debido a que se apreciaba una disminución significativa de los niveles de proteínas que no se correspondía con los de su ARNm. Los datos transcriptómicos también permitieron identificar el exón del que procedían los ARNs. Por lo tanto, el análisis PIT permitió visualizar datos genómicos, transcriptómicos y proteómicos fácilmente sin una base de datos proteómicos previa.

En resumen, el GBM es un tumor muy agresivo cuyas terapias estándar confieren a los pacientes una esperanza de vida media de poco más de un año. Una de las aproximaciones terapéuticas más novedosas es el tratamiento del GBM con el

adenovirus oncolítico Delta-24-RGD (DNX-2401). Sin embargo, la esperanza de vida media de estos pacientes continua siendo baja. Si se quiere avanzar en el desarrollo de terapias más eficaces y específicas, como el diseño de adenovirus modificados más potentes en el tratamiento del GBM, es imprescindible caracterizar en profundidad las alteraciones proteómicas producidas en las células de glioblastoma por el tratamiento actual. La espectrometría de masas es la aproximación *discovery* más adecuada para este fin, puesto que permite identificar y cuantificar con precisión casi cualquier proteína expresada en estas células, y de este modo establecer las bases moleculares para el desarrollo de nuevos vectores adenovirales más eficaces.

Objetivos

El tratamiento del GBM con el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD, ha demostrado ser seguro y específico. Esta nueva terapia contribuye a la remisión del tumor mediante diversos mecanismos, como la lisis celular y la activación del sistema inmune. No obstante, un alto porcentaje de pacientes no responde adecuadamente a este tratamiento oncolítico, y su esperanza de vida continua siendo baja. Se sabe que el adenovirus Delta-24-RGD induce la muerte celular programada por autofagia en las células que infecta. Sin embargo se desconocen los mecanismos moleculares que se ven alterados durante este proceso. Es por ello que los objetivos de la presente tesis doctoral son:

1. Caracterización de la señalización inducida tras la **adhesión e internalización** (5, 15 y 30 minutos posteriores a la infección (mpi)) del adenovirus Delta-24-RGD en células de glioblastoma humano U87
 - a. Análisis de actividad de rutas de señalización
2. Monitorizar el efecto del adenovirus Delta-24-RGD durante la **replicación del ADN adenoviral** (3-10hpi) en células de glioblastoma U87
 - a. Análisis del proteoma intracelular (6-10hpi)
 - b. Análisis del secretoma (3-10hpi)
 - c. Análisis funcional del proteoma diferencial
 - d. Caracterización de las rutas de señalización alteradas
3. Analizar el efecto del adenovirus Delta-24-RGD durante el proceso de **autofagia** (24-48hpi) en células de glioblastoma humano U87
 - a. Análisis del proteoma intracelular

- b. Análisis del secretoma
- c. Análisis funcional del proteoma diferencial
- d. Caracterización de las rutas de señalización alteradas

Material y Métodos

1. Materiales

1.1. Muestras biológicas

1.1.1. Línea celular de glioblastoma U87

La línea celular U87, formalmente conocida como U87-MG (U87-Malignat Glioma) (ATCC: HTB-14), es una línea celular humana de glioblastoma primario. Las U87 son células adherentes con morfología epitelial y alta tasa de proliferación (**Figura 5**).

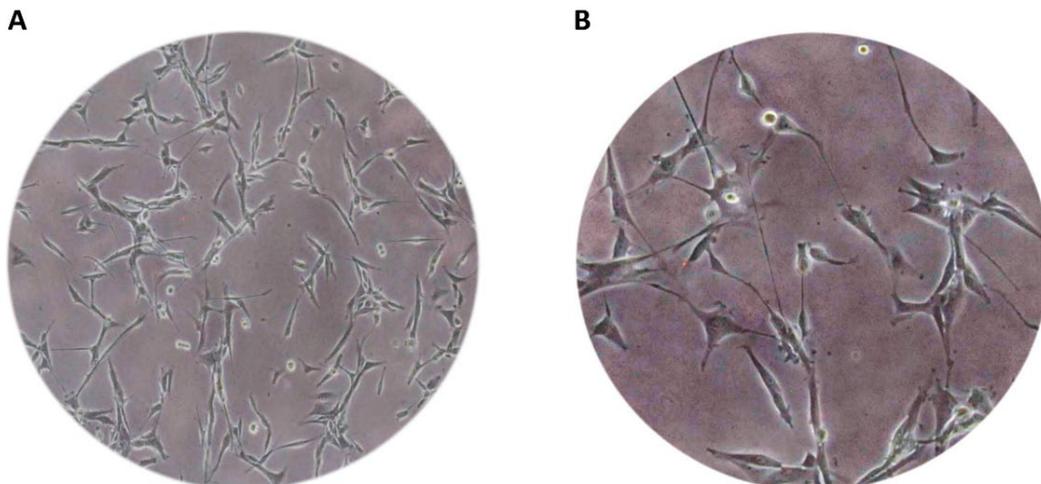


Figura 5: Fotografías de la línea celular de glioblastoma humano U87 cultivada en una placa de cultivos. A) Imagen 10X. B) Imagen 20X.

Las células se cultivaron en DMEM/F12-GlutaMAX (Gibco 10565018) suplementado con 10% FBS y 1% penicilina/estreptomicina. El cultivo se hizo en atmósfera húmeda, a 37°C y 5% CO₂. Se hicieron sucesivos subcultivos hasta conseguir el número deseado de células para cada experimento (**Tabla 1**). El subcultivo se hizo lavando las placas con PBS (Lonza) y añadiendo un volumen adecuado de tripsina (Lonza), a la que se dejó actuar unos minutos en el incubador a 37°C. Pasado este

tiempo la tripsinización se paró al añadir a las placas el medio de cultivo suplementado y se hizo la dilución adecuada en nuevas placas de cultivo.

1.1.2. Adenovirus oncolítico Delta-24-RGD

1.1.2.1. Producción del adenovirus oncolítico Delta-24-RGD

El adenovirus Delta-24-RGD fue proporcionado por la doctora Marta M^a Alonso (Universidad de Navarra). Este adenovirus surge a partir de dos modificaciones hechas en el adenovirus humano tipo 5 ^{157,161}. Por un lado se construyó el vector Ad5lucRGD, que expresa luciferasa, contiene la fibra recombinante RGD y E1 está eliminada ¹⁶³. Esto se consiguió mediante recombinación homóloga de la región E1 que contenía el gen de luciferasa en el plásmido pVK503 que contenía la fibra modificada ¹⁶³. Por otro lado, se deleccionaron 24pb (923-946 ambas inclusive) del genoma adenoviral que codifica para la proteína E1A, concretamente la región donde se une la pRB ²³². Para ello se empleó el plásmido pXC1, que contiene la secuencia del adenovirus tipo 5 del nucleótido 22 al 5790 y se deleccionaron las 24pb mediante cebadores (*primers*) mutagénicos fosforilados (pXC1-Delta24) ¹³⁸. Posteriormente este fragmento de E1A-Delta24 se escindió del plásmido pXC1-Delta24, y se clonó mediante recombinación homóloga en el plásmido pVK503, digerido con ClaI ^{161,163}. El genoma de este nuevo adenovirus se liberó de la cadena principal del plásmido mediante la digestión con PacI y se transfectaron las células HEK-293 (células embrionarias de riñón humano) para obtener el adenovirus Delta-24-RGD ¹⁶¹.

1.1.2.2. Infección de las células de glioblastoma U87

Una vez alcanzado el número de células deseado (**Tabla 1**), se sembraron en placas con medio de cultivo suplementado (DMEM/F12-GlutaMAX, 10% FBS y 1% penicilina/estreptomina) y 16 horas más tarde, cuando las células se adhirieron y

alcanzaron un 80% de confluencia, el medio fue retirado, se lavó la placa con PBS y se añadió DMEM/F12-GlutaMAX suplementado solamente con 1% penicilina/estreptomicina. Estas células se infectaron con el adenovirus Delta-24-RGD a una MOI=25 (*multiplicity of infection*) y se incubaron en atmósfera húmeda a 37°C y 5% CO₂ durante 30 minutos. Posteriormente se añadió al anterior medio, el doble de volumen de medio DMEM/F12-GlutaMAX suplementado con 10% FBS y 1% penicilina/estreptomicina. Las células se incubaron en estas condiciones hasta alcanzar los periodos de tiempo indicados (3, 6, 10, 24 y 48 hpi). Tras estos periodos de incubación, el medio fue retirado, filtrado (filtros de 0.22µm; Sigma-Aldrich Z359904-50EA) y guardado a -80°C hasta su posterior utilización para el análisis del secretoma. Las placas fueron lavadas 2 veces con PBS y las células se lisaron usando diferentes tampones de lisis según el experimento (**Tabla 1**).

Experimento	Placa	Nº de células/placa	Tampón de lisis	Tiempos tras la infección
Array de quinasas fosforiladas	150mm	3 x 10 ⁶ células	urea 6M; tiourea 2M; inhibidores de proteasas y fosfatasa	Mock (x3)
				5 min (x3)
				15 min (x3)
				30 min (x3)
Extracto total	150mm	3,5 x 10 ⁶ células	urea 6M; tiourea 2M; DTT 50Mm	Mock (x3)
				3h (x3)
				6h (x3)
Fracciones citosólica y nuclear	150mm	3,5 x 10 ⁶ células	10% NP40 ; Inhibidores de proteasas; en PBS	Mock (x3)
				6h (x3)
				10h (x3)
Extracto total	100mm	10 ⁶ células	urea6M; tiourea 2M; DTT 50Mm	Mock (x3)
				24h (x3)
				48h (x3)

Tabla 1. Resumen de los cultivos de las células de glioblastoma U87 y los tiempos de infección con el adenovirus Delta-24-RGD. Todos los experimentos se realizaron incluyendo 3 réplicas biológicas por condición.

Por otro lado, en los experimentos de tiempo de incubación corto (5, 15 y 30 mpi) (**Tabla 1**), se utilizó la misma MOI de 25 que en el resto de experimentos, pero se usó exclusivamente medio de infección (DMEM/F12-GlutaMAX suplementado con 1% penicilina/estreptomicina) debido a los tiempos de estudio. Cuando las células se recogieron en tampón de lisis, fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido.

1.2. Reactivos

Nombre del reactivo	Fabricante
40% solución de Acrilamida/Bis	BioRad
Acetonitrilo (ACN)	ThermoFisher Scientific
Ácido fórmico (FA)	Sigma-Aldrich
Ácido fosfórico (H ₃ PO ₄)	Sigma-Aldrich
Albumina	Sigma-Aldrich
Albumina (2mg/mL)	Sigma-Aldrich
Bicarbonato de amonio (ABC) (CH ₅ NO ₃)	Acros organics
Bio-Rad protein assay (Reactivo para ensayo de Bradford)	BioRad
Brilliant blue R (Azul de Coomassie)	Sigma-Aldrich
Cloroformo	Fisher-Chemical
Cloruro de potasio (KCl)	Sigma-Aldrich
Complete EDTA-free (inhibidor de proteasas)	Roche
Ditiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	BioRad
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich
Iodacetamida (IAA)	Sigma-Aldrich
Metanol	Fisher-Chemical
Metanotiosulfonato de metilo (MMTS)	Kit de iTRAQ (Sciex)
NP40	ThermoFisher Scientific
phosphoSTOP (inhibidor de fosfatasas)	Roche
Rojo Ponceau	Sigma-Aldrich
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	BioRad
Tiourea	GE Healthcare
Trietilamonio bicarbonato (TEAB)	ThermoFisher Scientific
Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP)	Kit de iTRAQ (Sciex)
Tween 20	Sigma-Aldrich
Urea	GE Healthcare
Western Lighting plus-ECL	Perkin Elmer

Tabla 2. Reactivos. Se indican los reactivos empleados durante la realización de este estudio y el fabricante.

1.3. Tampones

Tampón	Composición
Tampón A (Fase móvil-Cromatografía)	100% agua; 0,1% FA
Tampón B (Fase móvil-Cromatografía)	100% ACN; 0,1% FA
Tampón de carga de las proteínas en el gel de acrilamida	Laemmli sample buffer 4X (BioRad)
Tampón de carrera para proteínas	Tris 25mM; glicina 192mM; 0,1% SDS; pH=8,3 (BioRad)
Tampón de lisis para el estudio de quinasas fosforiladas	urea 6M; tiourea 2M; inhibidores de proteasas y fosfatasas
Tampón de lisis para extracto total	urea 6M; tiourea 2M; DTT 50mM
Tampón de lisis para fraccionamiento subcelular (fracción citosólica y nuclear)	10% NP40 ; Inhibidores de proteasas; en PBS
Tampón para la digestión en solución (iTRAQ)	TEAB 0,5M; urea 6M
TBS 10X	Tris 200mM; NaCl 1,5M; HCl 1M; pH=7,6
TBS-Tween 1X	TBS 1X; 0,1% de Tween 20

Tabla 3. Tampones. Se indican los tampones utilizados y su composición.

1.4. Equipos

Nombre	Descripción	Fabricante
5600 Triple TOF	Espectrómetro de masas Q-Q-TOF	Sciex
Branson 2510 ultrasonic cleaner	Sonicador de baño (ultrasonidos)	Marshall Scientific
Centrifuge 5427R	Centrífuga	Eppendorf
Chemidoc MP Imaging System	Sistema de imagen para geles y blots	BioRad
Concentrator plus	Concentrador a vacío	Eppendorf
CP100WX	Ultracentrífuga	Hitachi
Evolution 201	Espectrofotómetro	ThermoFisher Scientific
nanoLC ultra 1D plus	Sistema de cromatografía HPLC	Eksigent
Trans-Blot Turbo	Sistema de transferencia de Western-Blot de alto rendimiento	BioRad
Vibra cell 75185	Sonicador de vástago	Bioblock Scientific

Tabla 4. Equipos utilizados en el estudio. Se indica el nombre, la descripción y el fabricante de los aparatos empleados.

2. Análisis proteómico

2.1. Extracción de proteínas

2.1.1. Obtención del proteoma celular total

Se recogieron y lisaron triplicados de 3×10^6 células por condición (Mock, 3, 6 y 10hpi), y 10^6 células por condición (Mock, 24 y 48hpi) con tampón de lisis (urea 6M, tiourea 2M y DTT 50mM). Se dejó el lisado 30 minutos en hielo, las muestras se sonicaron con un sonicador de vástago para ayudar a la lisis y romper el ADN y finalmente se centrifugaron durante 1h a 15°C y 20.000g. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo (extracto total) y el pellet fue descartado. La concentración de extracto total de las proteínas celulares se obtuvo mediante el ensayo Bradford (Biorad).

2.1.2. Obtención del proteoma subcelular

Se recogieron triplicados de 3.5×10^6 de células por condición (Mock, 6 y 10hpi) y se homogeneizaron en el buffer NP40 con inhibidores de proteasas. Seguidamente los lisados se centrifugaron durante 1 minuto a 4°C y 18.000g. Los sobrenadantes obtenidos correspondían a la fracción citosólica y los pellets a la nuclear. Los pellets se lavaron con PBS y se centrifugaron de nuevo 1 minuto a 4°C y 18.000g para eliminar el PBS. Posteriormente, los pellets se resuspendieron en tampón de lisis (urea 6M, tiourea 2M, DTT 50mM) y se incubaron 30 minutos en hielo. Tras este paso, los lisados se centrifugaron durante 20 minutos a 15°C y 20.000g. Los sobrenadantes se pasaron a un tubo nuevo (fracción nuclear), mientras que los pellets se desecharon. La concentración de proteínas de cada fracción se obtuvo mediante el ensayo Bradford (Biorad).

2.2. Análisis del proteoma

2.2.1. iTRAQ

El análisis del proteoma de la fracción citosólica se hizo mediante una aproximación *shotgun* usando el marcaje isobárico iTRAQ²³³. El experimento se hizo con 2 réplicas biológicas del control (Mock) y 3 de cada una de los tiempos de cada infección (6 y 10hpi). 300 µg de proteína de cada muestra se precipitaron con metanol/cloroformo, y los pellets se resuspendieron en TEAB 0.5M (Trietilamonio bicarbonato), urea 6M. Posteriormente se cuantificó la proteína mediante el ensayo Bradford (Biorad). Se marcaron 80µg de proteína de cada una de las muestras. Este marcaje se hizo siguiendo las indicaciones del kit de iTRAQ (Sciex). Los 80µg de muestra primero se redujeron con TCEP 50mM (Tris (2-carboxietil) fosfina) a temperatura ambiente durante 1h, y seguidamente, se alquilaron los residuos de cisteína de las proteínas con MMTS 200mM (Metanotiosulfonato de metilo) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La digestión se hizo con tripsina (Promega V5117) a una ratio de 1:50 a 37°C durante 16h. Cada digerido se marcó con las siguientes etiquetas químicas:

- 113: Sin infectar: Mock-1
- 114: Sin infectar: Mock-2
- 115: 6hpi-1
- 116: 6hpi-2
- 117: 6hpi-3
- 118: 10hpi-1
- 119: 10hpi-2
- 121: 10hpi-3

Tras 2h de incubación, se hizo un *pool* con todas las muestras y se evaporaron en el concentrador a vacío. Para aumentar la cobertura en el estudio del proteoma, el *pool* se fraccionó mediante cromatografía SCX (*Strong Cation Exchange chromatography*) (ThermoFisher 90008). Para ello, el *pool* se resuspendió en fosfato

monopotásico 10mM (KH_2PO_4), 20% ACN, pH: 3. Seguidamente se sonicó durante 10 minutos (sonicador ultrasonidos) y centrifugó 3 minutos a temperatura ambiente y 18.000g. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se usó ácido fosfórico 0.5M (H_3PO_4) para reducir el pH de la muestra (pH < 3). Como fase móvil se empleó un gradiente de 1mM a 500mM de cloruro de potasio (KCl), obteniéndose 7 fracciones diferentes (25mM, 75mM, 100mM, 125mM, 150mM, 200mM y 250mM). Para purificar y concentrar los péptidos de cada una de ellas se utilizaron puntas C18 Zip Tip Solid Phase Extraction (Millipore ZTSCXS096). Las muestras se secaron usando el concentrador a vacío y se reconstituyeron en 10 μ l de 2% ACN, 0.1% ácido fórmico (FA), 98% agua-MilliQ antes de ser analizadas por espectrometría de masas.

2.2.2. Label-free

Para el análisis proteómico de la fracción nuclear y extracto total de las células U87, se empleó una aproximación libre de marcaje (*Label-free*). Para ello, 15 μ g de extractos nucleares y 20 μ g de extracto total de las células U87 infectadas y sin infectar, se diluyeron con Laemmli buffer (Biorad) y se cargaron en un gel de poliacrilamida (4%-*stacking*; 12.5%-*resolving*) de 1mm de grosor. La electroforesis se paró tan pronto como la muestra entró 3mm en el *resolving*, quedando el proteoma concentrado en la interfase. A continuación se tiñó la banda de proteína con azul de Coomassie, se cortó la banda, y se puso en un tubo nuevo. Seguidamente la banda se destiñó a 40°C usando una solución de ABC 50mM (Bicarbonato de amonio) y 50% ACN, y se deshidrató a la misma temperatura con 100% ACN. Las muestras se redujeron con DTT 10mM (Ditiotreitol) en ABC 100mM durante media hora a 40°C. Posteriormente se añadió IAA 55mM (Iodacetamida) en ABC 100mM para alquilar la muestra durante

media hora a 40°C. Pasado este tiempo, se añadió 100% ACN y se incubó la muestra 5 minutos a 40°C. El siguiente paso fue el lavado de la muestra con ABC 100mM durante 10 minutos y ABC 50mM con 50% ACN durante 5 minutos, todo a 40°C. Para la deshidratación de la banda se usó 100% ACN durante 5 minutos a 40°C y después de eliminarlo, se dejó secar la banda otros 10 minutos a 40°C. El siguiente paso fue la digestión de los 15µg de proteína, que se hizo mediante tripsina (Promega V5117) a una ratio 1:20 a 37°C durante 16h ²³⁴. Posteriormente se procedió a la extracción de los péptidos a temperatura ambiente. Para ello, se añadió a la muestra/banda una solución de 2% ACN, 0.5% FA y se incubó durante 30 minutos. El sobrenadante se recogió en un tubo nuevo Protein LoBind (Eppendorf). De nuevo se añadió a la banda la solución de 2% ACN, 0.5% FA además del mismo volumen de 100% ACN, y se dejó actuar durante media hora. El sobrenadante se recogió en el tubo Protein LoBind. Seguidamente se añadió a la banda 100% ACN y se le dejó actuar 5 minutos. El sobrenadante fue pasado al tubo Protein LoBind, y el proceso se repitió hasta que la banda quedó blanca y seca. Finalmente, la solución con los péptidos digeridos (tubo Protein LoBind) se secó con un concentrador a vacío. Tras este paso, los péptidos se resuspendieron en 10µl de 2% ACN, 0.5% FA, para proceder a la purificación y concentración de la muestra con puntas C18 Zip Tip Solid Phase Extraction (Millipore ZTSCXS096). Después de este paso, las muestras se secaron con un concentrador a vacío, y se reconstituyeron en 10µl de 2% ACN, 0.1% FA, 98% agua-MilliQ antes de ser analizadas en el espectrómetro de masas.

2.2.3. Espectrometría de masas

Antes del análisis con el espectrómetro de masas, los péptidos se separaron mediante cromatografía de fase reversa usando una bomba nanoLC Ultra 1D plus de

Eksigent equipada con una columna de diámetro interno de 75 μ m (Thermo Scientific C18, 0.075 x 250 mm). Previamente, la muestra se concentró en una precolumna de 0.5cm de longitud con un diámetro interno de 100 μ m y empaquetada con la misma química que la columna de separación. Como fase móvil se usaron los tampones A (100% agua, 0.1% FA) y B (100% ACN, 0.1% FA).

En el análisis de la fracción citosólica, el gradiente de la columna se desarrolló en un total de 135 minutos. Primero el gradiente aumentó de 5% de tampón B a 25% en 120 minutos y posteriormente del 25% al 70% en 15 minutos. La columna se equilibró con un 95% de tampón B durante 9 minutos y seguidamente 14 minutos con un 5%. En el caso del análisis de la fracción nuclear, el gradiente de la columna se desarrolló en un total de 240 minutos. En los primeros 210 minutos el porcentaje de tampón B aumentó del 5 al 25% y en los 30 minutos restantes, este aumentó del 25 al 40%. La columna se equilibró con un 95% de tampón B durante 9 minutos y seguidamente 14 minutos con un 5%. Para el análisis del extracto total se empleó un gradiente de 240 minutos. Primero el gradiente aumentó de 5% de tampón B a 30% en 225 minutos. Posteriormente desde el 30% al 70% en 15 minutos. La columna se equilibró con un 95% de B durante 5 minutos y seguidamente 13 minutos con un 5%. Durante todos los procesos, la precolumna estuvo en línea con la columna y el flujo se mantuvo a lo largo del gradiente a 300nl/min.

Después de su elución de la columna, los péptidos fueron analizados en el espectrómetro de masas 5600 Triple-TOF (Sciex) ²³⁵. La adquisición de datos se realizó tras un escaneo en un rango de 350-1250 m/z en 250ms. Los 25 péptidos más abundantes de la fracción citosólica, y los 35 de la fracción nuclear y extracto total, se seleccionaron para su posterior fragmentación. Para los péptidos procedentes de la

fracción citosólica, el tiempo mínimo de acumulación para MS/MS se estableció en 75 milisegundos (ms), lo que dio un ciclo total de 2.1 segundos (seg). Los iones resultantes se escanearon en un rango de 100-1500 m/z y se excluyeron de otra fragmentación durante 15 seg. En el caso de los péptidos procedentes de la fracción nuclear, el tiempo mínimo de acumulación para MS/MS se estableció en 100 ms, dando lugar a un ciclo de 3.8 seg. Los productos iónicos se escanearon en un rango de 230-1500 m/z y se excluyeron de una nueva fragmentación durante 15 seg. Para los péptidos procedentes de extracto total, el tiempo mínimo de acumulación para MS/MS se estableció en 100 ms, lo que dio un ciclo total de 3.8 seg. Los iones resultantes se escanearon en un rango de 100-1500 m/z y se excluyeron de otra fragmentación durante 15 seg. Los datos se adquirieron usando el software Analyst 1.7.1 (Sciex).

2.3. Análisis bioinformático

2.3.1. Identificación y cuantificación de proteínas

Los datos de la fracción citosólica, nuclear y extracto total, se analizaron mediante Protein Pilot™(v.5.0-Sciex), que usó el algoritmo Paragon™ (v.5.0.1) ²³⁶ con las modificaciones más habituales definidas por este, junto con las modificaciones en las cisteínas producidas por MMTS en el caso de las muestras de fracción citosólica. Progroup™ se utilizó para la agrupación de los datos. En la identificación de las proteínas citosólicas se emplearon las bases de datos de Uniprot:

- Fracción citosólica y nuclear (6 y 10hpi): humana (ID: UP000005640, diciembre 2015) y de adenovirus humano tipo 5 (ID: UP000004992, septiembre 2016)
- Extracto total (24 y 48hpi): humana (ID: UP000005640, septiembre 2016) y de adenovirus humano tipo 5 (ID: UP000004992, septiembre 2016)

Para el cálculo del FDR se utilizó un método de ajuste no lineal ²³⁹ usando la base de datos señuelo, obtenida a partir de la base de datos de referencia. Las identificaciones aceptadas fueron aquellas que presentaron un FDR < 1% a nivel de proteína.

En el análisis cuantitativo de la fracción citosólica se utilizó el software Protein Pilot™ (v.5.0-Sciex). Las intensidades de los iones reporteros se corrigieron de acuerdo a las indicaciones de pureza proporcionadas por el fabricante (Sciex). El criterio usado para la identificación de las proteínas requería que al menos uno de sus péptidos hubiese obtenido un *score* superior al 99% de confianza y un FDR del 1% o mejor. Sin embargo se excluyeron de la cuantificación los péptidos a los que no se les había detectado su correspondiente etiqueta iTRAQ, los identificados con una confianza baja (<1%), los que la suma de las ratios señal/ruido de sus picos era <6. Quedaron excluidas de la cuantificación las proteínas que no habían sido identificadas al menos con 2 péptidos únicos. Además, para los valores cuantitativos, se tuvieron exclusivamente en cuenta la cuantificación de los péptidos únicos, excluyendo los comunes a otras isoformas o proteínas de la misma familia proteica.

El análisis cuantitativo de la fracción nuclear y el extracto total se hizo mediante el software Progenesis® LC-MS, Nonlinear Dynamics (ver. 2.0.5556.29015, para la fracción nuclear; ver.4.0.6403.35451, para el extracto total). Para la comparación cuantitativa de las muestras, el software alinea el área cromatográfica de los péptidos de las muestras para compensar las variaciones entre cada una de ellas debido al sistema de separación nanoLC. Para ello los *runs* se alinearon con respecto a uno de referencia, elegido de forma aleatoria por el software, que a su vez proporciona valores de calidad de este alineamiento. Posteriormente se aplicaron otros filtros para

cuantificar las proteínas identificadas. Quedaron excluidas de la cuantificación las proteínas identificadas mediante la base de datos señuelo, las identificadas exclusivamente en base a modificaciones, los potenciales contaminantes y las proteínas que no habían sido identificadas al menos con 2 péptidos únicos.

Los análisis estadísticos para establecer el proteoma diferencial en las fracciones citosólicas y nucleares se hicieron mediante R, mientras que para el análisis del proteoma diferencial de extracto total se utilizó el software Perseus v.1.5.6²⁴⁰. Se consideraron proteínas diferenciales aquellas cuya tasa de cambio (TC) fue igual o mayor del 30% ($TC < 0.77$ o > 1.3) y su $pVal < 0.05$. Así las proteínas con una $TC > 1.3$ se consideraron sobre-expresadas, mientras que las que tenían una $TC < 0.77$ se consideró que disminuían sus niveles de expresión por efecto de la infección adenoviral.

2.3.2. Funcionalidad

Con el fin de comprender las implicaciones biológicas que conlleva la infección de las células de glioblastoma U87 con el adenovirus Delta-24-RGD, se analizó el proteoma diferencial de estas células durante la replicación del ADN viral (6 y 10hpi) y el inicio del proceso autofágico (24 y 48hpi) mediante la herramienta bioinformática Ingenuity® Pathway Analysis (IPA) (QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity). Este software contiene información curada de bases de datos de origen experimental y predictivo. De esta forma, IPA permite la caracterización de funciones, rutas de señalización y redes de interacción representadas en el set de datos analizado. El software genera valores de significación ($pVal$) de cada función biológica o molecular representada en función del test de Fisher ($p \leq 0.05$), y presenta cada uno de estos datos de forma jerárquica.

2.4. Inmunodetección (Western-blot)

Mediante Western-blot (WB) se validaron e hicieron los análisis funcionales de diferentes rutas de señalización alteradas durante la replicación del ADN adenoviral (3-10hpi) y durante la autofagia (24 y 48hpi). Se utilizaron los geles 4-15% Criterion™ TGX Stain-Free™ (#5678085, BioRad), donde se cargaron 5µg de proteína de cada muestra. Estos geles permiten la visualización de las proteínas una vez resueltas en el gel o transferidas a la membrana sin necesidad de tinción. Una vez que las proteínas se resolvieron a lo largo del gel, las proteínas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa con el Trans-blot Turbo (BioRad) en 7 minutos a una constante de 2.5A y 25V. Como control de carga, se utilizó tanto la digitalización de los geles *stain-free* como la tinción con Ponceau. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (**Tabla 5**), con 5% de leche o albúmina (BSA), y a la dilución correspondiente según las instrucciones del fabricante. Para los anticuerpos secundarios, se usó una dilución 1:5000.

Nombre de la proteína	Origen	Tipo	Fabricante
Anti- p38 MAPK fosforilada (Thr180/Tyr182)	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
Anti-AKT	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-AKT fosforilada (Ser473)	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-c JUN	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-c JUN fosforilada (Ser73)	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-c-SRC	Ratón	Monoclonal	Santa Cruz
Anti-c-SRC fosforilada (Tyr419)	Ratón	Monoclonal	Santa Cruz
Anti-E1A	Conejo	Policlonal	Santa Cruz
Anti-ERK1/2	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
Anti-ERK1/2 fosforilada (Thr202/Tyr204)	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-GAPDH	Ratón	Monoclonal	Calbiochem
Anti-GSK3 alfa/beta	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
Anti-GSK3 alfa/beta fosforilada (Ser21/9)	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
Anti-H3 dimetilada (Lys9)	Conejo	Policlonal	Merck
Anti-IkB alfa	Ratón	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-MEK1/2	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-MEK1/2 fosforilada (Ser217/221)	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-NFkB p65	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-NFkB p65 fosforilada (Ser536)	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-nmt55/p54nrb	Conejo	Policlonal	Abcam
Anti-OXSR1	Conejo	Policlonal	Abcam
Anti-p38 MAPK	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
Anti-PDK1	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
Anti-PDK1 fosforilada (Ser241)	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
Anti-PKAc	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
Anti-PKAc fosforilada (Thr197)	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-PKC fosforilada (Thr514)	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
Anti-PKC pan	Conejo	Policlonal	Sigma Aldrich
Anti-PLC gamma	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
Anti-PLC gamma fosforilada (Tyr783)	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-PP1 alfa	Ratón	Monoclonal	Santa Cruz
Anti-PP1 alfa fosforilada (Thr320)	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
Anti-PP2A alfa/beta	Conejo	Monoclonal	Abcam
Anti-Prohibitin 1	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
Anti-Proteína de fibra	Ratón	Monoclonal	ThermoFisher Scientific
Anti-SAPK/JNK	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
Anti-SAPK/JNK fosforilada (Thr183/Y185)	Ratón	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-STAT3	Ratón	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-STAT3 fosforilada (Tyr705)	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling

Tabla 5. Anticuerpos empleados. Se indica el nombre, la especie en la que se ha producido, el tipo de anticuerpo y el fabricante que lo comercia.

La detección de las proteínas se hizo mediante quimioluminiscencia, incubando las membranas con un sustrato de amplificación de quimioluminiscencia (ECL

-Enhanced chemiluminescence) (Perkin Elmer) y el sistema Chemidoc™MP Imaging System (BioRad). Para medir las intensidades de las bandas de proteínas se usó el software Image Lab v.5.2 (BioRad). Posteriormente estas intensidades se normalizaron con GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) o proteína total en cada muestra del gel.

2.5. Arrays de proteínas

2.5.1. Análisis del secretoma

El array empleado para el análisis de citoquinas y factores de crecimiento fue el Human Cytokine Antibody array (Abcam ab133998). Este permite analizar la presencia y los niveles de expresión de 80 citoquinas y factores de crecimiento humanos de manera simultánea (**Tabla 6**). En el presente estudio, se usó este kit para chequear el secretoma de las células U87 durante la replicación del ADN adenoviral (3, 6, 10hpi) y durante el inicio de la autogafia (24 y 48hpi), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Se incubó 1ml de medio (previamente filtrado y sin diluir) de cada una de las muestras, durante 16 horas a 4°C y en agitación, sobre membranas con los anticuerpos específicos de las citoquinas y factores de crecimiento. Posteriormente se lavó cada membrana y se incubó, durante 16h horas a 4°C en agitación, con un coctel de anticuerpos con una biotina conjugada y específicos contra las proteínas de interés. De nuevo las membranas se lavaron y se incubaron con estreptavidina, que se une a la biotina de los anticuerpos anteriores, durante 16 horas a 4°C en agitación. Tras este paso, las membranas se lavaron y las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia al añadir un buffer de detección que reaccionó con la estreptavidina. Las imágenes se obtuvieron mediante Chemidoc™MP Imaging System (Biorad), y con el software ImageLab 5.2 (Biorad) se cuantificaron los niveles de

expresión de las distintas citoquinas y factores de crecimiento. Los valores cuantitativos seleccionados fueron los volúmenes ajustados (*Adjust Volume*), donde el software elimina los valores de cuantificación que aporta el fondo (*background*) que se obtiene al revelar el array.

ENA-78	MCP-1	VEGF-A	IGFBP-3
GCSF	MCP-2	PDGF-BB	IGFBP-4
GM-CSF	MCP-3	Leptin	IL-16
GRO	MCSF	BDNF	IP-10
GRO-alpha	MDC	BLC	LIF
I-309	MIG	Ck β 8-1	LIGHT
IL-1alpha	MIP-1beta	Eotaxin	MCP-4
IL-1beta	MIP-1delta	Eotaxin-2	MIF
IL-2	RANTES	Eotaxin-3	MIP-3 alpha
IL-3	SCF	FGF-4	NAP-2
IL-4	SDF-1	FGF-6	NT-3
IL-5	TARC	FGF-7	NT-4
IL-6	TGF-beta1	FGF-9	Osteopontin
IL-7	TNF-alpha	Flt-3 Ligand	Osteoprotegerin
IL-8	TNF-beta	Fractalkine	PARC
IL-10	EGF	GCP-2	PLGF
IL-12 p40/p70	IGF-I	GDNF	TGF-beta2
IL-13	Angiogenin	HGF	TGF-beta3
IL-15	Oncostatin M	IGFBP-1	TIMP-1
IFN-gamma	Thrombopoietin	IGFBP-2	TIMP-2

Tabla 6. Citoquinas y factores de crecimiento analizados en el estudio. *Human Cytokine Antibody array* (Abcam ab133998).

2.5.2. Análisis de la fosforilación de quinasas y factores de transcripción

El array empleado para el análisis de la fosforilación de quinasas y factores de transcripción de las células de glioblastoma U87 a diferentes tiempos tras la infección con el adenovirus Delta-24-RGD fue el Human Phospho-Kinase array (R&D Systems ARY003B). Este array permite detectar simultáneamente los niveles de fosforilación de

43 sitios de fosforilación de diferentes quinasas y factores de transcripción humanos

(Tabla 7).

Nombre	Residuo fosforilado	Nombre	Residuo fosforilado	Proteína total
p38 α	T180/Y182	STAT3	S727	β -Catenin
ERK1/2	T202/Y204 T185/Y187	STAT3	Y705	HSP60
JNK 1/2/3	T183/Y185 T221/Y223	STAT5a/b	Y694/Y699	
GSK-3 α/β	S21/S9	STAT5a	Y694	
EGF R	Y1086	STAT5b	Y699	
MSK1/2	S376/S360	STAT6	Y641	
AMPK α 1	T183	p70 S6 Kinase	T421/S424	
Akt 1/2/3	S473	RSK1/2/3	S380/S386/S377	
Akt 1/2/3	T308	eNOS	S1177	
TOR	S2448	Fyn	Y420	
CREB	S133	Yes	Y426	
HSP27	S78/S82	Fgr	Y412	
AMPK α 2	T172	p27	T198	
p70 S6 Kinase	T389	PLC- γ 1	Y783	
p53	S46	Hck	Y411	
p53	S392	Chk-2	T68	
p53	S15	FAK	Y397	
c-Jun	S63	PDGF R β	Y751	
SRC	Y419	WNK1	T60	
Lyn	Y397	PYK2	Y402	
Lck	Y394	PRAS40	T246	
STAT2	Y689			

Tabla 7. Fosfoquinasas y factores de transcripción analizados en el estudio. Nombres y residuos de fosforilación de diferentes quinasas y factores de transcripción *targets* del kit *Human Phospho-Kinase array* (R&D Systems ARY003B).

Se recogieron triplicados de 3×10^6 de células por condición (0, 5, 15 y 30mpi) en tampón de lisis con inhibidores (urea 6M, tiourea 2M, inhibidores de proteasas y fosfatasa) y se congelaron en nitrógeno líquido. Posteriormente se descongelaron, sonicaron y se centrifugaron 1 hora a 15°C y 20.000g. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se determinó la concentración de proteínas mediante el ensayo Bradford (Biorad). El kit requiere entre 200-600 μ g de proteína por cada set

(Membrana A y B). El volumen de lisado de cada condición fue dividido en 2 volúmenes idénticos y concentrado mediante Amicon Ultra-0.5ml 10K (Millipore UFC501096). Previo paso de bloqueo de las membranas, la muestra concentrada se diluyó en 2 ml de buffer de bloqueo y se incubó sobre las membranas 16h a 4°C en agitación. Pasado este tiempo las membranas se lavaron e incubaron 2h a temperatura ambiente y agitación con anticuerpos con una biotina conjugada, y específicos contra las proteínas de interés. De nuevo las membranas se lavaron e incubaron con estreptavidina a temperatura ambiente y agitación durante media hora. Finalmente tras otro paso de lavado, las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia al añadir un buffer de detección que reaccionó con la estreptavidina. Las imágenes se obtuvieron mediante Chemidoc™MP Imaging System (Biorad). Los niveles de fosforilación de cada una de las quinasas representadas en el array se cuantificaron con el software ImageLab 5.2 (Biorad). Los valores cuantitativos seleccionados fueron los volúmenes ajustados (*Adjust Volume*).

2.5.3. Análisis estadístico de los arrays de proteínas

Para poder comparar los niveles de fosforilación de las distintas quinasas, y los niveles de expresión de las distintas citoquinas y factores de crecimiento entre condiciones, los datos se normalizaron usando la siguiente fórmula:

$$X(Ny) = X(y) * P1/P(y)$$

$X(Ny)$ = Intensidad de la proteína “X” normalizada en el array “Y”

$X(y)$ = Intensidad de la proteína “X” en el array “Y”

$P1$ = Media de las intensidades de los controles positivos del array de referencia

$P(y)$ = Media de las intensidades de los controles positivos del array “Y”

Para el análisis estadístico de las proteínas diferenciales se empleó el software Perseus 1.5.6 ²³⁸. La matriz de datos normalizados mediante la anterior fórmula se importó al software Perseus 1.5.6, donde transformaron los datos a Log2 con el fin de trabajar con ellos y representarlos en diferentes gráficos de manera más sencilla. Posteriormente se realizó el test estadístico (*T-test*), donde el criterio empleado para considerar a las proteínas diferenciales fue la significación estadística ($pVal < 0.05$).

A continuación se muestra un esquema (**Figura 6**) que resume los diferentes enfoques proteómicos utilizados para caracterizar el mecanismo de acción del adenovirus Delta-24-RGD en las células de glioblastoma.

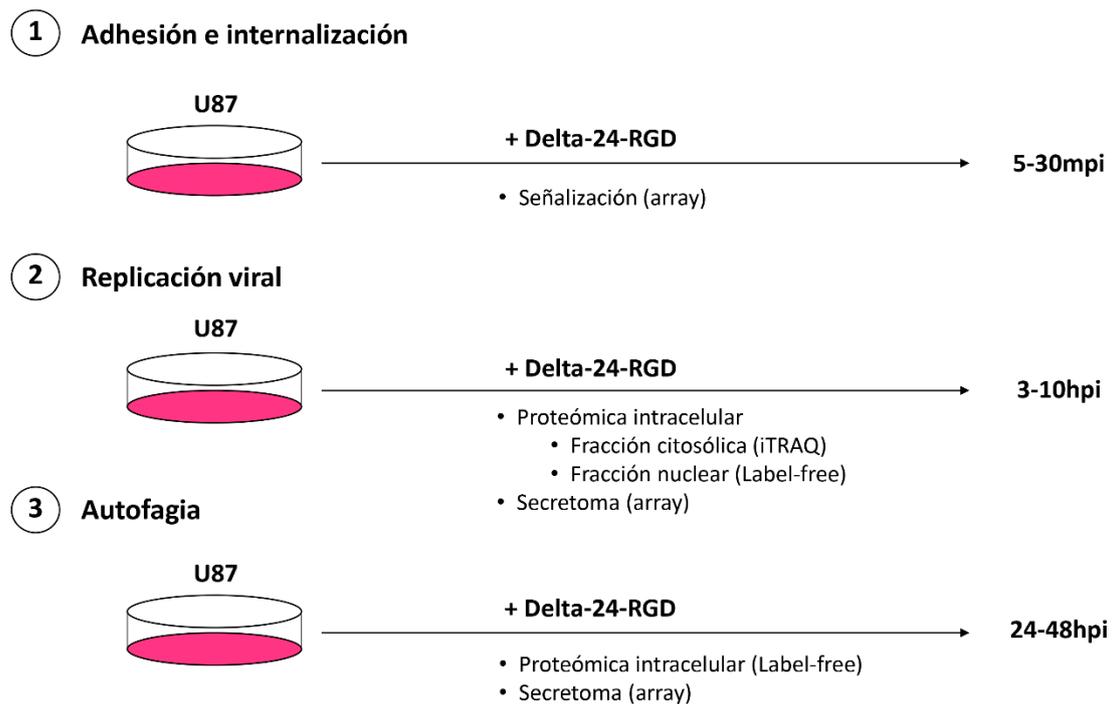


Figura 6. Esquema global de los análisis proteómicos que se llevaron a cabo durante la internalización del adenovirus Delta-24-RGD, la replicación de su ADN y el inicio del proceso autofágico en las células de glioblastoma U87.

Resultados

1. Cambios en el fosfoproteoma de las células de glioblastoma U87 tras la adhesión e internalización del adenovirus Delta-24-RGD

Con el objeto de identificar las rutas de señalización que se alteran por la adhesión e internalización del adenovirus Delta-24-RGD en células de glioblastoma, se analizó mediante un *array* 43 sitios de fosforilación de quinasas y factores de transcripción (**Tabla 7**) a los 5, 15 y 30mpi. Durante estos tiempos se produjo una disminución de los niveles de fosforilación de manera tiempo dependiente de rutas de supervivencia específicas (Akt, GSK-3, ERK1/2, p38 MAPK y MSK1/2, entre otras) (**Figuras 7 y 8**). Así mismo, los factores de transcripción p53, CREB (*Cyclic AMP-responsive element-binding protein*), STAT-2 (*Signal transducer and activator of transcription-2*) y STAT5b también disminuyeron su actividad significativamente a los 30mpi. Sin embargo c-Jun (*Transcription factor AP-1*) fue el único factor de transcripción que aumentó sus niveles de fosforilación activadora en los primeros 15mpi. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de fosforilación del resto de proteínas analizadas (**Tabla 7**).

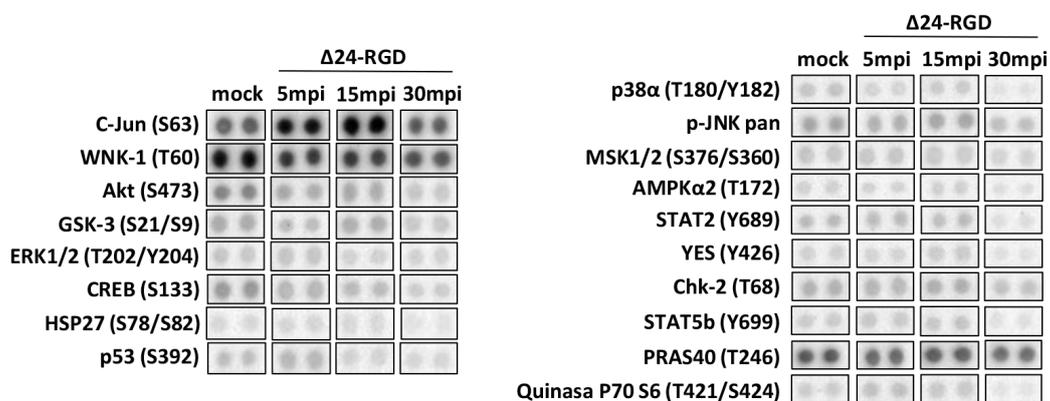


Figura 7. Array de fosfoquinasas diferenciales durante la adhesión e internalización del adenovirus Delta-24-RGD en las células de glioblastoma U87. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

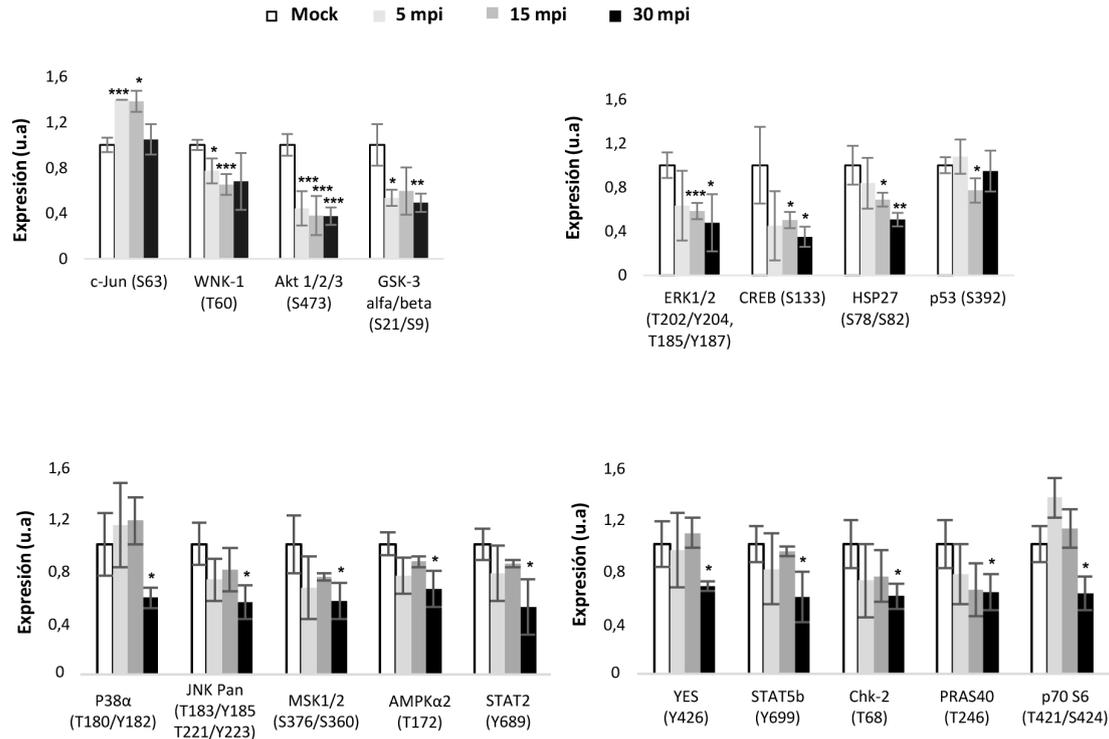


Figura 8: Cambios en la fosforilación de quinasas y factores de transcripción como respuesta a la infección del adenovirus Delta-24-RGD en los primeros 30 mpi.

2. Alteraciones en el proteoma de las células de glioblastoma durante la replicación del ADN del adenovirus oncolítico Delta-24-RGD

2.1. Caracterización de los cambios proteostáticos mediante proteómica subcelular

Para caracterizar las alteraciones proteómicas inducidas por el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD en las células de glioblastoma durante la replicación del ADN adenoviral, se analizó por separado el proteoma citosólico y nuclear de células U87 a las 6 y 10hpi. Un paso previo fue la comprobación de que el protocolo de fraccionamiento funcionaba adecuadamente. A simple vista se aprecia que el perfil del proteoma obtenido es muy diferente entre la fracción citosólica y nuclear (**Figura 9A**). Mediante WB se analizó la presencia de la proteína citosólica OXSR1 (*Serine/threonine protein kinase OSR1*), la mitocondrial PHB1 (*Prohibitin 1*) y la enzima glicolítica GAPDH,

además de la proteína nuclear histona dimetilada H3. Los controles de calidad realizados demostraron una óptima eficacia a la hora de obtener ambas fracciones subcelulares **Figura 9B**.

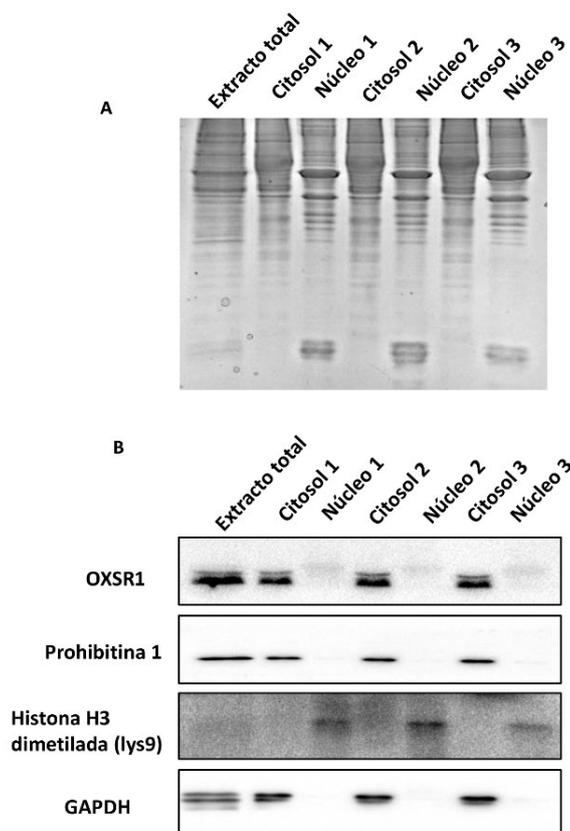


Figura 9: Validación del protocolo de enriquecimiento de la fracción citosólica y nuclear. A) Electroforesis del extracto total, y las fracciones citosólicas y nucleares (gel *stain-free*). B) WBs de las proteínas citosólicas (OXSR1, PHB1 y GAPDH) y de la nuclear (histona dimetilada H3 Lys9).

El estudio de los proteomas citosólico y nuclear se realizó mediante espectrometría de masas empleando dos metodologías de cuantificación complementarias. La fracción citosólica de las muestras fue marcada mediante iTRAQ pero debido a la escasez de muestra, la fracción nuclear no se marcó y se estudió mediante *label-free*. Del total de las proteínas cuantificadas (1397), 202 (6hpi) y 286 (10hpi) cambiaron sus niveles de expresión por la acción del adenovirus Delta-24-RGD (**Figura 10A**). Tal como se observa en las **Figuras 10B, 11** y **Figura suplementaria 1**, la mayoría de proteínas alteradas pertenecían a la fracción nuclear. Por otro lado, se

observó una alteración temprana de los componentes proteicos de las uniones adherentes y de las vesículas extracelulares, lo que sugiere cambios en la plasticidad de las células tumorales.

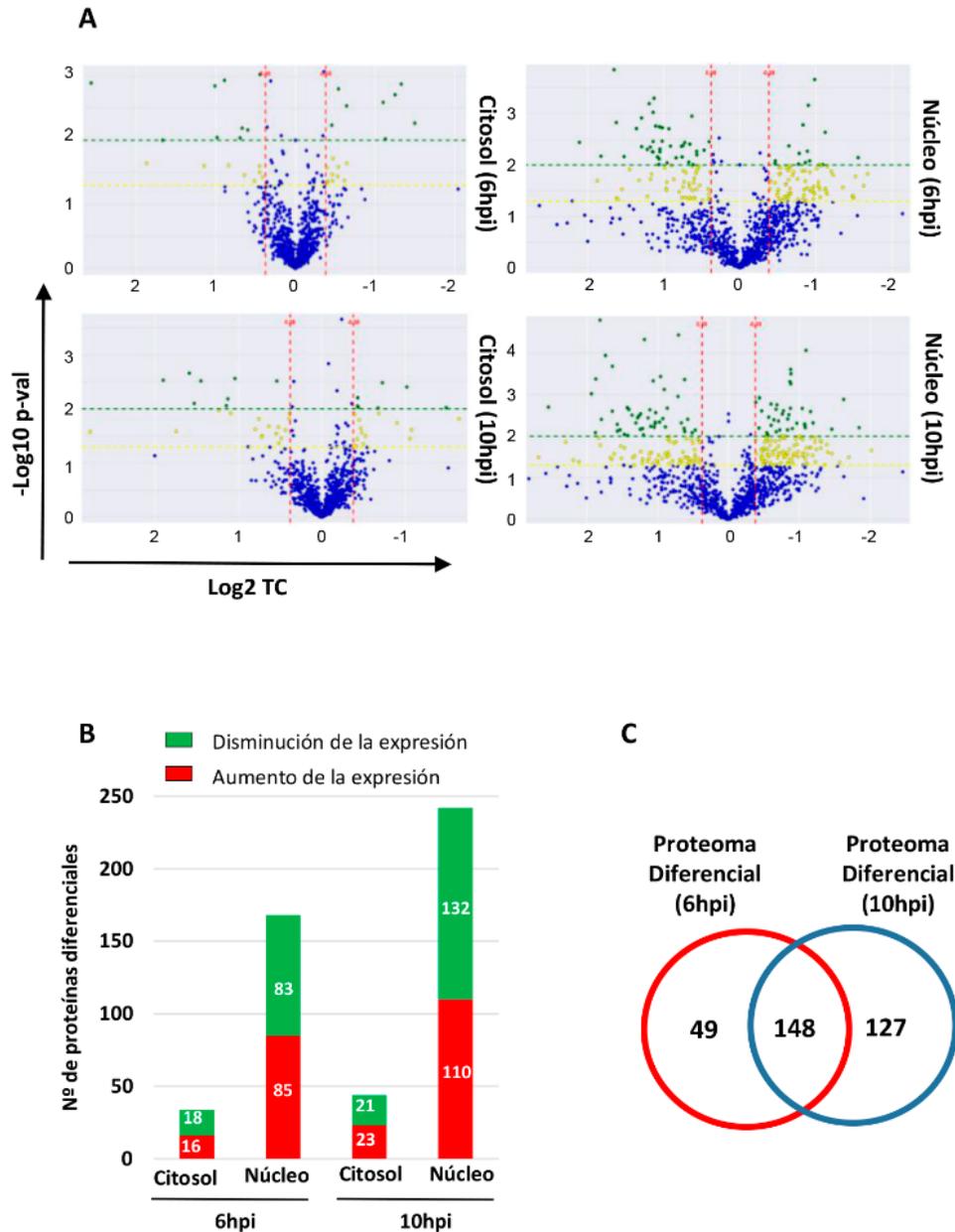


Figura 10: Modulación del proteoma de las células de glioblastoma U87 durante la replicación del ADN adenoviral. A) *Volcano plots* donde se representan las tasa de cambio (TC) y la significación estadística (pVal) de las proteínas de las fracciones citosólicas y nucleares a las 6 y 10hpi. Las proteínas con $p\text{Val} > 0.05$ y/o $\text{TC} < 30\%$ se consideraron no diferenciales (coloreadas en azul). Las proteínas con una $\text{TC} > 30\%$ se encuentran representadas en amarillo si el $p\text{Val} < 0.05$, y en verde si el $p\text{Val} < 0.01$. B) Histograma que representa el proteoma diferencial en cada fracción subcelular a las 6 y 10hpi. En verde, están representadas las proteínas que disminuyen significativamente su nivel de expresión, y en rojo las que lo aumentan. C) Diagrama de Venn de las proteínas diferenciales a las 6 y 10hpi.

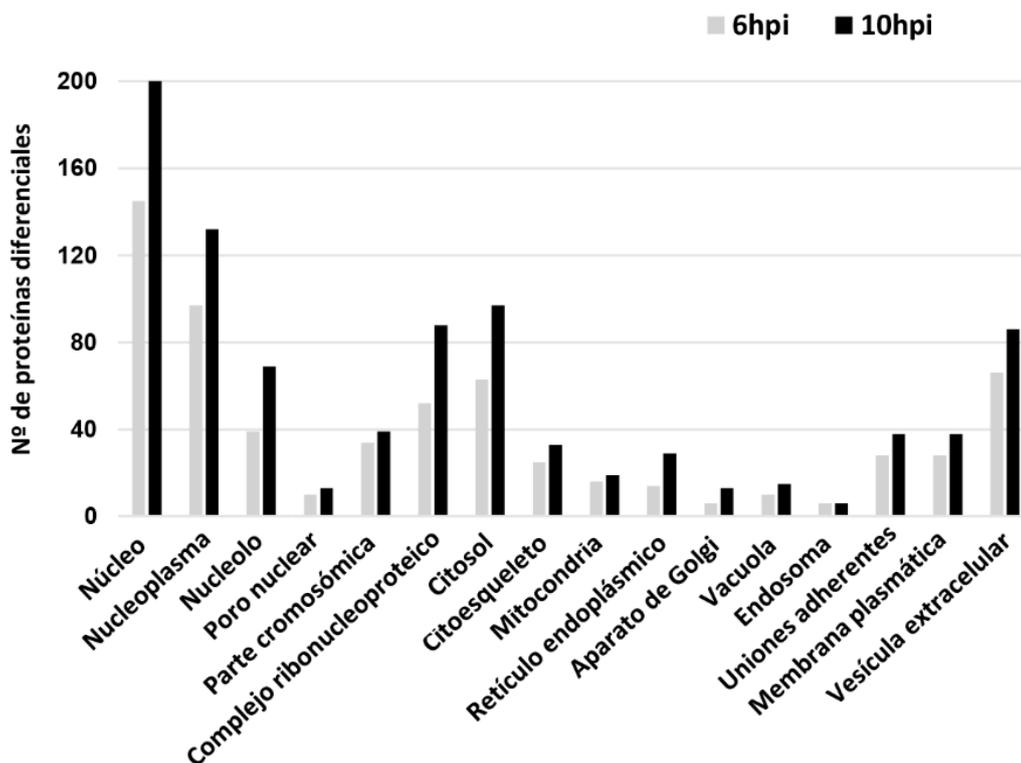


Figura 11: Localización de las proteínas diferenciales a las 6 y 10hpi utilizando la herramienta software DAVID ²³⁹.

En la **Tabla 8** se muestran las proteínas con mayores tasas de cambio con respecto al control. NONO (*Non-POU domain-containing octamer-binding protein*) es una proteína nuclear reguladora de la transcripción que participa en la regulación de la respuesta inmune innata mediada por ADN-virus ²⁴⁰. Con el fin de validar las identificaciones y cuantificaciones obtenidas mediante espectrometría de masas, se analizó la expresión de NONO en la fracción nuclear y extracto total de estas células. Como se puede observar en la **Figura 12**, el adenovirus Delta-24-RGD indujo la expresión de la proteína NONO a las 6hpi, validando parcialmente los datos obtenidos mediante espectrometría de masas.

Gen	Proteínas nucleares (6hpi)			Gen	Proteínas citosólicas (6hpi)		
	Descripción	pVal	TC		Descripción	pVal	TC
F2	Prothrombin	0,015	0,31	HIST1H4A	Histone H4	0,005	0,35
SSRP1	FACT complex subunit SSRP1	0,026	0,32	H3F3B	Histone H3 (Fragment)	0,001	0,40
SUPT16H	FACT complex subunit SPT16	0,007	0,34	HIST1H1E	Histone H1.4	0,002	0,42
SCAF1	Splicing factor, arginine/serine-rich 19	0,017	0,35	HIST1H1B	Histone H1.5	0,010	0,46
MTA1	Metastasis-associated protein MTA1	0,044	0,36	HIST1H2BK	Histone H2B type 1-K	0,003	0,47
HIST1H1C	Histone H1.2	0,040	0,36	ERH	Enhancer of rudimentary homolog	0,023	0,64
HIST1H1B	Histone H1.5	0,040	0,36	SHMT2	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	0,003	0,64
H2AFY	Core histone macro-H2A.1	0,027	0,39	H2AFV	Histone H2A.V	0,043	0,65
RSL24D1	Probable ribosome biogenesis protein RLP24	0,016	0,43	SFPQ	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	0,002	0,69
UBTF	Nucleolar transcription factor 1	0,013	0,43	SQRDL	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	0,026	0,69
RFC2	Replication factor C subunit 2	0,012	2,73	PSMD9	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	0,038	1,33
EIF3E	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	0,007	2,87	HDGF	Hepatoma-derived growth factor	0,025	1,37
EIF3L	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	0,030	2,93	TOMM70	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	0,043	1,43
ARID2	AT-rich interactive domain-containing protein 2	0,047	3,03	SNX6	Sorting nexin 6, isoform CRA_b	0,007	1,52
EIF3H	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	0,044	3,07	A2M	Alpha-2-macroglobulin	0,006	1,59
RACK1	Receptor of activated protein C kinase 1	0,002	3,08	LTF	Lactotransferrin	0,001	1,86
G3BP1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	0,000	3,14	NASP	Nuclear autoantigenic sperm protein	0,010	3,18
CPSF7	Cleavage and polyadenylation-specificity factor subunit 7 (Fragment)	0,007	3,54	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein (Fetuin-A)	0,023	3,66
SRSF2	Serine/arginine-rich-splicing factor 2 (Fragment)	0,020	3,66				
NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	0,004	4,31				

Gen	Proteínas nucleares (10hpi)			Gen	Proteínas citosólicas (10hpi)		
	Descripción	pVal	TC		Descripción	pVal	TC
RRP7A	Ribosomal RNA-processing protein 7 homolog A	0,022	0,25	HIST1H2BK	Histone H2B type 1-K	0,004	0,49
HIST1H1C	Histone H1.2	0,006	0,28	HIST1H4A	Histone H4	0,015	0,32
F2	Prothrombin	0,032	0,31	H3F3B	Histone H3 (Fragment)	0,010	0,35
H2AFY	Core histone macro-H2A.1	0,001	0,32	HIST1H1E	Histone H1.4	0,024	0,47
SCAF1	Splicing factor, arginine/serine-rich 19	0,043	0,34	HIST1H1B	Histone H1.5	0,036	0,48
ARPC4	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	0,026	0,36	SHMT2	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	0,018	0,53
IMP3	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP3	0,007	0,36	SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor 1	0,003	0,60
NUP50	Nuclear pore complex protein Nup50	0,025	0,38	AKAP2	A-kinase anchor protein 2	0,012	0,62
UTP6	U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog	0,016	0,38	SUPT16H	FACT complex subunit SPT16	0,010	0,63
SSRP1	FACT complex subunit SSRP1	0,049	0,39	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	0,032	0,69
NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	0,003	3,12	RPL23	60S ribosomal protein L23	0,015	1,31
RRBP1	Ribosome-binding protein 1	0,033	3,18	DNAJC8	DnaJ homolog subfamily C member 8	0,025	1,35
NMT1	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	0,016	3,51	KYNU	Kynureninase	0,035	1,40
RACK1	Receptor of activated protein C kinase 1	0,000	3,52	A2M	Alpha-2-macroglobulin	0,022	1,43
ANXA2	Annexin A2	0,011	3,56	RPN2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	0,003	1,45
RFC2	Replication factor C subunit 2	0,008	3,69	CNDP2	Cytosolic non-specific dipeptidase	0,029	1,46
ARID2	AT-rich interactive domain-containing protein 2	0,042	4,33	PSMD9	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	0,021	1,55
EIF3F	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	0,038	4,58	HDGF	Hepatoma-derived growth factor	0,033	1,65
PDCD6	Programmed cell death protein 6	0,014	4,93	LETM1	LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1, mitochondrial	0,003	2,73
RPS15	40S ribosomal protein S15	0,032	6,43	NASP	Nuclear autoantigenic sperm protein	0,026	3,36

Tabla 8: Proteínas con mayores tasas de cambios en las fracciones citosólicas y nucleares de las células de glioblastoma U87 a las 6 y 10hpi con el adenovirus Delta-24-RGD. El listado completo de proteínas diferenciales se encuentra en las Tablas suplementarias 3 y 4.

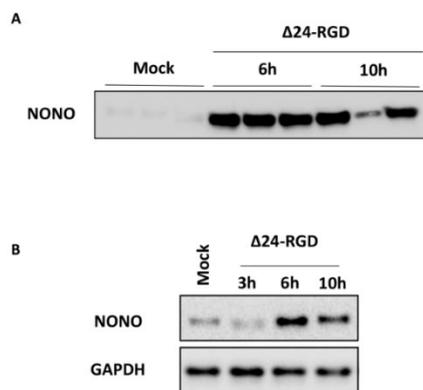


Figura 12: Cambios en la expresión de NONO durante la infección temprana de las células de glioblastoma U87 con el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD. WBs de A) fracción nuclear y B) extracto total de las células de glioblastoma U87 infectadas con el adenovirus Delta-24-RGD.

2.2. Estudio de las alteraciones funcionales producidas por el adenovirus Delta-24-RGD en las células de glioblastoma

Con el fin de entender el significado biológico de las alteraciones tempranas producidas por la infección con el adenovirus Delta-24-RGD, se utilizó la herramienta bioinformática IPA. Este software permitió explorar las redes de interacción entre los componentes proteicos que se ven alterados durante la infección. Este enfoque hizo posible:

- Dilucidar la función biológica y el contexto molecular de las proteínas celulares alteradas en cada uno de los tiempos.
- Establecer un marco para mapear la potencial interacción entre proteínas alteradas y módulos de red durante la infección.
- Definir posibles reguladores causales de las redes dependientes del tiempo, que pueden considerarse potenciales dianas para modular la infección del adenovirus Delta-24-RGD en las células de glioma.

Se analizó el proteoma alterado común a las 6 y 10hpi (148 proteínas) (**Figura 10C**). Las redes de interacción entre estas proteínas revelaron que el adenovirus Delta-24-RGD impactó en redes de señalización específicas como: la señalización de RAN (*GTP-binding nuclear protein RAN*) (pVal: 2.08E-6), el control de la replicación cromosómica en el ciclo celular (pVal: 2.99E-6), y la señalización del factor de transcripción EIF2 (pVal: 7.6E-10). Estos datos indicaron una alteración progresiva en el transporte entre el citosol y el núcleo mediante el complejo del poro nuclear (NPC), cambios en la replicación del ADN (pVal: 2.7E-8), la transcripción (pVal: 7.7E-7) y la traducción del RNAm (pVal: 4.1E-11) (**Figura 13**).

Además del alto número de proteínas y funciones biológicas alteradas a las 6 y 10hpi, existen procesos biológicos exclusivamente alterados en uno de los tiempos analizados. A las 6hpi se produjeron cambios de la morfología, diferenciación y adhesión celular, mientras que a las 10hpi se dieron alteraciones en la parada en la progresión del ciclo celular, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la respuesta antiviral (**Figura 14**).

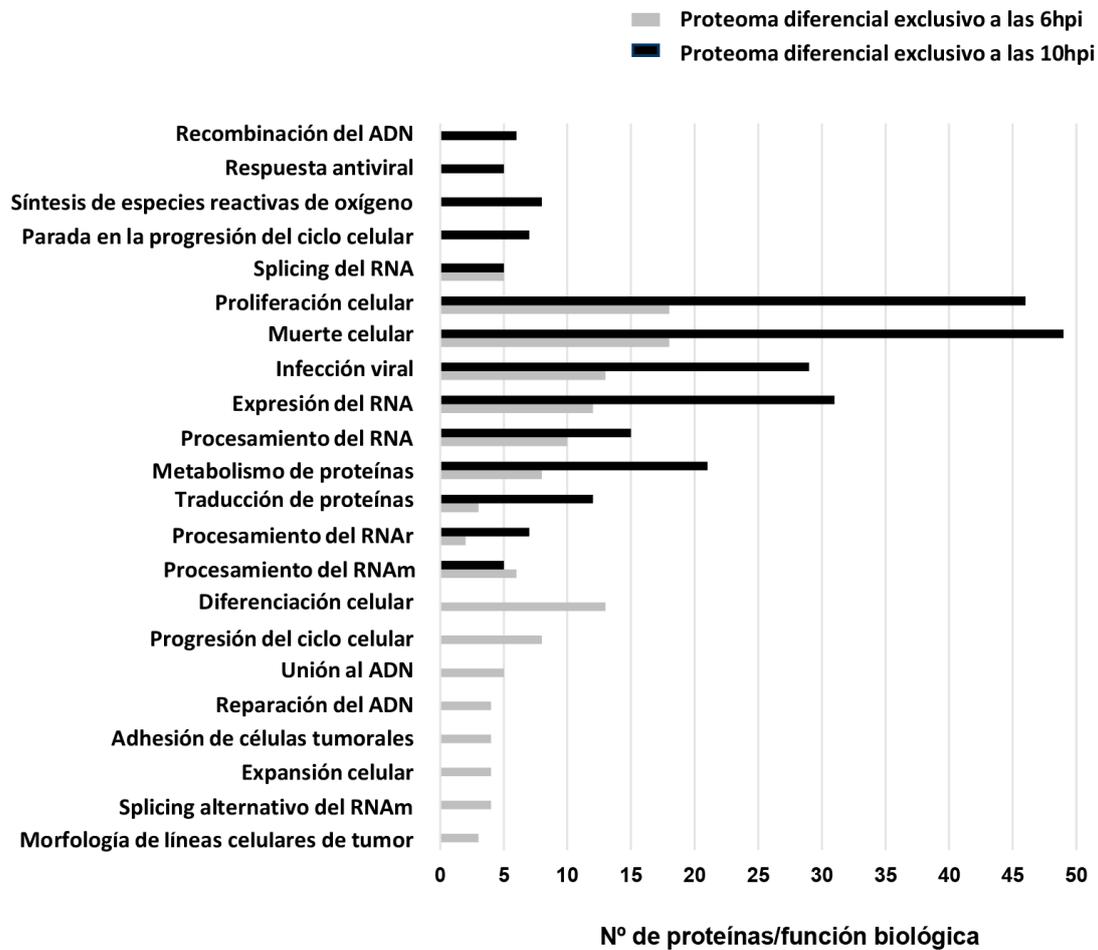


Figura 14. Representación de los procesos y funciones biológicas en las que participan las proteínas diferenciales a las 6 y 10hpi.

2.3. Moduladores de la alteración proteómica inducida por el adenovirus Delta-24-RGD

Con el objeto de comprender qué actividades biológicas son las responsables de los cambios en el proteoma celular tras la infección, se realizó un análisis predictivo de reguladores de la expresión de estas proteínas (*upstream regulators*) mediante IPA. Los reguladores sugeridos fueron STAT3 y JUN (Figura 15A). De esta manera, se monitorizó su perfil de activación durante las primeras horas posteriores a la infección. Como se aprecia en la Figura 15B, ambos factores de transcripción se encontraron inhibidos transitoriamente a las 3 y 10hpi.

A

Reguladores de la expresión	p-val	Moléculas alteradas en las células infectadas con el Delta-24-RGD
6 hpi		
STAT3	6,68E-03	A2M,AHSG,CDK1,COL1A1,CTS8,LTF,PML,SERPINE1,TFPI2,USP7
JUN	4,56E-04	A2M,CAPN2,CDK1,COL1A1,FUS,HMGA1,HNRNPA2B1,LGALS3,SERPINE1,SRSF2,TNC
10 hpi		
JUN	2,64E-04	A2M,ANXA2,CAPN2,CDK1,COL1A1,FUS,HMGA1,HNRNPA2B1,LGALS3,S100A10,SERPINE1,SF3B3,TNC,YWHAG

B

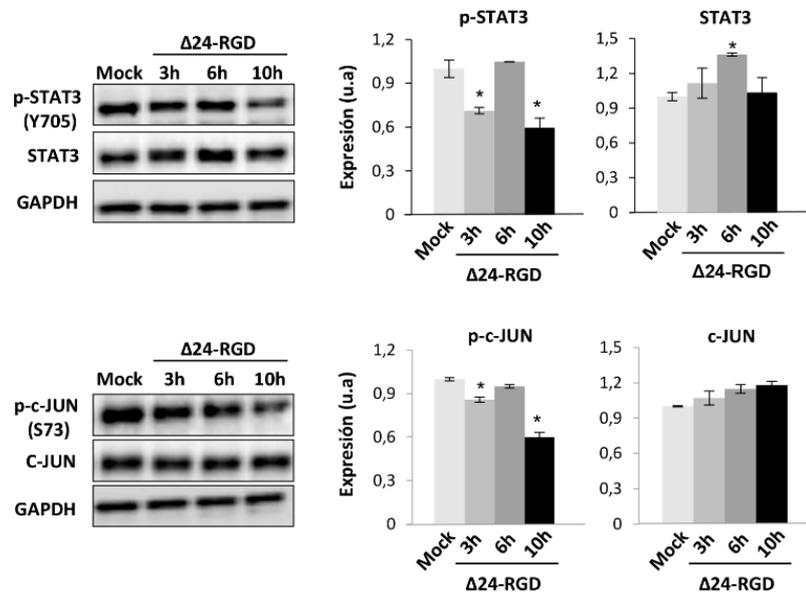


Figura 15: Perfiles de activación de STAT3 y c-Jun durante la replicación del material genético del adenovirus Delta-24-RGD en las células de glioblastoma U87. A) Reguladores propuestos por el software IPA. B) Niveles de expresión y fosforilación específica de STAT3 y c-Jun a las 3, 6 y 10hpi. Las muestras de los WBs son representativas de tres experimentos independientes donde la carga equitativa de los geles se evaluó mediante Ponceau y las intensidades de las bandas se normalizaron por la GAPDH. *(pVal<0.05)

Otro factor de transcripción, NFκB (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), propuesto como posible regulador de los cambios en la expresión de algunas proteínas a las 6hpi en las redes de IPA (**Figura 16**), aumentó sus niveles de fosforilación en la Ser536 a las 6hpi (**Figura 17**), lo que sugiere una activación transitoria de este factor de transcripción. A su vez la proteína PKC (*Protein kinase C*), interconectada con algunas proteínas del proteoma diferencial a 10hpi (**Figura 18**), incrementó sus niveles de activación a 6hpi (**Figura 19**), posiblemente debido a un aumento de su expresión, la cual disminuyó posteriormente.

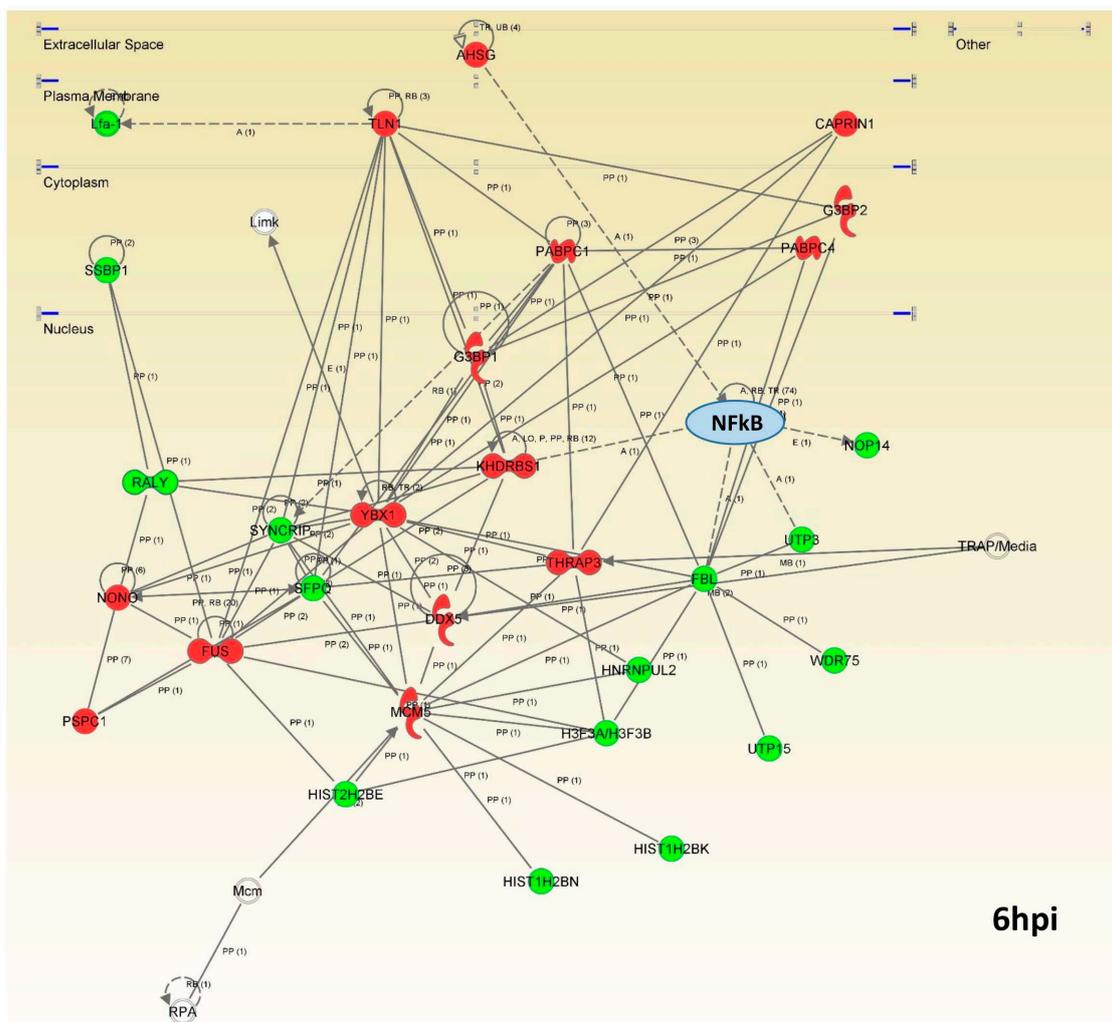


Figura 16: Red de interacción de proteínas diferenciales a las 6hpi donde NFκB se sugiere como interactivo y proteína potencialmente alterada. En las redes de interacción, en rojo están representadas las proteínas que aumentan sus niveles respecto al control (mock) y en verde las que los disminuyen. IPA Network score: 62

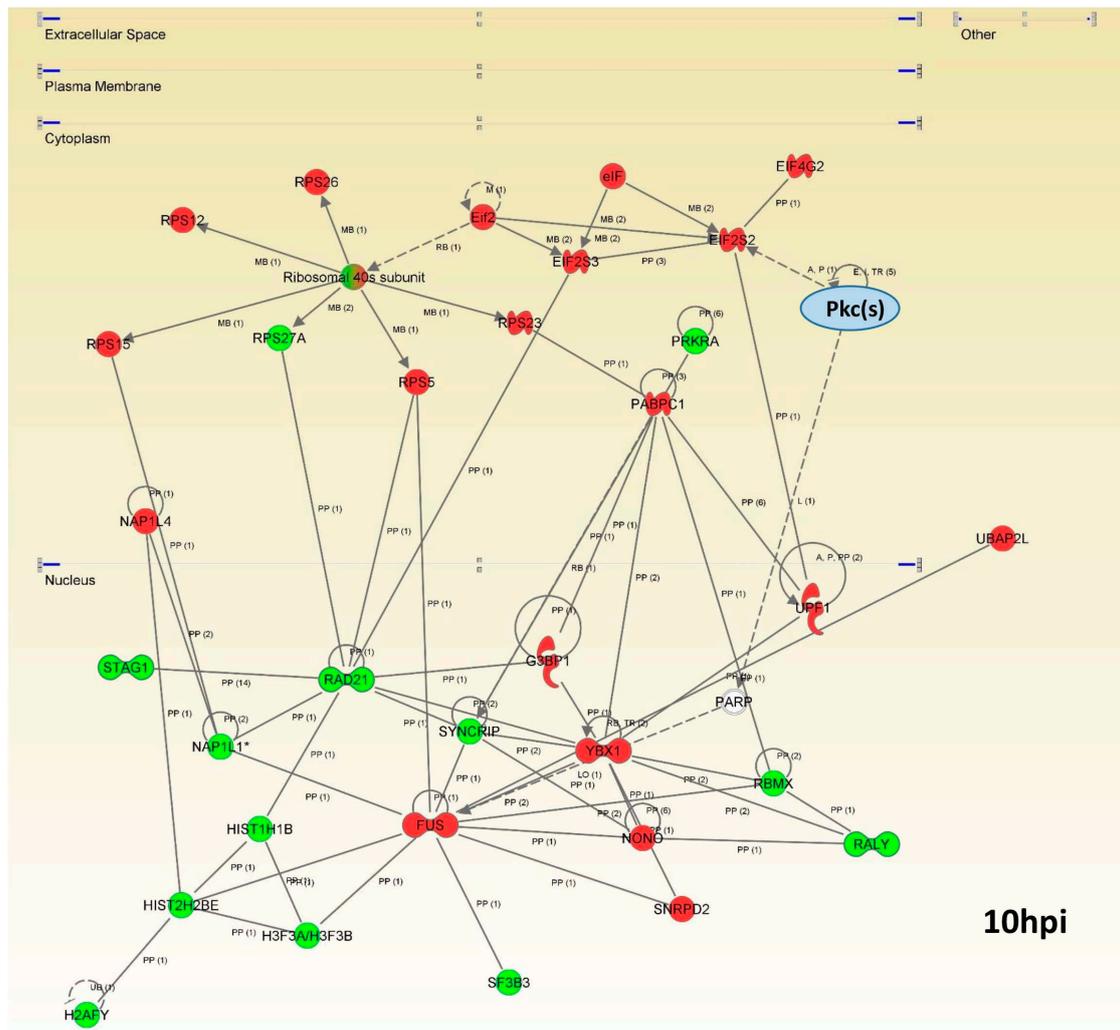


Figura 18: Red de interacción de proteínas diferenciales a las 10hpi donde PKC se sugiere como interactivo y proteína potencialmente alterada. En las redes de interacción, en rojo están representadas las proteínas que aumentan sus niveles respecto al control (mock) y en verde las que los disminuyen. IPA Network score: 57

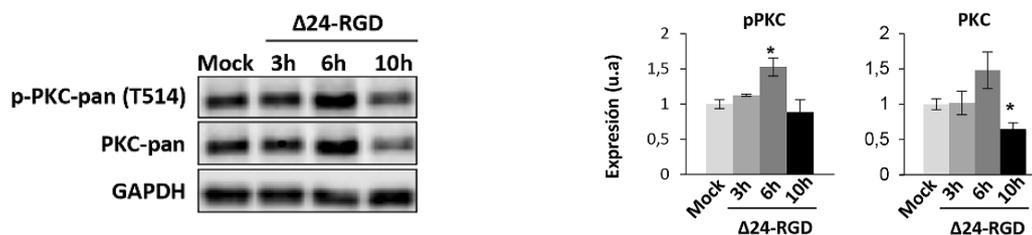


Figura 19: El adenovirus Delta-24-RGD modula la actividad de PKC en los estadios tempranos de la infección de las células de glioblastoma U87. Niveles de fosforilación y expresión de PKC a las 3, 6 y 10hpi. Las muestras de los WBs son representativas de tres experimentos independientes donde la carga equitativa de los geles se evaluó mediante Ponceau y las intensidades de las bandas se normalizaron por la GAPDH. *(pVal<0.05).

2.4. Modulación selectiva de rutas de supervivencia por acción del adenovirus Delta-24-RGD

Por otro lado, se estudiaron las potenciales rutas de señalización que podían verse comprometidas a cada uno de los tiempos en base al proteoma diferencial en cada uno de ellos. La señalización de mTOR (*mammalian Target of rapamycin*) e EIF2 (*Eukaryotic translation initiation factor 2*) fueron las rutas con mayor número de proteínas afectadas a ambos tiempos (Figura 20), y su activación se ha descrito previamente en infecciones adenovirales²⁴¹.

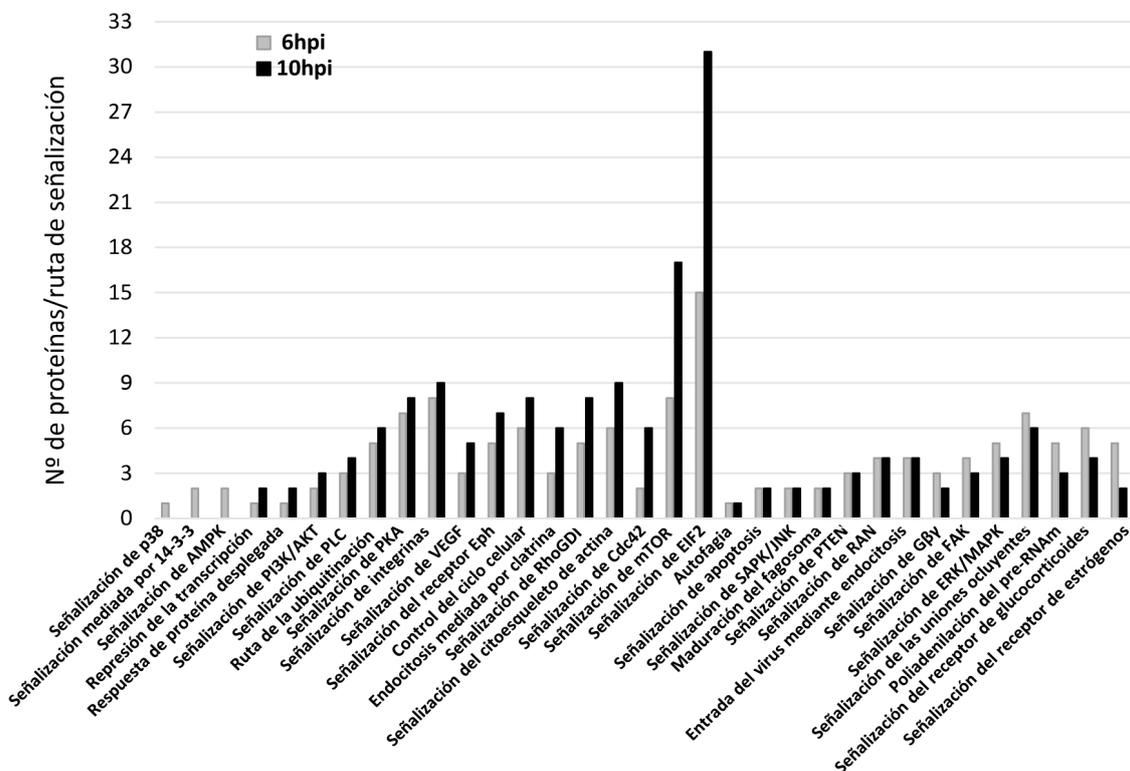


Figura 20: Representación de las rutas de señalización en las que participan las proteínas alteradas durante la replicación del ADN del adenovirus Delta-24-RGD en las células de glioblastoma U87.

Con el objeto de profundizar en la dinámica de activación de algunas de estas rutas de supervivencia, se incluyó un tiempo más temprano de 3hpi. Pese a las predicciones de alteración de numerosas rutas de señalización durante la replicación del material genético adenoviral (**Figura 20**), no se detectaron cambios significativos en la activación de PLC- γ (*Phospholipase C-gamma*), AKT (*Protein kinase B*), SAPK/JNK (*Stress-activated protein kinase/Jun amino terminal kinase*), PDK1 (*Phosphoinositide-dependent protein kinase 1*), PKA (*Protein kinase A*) ni MEK 1/2 (*Mitogen-activated protein kinase 1/2*) (**Figura 21B** y **Figura suplementaria 2**). Sin embargo, la actividad de las proteínas quinasas p38 MAPK (*Mitogen-activated protein kinase p38a*) y ERK1/2 (*Mitogen-activated protein kinase 1/2*) sí se vio comprometida tras la infección (**Figura 21A**). La actividad de ERK disminuyó de una forma tiempo-dependiente mientras que la actividad y niveles de p38 MAPK se vieron reducidos a las 10hpi.

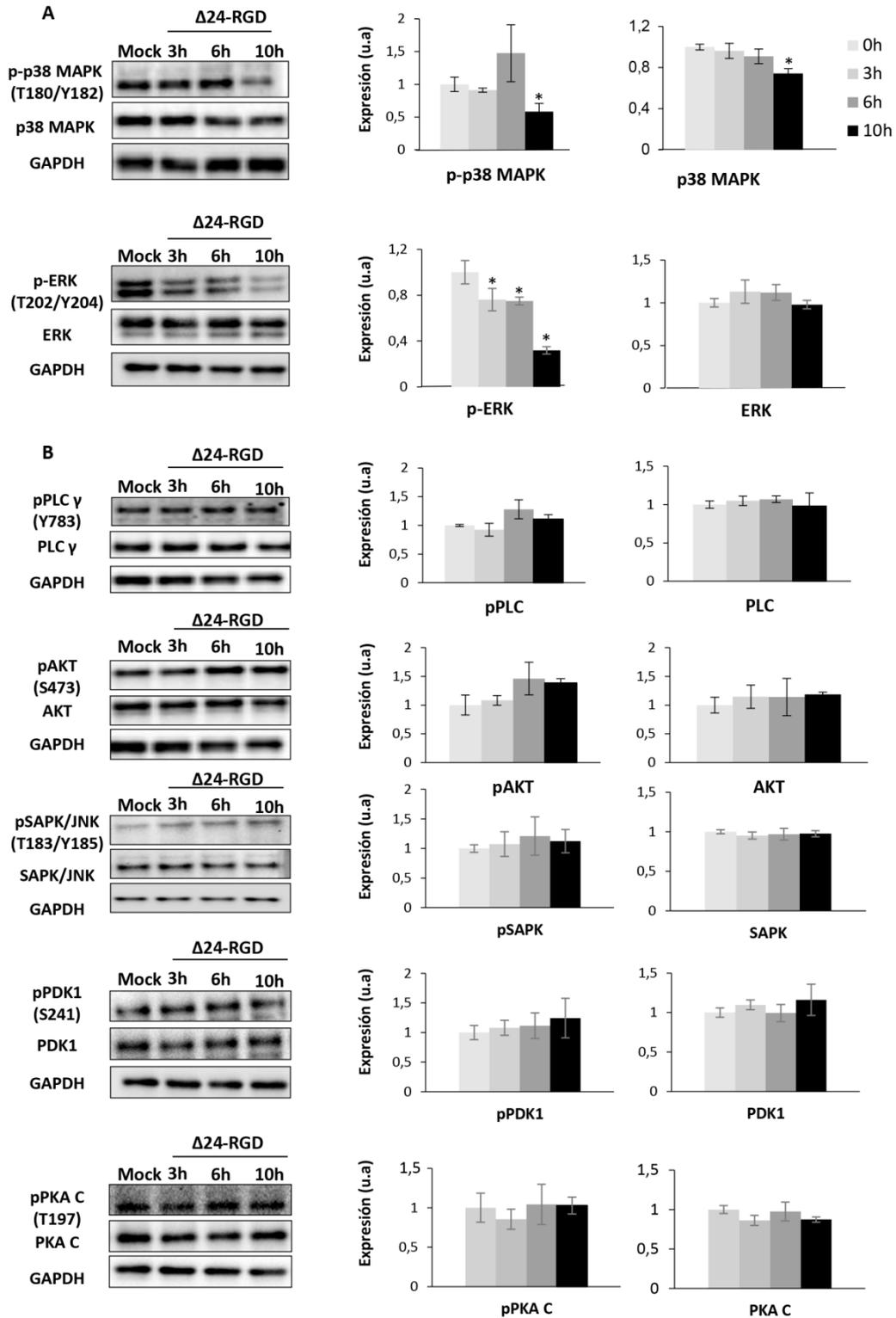


Figura 21: Rutas de señalización alteradas en células de glioma por la infección con el adenovirus Delta-24-RGD. Niveles de expresión y fosforilación específica de A) p38 MAPK y ERK 1/2 B) PLC γ , AKT, SAPK/JNK, PDK1 y PKA C, a las 3, 6 y 10hpi. Las muestras de los WBs son representativas de tres experimentos independientes donde la carga equitativa de los geles se evaluó mediante Ponceau y las intensidades de las bandas se normalizaron con los niveles de GAPDH. *(pVal<0.05)

3. Alteraciones del proteoma de glioblastoma durante la autofagia inducida tras la infección con el adenovirus Delta-24-RGD

Para replicarse eficientemente y liberar mediante la lisis celular su progenie, el adenovirus Delta-24-RGD induce autofagia en células que infecta a las 48hpi^{140,164,165,242}. Con el propósito de determinar las alteraciones proteómicas que se producen en las células de glioblastoma en este estadio, y en paralelo con la producción de las proteínas adenovirales (**Figura 22A**), se analizó el proteoma de las células de glioblastoma U87 a las 48hpi. Se cuantificaron 1616 proteínas, de las cuales 240 proteínas celulares resultaron ser diferenciales (127 proteínas aumentaron su expresión, 113 la disminuyeron) (**Figura 22B; Tabla suplementaria 5**). La distribución subcelular del proteoma diferencial corresponde mayoritariamente al núcleo, citosol, exosomas y membranas (**Figura 22C**). Por otro lado, 18 proteínas adenovirales también fueron detectadas por espectrometría de masas (**Tabla suplementaria 5**). Parte de las proteínas diferenciales participan no solo en la ruta de señalización de la autofagia sino en la respuesta a estrés oxidativo, inflamación (señalización de IL-8), organización del citoesqueleto (señalización de RhoA e ILK), diferenciación celular (señalización de HGF y Tec) y en la señalización de EIF2 y mTOR (**Figura 22D**).

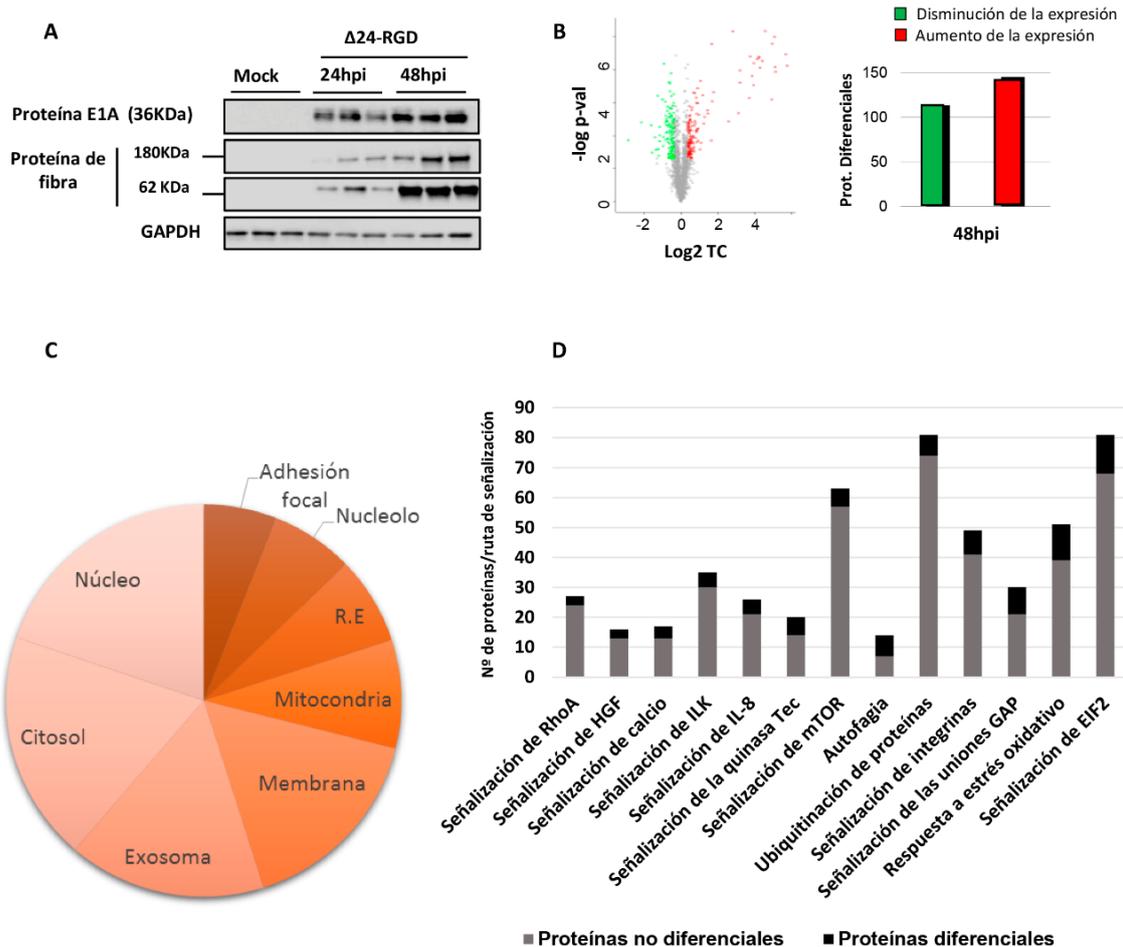


Figura 22: Expresión de las proteínas diferenciales en el estadio final de la infección adenoviral.

A) Expresión de las proteínas adenovirales E1A y proteína de fibra en las células infectadas. B) *Volcano plot* donde se representa la tasa de cambio (TC) y la significación (pVal) de las proteínas cuantificadas en las células de glioblastoma a las 48hpi con el adenovirus Delta-24-RGD. En verde están representadas las proteínas que significativamente disminuyen sus niveles de expresión ($pVal < 0.05$; $TC > 30\%$) y en rojo las que lo aumentan ($pVal < 0.05$; $TC > 30\%$). C) Distribución subcelular de las proteínas diferenciales utilizando la herramienta software DAVID ²³⁹. Los valores de enriquecimiento de la distribución subcelular son los siguientes: Adhesión focal ($pVal = 1,60E-12$); Nucleolo ($pVal = 2,50E-07$); R.E ($pVal = 9,80E-09$); Mitochondria ($pVal = 1,90E-07$); Membrana ($pVal = 9,00E-16$); Exosoma ($pVal = 2,50E-10$); Citosol ($pVal = 3,40E-12$); Núcleo ($pVal = 1,60E-03$). D) Representación de las rutas de señalización en las que participan parte de las proteínas diferenciales a las 48hpi. Valores de enriquecimiento de cada una de estas rutas atendiendo a las proteínas cuantificadas que participan en cada una de ellas, y porcentaje de proteínas diferenciales en cada ruta de señalización: señalización de RhoA ($pVal = 1,90546E-07$) (11,10%); señalización de HGF ($pVal = 0,011748976$) (18,75%); señalización de ILK ($pVal = 6,4565E-07$) (14,29%); señalización de IL-8 ($pVal = 0,00323594$) (19,23%); señalización de Tec Kinase ($pVal = 0,02137962$) (30,00%); señalización de mTOR ($pVal = 1,2589E-23$) (9,52%); Autofagia ($pVal = 0,03311311$) (50,00%); Ubiquitinización de proteínas ($pVal = 5,0119E-30$) (8,64%); señalización de integrinas ($pVal = 7,9433E-13$) (16,33%); señalización de las uniones GAP ($pVal = 0,00012023$) (30,00%); Respuesta a estrés oxidativo ($pVal = 1E-15$) (23,53%); señalización de EIF2 ($pVal = 3,9811E-62$) (16,05%).

Del mismo modo, se estudiaron los cambios en las proteínas celulares producidos por el adenovirus Delta-24-RGD a las 24hpi (**Tabla suplementaria 6**). Como puede observarse en la **Figura 22A**, a este tiempo las proteínas adenovirales comienzan a expresarse, y sin embargo el proceso autofágico aún no se ve iniciado ¹⁶⁴. 33 de las proteínas diferenciales a las 24hpi fueron comunes a las 48hpi (**Figura 23** y **Tabla suplementaria 7**). El patrón de expresión de las 33 comunes, progresó de manera tiempo-dependiente, llegando a decuplicarse en algunas de ellas.

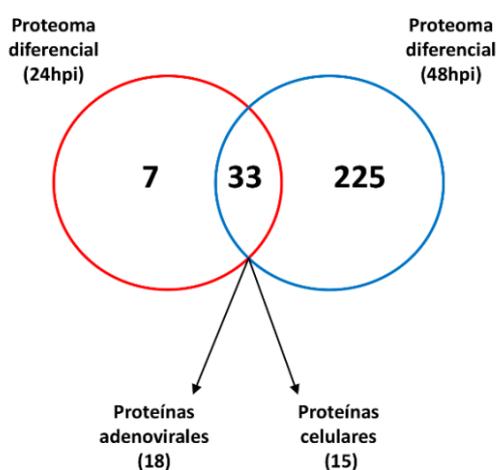


Figura 23: Diagrama de Venn de las proteínas diferenciales comunes y únicas a las 24 y 48hpi. (Mock vs 24 y 48hpi). 18 de las proteínas comunes pertenecen al adenovirus Delta-24-RGD y 15 son de las células de glioblastoma U87 (Ver **Tabla suplementaria 7**).

3.1. Alteraciones funcionales producidas por la infección con el adenovirus Delta-24-RGD en las células de glioblastoma U87 a las 48hpi

Para caracterizar en detalle los cambios proteómicos de las células de glioma debidos a la infección con el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD y discernir sus implicaciones biológicas, las 240 proteínas celulares diferenciales se analizaron mediante el software STRING (v.10.5). Como se aprecia en la **Figura 24**, el tratamiento prolongado (48hpi) de las células U87 con este adenovirus afectó a la

poliadenilación del ARN, la traducción del ARN, el splicing alternativo, el metabolismo de AMP (Adenosine monophosphate), y la señalización por tirosina quinasas en estadios avanzados de la infección.

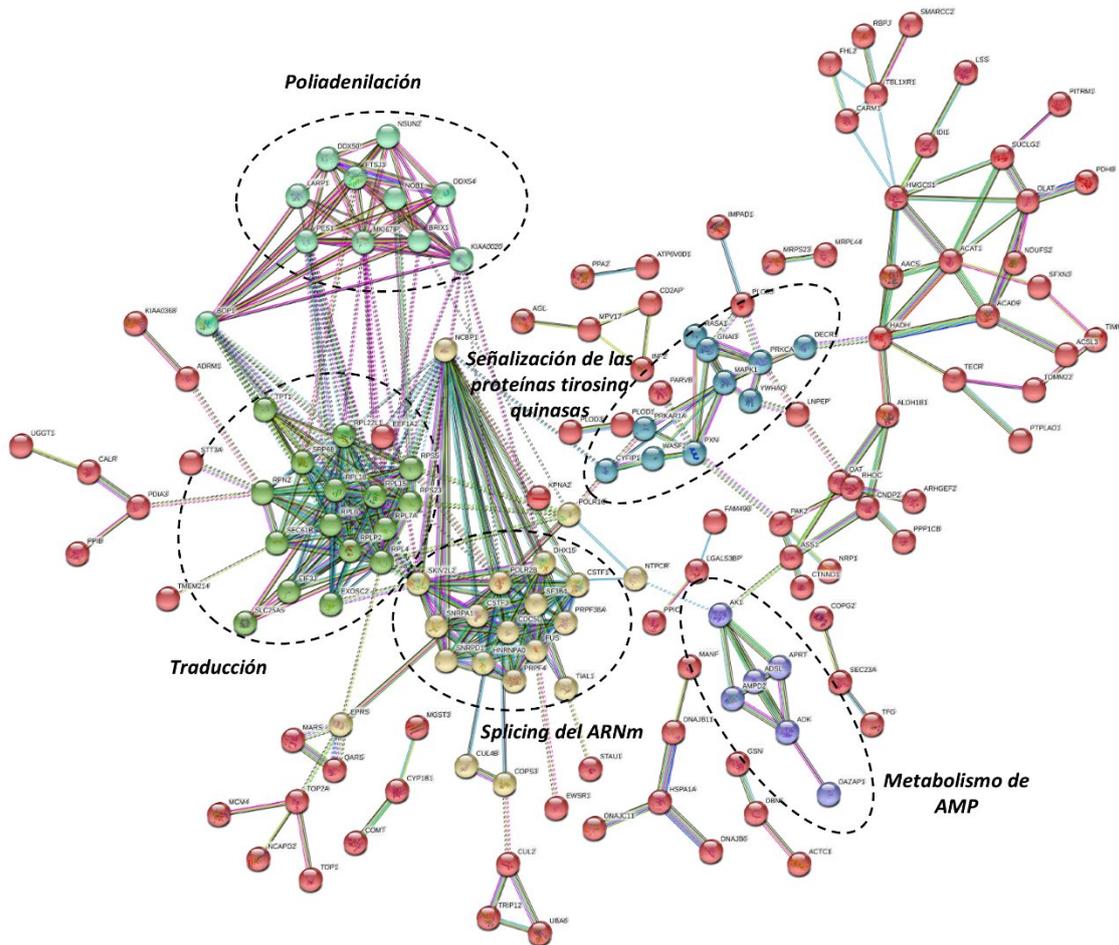


Figura 24: Red de interacción funcional de las proteínas celulares de la línea de glioblastoma U87, alteradas por la infección con el adenovirus Delta-24-RGD en el estadio autofágico. Para el análisis se utilizó el software STRING (v.10.5) y el ID de cada una de las proteínas, representadas con un nodo. Las líneas continuas representan interacciones físicas entre ellas, mientras que las discontinuas representan interacciones funcionales. Estas interacciones se fundamentan en la literatura o información canónica de la base de datos de STRING. Las interacciones representadas presentan una confianza alta (>0.7) en la base de datos. Se usó la opción *K means clustering* para visualizar mejor la funcionalidad de las subredes de interacción.

3.2. Alteración específica de rutas de supervivencia durante la autofagia inducida por el adenovirus Delta-24-RGD

La herramienta bioinformática IPA, permite realizar un análisis similar a STRING, además de proponer mediadores cuya alteración se encuentra potencialmente relacionada con las alteraciones previamente caracterizadas por proteómica. De esta

manera, una de las redes de IPA propuso a NFκB como una proteína potencialmente alterada a las 48hpi (**Figura 25**). Mediante WB se monitorizó la expresión y activación de NFκB a las 24 y 48hpi. El aumento en la fosforilación de la S536, junto con un descenso en los niveles de expresión de su inhibidor (IκB-α: *NF-kappa-B inhibitor alpha*) a las 48hpi, sugirieron una activación de este factor de transcripción (**Figura 26**).

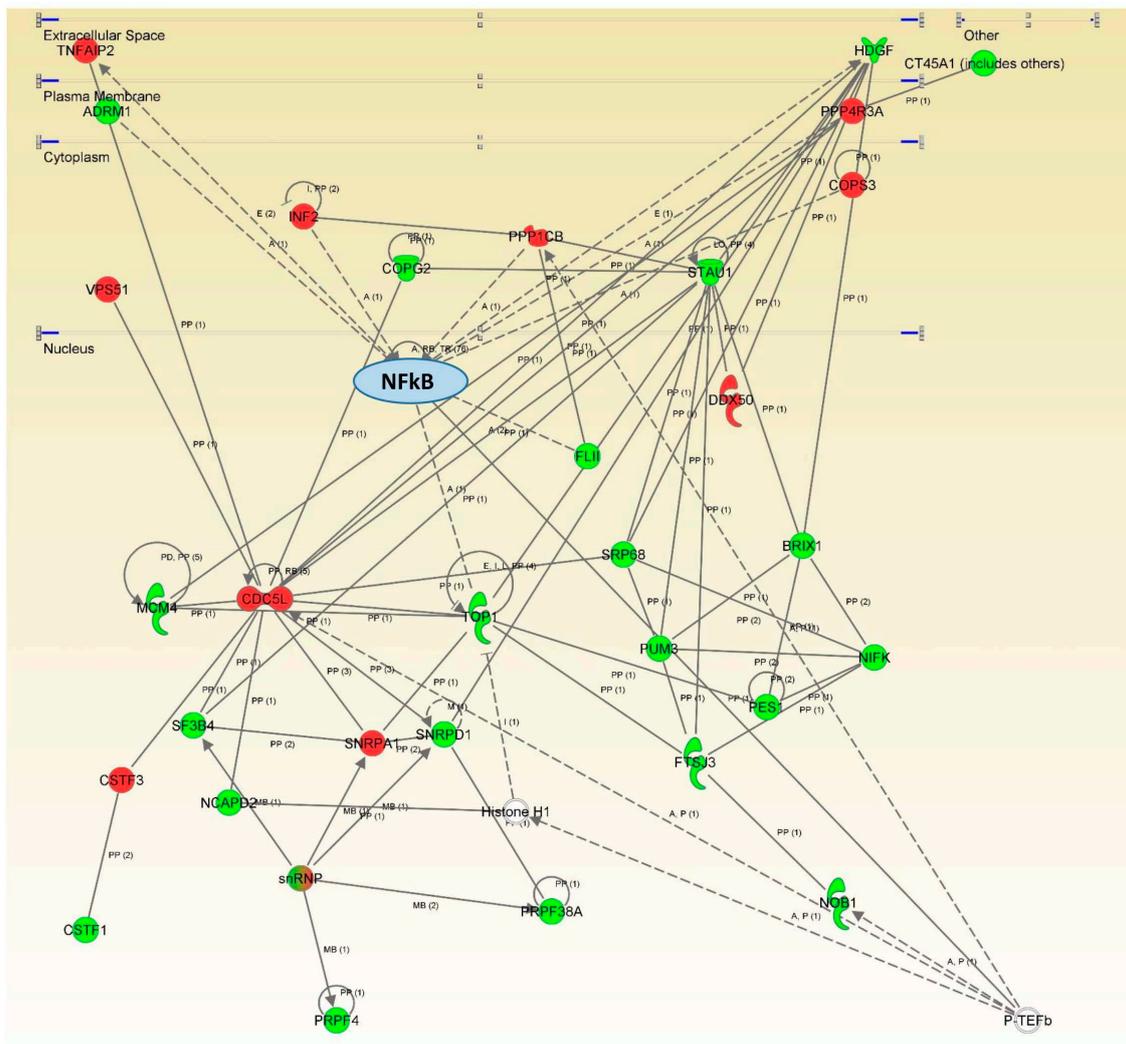


Figura 25: Red de interacción de las proteínas diferenciales durante el inicio del proceso autofágico, donde NFκB se sugiere como interactivo y proteína potencialmente alterada. Representación de las redes de interacción de algunas proteínas que se sobreexpresan (rojo) o disminuyen (verde) a las 48hpi con el adenovirus Delta-24-RGD. IPA Network score: 61

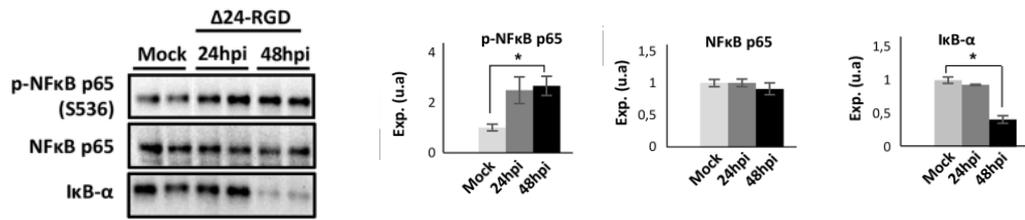


Figura 26: La infección de las células de glioma U87 con el adenovirus Delta-24-RGD produce cambios en la actividad de NFκB en las células de GBM. Niveles de fosforilación y expresión de NFκB. Las muestras de los WBs son representativas de tres experimentos independientes donde la carga equitativa de los gels se evaluó mediante Ponceau y las intensidades de las bandas se normalizaron por la tinción total en cada carril del gel.*(pVal<0.05)

En otra red de interacción se propuso a la familia quinasas SRC (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*) como potenciales proteínas alteradas tras la infección (Figura 27).

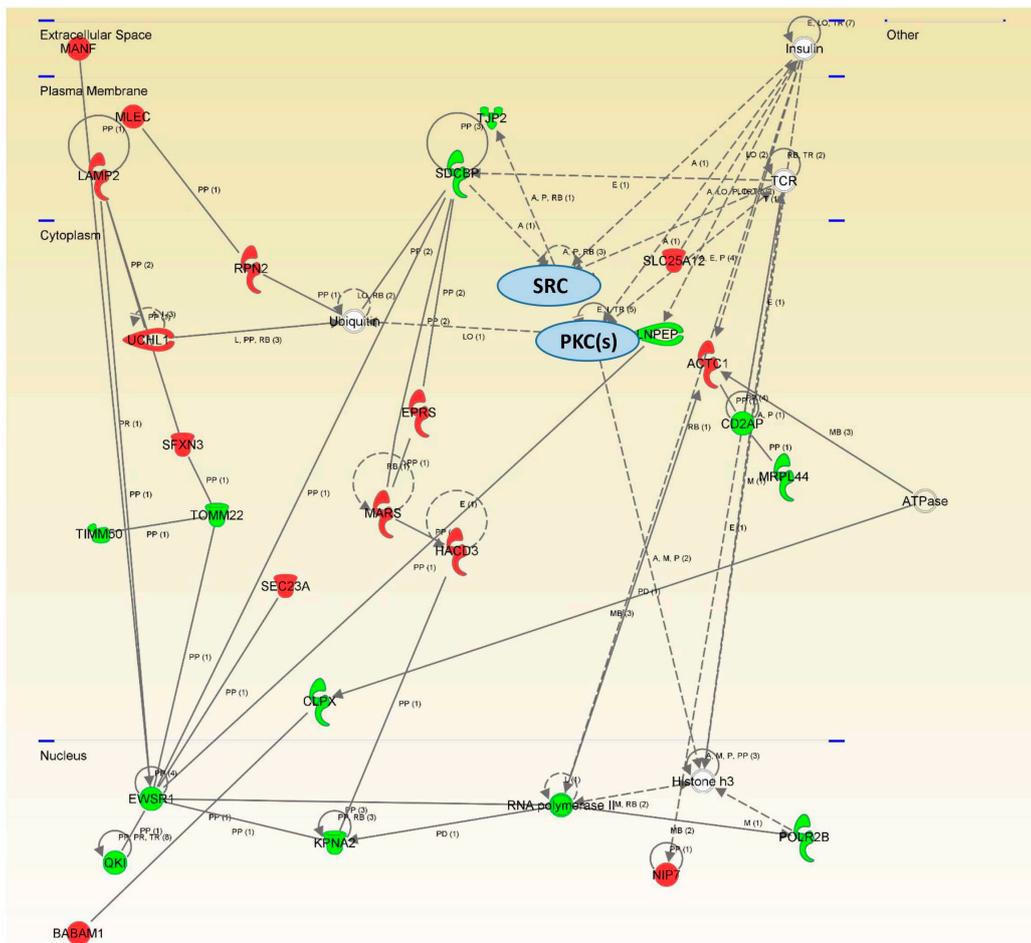


Figura 27: Red de interacción de las proteínas diferenciales durante el inicio del proceso autofágico, donde SRC se sugiere como interactivo y proteína potencialmente alterada. Representación de las redes de interacción de algunas proteínas que se sobreexpresan (rojo) o disminuyen (verde) a las 48hpi con el adenovirus Delta-24-RGD. IPA Network score: 47

Se apreció una disminución significativa en el estado de fosforilación y expresión de esta proteína a las 48hpi. En la misma red, los datos de espectrometría de masas indicaron una reducción en los niveles de expresión de PKC, que se confirmaron mediante WB (**Figura 28**).

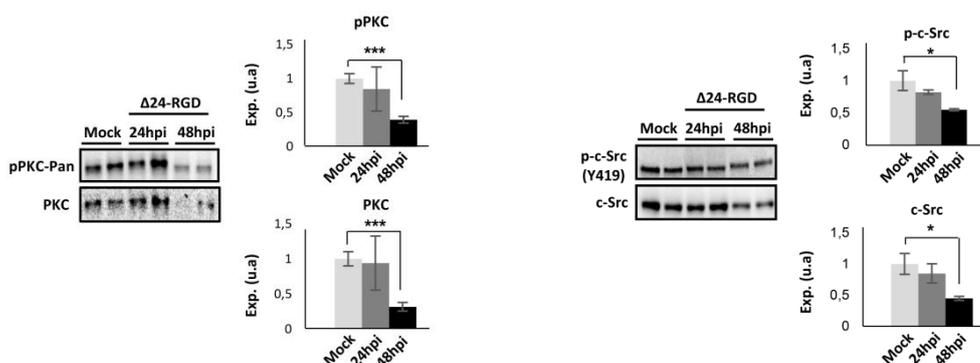


Figura 28: El adenovirus Delta-24-RGD modula la actividad de SRC y PKC en el estadio autofágico inducido en las células de glioma a las 48h tras la infección. Niveles de fosforilación y expresión de PKC y c-SRC a las 24 y 48hpi. Las muestras de los WBs son representativas de tres experimentos independientes donde la carga equitativa de los geles se evaluó mediante Ponceau y las intensidades de las bandas se normalizaron por la tinción total en cada carril del gel. *(pVal<0.05); ***(pVal<0.001)

El adenovirus también afectó a la señalización de MAPK puesto que los niveles de ERK disminuyeron (**Tabla suplementaria 5**), al igual que los de MEK 1/2 (**Figura 29**). Debido a la disminución de PRKAR1A (*cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit*) (**Figura 29** y **Tabla suplementaria 5**), se comprobó la expresión y estado de activación de PKA. Los niveles de fosforilación de la proteína aumentaron a las 24hpi pero disminuyeron a las 48hpi. GSK3 (*Glycogen synthase kinase-3*) es otra de las proteínas propuestas por IPA como potencial regulador. Como se puede apreciar en la **Figura 29**, a las 24hpi se produjo un descenso en los niveles de fosforilación de GSK3 α/β , mientras que los niveles de la proteína tienden a disminuir a las 48hpi.

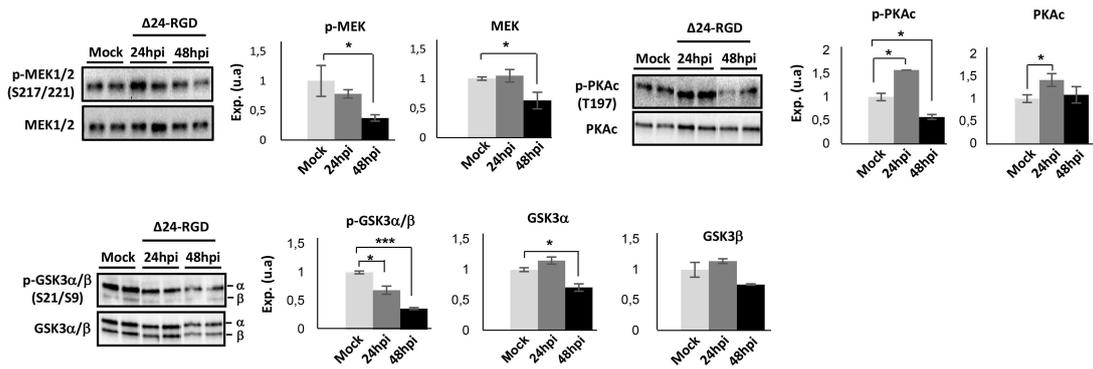
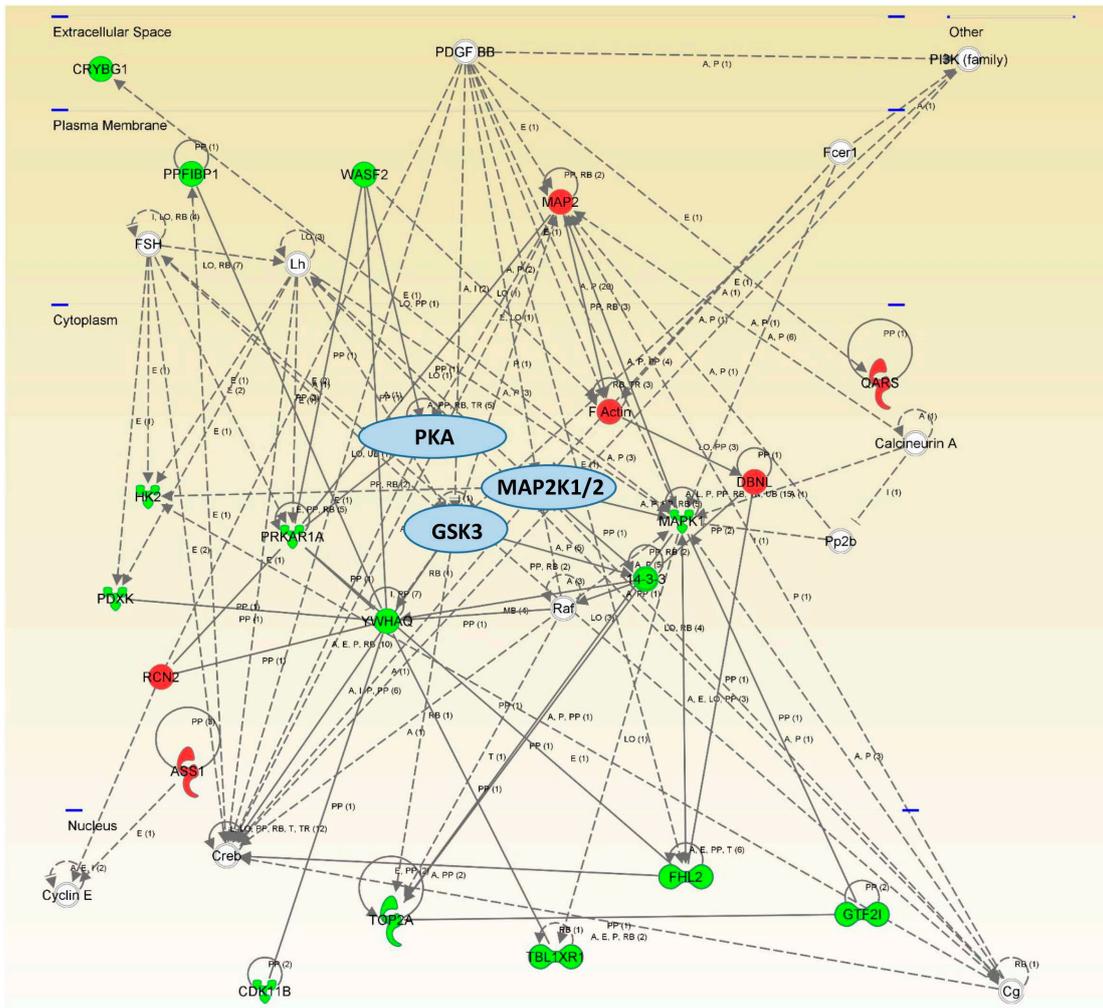
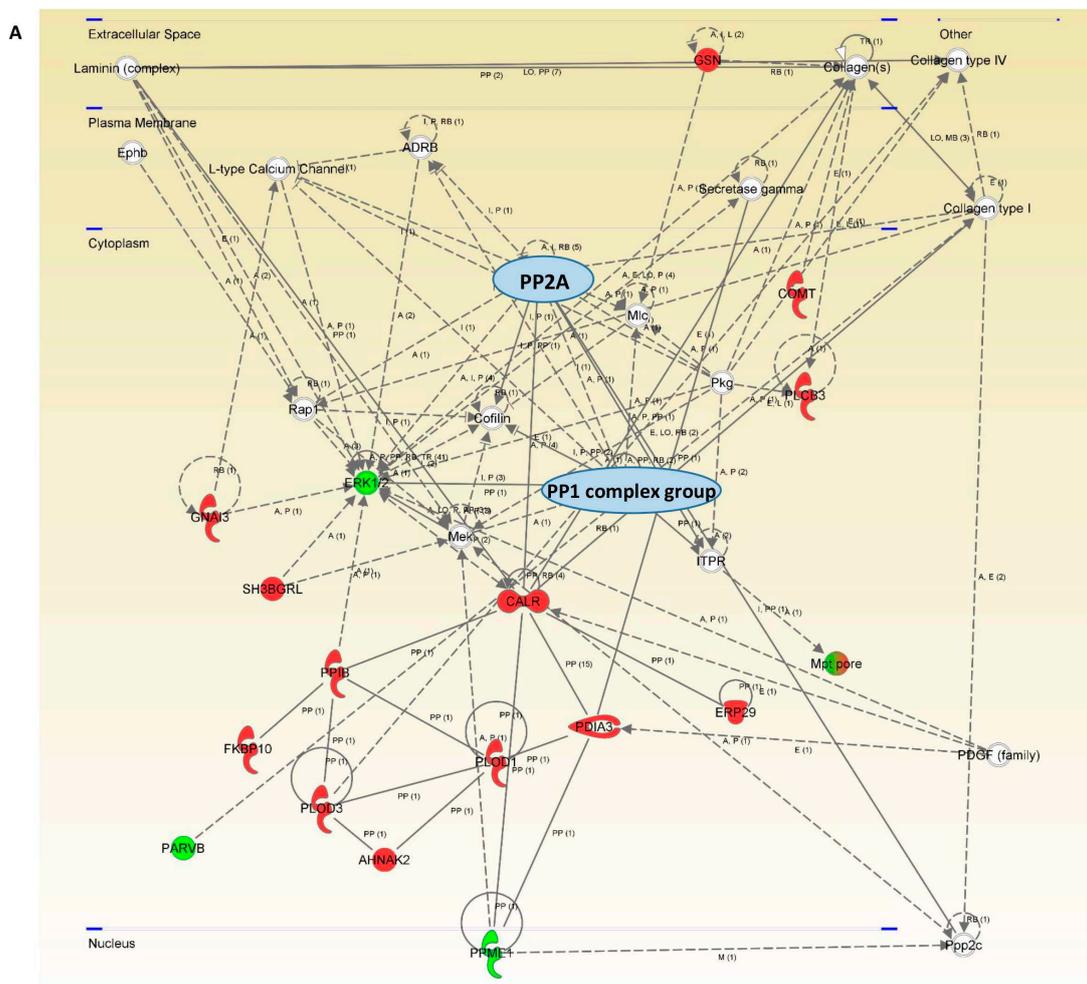


Figura 29: La infección de las células de glioblastoma U87 con el adenovirus Delta-24-RGD modula la actividad de quinasas específicas: MEK, PKAc, GSK3. Representación de las redes de interacción de algunas proteínas que se sobreexpresan (rojo) o disminuyen (verde) a las 48hpi con el adenovirus Delta-24-RGD. Niveles de fosforilación y expresión de MEK, PKAc, GSK3 a las 24 y 48hpi. Las muestras de los WBs son representativas de tres experimentos independientes donde la carga equitativa de los geles se evaluó mediante Ponceau y las intensidades de las bandas se normalizaron por la tinción total en cada carril del gel. *(pVal<0.05); ***(pVal<0.001) IPA Network score: 28

Por otro lado, el sistema de fosfatasa también es diana del adenovirus Delta-24-RGD durante el proceso autofágico. La infección del adenovirus Delta-24-RGD indujo la producción de PPP6C (*Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit*), PP4R3A (*Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A*) y PPP1CB (*Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit*) (Tabla suplementaria 5). PP2A (*Serine/threonine-protein phosphatase 2*) se encontró junto con PP1 (*Serine/threonine-protein phosphatase 1*) regulando parte del interactoma de las proteínas diferenciales (Figura 30°). PP1α (*Serine/threonine-protein phosphatase 1 alpha catalitic subunit*) disminuyó sus niveles de fosforilación en T320 (fosforilación inhibitoria) a 24 y 48hpi, mientras que su expresión, al igual que la de PP2A, decreció a las 48hpi (Figura 30B).



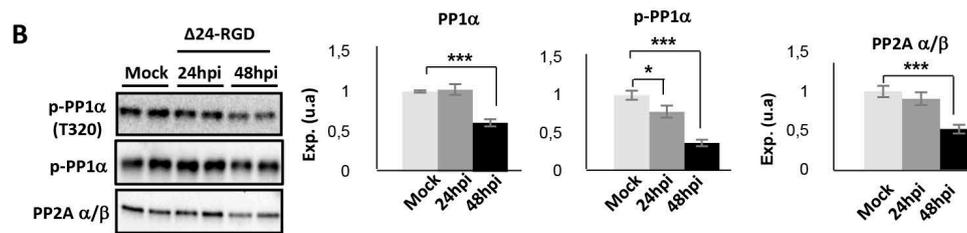


Figura 30: La infección de las células de glioblastoma U87 con el adenovirus Delta-24-RGD modula la actividad de fosfatasa específicas: PP1α y PP2A. A) Representación de las redes de interacción de algunas proteínas que se sobreexpresan (rojo) o disminuyen (verde) a las 48hpi con el adenovirus Delta-24-RGD. B) Niveles de fosforilación y/o expresión de PP1α y PP2Aα/β a las 24 y 48hpi. Las muestras de los WBs son representativas de tres experimentos independientes donde la carga equitativa de los geles se evaluó mediante Ponceau y las intensidades de las bandas se normalizaron por la tinción total en cada carril del gel. *(pVal<0.05); ***(pVal<0.001) IPA Network score: 22

4. Modulación del proteoma extracelular de las células de glioblastoma durante la infección con el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD

Debido a la importancia del microambiente tumoral en la progresión o remisión de los tumores, y a la estimulación del sistema inmune producida por el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD^{105,157,170,243}, se quiso monitorizar la respuesta extracelular de las células de glioblastoma a este tratamiento mediante el análisis parcial de su secretoma usando un array comercial de citoquinas y factores de crecimiento.

Durante la replicación del ADN adenoviral (3, 6 y 10hpi), 23 citoquinas y factores de crecimiento aumentaron sus niveles de forma significativa y tiempo-dependiente (**Figura 31**). De este modo, factores de crecimiento y citoquinas como EGF (*Epidermal growth factor*), GDNF (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*), NT-3 (*Neurophin-3*) o IL-1β (*Interleukin-1β*), aumentaron sus niveles extracelulares exclusivamente a las 3hpi. Otras citoquinas como IL-13 o TNF-β (*Tumor necrosis factor beta*), y factores de crecimiento como TGF-β3 (*Tumor growth factor-β3*) lo hicieron

exclusivamente a las 6hpi. A las 10hpi se produjo un aumento en el medio de IL-2 y de GCSF (*Granulocyte colony stimulating factor*). A su vez, RANTES (*Regulated on activation normal T cell expressed and secreted*) (CCL5) y LIF (*Leukemia inhibitory factor*) se encontraron aumentadas en todos los tiempos posteriores a la infección.

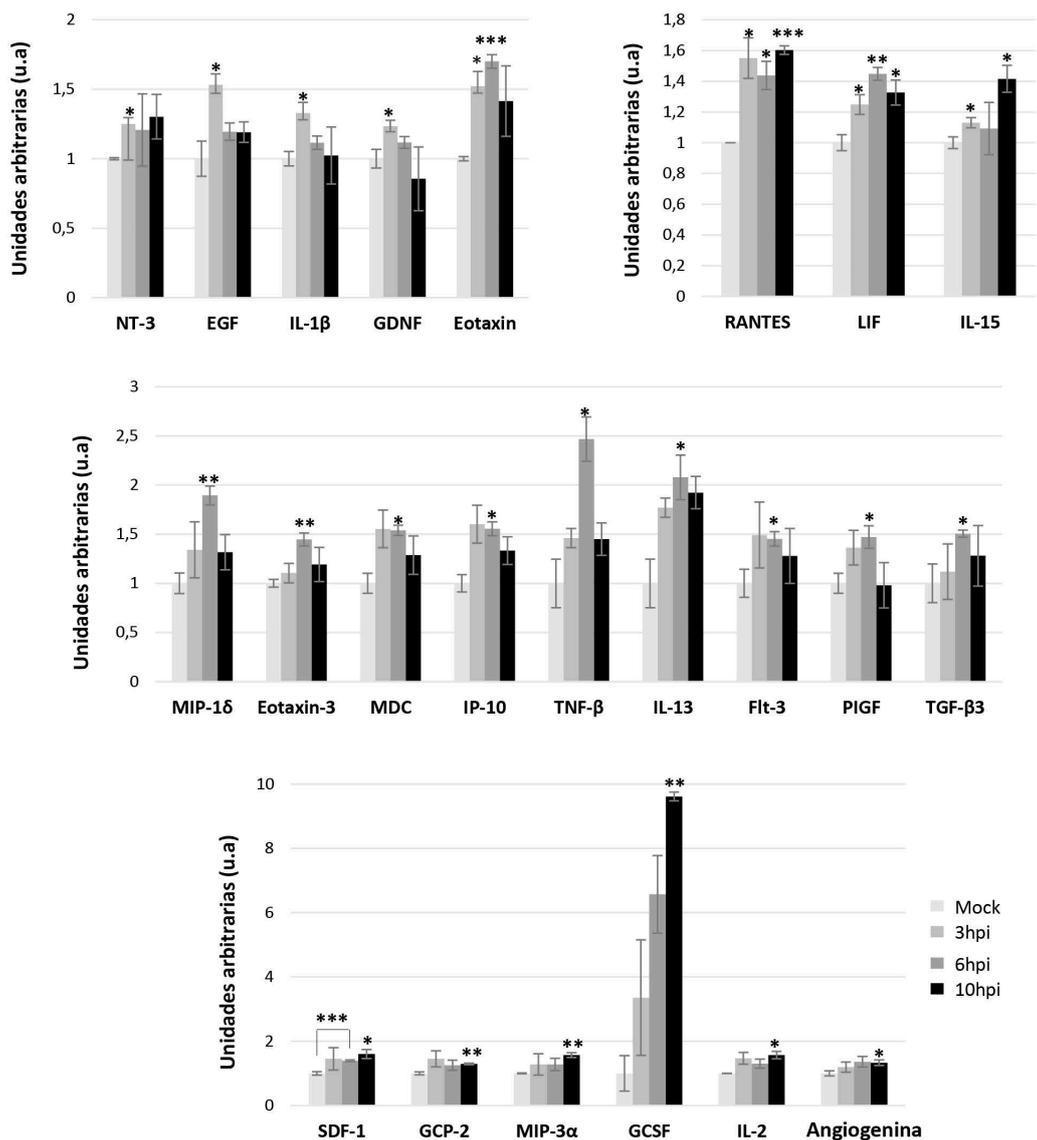


Figura 31: Monitorización de las citoquinas y factores de crecimiento secretados por las células de glioblastoma U87 infectadas con el adenovirus Delta-24-RGD a las 3, 6 y 10hpi. Variaciones significativas y tiempo-dependientes en la expresión de 23 de las 80 citoquinas y factores de crecimiento humanos analizados en el medio de las células de glioblastoma U87 tratadas con el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD vs mock. Resultados de tres experimentos independientes. *(pVal<0.05) ** (pVal<0.01) ***(pVal<0.001)

Por otro lado, en estadios iniciales del proceso autofágico (24 y 48hpi), 14 de las 80 citoquinas y factores de crecimiento analizados aumentaron significativamente sus niveles de expresión de una forma tiempo-dependiente (**Figura 32**). TGF-β3 aumentó significativamente sus niveles en el medio exclusivamente a las 24hpi, mientras que otros factores quimiotácticos como GRO (CXCL1), los inhibidores de metaloproteinasas TIMP-1 (*Tissue inhibitor of metalloproteinases-1*) y TIMP-2 lo hicieron a las 24 y 48hpi. Otras citoquinas como GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), IL-8, angiogenina, BCL (CXCL13), HGF (*Hepatocyte growth factor*), IGFBP-1 (*Insulin-like growth factor-binding protein 1*), MIF (*Macrophage migration inhibitory factor*), osteopontina y osteoprotegerina (TNFRSF11B), aumentaron sus niveles significativamente a las 48hpi.

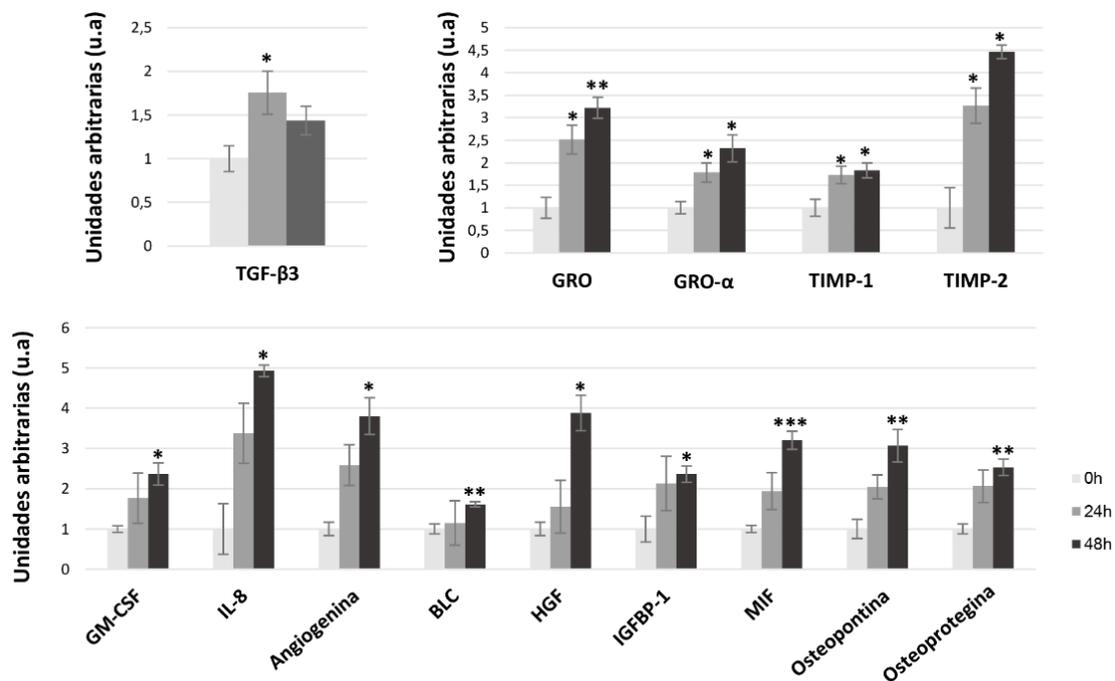


Figura 32: Monitorización de las citoquinas y factores de crecimiento secretados por las células de glioblastoma U87 infectadas con el adenovirus Delta-24-RGD las 24 y 48hpi. Variaciones significativas y tiempo-dependientes en la expresión de 14 de las 80 citoquinas y factores de crecimiento humanos analizados en el medio de las células de glioblastoma U87 tratadas con el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD vs mock. Resultados de tres experimentos independientes. *(pVal<0.05) ** (pVal<0.01) *** (pVal<0.001)

No se identificaron cambios significativos en el resto de citoquinas y factores de crecimiento analizados (**Tabla 6**). Todos estos datos demuestran que la infección del adenovirus Delta-24-RGD conlleva un aumento tiempo-dependiente en la secreción de una variedad de biomoléculas que potencialmente puedan estar relacionadas con el crecimiento tumoral y el reclutamiento de células del sistema inmune.

Además, se quiso profundizar en la implicación y acción cooperativa entre los proteomas diferenciales intra y extracelulares. Para ello se combinaron los datos diferenciales de cada uno de los tiempos y se hizo un nuevo análisis con IPA. Las rutas de señalización alteradas se relacionan con comunicación celular, sistema inmune y respuesta a infección, tanto a los tiempos más tempranos tras la infección como a las 48hpi (**Figura 33**).



Figura 33: La infección del adenovirus Delta-24-RGD modula diferentes rutas de señalización del sistema inmune. Representación de las rutas de señalización durante A) la replicación adenoviral (3, 6 y 10hpi) y B) el inicio de la autofagia (24 y 48hpi), en las que participan las proteínas intra y extracelulares de las células de glioblastoma U87 cuyos niveles de expresión se alteran por la infección del adenovirus oncolítico Delta-24-RGD.

Discusión

El glioblastoma multiforme (GBM) es uno de los tipos de tumores más agresivos que existen, debido a que los pacientes presentan una esperanza de vida media de tan solo 15 meses tras recibir el tratamiento estándar ⁸. Esto se debe principalmente a su alta heterogeneidad y la presencia de CMT, que suelen presentar resistencia al tratamiento ^{55,56} y hacen que el tumor surja nuevamente a pocos centímetros del lugar original ⁴⁹. Una alternativa terapéutica contra los tumores es el uso de virus oncolíticos. Estos virus son modificados para infectar y replicarse de manera selectiva en las células tumorales ⁹⁹. Su uso como agentes terapéuticos en el tratamiento del GBM resulta muy adecuado ya que este tipo de tumor no suele metastatizar, haciendo que el tratamiento viral pueda aplicarse de manera local. El adenovirus Delta-24-RGD es uno de los más estudiados con el fin de lograr ese propósito. Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo*, han caracterizado los mecanismos moleculares que regulan la muerte celular programada por autofagia, que el adenovirus produce en las células que infecta (entre ellas las de GBM ^{140,164,165}), para así replicarse y finalmente liberar su progenie adenoviral mediante la lisis celular. También se ha evaluado la seguridad y la eficacia del tratamiento en ensayos clínicos, donde se ha observado una supervivencia >3 años en un 20% de los pacientes tratados, y una reducción $\geq 95\%$ de la masa tumoral, junto con una supervivencia libre de progresión tumoral en 3 de estos pacientes ²¹.

Al igual que ocurre en otros tipos de cáncer ²⁴⁴, el GBM surge de la acumulación de diferentes alteraciones genéticas ^{3,24,28}. Sin embargo, el análisis del genoma cancerígeno no refleja adecuadamente los cambios que se producen en estas

células, ya que son las proteínas las principales entidades funcionales a este nivel ²⁴⁵. Debido a la heterogeneidad del cáncer ²⁴⁶, multitud de proteínas y rutas de señalización se encuentran involucradas en el inicio y la progresión tumoral ²⁴⁷. Por otro lado, las alteraciones de estas proteínas pueden producirse a diferentes niveles (ej. estructural, funcional y/o MPTs), por lo que resulta complicado estudiar los mecanismos subyacentes durante la progresión tumoral. Gracias a las tecnologías ómicas en general, y a la proteómica en particular, podemos profundizar en las proteínas, rutas de señalización y funciones celulares, que se ven alteradas en los distintos tipos de cáncer. Por otra parte, los estudios proteómicos permiten identificar nuevas dianas terapéuticas, y predecir o monitorizar la respuesta a los diferentes tratamientos ²⁴⁸. Con el fin de caracterizar en detalle cada una de las anomalías proteicas implicadas en la aparición y evolución del tumor, se han empleado diferentes tipos de aproximaciones y tecnologías, que han ido evolucionando con el tiempo ²⁴⁵. En concreto, estas tecnologías se han utilizado para caracterizar el proteoma diferencial en los diferentes grados de astrocitoma (**Tabla suplementaria 1**). También se han empleado para caracterizar el proteoma de distintos tipos de adenovirus, donde se han identificado interacciones específicas entre algunas proteínas adenovirales y de la célula hospedadora (**Tabla suplementaria 2**). Sin embargo, muy pocos estudios han profundizado en las alteraciones proteómicas que se producen en la célula tumoral tras la infección con un adenovirus oncolítico. En el caso del adenovirus Delta-24-RGD, el conocimiento de las alteraciones del proteoma intra y extracelular de las células de glioma puede resultar muy útil para el descubrimiento de potenciales dianas terapéuticas, nuevas modificaciones del adenovirus, así como posibles combinaciones terapéuticas que incrementen la eficacia del tratamiento

oncolítico. Con este objetivo, en el presente estudio se han monitorizado las rutas de señalización que se alteran al inicio de la infección adenoviral (internalización: 5-30mpi), en las etapas de replicación del ADN adenoviral (3-10hpi), y en los estadios pre-autofágico y autofágico (24 y 48hpi) de las células de glioblastoma infectadas con el adenovirus Delta-24-RGD. Para ello, se integraron los datos cuantitativos diferenciales obtenidos mediante espectrometría de masas, junto con datos del interactoma de los mediadores proteicos detectados, y otras aproximaciones bioquímicas. Debido a que el microambiente juega un papel importante en el desarrollo del tumor, y a que diferentes estudios apuntan a un cambio en él producido por el tratamiento con el adenovirus Delta-24-RGD ^{105,170,249}, también se profundizó en la caracterización del secretoma de estas células en las etapas de replicación adenoviral y autofagia. Para ello se utilizó un array de citoquinas y factores de crecimiento, una aproximación *targeted* utilizada en la caracterización de otros tipos de cáncer ^{250,251}, el microambiente tumoral ²⁵², y/o las respuestas a tratamientos ^{253,254}.

El Adv5, junto con el tipo 2, son los más utilizados en la clínica debido a que son los adenovirus de los que mayor conocimiento biológico se tiene. Además de los receptores CAR y las integrinas, estos adenovirus presentan otros factores de unión a HSPG (*Heparan sulfate proteoglycan*), FX (*Coagulation factor X*), DPP (*Dipalmitoyl phosphatidylcholine*) y Lf (*Lactoferrin*) ^{121,255}, lo que implica la alteración de distintas rutas de señalización. Los adenovirus se adhieren y penetran en la célula hospedadora en los primeros 20 minutos de contacto, y seguidamente las partículas adenovirales se desplazan hasta el núcleo para transferir su material genético (30-40mpi) ²⁵⁶⁻²⁵⁸. Pese a que se conocen algunas de las rutas de señalización que se alteran debido a esta infección ^{121,259,260}, no existen estudios realizados en células de glioblastoma. Además

el adenovirus Delta-24-RGD infecta a las células de manera independiente de CAR ¹⁵⁷, por lo que las rutas de señalización alteradas por este adenovirus pueden ser diferentes a las del Adv5. Por estas razones, se quisieron estudiar los cambios en los patrones de fosforilación de quinasas y factores de transcripción de las células de glioblastoma U87 debidos al acoplamiento e internalización del adenovirus Delta-24-RGD a los 5, 15 y 30mpi. Como puede verse en las **Figuras 7 y 8**, c-Jun fue el único factor de transcripción analizado que aumentó su fosforilación activadora (Ser63) en los primeros minutos posteriores a la infección. A pesar de que las quinasas c-Jun N-terminal (JNKs), entre las que se encuentra SAPK/JNK, son reguladores canónicos de la actividad de c-Jun ²⁶¹⁻²⁶³, en estos primeros minutos esta quinasa no aumentó su activación, y por lo tanto la activación de c-Jun probablemente se deba a otras quinasas como por ejemplo Cdk3 ²⁶⁴ o VRK1 (*Vaccinia-related kinases*) ²⁶⁵. La activación de JNK, ERK1/2 y p38 MAPK en estos primeros minutos, está ligada a la unión de la cabeza de la fibra adenoviral con CAR ²⁶⁰, y trabajos previos corroboran que p38 MAPK y ERK aumentan sus niveles de fosforilación en estos primeros minutos posteriores a la infección ^{266,267}, aunque se observa una caída de la fosforilación de p38 MAPK a los 30mpi ²⁶⁷. La discrepancia en los resultados de este trabajo puede deberse a la modificación en la fibra del adenovirus Delta-24-RGD (independiente de CAR, dominio RGD en la fibra), puesto que se ha descrito previamente una disminución en la fosforilación de JNK, ERK1/2 y p38 MAPK en estos primeros minutos, cuando las células exclusivamente contactan con la base pentónica (dominio RGD) o el hexón adenoviral ²⁶⁰. Por otro lado la activación de p38 MAPK junto con MK2 (*MAPKAP kinase 2*) y HSP27 (*Heat shock 27kDa protein*), promueven el desplazamiento del adenovirus a través del citosol hasta llegar al núcleo ²⁶⁸. HSP27 es fosforilada en S78 y S82 por MK2

como resultado de la activación de p38 MAPK ^{269,270}, lo que explica la disminución en la fosforilación de HSP27 (**Figura 8**) y p38 MAPK cuando el material genético ya ha sido transferido ^{256,257}. La proteína WNK-1 (T60) (*Serine/threonine-protein kinase WNK1*), que disminuyó su fosforilación en los 15 primeros minutos tras la infección, es un sustrato no solo de AKT sino también de SGK1 (*Serine/threonine-protein kinase Sgk1*) ^{271,272}, lo que puede explicar parcialmente que la disminución de sus niveles de fosforilación no siga la misma tendencia que presenta AKT (**Figura 8**). Se sabe que WNK-1 aumenta sus niveles de expresión y fosforilación en las células de glioma ²⁷³. De hecho, la activación de la ruta de señalización WNK-1/OSR1/NKCC1 facilita la migración de las células de glioma, y la resistencia anti-apoptótica al tratamiento de las células con TMZ ²⁷³. De esta manera se refuerza la idea de que el tratamiento conjunto de quimioterapia con TMZ y el adenovirus Delta-24-RGD puede conseguir un efecto terapéutico mayor ⁴⁷. La activación de la ruta de señalización PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*)/AKT/mTOR regula negativamente la autofagia ²⁷⁴. AKT disminuyó progresivamente su actividad durante los primeros minutos posteriores a la infección (**Figura 8**), mientras que la posible inhibición de mTOR se reflejó exclusivamente a los 30mpi, mediante la desfosforilación de P70 S6 (*70 kDa ribosomal protein S6 kinase 1*) ^{140,275} (**Figura 8**). Estos datos sugieren una potencial activación del proceso autofágico como respuesta antiviral. Las células de GBM se caracterizan por tener una alta tasa proliferativa, por lo que una de las aproximaciones para el tratamiento de estos tumores es el uso de inhibidores de la proliferación celular como AT7867 ²⁷⁶ y Witaferina A ²⁷⁷, e inhibición de PDK1 ²⁷⁸. La inhibición de la proliferación celular mediante estos tratamientos, tiene asociada la disminución de los niveles de activación de AKT y p70 S6 ^{276–278}, generalmente elevados en los pacientes con GBM ²⁷⁹. De este

modo, el adenovirus Delta-24-RGD contribuye a la inactivación temprana de ambas quinasas, y una disminución de las señales de proliferación tumoral en estos primeros minutos. Estos resultados deben ser estudiados en mayor profundidad, además de analizar el efecto de la combinación en el tratamiento del GBM de este adenovirus modificado con los diferentes inhibidores de la proliferación celular. La rápida inhibición de los factores de transcripción CREB, STAT2 y STAT5b (**Figura 8**) por parte del adenovirus Delta-24-RGD, pueden estar relacionados con la inhibición de la progresión tumoral ²⁸⁰⁻²⁸², y el bloqueo de la respuesta antiviral ²⁸³. La fosforilación de p53 en S392 se encuentra aumentada en diferentes tipos de células tumorales, incluidas células de glioblastoma ²⁸⁴, contribuyendo a su progresión ²⁸⁵. A los 15 minutos posteriores al tratamiento con el adenovirus Delta-24-RGD, los niveles de esta fosforilación activadora cayeron (**Figura 8**). Sin embargo, en los 15 minutos siguientes, p53 recupera unos valores de fosforilación similares a los iniciales. Esta dinámica puede ser debida a la transferencia del ADN adenoviral al núcleo celular, donde la fosforilación de p53 (S392) aumenta su interacción con el ADN ^{286,287} y su actividad transcripcional ²⁸⁸, iniciándose así la expresión de las primeras proteínas adenovirales. Hay que tener en cuenta que debido a la aproximación utilizada, en este estudio no se analizó el estado de fosforilación de todas las quinasas y factores de transcripción que pueden verse implicados en la adhesión e internalización del adenovirus Delta-24-RGD, y que posiblemente haya otras quinasas y factores de transcripción que jueguen un papel importante durante su internalización. Por lo tanto, y a la vista de los resultados obtenidos, son necesarios estudios adicionales de fosfoproteómica en los que a escala masiva, se caractericen en detalle el efecto de la fosforilación o defosforilación del proteoma tumoral en los primeros minutos de la infección.

Para el estudio de las alteraciones intracelulares que se producen en las células de glioblastoma U87 durante la replicación del adenovirus oncolítico Delta-24-RGD (6-10hpi) se utilizó una aproximación subcelular, de manera que los proteomas nucleares y citosólicos se analizaron independientemente. Sin embargo, la autofagia altera los orgánulos celulares ¹⁶⁴, por lo que no se realizó un enriquecimiento subcelular cuando quisimos estudiar el proteoma alterado al inicio del proceso autofágico (24-48hpi). La replicación adenoviral comienza aproximadamente a las 7hpi ¹²⁹, y las partículas víricas empiezan su ensamblaje en el núcleo alrededor de 24hpi ¹²⁸, y continúan hasta las 48-72hpi ^{129,164}. Aproximadamente a las 48hpi comienza la autofagia celular ²⁸⁹, que el adenovirus induce para liberar su progenie viral ^{164,290}. De las 36 proteínas alteradas tanto en las fases de replicación del material genético (6-10hpi) como en el ensamblaje de las partículas adenovirales (24-48hpi), 16 fueron proteínas adenovirales (**Figura 34**). Todas ellas alcanzan su máxima expresión a las 48hpi, y correspondiendo con el aumento de la progenie adenoviral, las proteínas estructurales que forman la cápside fueron las que experimentaron mayor tasa de cambio (**Tabla suplementaria 6**). Sin embargo, la proteína adenoviral más expresada a las 48hpi fue *Early E3 14.5kDa*, que protege a las células de la citólisis inducida por TNF ²⁹¹. De esta forma se evita que la célula se lise antes de tiempo y la progenie adenoviral no pueda expandirse. Por el contrario, la dinámica que siguieron las 20 proteínas celulares restantes varía en función del estadio del ciclo adenoviral. Resulta interesante destacar que, pese al aumento de la expresión de proteínas adenovirales (**Figura 22A**), algunas proteínas celulares relacionadas con la síntesis de proteínas (ribosomales, proteínas de unión al ARN y al ADN), disminuyeron su expresión durante los estadios más tardíos de la infección (**Tabla suplementaria 8**). De hecho, diferentes

estudios han observado que durante la fase tardía de la infección viral se produce una disminución no solo de la síntesis de proteínas celulares, sino también del ADN celular ^{129,292}, mientras que la traducción de proteínas adenovirales continua ²⁹³. Esta selectividad en la traducción de proteínas adenovirales y silenciamiento de las proteínas celulares se debe a diferentes mecanismos moleculares como la interacción de las proteínas adenovirales E1B-55KDa y E4orf6 ^{294–296}, o la inhibición de E2Fα mediante la kinasa celular DAI (*Double-stranded RNA-activated inhibitor*) ²⁹⁷. Esta selectividad ha llevado también a suponer la existencia dentro de la célula de dos compartimentos aislados entre sí, en los que se distribuye la maquinaria de síntesis de proteínas ²⁹⁷.

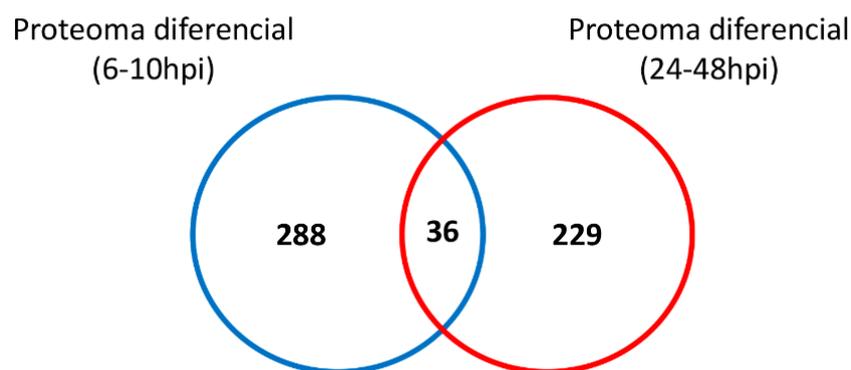


Figura 34: Diagrama de Venn de las proteínas alteradas durante la replicación del ADN adenoviral (6 y 10hpi) y el inicio de la autofagia celular (24 y 48hpi).

En la etapa de replicación adenoviral, el proteoma nuclear presentó mayor número de proteínas alteradas que el proteoma citosólico (**Figura 10B y 11**). Tanto el aumento tiempo-dependiente del proteoma diferencial como la localización de estas proteínas se explica debido a la infección, puesto que el adenovirus induce modificaciones estructurales y funcionales en el núcleo de las células que infecta ^{298–300}. Los resultados obtenidos a las 6, 10 y 24hpi, se compararon con los de un análisis

proteogenómico realizado en células de cáncer de cérvix (HeLa) infectadas con el Adv5 en unas condiciones de infectividad similares ²³⁰ (Figuras 35 y 36). Ambos *datasets* se superpusieron, validando parcialmente el enfoque proteómico utilizado, e identificando mecanismos moleculares comunes asociados a la infección de células tumorales con Adv5.

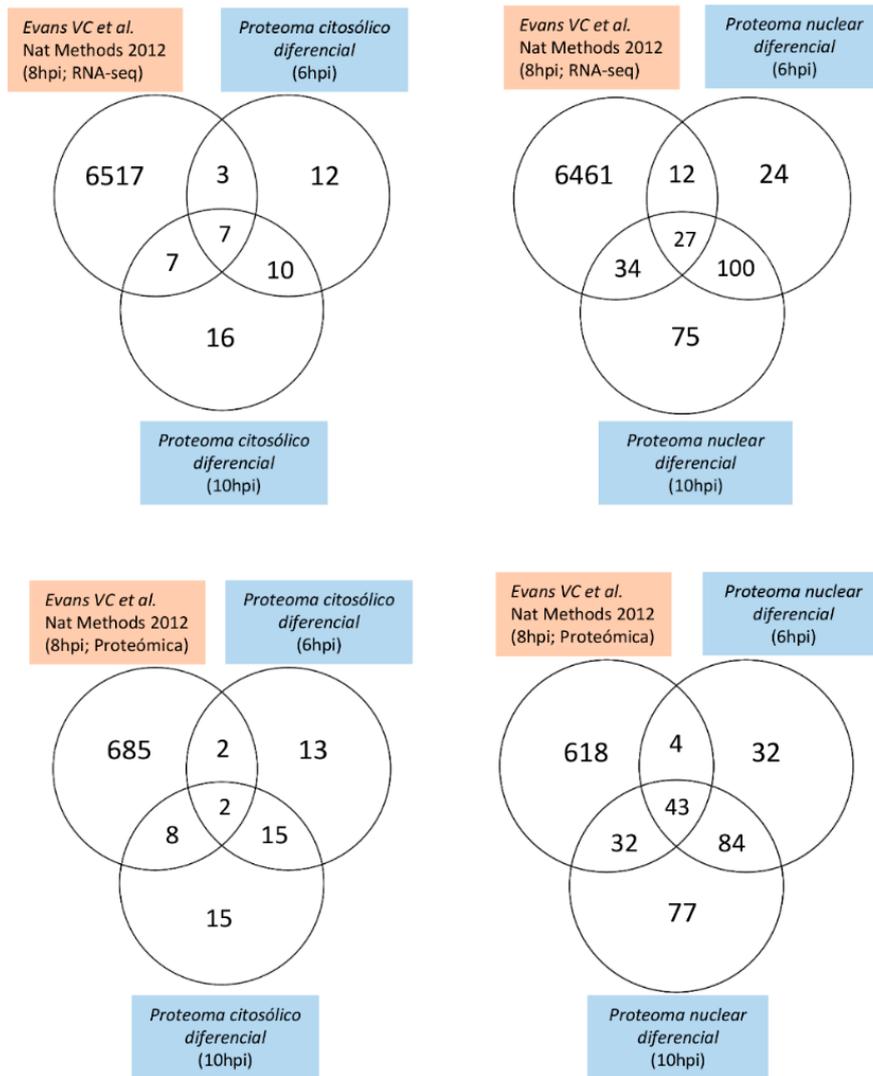


Figura 35: Comparativa entre las proteínas alteradas en las células U87 infectadas con el adenovirus Delta-24-RGD a las 6 y 10hpi, y el estudio proteogenómico realizado por *Evans VC et al.2012*

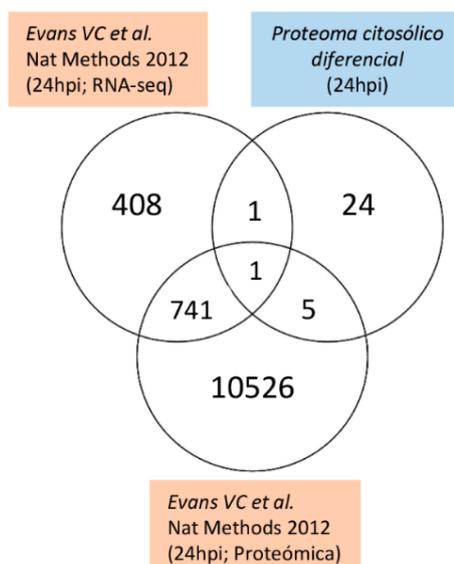


Figura 36: Superposición entre el análisis proteómico durante el estadio pre-autofágico (24hpi) y el estudio proteogenómico realizado por Evans VC et al.2012

La ruta de señalización de EIF2, encargada de la regulación de la síntesis de proteínas ³⁰¹, fue la que presentó un mayor número de proteínas alteradas en ambas etapas del ciclo adenoviral (**Figuras 20 y 22D**). En un trabajo previo con Adv5 y células tumorales HeLa, se observó que la actividad de esta proteína oscila a lo largo del tiempo, disminuyendo en las etapas más tardías de la infección ³⁰². Estos datos sugieren que alteraciones similares pueden estar ocurriendo en las células de glioblastoma cuando son tratadas con el Adv5 modificado Delta-24-RGD. Por otro lado, la señalización de mTOR, cuya activación inhibe la autofagia ³⁰³, también se vio afectada en ambos estadios infectivos. Al inicio de la infección adenoviral (6 y 10hpi), el adenovirus Delta-24-RGD alteró diferentes proteínas implicadas en la señalización de mTOR (**Figura 20**), cuya activación se ha relacionado con la entrada de las células infectadas en la fase S del ciclo celular y la replicación adenoviral ²⁴¹. Conforme la infección progresó (48hpi), el número de proteínas alteradas relacionadas con esta ruta de señalización disminuyó, pero se incrementó el número de proteínas

diferenciales relacionadas con autofagia (**Figuras 20 y 22D**), corroborando de este modo el inicio del proceso autofágico. La mayoría de funciones biológicas y rutas de señalización alteradas variaron según la etapa infectiva. A las 6hpi, se produjeron alteraciones en la expresión de proteínas relacionadas con la reparación y unión al ADN, además de la alteración progresiva de la transcripción y traducción de proteínas (6 y 10hpi). Al final de esta etapa (10hpi), comenzaron a producirse diferentes respuestas ante el estrés generado por la infección. Una de estas es la síntesis de ROS (**Figura 14**)^{304,305}, que se reflejó a las 48hpi como respuesta al estrés oxidativo (**Figura 22D**). El aumento de ROS ocasiona muerte celular, y por ello, se ha estudiado su potencial uso terapéutico en el tratamiento de GBM³⁰⁶⁻³⁰⁹. De este modo, el efecto terapéutico del adenovirus Delta-24-RGD queda reforzado, además de su posible uso junto con otras terapias inductoras de la producción de ROS.

Durante la replicación del ADN adenoviral y el proceso autofágico se produjo la activación del factor de transcripción NfκB (**Figuras 17 y 26**). Estudios previos muestran que las infecciones adenovirales inducen la activación de NfκB tanto en células no tumorales³¹⁰⁻³¹² como tumorales^{313,314}, como respuesta inmune ante la infección adenoviral. Esta respuesta desencadena la transcripción de diferentes tipos de citoquinas³¹⁵⁻³¹⁷, lo que potencialmente impulsa la recuperación de la inmunosupresión del microambiente, y potencia la respuesta inmune anti-tumoral. Por otro lado, la activación de NfκB se ha relacionado con una mayor resistencia a quimioterapéuticos como la TMZ³¹⁸ u otros tipos de muertes celulares³¹⁹, sugiriendo que esta activación puede ser un mecanismo de protección de las células de glioma frente al tratamiento con el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD. A su vez, hay que destacar que el perfil de activación de NfκB es muy complejo puesto que depende del

contexto biológico/estimulo que se da en cada momento ³²⁰, además de la combinación de sus diferentes MPTs, que en conjunto activarán o inhibirán la transcripción de genes concretos tras la infección adenoviral. La activación de PKC se ha relacionado con la modulación del crecimiento del glioma ^{321–323}. Si bien es cierto que existen once isoformas de PKC, y que cada una de ellas contribuye de distinta manera a la progresión del glioma, la mayoría de ellas tienen en GBM función pro-tumoral ³²⁴. Es posible que las isoformas que se modulan durante la replicación adenoviral (**Figura 19**) y el estadio autofágico (**Figura 28**) sean distintas. Por ejemplo la disminución de PKC α en GBM hace a las células más sensibles a estímulos pro-apoptóticos ³²¹, y la inhibición de PKC β reduce la proliferación celular in vitro ^{325,326}. A diferencia de otros tipos de células cancerígenas, donde su invasión y migración dependen de la activación de PLC y PKC ^{327,328}, la activación transitoria de PKC en las células de glioma, es independiente de PLC (**Figura 21B**). P38 MAPK tiene un papel dual en el desarrollo del GBM. Por un lado, diferentes estudios describen una mejor respuesta a la terapia citotóxica y un aumento de la respuesta inmune del GBM, cuando p38 MAPK se inhibe ^{329,330}. Por otro lado, la actividad de p38 MAPK ha sido relacionado con la inhibición de la autorrenovación de estas células ³⁰⁹, y también participa en la respuesta antiviral ¹²⁰, regulando la señalización de mediadores pro-inflamatorios como IL-8 ³¹⁷. De este modo, el adenovirus Delta-24-RGD contribuiría a la inhibición del crecimiento del glioma produciendo por un lado una respuesta inmune, y por otro impidiendo la autorrenovación celular (**Figura 21A**). Los datos de expresión y activación de AKT, y c-Jun (**Figura suplementaria 3**) son coherentes con los previamente publicados por Klein, S.R et al., donde se da una activación de la ruta de señalización AKT/mTOR y JNK/c-Jun (S63), cuando células de glioblastoma son tratadas

con el adenovirus Delta-24-RGD, y se inicia el proceso autofágico ²⁸⁹. Es posible que la diferencia en los niveles de activación se deba a la menor MOI utilizada en el presente estudio. La caída de la activación del factor de transcripción c-Jun a las 3 y 10hpi, y su aumento a las 48hpi, sugieren que el fosfoproteoma de c-Jun es muy dinámico durante el ciclo adenoviral. STAT3 es otro factor de transcripción que se ve alterado durante las primeras horas tras el tratamiento de las células U87 (**Figura 15B**). Este factor de transcripción se encuentra activado en las células de glioblastoma promoviendo la progresión del tumor ^{331,332}, y por esta razón, actualmente existen ensayos clínicos (NCT01904123) de inhibidores de STAT3 para el tratamiento de gliomas malignos. Además, investigaciones en diferentes tipos tumorales han demostrado que la inhibición de STAT3, mediante adenovirus oncolíticos, produce una actividad antitumoral potente ^{333,334}. De esta forma, el efecto positivo observado en el tratamiento del GBM con el adenovirus Delta-24-RGD puede parcialmente deberse a la inhibición de STAT3. Por otra parte, no se produjeron cambios en la activación de ERK1/2 durante el proceso autofágico ²⁸⁹. No obstante, el adenovirus Delta-24-RGD produjo una inactivación progresiva de ERK1/2 en las primeras horas posteriores a la infección (3-10hpi) (**Figura 21A**), que junto con la caída en la fosforilación de p38 MAPK, puede contribuir a la disminución de la migración de las células de glioma ³³⁵. Generalmente, la activación de MEK precede a la activación de su sustrato ERK. Pero en este caso, los patrones de activación de ambas quinasas difirieron (**Figura 21A, 29 y Figuras suplementarias 2 y 5**). En neutrófilos, se ha observado que debido a la mediación de ciertas citoquinas (IL-1 β , IL-8, TNF) y ligandos de receptores de tipo Toll, la activación de ambas proteínas se produce de manera independiente ^{336,337}. Si bien es cierto que este estudio difiere en la línea celular utilizada, además del tratamiento

con el adenovirus Delta-24-RGD, el aumento de estas citoquinas en el medio extracelular (**Figuras 31 y 32**) puede ser el responsable de la independencia en la activación de ambas quinasas. PKA interacciona con la proteína adenoviral E1A, y el aumento en la expresión de ambas proteínas (**Figuras 22A y 29**) puede contribuir a la transcripción adenoviral, la expresión de proteínas y la producción de la progenie adenoviral³³⁸. PKA también fosforila a la proteína adenoviral L4-33K, lo que contribuye al *splicing* alternativo de IIIa³³⁹. La inhibición de PKA a las 48hpi, correspondió con una disminución en la expresión de GAP (*Ras GTPase-activating protein 1*) (**Tabla suplementaria 5**), un inhibidor de la ruta de señalización de Ras/cAMP que restringe la generación de cAMP (*Cyclic adenosine monophosphate*). Pese a que no existen muchos estudios que relacionen PKA con autofagia en células de mamíferos, la inhibición de esta proteína parece estar ligada a la inducción de autofagia³⁴⁰. La expresión y activación de GSK3 se encuentra aumentada en GBM³⁴¹, pero la fosforilación de GSK3 α/β en S21 y S9, inhibe la actividad de la proteína³⁴². La disminución de la expresión, y por lo tanto la fosforilación de GSK3 a las 48hpi (**Figura 29**), puede deberse al inicio del proceso autofágico³⁴³. La quinasa SRC se encuentra generalmente activa en GBM contribuyendo a su fenotipo maligno^{344–346}, y participando en la proliferación, diferenciación, supervivencia y migración celular³⁴⁷. El tratamiento de las células de glioblastoma con el adenovirus Delta-24-RGD, inhibe esta activación (**Figura 28**). Posiblemente esto se deba a la disminución de la actividad de PKC, que en infecciones adenovirales, regula la activación de SRC³⁴⁸. Del mismo modo, el adenovirus Delta-24-RGD disminuyó la expresión de las fosfatasa PP1 α y PP2A, y la fosforilación inhibitoria de PP1 α (T320) de manera tiempo-dependiente (**Figura 30B**). La proteína adenoviral E1A contribuye a la actividad de PP2A mediante el aumento de

la expresión de su subunidad catalítica (PP2A/C) ³⁴⁹. Esta actividad conlleva la activación de p38 MAPK y la represión de AKT ³⁴⁹. Sin embargo una delección en el dominio CR2 de E1A, mismo dominio que la delección del Delta-24 ³⁵⁰, impide que E1A contribuya al aumento de la expresión de PP2A/C ³⁴⁹, y por lo tanto en la activación de p38 MAPK (**Figura suplementaria 4**) y represión de AKT (**Figura suplementaria 3**) ^{349,351}. Pese a que no se detectó mediante espectrometría de masas la proteína adenoviral E4orf4, a las 48hpi disminuyeron dos de sus principales proteínas asociadas, PP2A y SRC. Esta asociación está relacionada con la inducción de muerte celular ³⁵². Por otro lado, el uso de tratamientos inhibidores de SRC ³⁴⁵ y de PP1 α y PP2A ³⁵³, han demostrado una reducción de la viabilidad, migración y crecimiento de células de glioblastoma, además de la inducción de muerte celular programada por autofagia ³⁵⁴. Dicho esto, se abre la puerta a un futuro estudio del efecto que produce la combinación del tratamiento adenoviral, con alguno/os de estos inhibidores en las células de glioblastoma tanto *in vitro* como *in vivo*.

Las infecciones virales desencadenan en la célula hospedadora una respuesta antiviral, que se traduce en la liberación al medio de diferentes biomoléculas, entre ellas citoquinas y quimioquinas pleiotrópicas y redundantes, como IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 IL-15 e IL-21 ^{355,356}, con el objetivo de atraer hasta el lugar de la infección a las diferentes células efectoras del sistema inmune. Como puede apreciarse en las **Figuras 31 y 32**, durante la replicación del ADN adenoviral y el proceso autofágico inducido por el adenovirus Delta-24-RGD, las células de glioblastoma presentaron un perfil de secreción de citoquinas y factores de crecimiento muy dinámico, específico y tiempo-dependiente, entre las que se encuentran algunas de las citoquinas mencionadas previamente. Estas citoquinas y factores de crecimiento provocan la activación e

inducen la migración de variedad de células del sistema inmune, incidiendo especialmente en el reclutamiento y migración de leucocitos y fagocitos (**Figura 33**). Diferentes estudios muestran que los factores de crecimiento TGF β 1 y TGF β 2, se encuentran aumentados en GBM ^{357–359}. Ambos factores ejercen un papel dual en el tumor, puesto que se han relacionado por una parte con progresión ³⁶⁰ e inmunosupresión tumoral³⁶¹, y por otra, con respuesta inmune anti-tumoral ^{362–364}. En este estudio no se apreciaron diferencias significativas en su secreción. Sin embargo se produjo un aumento en la secreción de TGF β 3, una isoforma relacionada con astrocitomas menos malignos que el GBM ³⁵⁸, y respuesta inmune anti-tumoral ^{362–364}. El aumento progresivo en los niveles extracelulares de GRO a las 24 y 48hpi posiblemente se deba al aumento de GRO α (**Figura 32**). *In vitro*, esta citoquina promueve el crecimiento tumoral y la motilidad celular, e *in vivo* la invasión y expansión tumoral ³⁶⁵. También TIMP-1 y TIMP-2 se han relacionado con invasión tumoral ³⁶⁶ y su sobreexpresión, con un peor pronóstico para los pacientes de GBM ³⁶⁷. De hecho, unos niveles séricos bajos de TIMP-1 se asocian con mayor supervivencia, independientemente de la edad o el tratamiento del paciente ³⁶⁸. Hay que tener en cuenta que las células tumorales continúan desactivando y activando señales de proliferación, por lo que es de esperar un aumento de proteínas que promueven la expansión e invasión tumoral. No obstante, trabajos más recientes relacionan un aumento de TIMP-2 con la inhibición de la invasión de las células de glioblastoma y CMT ^{369,370}. Por lo tanto, se debe investigar con mayor profundidad la relación entre el tratamiento adenoviral y el incremento de la secreción de estas proteínas. Finalmente, el aumento en la producción de algunas de las citoquinas como RANTES, IP-10 (*10 kDa interferon gamma-induced protein*) (CXCL10), IL-1 β , G-CSF e IL-8, se ha descrito

previamente como respuesta a infecciones adenovirales ^{316,371–376}. *In vivo*, el adenovirus Delta-24-RGD induce la expresión de IP-10 e IL-1 β , junto con MIPs (*Macrophage inflammatory proteins*) ³⁷⁷, y esta inducción está relacionada con la atracción de macrófagos y células T CD4+, CD8+ en el tumor ^{105,170,377}.

En definitiva, el flujo proteómico establecido en esta tesis doctoral ha permitido la detección e identificación de nuevos mediadores inflamatorios, así como un grupo de quinasas y fosfatasas que son dianas del adenovirus Delta-24-RGD. Esto incrementa el conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que inducen la muerte de las células de glioma por efecto del vector terapéutico, sentando las bases para futuros desarrollos preclínicos orientados a potenciar el efecto anti-tumoral (**Figura 37**). Este estudio pone de nuevo de manifiesto la capacidad activadora del sistema inmune que tiene el tratamiento con el adenovirus Delta-24-RGD en las células de glioblastoma, aportando un listado de nuevos factores quimioatrayentes y citoquinas que contribuyen al efecto terapéutico del adenovirus Delta-24-RGD.

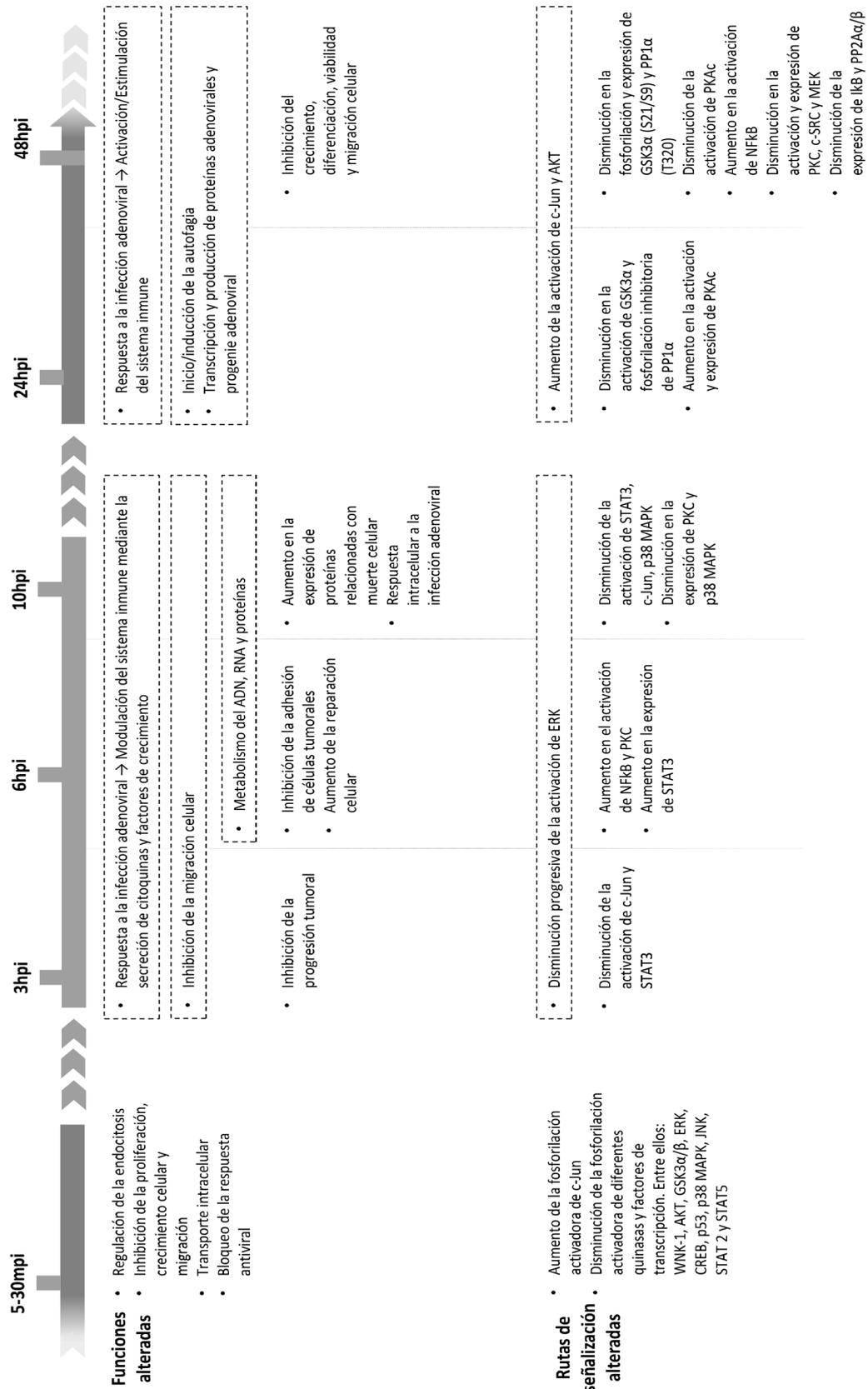


Figura 37. Esquema representativo de los hallazgos que explican el comportamiento de las células de glioma frente al vector terapéutico Delta-24-RGD.

Conclusiones

1. En esta tesis doctoral se ha establecido y optimizado un *pipeline* para la monitorización tanto intra como extracelular de proteomas tumorales susceptibles de ser tratados con diferentes tratamientos (ej. viroterapia, quimioterapia)
2. Los análisis cuantitativos mediante iTRAQ y *label-free* han permitido identificar 324 proteínas alteradas durante la replicación del ADN adenoviral, y 265 durante el inicio del proceso autofágico, aumentando el conocimiento acerca de la modulación metabólica inducida por el adenovirus delta-24-RGD.
3. La internalización del adenovirus oncolítico Delta-24-RGD produce en las células de glioblastoma una respuesta antiviral temprana que se traduce en la disminución de la activación de proteínas que contribuyen a la proliferación del GBM.
4. Durante todo el proceso infectivo, las células de glioblastoma inhiben su proliferación y migración como consecuencia de la alteración tiempo-dependiente de diferentes rutas de señalización.
5. En la replicación adenoviral del Delta-24-RGD en las células de glioblastoma, se inhibe la respuesta antiviral temprana mediante la inactivación de c-Jun y p38 MAPK.
6. La modulación en la expresión y activación de GSK3, PKAc, c-Jun y AKT contribuyen al inicio del proceso autofágico en las células de glioblastoma infectadas con el adenovirus Delta-24-RGD.

7. Durante la infección adenoviral, las células de glioblastoma secretan al medio de forma tiempo-dependiente diferentes factores de crecimiento, y citoquinas pleiotrópicas y redundantes, que en su mayoría tienen función quimiotáctica y activadora de las células del sistema inmune.
8. En el transcurso de la replicación de su material genético e inicio de la autofagia, el adenovirus Delta-24-RGD modula diferentes dianas terapéuticas de varios tratamientos contra el GBM (inhibición de STAT3, SRC, PP1 α , PP2A), sentando las bases a futuras combinaciones terapéuticas junto con la viroterapia Delta-24-RGD.

Perspectivas de futuro

Desde el punto de vista de la investigación básica, en esta tesis doctoral se han caracterizado exclusivamente las alteraciones proteómicas de la línea celular de glioblastoma humano U87 tratadas con el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD. El GBM es un tumor muy heterogéneo, compuesto por células tumorales con distintos grados de malignidad, diferentes anomalías moleculares y rutas de señalización alteradas^{3,25-27}, además de niveles de expresión de receptores CAR e integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ muy desiguales¹⁵⁷. Por otro lado, estos tumores presentan una subpoblación celular de CMT, que juegan un papel clave en la recurrencia del GBM, al ser resistentes a la radiación y la quimioterapia³⁷⁸. El adenovirus Delta-24-RGD también es capaz de infectar e inducir autofagia en esta subpoblación celular¹⁴⁰. Por esta razón, es necesario complementar este estudio caracterizando el proteoma alterado durante los distintos estadios infectivos del adenovirus Delta-24-RGD, en otras líneas celulares de glioblastoma humano (ej. U251, SNB19, U138) y CMT. Estos estudios permitirán saber si las respuestas inducidas por el adenovirus Delta-24-RGD (proteínas, rutas de señalización y/o funciones biológicas), son comunes a todas las células de glioblastoma, o si por el contrario, son específicas de cada una de las líneas celulares. Este conocimiento podrá ser la base para en un futuro, entender las distintas respuestas de los pacientes ante el tratamiento, investigar en la combinación de tratamientos complementarios, predecir la respuesta al tratamiento, desarrollar tratamientos más personalizados, o crear nuevas modificaciones en los vectores adenovirales, en función de los resultados obtenidos. Del mismo modo, deberían estudiarse las alteraciones moleculares que se producen en estas mismas líneas

celulares de glioblastoma y CMT, al ser tratadas con otros adenovirus oncolíticos, como el Delta-24-RGDOX (DNX-2440). Recientemente se ha iniciado un ensayo clínico en el que pacientes de glioblastoma recurrente son tratados con este adenovirus (NCT03714334). Los resultados obtenidos del estudio proteómico de las células de glioblastoma infectadas con el adenovirus Delta-24-RGDOX, quizás complementen los que se obtendrán en el ensayo clínico.

La utilización conjunta del adenovirus Delta-24-RGD, y otros tratamientos, como la radio y la quimioterapia, proporcionan un efecto sinérgico en la remisión del GBM ^{47,171,172}. Del mismo modo, nuestros datos muestran alteración en las proteínas relacionadas con la producción de ROS (**Figura 14**), y una disminución en la expresión de proteínas como c-SRC, PP1 α y PP2A (**Figuras 28 y 30**), cuyo potencial terapéutico para el tratamiento del GBM ya se ha estudiado ^{306–309,345,352}. Por lo tanto, caracterizar *in vitro* las alteraciones proteómicas que surgen de la combinación de este y otros adenovirus junto con otras aproximaciones como radioterapia y/o quimioterapia, permitirá identificar proteínas, rutas de señalización y funciones biológicas, claves para la remisión del tumor. Posteriormente este conocimiento puede ser empleado para perfeccionar, desarrollar, o incluir en la clínica de manera estandarizada, la combinación de diferentes aproximaciones para tratar el GBM.

Por otro lado, los proteomas diferenciales apuntan a una alteración en el cargo de las vesículas extracelulares/exosomas, por lo que un análisis detallado del contenido molecular de dichas vesículas durante la infección por el adenovirus Delta-24-RGD proporcionará información valiosa a la hora de interpretar la comunicación de las células tumorales con el microambiente tumoral.

Observando los datos obtenidos en este estudio desde otra perspectiva, se han podido observar cambios en la expresión y actividad de diferentes proteínas de manera tiempo-dependiente. Sin embargo, las proteínas pueden presentar diferentes isoformas. Debido a la importancia biológica que tienen las diferentes isoformas de una proteína, se debería caracterizar en mayor profundidad el comportamiento de las diferentes isoformas de algunas de las proteínas que en este trabajo se encuentran alteradas (ej. PKC, AKT).

El tratamiento del GBM con el adenovirus Delta-24-RGD produce una reactivación del sistema inmune ^{105,157,170,243}. Corroborando estos datos, en el presente estudio se ha observado un aumento en la secreción de multitud de citoquinas, muchas de ellas con funciones quimioatrayentes. Para evaluar el efecto de estas proteínas en el microambiente tumoral, se deberían de desarrollar alguno de los siguientes experimentos. Se pueden poner en contacto durante un periodo determinado, una o más líneas celulares del sistema inmune y células de glioblastoma con o sin tratamiento, y de este modo estudiar el efecto que el co-cultivo y/o el tratamiento produce en todas ellas (ej. migración, morfología, cambios en el proteoma intracelular y extracelular). Por otro lado se pueden silenciar los genes o inhibir la secreción de algunas de estas citoquinas de las células de glioblastoma, y estudiar el efecto que esto tiene en las células del sistema inmune.

El array de citoquinas y factores de crecimiento utilizado en este estudio permite monitorizar las citoquinas y factores de crecimiento en diferentes muestras biológicas, entre ellas suero. Por lo tanto, desde el punto de vista traslacional, la respuesta inmune producida por el tratamiento adenoviral del

glioblastoma, puede estudiarse *in vivo* en ratones xeno-injertados y posteriormente tratados con el adenovirus Delta-24-RGD, o cualquier otro, además de en combinación con radioterapia y/o quimioterapia. Al ser la obtención de suero una técnica no invasiva, este array también puede utilizarse en el análisis del suero de pacientes con GBM, antes y después de su tratamiento. De hecho, este estudio puede aportar valiosa información a los ensayos clínicos donde usan adenovirus oncolíticos, junto con quimioterapia y/o radioterapia, para tratar el GBM (NCT01582516, NCT03714334, NCT01956734, NCT02798406, NCT03603405, NCT01811992). Gracias al análisis de su suero, antes y después del tratamiento, y distinguiendo a los pacientes respondedores de los no respondedores, estos estudios podrán establecer el patrón de secreción de citoquinas y factores de crecimiento ligados o no, a la respuesta a la terapia. En el futuro, esto puede resultar de gran utilidad para predecir la potencial respuesta de un paciente a los distintos tratamientos (ej. Adenovirus, adenovirus y TMZ, adenovirus y radioterapia), además de realizar un seguimiento detallado de esta respuesta. Para su diagnóstico a los pacientes de glioblastoma se les realiza una biopsia de tejido, o incluso antes de ser tratados se les elimina la mayor parte de la masa tumoral. Por lo tanto, otros estudios pueden focalizarse en caracterizar el proteoma tumoral de los pacientes respondedores y no respondedores a ciertas terapias, antes y después de ellas, para establecer las diferencias potencialmente ligadas a estos resultados.

Abreviaturas

Siglas	Castellano	Inglés
AAT	Antígenos asociados a tumor	/
Adv	Adenovirus	/
AGT	/	<i>O</i> ⁶ -alkylguanine DNA alkyltransferase
AKT	/	Protein kinase B
AMP	/	Adenosine monophosphate
BHE	Barrera hematoencefálica	/
cAMP	/	Cyclic adenosine monophosphate
CAR	/	Coxsackie virus and adenovirus receptor
CBP	/	CREB binding protein
CD	Células dendríticas	/
Cdk	/	Cyclin-dependent kinase
CDKN2	/	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
CID	/	Collision induced dissociation
c-Jun	/	Transcription factor AP-1
CMT	Células madre tumorales	/
CPA	Célula presentadora de antígenos	/
CREB	/	Cyclic AMP-responsive element-binding protein
DAI	/	Double-stranded RNA-activated inhibitor
DAVID	/	Database for annotation, visualization and integrated discovery
DPP	/	Dipalmitoyl phosphatidylcholine
EGF	/	Epidermal growth factor
EGFR	/	Epidermal growth factor receptor
EIF2	/	Eukaryotic initiation factor 2
ERK1/2	/	Mitogen-activated protein kinase 1/2
ESI	/	Electrospray ionization
FDR	/	False discovery rate
FX	/	Coagulation factor X
GAP	/	Ras GTPase-activating protein 1
GAPDH	/	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme	/
GCSF	/	Granulocyte colony stimulating factor
GDNF	/	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GM-CSF	/	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GSK-3	/	Glycogen synthase kinase-3
GWAS	/	Genome-wide association study
HGF	/	Hepatocyte growth factor
hpi	Horas posteriores a la infección	/
HPLC	/	High-performance liquid chromatography
HSP27	/	Heat shock 27kDa protein
HSPG	/	Heparan sulfate proteoglycan
IARC	/	International agency for research on cancer
IDH	/	Isocitrate dehydrogenase
IGFBP-1	/	Insulin-like growth factor-binding protein 1
IL	/	Interleukin
IP-10	/	10 kDa interferon gamma-induced protein
IPA	/	Ingenuity pathway analysis software
IRM	Imagen de resonancia magnética	/
iTRAQ	/	Isobaric tags for relative and absolute quantification
IκB-alpha	/	NF-kappa-B inhibitor alpha
LC-MS	/	Liquid chromatography Mass spectrometer
LCR	Líquido cefalorraquídeo	/
Lf	/	Lactoferrin
LIF	/	Leukemia inhibitory factor
m/z	masa/carga	/
MAT	Microambiente tumoral	/
MCM	/	Minichromosome maintenance
MDSC	/	Myeloid-derived suppressor cell
MEK	/	Mitogen-activated protein kinase 1/2

MGMT	/	O ⁶ -methylguanine-DNA methyltransferase
MHC	/	Major histocompatibility complex
MIF	/	Macrophage migration inhibitory factor
MIP	/	Macrophage inflammatory protein
MK2	/	MAPKAP kinase 2
MOI	/	Multiplicity of infection
mpi	Minutos posteriores a la Infección	/
MPT	Modificaciones postraduccionales	/
mTOR	/	Mammalian target of rapamycin
NFκB	/	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NKT	/	Natural Killer T cells
NONO	/	Non-POU domain-containing octamer-binding protein
NPC	/	Nuclear pore complex
NT-3	/	Neutrophin-3
OMS	Organización mundial de la salud	/
OXSRI	/	Serine/threonine protein kinase OSR1
p16INK4α	/	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p300	/	Histone acetyltransferase p300
p38 MAPK	/	Mitogen-activated protein kinase p38α
p53	/	Cellular tumor antigen p53
p70 S6	/	70kDa ribosomal protein S6 kinase 1
pb	Pares de bases	/
PDK1	/	Phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PHB1	/	Prohibitin 1
PI3K	/	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIT	/	Proteomics informed by transcriptomics
PKA	/	Protein kinase A
PKC	/	Protein kinase C
PLC- gamma	/	Phospholipase C-gamma
PMAD	Patrones moleculares asociados a daño	/
PMAP	Patrones moleculares asociados a patógenos	/
PP1	/	Serine/threonine-protein phosphatase 1
PP1- alpha	/	Serine/threonine-protein phosphatase 1-alpha catalytic subunit
PP2A	/	Serine/threonine-protein phosphatase 2
PP4R3A	/	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A
PPP1CB	/	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit
PPP6C	/	Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit
pRB	/	Retinoblastoma protein
PRKAR1A	/	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit
RAN	/	GTP-binding nuclear protein RAN
RANTES	/	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RB	/	Retinoblastoma (gene)
REDECAN	Red española de registros de cáncer	/
ROS	/	Reactive oxygen species
RTEL1	/	Regulator of telomerase elongation helicase 1
SAPK/JNK	/	Stress-activated protein kinase/Jun amino terminal kinase
SCX	/	Strong cation exchange chromatography
SGK1	/	Serine/threonine-protein kinase Sgk1

SNC	<i>Sistema nervioso central</i>	/
SNP	<i>Sistema nervioso periférico</i>	/
SNPs	/	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
SRC	/	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
STAT	/	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STRING	/	<i>Search tool for the retrieval of interacting genes/proteins</i>
TC/TAC	<i>Tomografía computarizada</i>	/
TCR	/	<i>T-cell receptor</i>
TGF	/	<i>Tumor growth factor</i>
TIMP	/	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TMZ	<i>Temozolomida</i>	/
TNF-beta	/	<i>tumor necrosis factor beta</i>
TOF	/	<i>Time of flight</i>
Treg	<i>Linfocitos T reguladores</i>	/
VRK1	/	<i>Vaccinia-related kinases</i>
WB	/	<i>Western-blot</i>
WNK-1	/	<i>Serine/threonine protein kinase WNK1</i>

Bibliografía

1. Westermarck, B. Glioblastoma—a moving target. *Ups. J. Med. Sci.* **117**, 251–256 (2012).
2. Jayaram, S., Gupta, M. K., Polisetty, R. V., Cho, W. C. & Sirdeshmukh, R. Towards developing biomarkers for glioblastoma multiforme: a proteomics view. *Expert Rev. Proteomics* **11**, 621–639 (2014).
3. Wen, P. Y. & Kesari, S. Malignant Gliomas in Adults. *N. Engl. J. Med.* **359**, 492–507 (2008).
4. Sontheimer, H. A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *Journal of Neurochemistry* **105**, 287–295 (2008).
5. Rothstein, J. D. Paving new pathways. *Nature Medicine* **8**, 938–940 (2002).
6. Maher, E. A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* **15**, 1311–1333 (2001).
7. DeAngelis, L. M. Brain Tumors. *N. Engl. J. Med.* **344**, 114–123 (2001).
8. Stupp, R. *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **10**, 459–466 (2009).
9. Galceran, J. *et al.* Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin. Transl. Oncol.* **19**, 799–825 (2017).
10. Herculano-Houzel, S. The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* **62**, 1377–1391 (2014).
11. von Bartheld, C. S., Bahney, J. & Herculano-Houzel, S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J. Comp. Neurol.* **524**, 3865–3895 (2016).
12. Lee, Y. *et al.* Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* (2012). doi:10.1038/nature11314
13. Magistretti, P. J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. in *Experimental Physiology* (2011). doi:10.1113/expphysiol.2010.053157
14. Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S. & Barres, B. A. Control of synapse number by glia. *Science (80-.)*. (2001). doi:10.1126/science.291.5504.657
15. Schummers, J., Yu, H. & Sur, M. Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science (80-.)*. (2008). doi:10.1126/science.1156120
16. Blackburn, D., Sargsyan, S., Monk, P. N. & Shaw, P. J. Astrocyte function and role in motor neuron disease: A future therapeutic target? *GLIA* (2009). doi:10.1002/glia.20848
17. Montgomery, D. L. Astrocytes: Form, Functions, and Roles in Disease. *Veterinary Pathology* (1994). doi:10.1177/030098589403100201
18. Hanani, M. Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: In search of function. *Brain Res. Rev.* **64**, 304–327 (2010).

19. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* **131**, 803–820 (2016).
20. de Vleeschouwer, S. & Bergers, G. *Glioblastoma*. *Glioblastoma* (Codon Publications, 2017). doi:10.15586/codon.glioblastoma.2017
21. Jiang, H. *et al.* Examination of the therapeutic potential of Delta-24-RGD in brain tumor stem cells: Role of autophagic cell death. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 1410–1414 (2007).
22. Jiang, H., White, E. J., Conrad, C., Gomez-Manzano, C. & Fueyo, J. *Chapter 13 Autophagy Pathways in Glioblastoma*. *Methods in Enzymology* **453**, (Elsevier Inc., 2009).
23. Ait-Belkacem, R. *et al.* MALDI imaging and in-source decay for top-down characterization of glioblastoma. *Proteomics* **14**, 1290–1301 (2014).
24. Furnari, F. B. *et al.* Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes and Development* **21**, 2683–2710 (2007).
25. Phillips, H. S. *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **9**, 157–173 (2006).
26. Maher, E. A. *et al.* Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. *Cancer Res.* **66**, 11502–11513 (2006).
27. Sanai, N. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma. *World Neurosurgery* **74**, 4–5 (2010).
28. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *American Journal of Pathology* **170**, 1445–1453 (2007).
29. Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D. & Collins, V. P. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 8602–8606 (1990).
30. Wrensch, M. *et al.* Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nat. Genet.* **41**, 905–908 (2009).
31. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* **131**, 803–820 (2016).
32. Arora, R. S. *et al.* Age-incidence patterns of primary CNS tumors in children, adolescents, and adults in England. *Neuro. Oncol.* **11**, 403–13 (2009).
33. Suri, V. *et al.* Pediatric glioblastomas: A histopathological and molecular genetic study. *Neuro. Oncol.* **11**, 274–280 (2009).
34. Sánchez-Herrera, F. *et al.* Glioblastoma multiforme in children: Experience at Hospital Infantil de Mexico Federico Gomez. *Child's Nerv. Syst.* **25**, 551–557 (2009).
35. Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D. & Wrensch, M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pr. Neurol* **2**, 494–503; quiz 1 p following 516 (2006).
36. Chi, A. S. & Wen, P. Y. Inhibiting kinases in malignant gliomas. *Expert Opin. Ther. Targets* **11**, 473–96 (2007).
37. Colen, R. R., Wang, J., Singh, S. K., Gutman, D. A. & Zinn, P. O. Glioblastoma: Imaging

- Genomic Mapping Reveals Sex-specific Oncogenic Associations of Cell Death. *Radiology* **275**, 215–227 (2015).
38. Golla, H. *et al.* Glioblastoma multiforme from diagnosis to death: a prospective, hospital-based, cohort, pilot feasibility study of patient reported symptoms and needs. *Support. Care Cancer* **22**, 3341–3352 (2014).
 39. Walbert, T. & Khan, M. End-of-life symptoms and care in patients with primary malignant brain tumors: a systematic literature review. *J. Neurooncol.* **117**, 217–224 (2014).
 40. Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* **114**, 97–109 (2007).
 41. Cheng, H.-B. *et al.* IDH1 mutation is associated with improved overall survival in patients with glioblastoma: a meta-analysis. *Tumour Biol.* **34**, 3555–9 (2013).
 42. Chaichana, K. L. *et al.* Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro. Oncol.* **16**, 113–122 (2014).
 43. Grabowski, M. M. *et al.* Residual tumor volume versus extent of resection: predictors of survival after surgery for glioblastoma. *J. Neurosurg.* **121**, 1115–1123 (2014).
 44. Perry, J. R. *et al.* Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1027–1037 (2017).
 45. Yu, L.-R., Stewart, N. A. & Veenstra, T. D. Proteomics: The deciphering of the functional genome. in *Essentials of Genomic and Personalized Medicine* **352**, 89–96 (Elsevier, 2010).
 46. Wang, Y. *et al.* Comparison of the clinical efficacy of temozolomide (TMZ) versus nimustine (ACNU)-based chemotherapy in newly diagnosed glioblastoma. *Neurosurg. Rev.* **37**, 73–78 (2014).
 47. Alonso, M. M., Gomez-Manzano, C., Bekele, B. N., Yung, W. K. A. & Fueyo, J. Adenovirus-based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. *Cancer Res.* **67**, 11499–11504 (2007).
 48. Jacinto, F. V. & Esteller, M. MGMT hypermethylation: A prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair (Amst).* **6**, 1155–1160 (2007).
 49. Gomez-Manzano, C. *et al.* A novel E1A–E1B mutant adenovirus induces glioma regression in vivo. *Oncogene* **23**, 1821–1828 (2004).
 50. Singh, S. K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396–401 (2004).
 51. Lee, J. *et al.* Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* **9**, 391–403 (2006).
 52. Galli, R. *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* **64**, 7011–7021 (2004).
 53. Ignatova, T. N. *et al.* Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* **39**, 193–206 (2002).
 54. Hemmati, H. D. *et al.* Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci.* **100**, 15178–15183 (2003).
55. Dean, M., Fojo, T. & Bates, S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 275–284 (2005).
 56. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756–760 (2006).
 57. Wang, J. *et al.* Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells* **28**, 17–28 (2010).
 58. Happold, C. *et al.* Interferon- β induces loss of spherogenicity and overcomes therapy resistance of glioblastoma stem cells. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 948–61 (2014).
 59. Hasselbalch, B. *et al.* Cetuximab, bevacizumab, and irinotecan for patients with primary glioblastoma and progression after radiation therapy and temozolomide: A phase II trial. *Neuro. Oncol.* **12**, 508–516 (2010).
 60. Wick, W. *et al.* Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1954–1963 (2017).
 61. Ma, D. J. *et al.* A phase II trial of everolimus, temozolomide, and radiotherapy in patients with newly diagnosed glioblastoma: NCCTG N057K. *Neuro. Oncol.* **17**, 1261–1269 (2015).
 62. Chinnaiyan, P. *et al.* RTOG 0913: A phase 1 study of daily everolimus (RAD001) in combination with radiation therapy and temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **86**, 880–884 (2013).
 63. Bregy, A. *et al.* The role of Gliadel wafers in the treatment of high-grade gliomas. *Expert Review of Anticancer Therapy* **13**, 1453–1461 (2013).
 64. Mack, F. *et al.* Carmustine (BCNU) plus Teniposide (VM26) in recurrent malignant glioma. *Oncol.* **86**, 369–372 (2014).
 65. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 235–271 (2011).
 66. Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D. & Ploix, C. C. CNS immune privilege: Hiding in plain sight. *Immunological Reviews* **213**, 48–65 (2006).
 67. Hickey, W. F., Hsu, B. L. & Kimura, H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* **28**, 254–260 (1991).
 68. Shaftel, S. S. *et al.* Chronic interleukin-1 β expression in mouse brain leads to leukocyte infiltration and neutrophil-independent blood brain barrier permeability without overt neurodegeneration. *J. Neurosci.* **27**, 9301–9309 (2007).
 69. Louveau, A. *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* **523**, 337–341 (2015).
 70. Louveau, A., Harris, T. H. & Kipnis, J. Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends in Immunology* **36**, 569–577 (2015).
 71. Fidler, I. J., Yano, S., Zhang, R. D., Fujimaki, T. & Bucana, C. D. The seed and soil hypothesis: Vascularisation and brain metastases. *Lancet Oncol.* **3**, 53–57 (2002).
 72. Nir, I., Levanon, D. & Iosilevsky, G. Permeability of blood vessels in experimental gliomas: Uptake of ^{99m}Tc -glucoheptonate and alteration in blood-brain barrier as

- determined by cytochemistry and electron microscopy. *Neurosurgery* **25**, 523–532 (1989).
73. Amin, M. M. *et al.* Immune cell infiltrate in different grades of astrocytomas. *Egypt. J. Pathol.* **32**, 175–180 (2012).
 74. Morimura, T. *et al.* Monocyte subpopulations in human gliomas: Expression of Fc and complement receptors and correlation with tumor proliferation. *Acta Neuropathol.* **80**, 287–294 (1990).
 75. Kiefer, R., Supler, M. L., Toyka, K. V & Streit, W. J. In situ detection of transforming growth factor-beta mRNA in experimental rat glioma and reactive glial cells. *Neurosci. Lett.* **166**, 161–164 (1994).
 76. Watters, J. J., Schartner, J. M. & Badie, B. Microglia function in brain tumors. *J. Neurosci. Res.* **81**, 447–455 (2005).
 77. Curtin, J. F. *et al.* Treg depletion inhibits efficacy of cancer immunotherapy: Implications for clinical trials. *PLoS One* **3**, (2008).
 78. Fujita, M. *et al.* COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* **71**, 2664–2674 (2011).
 79. Jia, W., Jackson-Cook, C. & Graf, M. R. Tumor-infiltrating, myeloid-derived suppressor cells inhibit T cell activity by nitric oxide production in an intracranial rat glioma+vaccination model. *J. Neuroimmunol.* **223**, 20–30 (2010).
 80. Magaña-Maldonado, R. *et al.* Immunological Evasion in Glioblastoma. *Biomed Res. Int.* **2016**, 1–7 (2016).
 81. Hao, C. *et al.* Cytokine and cytokine receptor mRNA expression in human glioblastomas: Evidence of Th1, Th2 and Th3 cytokine dysregulation. *Acta Neuropathol.* **103**, 171–178 (2002).
 82. Van Meir, E., Sawamura, Y., Diserens, a C., Hamou, M. F. & de Tribolet, N. Human glioblastoma cells release interleukin 6 in vivo and in vitro. *Cancer Res.* **50**, 6683–8 (1990).
 83. Murphy, G. M. *et al.* Expression of interleukin-11 and its encoding mRNA by glioblastoma cells. *Neurosci. Lett.* **196**, 153–156 (1995).
 84. Halfter, H. *et al.* Growth inhibition of newly established human glioma cell lines by leukemia inhibitory factor. *J. Neurooncol.* **39**, 1–18 (1998).
 85. Halfter, H. *et al.* Inhibition of growth and induction of differentiation of glioma cell lines by oncostatin M (OSM). *Growth Factors* **15**, 135–147 (1998).
 86. Shweiki, D., Neeman, M., Itin, A. & Keshet, E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 768–72 (1995).
 87. Reiss, Y., Machein, M. R. & Plate, K. H. The role of angiopoietins during angiogenesis in gliomas. *Brain Pathol.* **15**, 311–317 (2005).
 88. Gabilovich, D. I. *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* **2**, 1096–103 (1996).
 89. Xue, Q. *et al.* High expression of MMP9 in glioma affects cell proliferation and is

associated with patient survival rates. *Oncol. Lett.* 1325–1330 (2017).
doi:10.3892/ol.2017.5567

90. Esteve, P.-O., Tremblay, P., Houde, M., St-Pierre, Y. & Mandeville, R. In vitro expression of MMP-2 and MMP-9 in glioma cells following exposure to inflammatory mediators. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1403**, 85–96 (1998).
91. Xie, H. *et al.* Expressions of matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-14 associated with the activation of extracellular signal-regulated kinase1/2 in human brain gliomas of different pathological grades. *Med. Oncol.* **28**, (2011).
92. Tang, B. *et al.* Activation of glioma cells generates immune tolerant NKT cells. *J. Biol. Chem.* **289**, 34595–34600 (2014).
93. Wurdinger, T., Deumelandt, K., Vliet, H. J. Van Der, Wesseling, P. & Gruijl, T. D. De. *Biochimica et Biophysica Acta* Mechanisms of intimate and long-distance cross-talk between glioma and myeloid cells : How to break a vicious cycle. **1846**, 560–575 (2014).
94. Rodrigues, J. C. *et al.* Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties. **12**, 351–365 (2010).
95. Umemura, N. *et al.* Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 1136–1144 (2008).
96. Zagzag, D. *et al.* Downregulation of major histocompatibility complex antigens in invading glioma cells: Stealth invasion of the brain. *Lab. Investig.* **85**, 328–341 (2005).
97. Platten, M. & Reardon, D. A. Concepts for Immunotherapies in Gliomas. *Semin. Neurol.* (2018). doi:10.1055/s-0037-1620274
98. Samaha, H. *et al.* A homing system targets therapeutic T cells to brain cancer. *Nature* (2018). doi:10.1038/s41586-018-0499-y
99. Dunn-Pirio, A. M. & Vlahovic, G. Immunotherapy approaches in the treatment of malignant brain tumors. *Cancer* **123**, 734–750 (2017).
100. Kirn, D. Replication-selective oncolytic adenoviruses: virotherapy aimed at genetic targets in cancer. *Oncogene* **19**, 6660–6669 (2000).
101. Guidotti, L. G. & Chisari, F. V. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu. Rev. Immunol.* (2001). doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.65
102. Janeway, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (1989). doi:10.1101/SQB.1989.054.01.003
103. Ludgate, C. M. Optimizing Cancer Treatments to Induce an Acute Immune Response: Radiation Abscopal Effects, PAMPs, and DAMPs. *Clin. Cancer Res.* **18**, 4522–4525 (2012).
104. Workenhe, S. T. & Mossman, K. L. Oncolytic Virotherapy and Immunogenic Cancer Cell Death: Sharpening the Sword for Improved Cancer Treatment Strategies. *Mol. Ther.* **22**, 251–256 (2014).
105. Jiang, H. *et al.* Delta-24-RGD oncolytic adenovirus elicits anti-glioma immunity in an immunocompetent mouse model. *PLoS One* **9**, (2014).

106. Foreman, P. M., Friedman, G. K., Cassady, K. A. & Markert, J. M. Oncolytic Virotherapy for the Treatment of Malignant Glioma. *Neurotherapeutics* **14**, 333–344 (2017).
107. Stewart, P. L. & Burnett, R. M. Adenovirus Structure by X-ray Crystallography and Electron Microscopy. in *The Molecular Repertoire of Adenoviruses I: Virion Structure and Infection* (eds. Doerfler, W. & Böhm, P.) 25–38 (Springer Berlin Heidelberg, 1995). doi:10.1007/978-3-642-79496-4_2
108. Russell, W. C. Adenoviruses: update on structure and function. *J. Gen. Virol.* **90**, 1–20 (2009).
109. Christensen, J. B. *et al.* Presence of the Adenovirus IVa2 Protein at a Single Vertex of the Mature Virion. *J. Virol.* **82**, 9086–9093 (2008).
110. Liu, H. *et al.* Atomic structure of human adenovirus by cryo-EM reveals interactions among protein networks. *Science* **329**, 1038–43 (2010).
111. Reddy, V. S., Natchiar, S. K., Stewart, P. L. & Nemerow, G. R. Crystal structure of human adenovirus at 3.5 Å resolution. *Science* **329**, 1071–5 (2010).
112. Giberson, A. N., Davidson, A. R. & Parks, R. J. Chromatin structure of adenovirus DNA throughout infection. *Nucleic Acids Res.* **40**, 2369–2376 (2012).
113. Zubietta, C., Schoehn, G., Chroboczek, J. & Cusack, S. The structure of the human adenovirus 2 penton. *Mol. Cell* **17**, 121–135 (2005).
114. San Martín, C. Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly. *Viruses* **4**, 847–877 (2012).
115. Bergelson, J. M. *et al.* Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science (80-.)*. **275**, 1320–1323 (1997).
116. Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. a & Nemerow, G. R. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**, 309–319 (1993).
117. Li, E. *et al.* Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor. *J. Virol.* **75**, 5405–9 (2001).
118. Wang, K., Guan, T., Cheresch, D. A. & Nemerow, G. R. Regulation of adenovirus membrane penetration by the cytoplasmic tail of integrin beta5. *J. Virol.* **74**, 2731–9 (2000).
119. Rajala, M. S., Rajala, R. V. S., Astley, R. A., Butt, A. L. & Chodosh, J. Corneal cell survival in adenovirus type 19 infection requires phosphoinositide 3-kinase/Akt activation. *J. Virol.* **79**, 12332–41 (2005).
120. Liu, Q. & Muruve, D. A. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther.* **10**, 935–940 (2003).
121. Wolfrum, N. & Greber, U. F. Adenovirus signalling in entry. *Cell. Microbiol.* **15**, 53–62 (2013).
122. Davison, A. J., Benko, M. & Harrach, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology* (2003). doi:10.1099/vir.0.19497-0
123. Mirza, M. A. & Weber, J. Structure of adenovirus chromatin. *BBA - Gene Struct. Expr.* (1982). doi:10.1016/0167-4781(82)90012-4

124. Brown, D. T., Westphal, M., Burlingham, B. T., Winterhoff, U. & Doerfler, W. Structure and composition of the adenovirus type 2 core. *J Virol* (1975).
125. Everitt, E., Sundquist, B., Pettersson, U. & Philipson, L. Structural proteins of adenoviruses. X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2. *Virology* **52**, 130–147 (1973).
126. Anderson, C. W., Young, M. E. & Flint, S. J. Characterization of the adenovirus 2 virion protein, Mu. *Virology* (1989). doi:10.1016/0042-6822(89)90193-1
127. Pérez-Berná, A. J. *et al.* Structure and Uncoating of Immature Adenovirus. *J. Mol. Biol.* (2009). doi:10.1016/j.jmb.2009.06.057
128. D'Halluin, J. C. Virus Assembly. in *The Molecular Repertoire of Adenoviruses I* (eds. Doerfler, W. & Böhm, P.) **199/3**, 47–66 (Springer Berlin Heidelberg, 1995).
129. Tollefson, A. E. *et al.* The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J. Virol.* **70**, 2296–306 (1996).
130. Kaelin, W. G. Functions of the retinoblastoma protein. *BioEssays* **21**, 950–958 (1999).
131. Trimarchi, J. M. & Lees, J. A. Sibling rivalry in the E2F family. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 11–20 (2002).
132. Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Yung, W. K. & Kyritsis, A. P. The functional role of tumor suppressor genes in gliomas: clues for future therapeutic strategies. *Neurology* **51**, 1250–1255 (1998).
133. Sherr, C. J. Cancer Cell Cycles. *Science* (80-.). (1996). doi:10.1126/science.274.5293.1672
134. Graña, X., Garriga, J. & Mayol, X. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* **17**, 3365–3383 (1998).
135. Davy, C. & Doorbar, J. G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology* **368**, 219–226 (2007).
136. Thomas E. Shenk. *Adenoviridae*. (Lippincott-Raven Publishers, 1996).
137. Gomez-Manzano, C., Yung, W. K. A., Alemany, R. & Fueyo, J. Genetically modified adenoviruses against gliomas: From bench to bedside. *Neurology* (2004). doi:10.1212/01.WNL.0000133302.15022.7F
138. Fueyo, J. *et al.* A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* **19**, 2–12 (2000).
139. Bayley, S. T. & Mymryk, J. S. Adenovirus E1A proteins and transformation. *International Journal of Oncology* (1994).
140. Ito, H. *et al.* Autophagic Cell Death of Malignant Glioma Cells Induced by a Conditionally Replicating Adenovirus. **77030**, (2006).
141. Baird, S. K. *et al.* Oncolytic adenoviral mutants induce a novel mode of programmed cell death in ovarian cancer. *Oncogene* (2008). doi:10.1038/sj.onc.1210977
142. Tyler, M. A., Ulasov, I. V & Lesniak, M. S. Cancer cell death by design: apoptosis, autophagy and glioma virotherapy. *Autophagy* **5**, 856–7 (2009).

143. Takaoka, A. *et al.* Integration of interferon- α/β signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* (2003). doi:10.1038/nature01850
144. Muñoz-Fontela, C. *et al.* Resistance to viral infection of super p53 mice. *Oncogene* (2005). doi:10.1038/sj.onc.1208477
145. Dharel, N. *et al.* Potential contribution of tumor suppressor p53 in the host defense against hepatitis C virus. *Hepatology* (2008). doi:10.1002/hep.22176
146. Yan, W. *et al.* Transcriptional analysis of immune-related gene expression in p53-deficient mice with increased susceptibility to influenza A virus infection. *BMC Med. Genomics* (2015). doi:10.1186/s12920-015-0127-8
147. Levine, A. J. The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology* (2009). doi:10.1016/j.virol.2008.09.034
148. Querido, E. *et al.* Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J Virol* **71**, 3788–3798 (1997).
149. Martin, M. E. & Berk, a J. Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. *J. Virol.* **72**, 3146–54 (1998).
150. Lill, N. L., Grossman, S. R., Ginsberg, D., DeCaprio, J. & Livingston, D. M. Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**, 823–827 (1997).
151. Avantaggiati, M. L. *et al.* Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**, 1175–1184 (1997).
152. Gu, W., Shi, X. L. & Roeder, R. G. Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**, 819–823 (1997).
153. Scolnick, D. M. *et al.* CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res.* **57**, 3693–3696 (1997).
154. Alemany, R., Balagué, C. & Curiel, D. T. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat. Biotechnol.* **18**, 723–727 (2000).
155. Frisch, S. M. & Mymryk, J. S. Adenovirus-5 E1A: Paradox and paradigm. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 441–452 (2002).
156. Avvakumov, N., Wheeler, R., D’Halluin, J. C. & Mymryk, J. S. Comparative sequence analysis of the largest E1A proteins of human and simian adenoviruses. *J. Virol.* **76**, 7968–75 (2002).
157. Fueyo, J. *et al.* Preclinical characterization of the antiglioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 652–660 (2003).
158. DOUGLAS, J. T. Targeted adenoviral vectors. *Mol. Phys.* **100**, 3075–3091 (2002).
159. Bello, L. *et al.* Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery. *Neurosurgery* **49**, 380–9; discussion 390 (2001).
160. Desgrosellier, J. S. & Cheresch, D. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 9–22 (2010).
161. Suzuki, K. *et al.* A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows

- improved oncolytic potency. *Clin. Cancer Res.* **7**, 120–126 (2001).
162. Kolvunen, E., Wang, B. & Ruoslahti, E. Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: Ligand specificities of the rgd-directed integrine. *Bio/Technology* **13**, 265–270 (1995).
 163. Pasqualini, R., Koivunen, E. & Ruoslahti, E. α_v Integrins as Receptors for Tumor Targeting by Circulating Ligands. *Nat. Biotechnol.* **15**, 542–546 (1997).
 164. Jiang, H. *et al.* Human Adenovirus Type 5 Induces Cell Lysis through Autophagy and Autophagy-Triggered Caspase Activity. *J. Virol.* **85**, 4720–4729 (2011).
 165. Piya, S. *et al.* The E1B19K oncoprotein complexes with beclin 1 to regulate autophagy in adenovirus-infected cells. *PLoS One* **6**, 1–7 (2011).
 166. Melcher, A., Parato, K., Rooney, C. M. & Bell, J. C. Thunder and Lightning: Immunotherapy and Oncolytic Viruses Collide. *Mol. Ther.* **19**, 1008–1016 (2011).
 167. van den Bossche, W. B. L. *et al.* Oncolytic virotherapy in glioblastoma patients induces a tumor macrophage phenotypic shift leading to an altered glioblastoma microenvironment. *Neuro. Oncol.* 1–31 (2018). doi:10.1093/neuonc/noy082
 168. Li, Y. *et al.* Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells. *Cancer Res.* (2008). doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0161
 169. Uhl, M. *et al.* Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8+T cells. *Cell Death Differ.* (2009). doi:10.1038/cdd.2009.8
 170. Lang, F. F. *et al.* Phase I Study of DNX-2401 (Delta-24-RGD) Oncolytic Adenovirus: Replication and Immunotherapeutic Effects in Recurrent Malignant Glioma. *J. Clin. Oncol.* **36**, JCO.2017.75.821 (2018).
 171. Lamfers, M. L. M. *et al.* Potential of the Conditionally Replicative Adenovirus Ad5- Δ 24RGD in the Treatment of Malignant Gliomas and Its Enhanced Effect with Radiotherapy Potential of the Conditionally Replicative Adenovirus Ad5- Δ 24RGD in the Treatment of Malignant Gliomas and. *Cancer Res.* 5736–5742 (2002).
 172. Alonso, M. M. *et al.* Delta-24-RGD in Combination With RAD001 Induces Enhanced Anti-glioma Effect via Autophagic Cell Death. *Mol. Ther.* **16**, 487–493 (2008).
 173. Campa, M. J., Kuan, C. T., O'Connor-McCourt, M. D., Bigner, D. D. & Patz, E. F. Design of a novel small peptide targeted against a tumor-specific receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 631–636 (2000).
 174. Piao, Y. *et al.* Oncolytic adenovirus retargeted to Delta-EGFR induces selective antiglioma activity. *Cancer Gene Ther.* **16**, 256–265 (2009).
 175. Jakubczak, J. L. *et al.* An oncolytic adenovirus selective for retinoblastoma tumor suppressor protein pathway-defective tumors: dependence on E1A, the E2F-1 promoter, and viral replication for selectivity and efficacy. *Cancer Res.* **63**, 1490–9 (2003).
 176. Alonso, M. M. *et al.* ICOVIR-5 shows E2F1 addiction and potent antiglioma effect in vivo. *Cancer Res.* **67**, 8255–8263 (2007).
 177. Cascallo, M. *et al.* Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol. Ther.* **15**, 1607–1615 (2007).

178. Jiang, H. *et al.* Oncolytic adenovirus and tumor-targeting immune modulatory therapy improve autologous cancer vaccination. *Cancer Res.* **77**, 3894–3907 (2017).
179. Jiang, H., McCormick, F., Lang, F. F., Gomez-Manzano, C. & Fueyo, J. Oncolytic adenoviruses as antiglioma agents. *Expert Review of Anticancer Therapy* **6**, 697–708 (2006).
180. Chiocca, E. A. *et al.* A Phase I Open-Label, Dose-Escalation, Multi-Institutional Trial of Injection with an E1B-Attenuated Adenovirus, ONYX-015, into the Peritumoral Region of Recurrent Malignant Gliomas, in the Adjuvant Setting. *Mol. Ther.* **10**, 958–966 (2004).
181. Westerhoff, H. V. & Palsson, B. O. The evolution of molecular biology into systems biology. *Nature Biotechnology* **22**, 1249–1252 (2004).
182. Kell, D. B. & Oliver, S. G. Here is the evidence, now what is the hypothesis? The complementary roles of inductive and hypothesis-driven science in the post-genomic era. *BioEssays* **26**, 99–105 (2004).
183. Wilkins, M. Proteomics data mining. *Expert Rev. Proteomics* **6**, 599–603 (2009).
184. Christians, U., Klawitter, J., Klepacki, J. & Klawitter, J. Chapter 4: The Role of Proteomics in the Study of Kidney Diseases and in the Development of Diagnostic Tools. in *Biomarkers of Kidney Disease* 119–223 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-803014-1.00004-2
185. Aebersold, R. & Mann, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* **537**, 347–355 (2016).
186. Gaudet, P. *et al.* The neXtProt knowledgebase on human proteins: 2017 update. *Nucleic Acids Res.* (2017). doi:10.1093/nar/gkw1062
187. Aken, B. L. *et al.* Ensembl 2017. *Nucleic Acids Res.* (2017). doi:10.1093/nar/gkw1104
188. UniProt Consortium, T. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* (2018). doi:10.1093/nar/gky092
189. Wang, E. T. *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* (2008). doi:10.1038/nature07509
190. Aebersold, R. *et al.* How many human proteoforms are there? *Nat. Chem. Biol.* **14**, 206–214 (2018).
191. Smith, L. M. & Kelleher, N. L. Proteoform: A single term describing protein complexity. *Nature Methods* (2013). doi:10.1038/nmeth.2369
192. Cox, J. & Mann, M. Is Proteomics the New Genomics? *Cell* (2007). doi:10.1016/j.cell.2007.07.032
193. Aebersold, R. *et al.* How many human proteoforms are there? *Nat. Chem. Biol.* **14**, 206–214 (2018).
194. Dimitrov, D. S. Therapeutic Proteins. in *Methods in Molecular Biology* 1–26 (2012). doi:10.1007/978-1-61779-921-1_1
195. Aebersold, R. & Goodlett, D. R. Mass Spectrometry in Proteomics. *Chem. Rev.* **101**, 269–296 (2001).
196. Domon, B. & Aebersold, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science (80-.).* **312**, 212–217 (2006).

197. Tran, J. C. *et al.* Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. *Nature* **480**, 254–258 (2011).
198. Nagaraj, N. *et al.* System-wide Perturbation Analysis with Nearly Complete Coverage of the Yeast Proteome by Single-shot Ultra HPLC Runs on a Bench Top Orbitrap. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, M111.013722 (2012).
199. Altelaar, A. F. M., Munoz, J. & Heck, A. J. R. Next-generation proteomics: Towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 35–48 (2013).
200. Catherman, A. D., Skinner, O. S. & Kelleher, N. L. Top Down proteomics: Facts and perspectives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **445**, 683–693 (2014).
201. Ow, S. Y., Salim, M., Noirel, J., Evans, C. & Wright, P. C. Minimising iTRAQ ratio compression through understanding LC-MS elution dependence and high-resolution HILIC fractionation. *Proteomics* **11**, 2341–2346 (2011).
202. Wysocki, V. H., Resing, K. A., Zhang, Q. & Cheng, G. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods* **35**, 211–222 (2005).
203. Larsen, M. R. *et al.* *Proof by reference to inaccessible literature- Compendium Introduction to proteomics. Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*
204. Roepstorff, P. & Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601 (1984).
205. Biemann, K. Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol.* **193**, 886–7 (1990).
206. Aebersold, R., Rist, B. & Gygi, S. P. Quantitative proteome analysis: methods and applications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **919**, 33–47 (2000).
207. Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E. & Aebersold, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 4646–58 (2003).
208. Rappsilber, J. & Mann, M. What does it mean to identify a protein in proteomics? *Trends Biochem. Sci.* **27**, 74–8 (2002).
209. Nesvizhskii, A. I., Vitek, O. & Aebersold, R. Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. *Nat Methods* **4**, 787–797 (2007).
210. Käll, L., Canterbury, J. D., Weston, J., Noble, W. S. & MacCoss, M. J. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat. Methods* **4**, 923–925 (2007).
211. Elias, J. E. & Gygi, S. P. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat. Methods* **4**, 207–214 (2007).
212. The, M., Tasnim, A. & Käll, L. How to talk about protein-level false discovery rates in shotgun proteomics. *Proteomics* (2016). doi:10.1002/pmic.201500431
213. Gouw, J. W., Krijgsveld, J. & Heck, A. J. R. Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms. *Mol. Cell. Proteomics* (2010). doi:10.1074/mcp.R900001-MCP200
214. Ong, S. E. *et al.* Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1**, 376–386 (2002).
215. Oda, Y., Huang, K., Cross, F. R., Cowburn, D. & Chait, B. T. Accurate quantitation of

- protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6591–6596 (1999).
216. Krijgsveld, J. *et al.* Metabolic labeling of *C. elegans* and *D. melanogaster* for quantitative proteomics. *Nat Biotechnol* **21**, 927–931 (2003).
 217. Wu, C. C., MacCoss, M. J., Howell, K. E., Matthews, D. E. & Yates, J. R. Metabolic labeling of mammalian organisms with stable isotopes for quantitative proteomic analysis. *Anal. Chem.* **76**, 4951–4959 (2004).
 218. Rauniyar, N., McClatchy, D. B. & Yates, J. R. Stable isotope labeling of mammals (SILAM) for in vivo quantitative proteomic analysis. *Methods* **61**, 260–268 (2013).
 219. Latosinska, A. *et al.* Comparative analysis of label-free and 8-plex iTRAQ approach for quantitative tissue proteomic analysis. *PLoS One* **10**, (2015).
 220. Wang, H., Alvarez, S. & Hicks, L. M. Comprehensive comparison of iTRAQ and label-free LC-based quantitative proteomics approaches using two *Chlamydomonas reinhardtii* strains of interest for biofuels engineering. *J. Proteome Res.* **11**, 487–501 (2012).
 221. Michalski, A., Cox, J. & Mann, M. More than 100,000 Detectable Peptide Species Elute in Single Shotgun Proteomics Runs but the Majority is Inaccessible to Data-Dependent LC–MS/MS. *J. Proteome Res.* **10**, 1785–1793 (2011).
 222. Houel, S. *et al.* Quantifying the Impact of Chimera MS/MS Spectra on Peptide Identification in Large-Scale Proteomics Studies. *J. Proteome Res.* **9**, 4152–4160 (2010).
 223. Sandberg, A. S., Branca, R. M. M., Lehtiö, J. & Forshed, J. Quantitative accuracy in mass spectrometry based proteomics of complex samples: The impact of labeling and precursor interference. *J. Proteomics* (2014). doi:10.1016/j.jprot.2013.10.035
 224. Verheggen, K. *et al.* Anatomy and evolution of database search engines—a central component of mass spectrometry based proteomic workflows. *Mass Spectrom. Rev.* (2017). doi:10.1002/mas.21543
 225. Hutchins, J. R. A. What’s that gene (or protein)? Online resources for exploring functions of genes, transcripts, and proteins. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1187–201 (2014).
 226. Blanche, F. *et al.* Polypeptide composition of an adenovirus type 5 used in cancer gene therapy. *J. Chromatogr. A* (2001). doi:10.1016/S0021-9673(01)00896-2
 227. Takahashi, E., Cohen, S. L., Tsai, P. K. & Sweeney, J. A. Quantitation of adenovirus type 5 empty capsids. *Anal. Biochem.* **349**, 208–217 (2006).
 228. Källsten, M. *et al.* Temporal characterization of the non-structural Adenovirus type 2 proteome and phosphoproteome using high-resolving mass spectrometry. *Virology* (2017). doi:10.1016/j.virol.2017.08.032
 229. Benevento, M. *et al.* Adenovirus composition, proteolysis, and disassembly studied by in-depth qualitative and quantitative proteomics. *J. Biol. Chem.* (2014). doi:10.1074/jbc.M113.537498
 230. Bergström Lind, S. *et al.* The phosphoproteome of the adenovirus type 2 virion. *Virology* (2012). doi:10.1016/j.virol.2012.08.012
 231. Chelius, D. *et al.* Analysis of the Adenovirus Type 5 Proteome by Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry Methods. *J. Proteome Res.* **1**, 501–513 (2002).
 232. Evans, V. C. *et al.* De novo derivation of proteomes from transcriptomes for transcript

- and protein identification. *Nat. Methods* **9**, 1207–1211 (2012).
233. Grabherr, M. G. *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* (2011). doi:10.1038/nbt.1883
234. Egan, C. *et al.* Mapping of cellular protein-binding sites on the products of early-region 1A of human adenovirus type 5. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3955–9 (1988).
235. Unwin, R. D., Griffiths, J. R. & Whetton, A. D. Simultaneous analysis of relative protein expression levels across multiple samples using iTRAQ isobaric tags with 2D nano LC-MS/MS. *Nat. Protoc.* **5**, 1574–1582 (2010).
236. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856–60 (2006).
237. Andrews, G. L., Simons, B. L., Young, J. B., Hawkridge, A. M. & Muddiman, D. C. Performance Characteristics of a New Hybrid Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometer (TripleTOF 5600). *Anal. Chem.* **83**, 5442–5446 (2011).
238. Shilov, I. V. *et al.* The Paragon Algorithm, a Next Generation Search Engine That Uses Sequence Temperature Values and Feature Probabilities to Identify Peptides from Tandem Mass Spectra. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1638–1655 (2007).
239. Tang, W. H., Shilov, I. V. & Seymour, S. L. Nonlinear Fitting Method for Determining Local False Discovery Rates from Decoy Database Searches. *J. Proteome Res.* **7**, 3661–3667 (2008).
240. Tyanova, S. *et al.* The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods* (2016). doi:10.1038/nmeth.3901
241. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* (2009). doi:10.1038/nprot.2008.211
242. Morchikh, M. *et al.* HEXIM1 and NEAT1 Long Non-coding RNA Form a Multi-subunit Complex that Regulates DNA-Mediated Innate Immune Response. *Mol. Cell* (2017). doi:10.1016/j.molcel.2017.06.020
243. Shea, C. O. *et al.* Adenoviral proteins mimic nutrient / growth signals to activate the mTOR pathway for viral replication. **24**, 1211–1221 (2005).
244. Jiang, H., White, E. J., Gomez-Manzano, C. & Fueyo, J. Adenovirus's last trick: You say lysis, we say autophagy. *Autophagy* **4**, 118–120 (2008).
245. Jiang, H. *et al.* Oncolytic adenovirus research evolution : from cell-cycle checkpoints to immune checkpoints. *Curr. Opin. Virol.* **13**, 33–39 (2015).
246. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (2011). doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
247. Zhou, L., Li, Q., Wang, J., Huang, C. & Nice, E. C. Oncoproteomics: Trials and tribulations. *PROTEOMICS - Clin. Appl.* **10**, 516–531 (2016).
248. Meacham, C. E. & Morrison, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* (2013). doi:10.1038/nature12624
249. Cho, W. C. S. & Cheng, C. H. K. Oncoproteomics: current trends and future perspectives. *Expert Rev. Proteomics* (2007). doi:10.1586/14789450.4.3.401

250. Ludwig, J. A. & Weinstein, J. N. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature Reviews Cancer* (2005). doi:10.1038/nrc1739
251. Jiang, H. & Fueyo, J. Healing after death: antitumor immunity induced by oncolytic adenoviral therapy. *Oncoimmunology* **3**, e947872 (2014).
252. Huang, Y. J., Frazier, M. L., Zhang, N., Liu, Q. & Wei, C. Reverse-phase protein array analysis to identify biomarker proteins in human pancreatic cancer. *Dig. Dis. Sci.* (2014). doi:10.1007/s10620-013-2938-9
253. Hudelist, G. *et al.* Use of high-throughput protein array for profiling of differentially expressed proteins in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* **86**, 281–91 (2004).
254. Huang, W. *et al.* New insights into the tumor microenvironment utilizing protein array technology. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
255. Byers, L. A. *et al.* Proteomic profiling identifies dysregulated pathways in small cell lung cancer and novel therapeutic targets including PARP1. *Cancer Discov.* (2012). doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0112
256. Smith, L. The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. *Mol. Cancer Ther.* (2006). doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0190
257. Adams, W. C. *et al.* Adenovirus serotype 5 infects human dendritic cells via a coxsackievirus-adenovirus receptor-independent receptor pathway mediated by lactoferrin and DC-SIGN. *J. Gen. Virol.* (2009). doi:10.1099/vir.0.008342-0
258. Suomalainen, M. *et al.* A Direct and Versatile Assay Measuring Membrane Penetration of Adenovirus in Single Cells. *J. Virol.* **87**, 12367–12379 (2013).
259. Greber, U. F., Willetts, M., Webster, P. & Helenius, A. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* (1993). doi:10.1016/0092-8674(93)90382-Z
260. Suomalainen, M. *et al.* Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J. Cell Biol.* (1999). doi:10.1083/jcb.144.4.657
261. Ji, W.-T. & Liu, H. J. PI3K-Akt signaling and viral infection. *Recent Pat. Biotechnol.* **2**, 218–26 (2008).
262. Tamanini, A. *et al.* Interaction of Adenovirus Type 5 Fiber with the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Activates Inflammatory Response in Human Respiratory Cells. *J. Virol.* **80**, 11241–11254 (2006).
263. Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. & Karin, M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* (1993). doi:10.1101/gad.7.11.2135
264. Dérijard, B. *et al.* JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* (1994). doi:10.1016/0092-8674(94)90380-8
265. Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E. & Woodgett, J. R. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* (1991). doi:10.1038/353670a0
266. Cho, Y. Y. *et al.* Cyclin-dependent kinase-3-mediated c-Jun phosphorylation at Ser63

- and Ser73 enhances cell transformation. *Cancer Res.* (2009). doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3125
267. Sevilla, A., Santos, C. R., Barcia, R., Vega, F. M. & Lazo, P. A. c-Jun phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and its cooperation with the N-terminal kinase of c-Jun (JNK). *Oncogene* (2004). doi:10.1038/sj.onc.1208015
 268. Tibbles, L. A. *et al.* Activation of p38 and ERK signaling during adenovirus vector cell entry lead to expression of the C-X-C chemokine IP-10. *J Virol* **76**, 1559–1568 (2002).
 269. Bhat, N. R. & Fan, F. Adenovirus infection induces microglial activation: involvement of mitogen-activated protein kinase pathways. *Brain Res.* **948**, 93–101 (2002).
 270. Suomalainen, M., Nakano, M. Y., Boucke, K., Keller, S. & Greber, U. F. Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *EMBO J.* **20**, 1310–1319 (2001).
 271. Landry, J. *et al.* Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J. Biol. Chem.* (1992). doi:10.1074/jbc.M109.082644
 272. Rouse, J. *et al.* A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* (1994). doi:10.1016/0092-8674(94)90277-1
 273. VITARI, A. C. *et al.* WNK1, the kinase mutated in an inherited high-blood-pressure syndrome, is a novel PKB (protein kinase B)/Akt substrate. *Biochem. J.* **378**, 257–268 (2004).
 274. Xu, B. E., Stippec, S., Lazrak, A., Huang, C. L. & Cobb, M. H. WNK1 activates SGK1 by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and non-catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* (2005). doi:10.1074/jbc.M505735200
 275. Zhu, W. *et al.* WNK1-OSR1 kinase-mediated phospho-activation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter facilitates glioma migration. *Mol. Cancer* (2014). doi:10.1186/1476-4598-13-31
 276. Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R. & Kondo, S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Reviews Cancer* (2005). doi:10.1038/nrc1692
 277. Iwamaru, A. *et al.* Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells. *Oncogene* (2007). doi:10.1038/sj.onc.1209992
 278. Grimshaw, K. M. *et al.* AT7867 is a potent and oral inhibitor of AKT and p70 S6 kinase that induces pharmacodynamic changes and inhibits human tumor xenograft growth. *Mol. Cancer Ther.* (2010). doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0986
 279. Grogan, P. T., Sarkaria, J. N., Timmermann, B. N. & Cohen, M. S. Oxidative cytotoxic agent withaferin A resensitizes temozolomide-resistant glioblastomas via MGMT depletion and induces apoptosis through Akt/mTOR pathway inhibitory modulation. *Invest. New Drugs* **32**, 604–17 (2014).
 280. Flynn, P., Wong, M., Zavar, M., Dean, N. M. & Stokoe, D. Inhibition of PDK-1 activity causes a reduction in cell proliferation and survival. *Curr. Biol.* (2000). doi:10.1016/S0960-9822(00)00801-0

281. Chakravarti, A. *et al.* The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J. Clin. Oncol.* (2004). doi:10.1200/JCO.2004.07.193
282. Daniel, P. *et al.* Selective CREB-dependent cyclin expression mediated by the PI3K and MAPK pathways supports glioma cell proliferation. *Oncogenesis* (2014). doi:10.1038/oncsis.2014.21
283. Feng, C. & Cao, S. Activation of STAT5 contributes to proliferation in U87 human glioblastoma multiforme cells. *Mol. Med. Rep.* (2014). doi:10.3892/mmr.2014.2223
284. Liang, Q. C. *et al.* Inhibition of transcription factor STAT5b suppresses proliferation, induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human glioblastoma multiforme cells. *Cancer Lett.* (2009). doi:10.1016/j.canlet.2008.08.011
285. Blaszczyk, K. *et al.* The unique role of STAT2 in constitutive and IFN-induced transcription and antiviral responses. *Cytokine and Growth Factor Reviews* (2016). doi:10.1016/j.cytogfr.2016.02.010
286. Ullrich, S. J. *et al.* Phosphorylation at Ser-15 and Ser-392 in mutant p53 molecules from human tumors is altered compared to wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1993). doi:10.1073/pnas.90.13.5954
287. Matsumoto, M. *et al.* Prognostic significance of serine 392 phosphorylation in overexpressed p53 protein in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* (2004). doi:10.1159/000081001
288. Hupp, T. R., Meek, D. W., Midgley, C. A. & Lane, D. P. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* (1992). doi:10.1016/0092-8674(92)90562-Q
289. Lu, H., Fisher, R. P., Bailey, P. & Levine, A. J. The CDK7-cycH-p36 complex of transcription factor IIH phosphorylates p53, enhancing its sequence-specific DNA binding activity in vitro. *Mol. Cell. Biol.* (1997). doi:10.1128/MCB.17.10.5923
290. Yap, D. B. S. *et al.* Ser392phosphorylation regulates the oncogenic function of mutant p53. *Cancer Res.* (2004). doi:10.1158/0008-5472.CAN-1305-2
291. Klein, S. R. *et al.* C-Jun N-terminal kinases are required for oncolytic adenovirus-mediated autophagy. *Oncogene* **34**, 5295–5301 (2015).
292. Berk AJ. Adenoviridae: the viruses and their replication. in *Fields virology* (eds. Knipe DM & Howley PM) 2355–2394 (2007).
293. Gooding, L. R. *et al.* The 10,400- and 14,500-dalton proteins encoded by region E3 of adenovirus function together to protect many but not all mouse cell lines against lysis by tumor necrosis factor. *J. Virol.* (1991).
294. Ginsberg, H. S., Bello, L. J. & Levine, A. J. Control of Biosynthesis of Host Macromolecules in Cells Infected with Adenoviruses. in *The Molecular Biology of Viruses* 547–572 (Elsevier, 1967). doi:10.1016/B978-0-12-395717-7.50036-5
295. Schneider, R. J. & Zhang, Y. Translational Regulation in Adenovirus-Infected Cells. in *Translational Regulation of Gene Expression 2* 227–250 (Springer US, 1993). doi:10.1007/978-1-4615-2894-4_11
296. Babiss, L. E. & Ginsberg, H. S. Adenovirus Type 5 Early Region Ib Gene Product Is Required for Efficient Shutoff of Host Protein Synthesis. *J. Virol.* (1984).

297. Bridge, E. & Ketner, G. Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression. *Virology* (1990). doi:10.1016/0042-6822(90)90088-9
298. Halbert, D. N., Cutt, J. R. & Shenk, T. Adenovirus Early Region 4 Encodes Functions Required for Efficient DNA Replication, Late Gene Expression, and Host Cell Shutoff. *J. Virol.* (1985).
299. O'Malley, R. P., Duncan, R. F., Hershey, J. W. B. & Mathews, M. B. Modification Of Protein-Synthesis Initiation-Factors and the Shut-Off Of Host Protein-Synthesis In Adenovirus-Infected Cells. *Virology* **168**, 112–118 (1989).
300. Russell, W. C. & Matthews, D. A. Nuclear perturbations following adenovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **272**, 399–413 (2003).
301. Lam, Y. W., Evans, V. C., Heesom, K. J., Lamond, A. I. & Matthews, D. a. Proteomics analysis of the nucleolus in adenovirus-infected cells. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 117–30 (2010).
302. Hidalgo, P. *et al.* Morphological, biochemical and functional study of viral replication compartments isolated from adenovirus-infected cells. *J. Virol.* JVI.00033-16 (2016). doi:10.1128/JVI.00033-16
303. Pain, V. M. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* (1996). doi:10.1111/j.1432-1033.1996.00747.x
304. Spurgeon, M. E. & Ornelles, D. A. The adenovirus E1B 55-kilodalton and E4 open reading frame 6 proteins limit phosphorylation of eIF2alpha during the late phase of infection. *J. Virol.* **83**, 9970–82 (2009).
305. Paquette, M., El-Houjeiri, L. & Pause, A. mTOR Pathways in Cancer and Autophagy. *Cancers (Basel)*. **10**, (2018).
306. McGuire, K. A., Barlan, A. U., Griffin, T. M. & Wiethoff, C. M. Adenovirus type 5 rupture of lysosomes leads to cathepsin B-dependent mitochondrial stress and production of reactive oxygen species. *J. Virol.* **85**, 10806–13 (2011).
307. Fink, K., Duval, A., Martel, A., Soucy-Faulkner, A. & Grandvaux, N. Dual role of NOX2 in respiratory syncytial virus- and sendai virus-induced activation of NF-kappaB in airway epithelial cells. *J. Immunol.* **180**, 6911–22 (2008).
308. Liu, J. M. *et al.* Piperlongumine selectively kills glioblastoma multiforme cells via reactive oxygen species accumulation dependent JNK and p38 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **437**, 87–93 (2013).
309. Choi, Y. J. *et al.* Ginsenoside Rg3 induces apoptosis in the U87MG human glioblastoma cell line through the MEK signaling pathway and reactive oxygen species. *Oncol. Rep.* **30**, 1362–70 (2013).
310. Lee, B.-S. *et al.* Reactive oxygen species responsive nanoprodruge to treat intracranial glioblastoma. *ACS Nano* **7**, 3061–77 (2013).
311. Singer, E. *et al.* Reactive oxygen species-mediated therapeutic response and resistance in glioblastoma. *Cell Death Dis.* **6**, e1601 (2015).
312. Melotti, P. *et al.* Activation of NF-kB mediates ICAM-1 induction in respiratory cells exposed to an adenovirus-derived vector. *Gene Ther.* **8**, 1436–42 (2001).
313. Tamanini, A., Rolfini, R., Nicolis, E., Melotti, P. & Cabrini, G. MAP kinases and NF-kappaB

- collaborate to induce ICAM-1 gene expression in the early phase of adenovirus infection. *Virology* **307**, 228–42 (2003).
314. Clesham, G. J. *et al.* High adenoviral loads stimulate NF kappaB-dependent gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Gene Ther.* (1998). doi:10.1038/sj.gt.3300576
 315. Palmer, D. H., Chen, M.-J., Searle, P. F., Kerr, D. J. & Young, L. S. Inhibition of NF-kappaB enhances the cytotoxicity of virus-directed enzyme prodrug therapy and oncolytic adenovirus cancer gene therapy. *Gene Ther.* (2005). doi:10.1038/sj.gt.3302510
 316. Hodzic, J., Sie, D., Vermeulen, A. & van Beusechem, V. W. Functional Screening Identifies Human miRNAs that Modulate Adenovirus Propagation in Prostate Cancer Cells. *Hum. Gene Ther.* (2017). doi:10.1089/hum.2016.143
 317. Bowen, G. P. *et al.* Adenovirus Vector-Induced Inflammation: Capsid-Dependent Induction of the C-C Chemokine RANTES Requires NF- κ B. *Hum. Gene Ther.* **13**, 367–379 (2002).
 318. Borgland, S. L., Bowen, G. P., Wong, N. C., Libermann, T. a & Muruve, D. a. Adenovirus vector-induced expression of the C-X-C chemokine IP-10 is mediated through capsid-dependent activation of NF-kappaB. *J. Virol.* (2000). doi:10.1128/JVI.74.9.3941-3947.2000
 319. Rajaiya, J., Yousuf, M. A., Singh, G., Stanish, H. & Chodosh, J. Heat Shock Protein 27 Mediated Signaling in Viral Infection. *Biochemistry* **51**, 5695–5702 (2012).
 320. Bredel, M. *et al.* Tumor Necrosis Factor- α -Induced Protein 3 As a Putative Regulator of Nuclear Factor- κ B-Mediated Resistance to O⁶-Alkylating Agents in Human Glioblastomas. *J. Clin. Oncol.* **24**, 274–287 (2006).
 321. Kasuga, C. *et al.* Sensitization of human glioblastomas to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) by NF-kappaB inhibitors. *Cancer Sci.* **95**, 840–4 (2004).
 322. Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V. & Chariot, A. Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: Implications in cancer and inflammation. *Trends in Biochemical Sciences* (2005). doi:10.1016/j.tibs.2004.11.009
 323. Cameron, A. J., Procyk, K. J., Leitges, M. & Parker, P. J. PKC alpha protein but not kinase activity is critical for glioma cell proliferation and survival. *Int. J. Cancer* **123**, 769–779 (2008).
 324. Sharif, T. R. & Sharif, M. Overexpression of protein kinase C epsilon in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples. *Int. J. Oncol.* **15**, 237–243 (1999).
 325. da Rocha, a B., Mans, D. R. a, Regner, a & Schwartzmann, G. Targeting protein kinase C: new therapeutic opportunities against high-grade malignant gliomas? *Oncologist* (2002). doi:10.1634/THEONCOLOGIST.7-1-17
 326. Carmo, A. do, Balça-Silva, J., Matias, D. & Lopes, M. PKC signaling in glioblastoma. *Cancer Biol. Ther.* **14**, 287–294 (2013).
 327. Griner, E. M. & Kazanietz, M. G. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 281–294 (2007).
 328. Graff, J. R. *et al.* The Protein Kinase C β -Selective Inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), Suppresses Signaling through the AKT Pathway, Induces Apoptosis, and Suppresses Growth of Human Colon Cancer and Glioblastoma Xenografts. *Cancer Res.* **65**, 7462–

- 7469 (2005).
329. Dorsam, R. T. & Gutkind, J. S. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 79–94 (2007).
 330. Du, H. F. *et al.* A new PKC α / β /TBX3/E-cadherin pathway is involved in PLC ϵ -regulated invasion and migration in human bladder cancer cells. *Cell. Signal.* **26**, 580–593 (2014).
 331. Demuth, T. *et al.* MAP-ing glioma invasion: Mitogen-activated protein kinase kinase 3 and p38 drive glioma invasion and progression and predict patient survival. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 1212–1222 (2007).
 332. Kühnöl, C., Herbarth, M., Föll, J., Staeger, M. S. & Kramm, C. CD137 stimulation and p38 MAPK inhibition improve reactivity in an in vitro model of glioblastoma immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 1797–1809 (2013).
 333. Chang, N., Ahn, S. H., Kong, D.-S., Lee, H. W. & Nam, D.-H. The role of STAT3 in glioblastoma progression through dual influences on tumor cells and the immune microenvironment. *Mol. Cell. Endocrinol.* **451**, 53–65 (2017).
 334. Iwamaru, A. *et al.* A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. *Oncogene* **26**, 2435–2444 (2007).
 335. Han, Z. *et al.* A novel oncolytic adenovirus selectively silences the expression of tumor-associated STAT3 and exhibits potent antitumoral activity. *Carcinogenesis* **30**, 2014–2022 (2009).
 336. Han, Z. *et al.* A Potent Oncolytic Adenovirus Selectively Blocks the STAT3 Signaling Pathway and Potentiates Cisplatin Antitumor Activity in Ovarian Cancer. *Hum. Gene Ther.* **23**, 32–45 (2012).
 337. Bae, I. H., Lee, W. S., Yun, D. H., Han, Y.-H. & Lee, J.-S. 3-Hydroxy-3',4'-dimethoxyflavone suppresses Bcl-w-induced invasive potentials and stemness in glioblastoma multiforme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **450**, 704–710 (2014).
 338. Simard, F. A., Cloutier, A., Ear, T., Vardhan, H. & McDonald, P. P. MEK-independent ERK activation in human neutrophils and its impact on functional responses. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 565–573 (2015).
 339. Foreback, J. L. *et al.* Blood mononuclear cell production of TNF- α and IL-8: Engagement of different signal transduction pathways including the p42 MAP kinase pathway. in *Journal of Leukocyte Biology* (1998). doi:10.1002/jlb.64.1.124
 340. King, C. R. *et al.* Functional and Structural Mimicry of Cellular Protein Kinase A Anchoring Proteins by a Viral Oncoprotein. *PLOS Pathog.* **12**, e1005621 (2016).
 341. Törmänen Persson, H. *et al.* Two Cellular Protein Kinases, DNA-PK and PKA, Phosphorylate the Adenoviral L4-33K Protein and Have Opposite Effects on L1 Alternative RNA Splicing. *PLoS One* **7**, e31871 (2012).
 342. Papinski, D. & Kraft, C. Regulation of Autophagy By Signaling Through the Atg1/ULK1 Complex. *J. Mol. Biol.* **428**, 1725–1741 (2016).
 343. Majewska, E. & Szeliga, M. AKT/GSK3 β Signaling in Glioblastoma. *Neurochem. Res.* **42**, 918–924 (2017).
 344. McCubrey, J. A. *et al.* GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget* **5**, (2014).

345. Mancinelli, R. *et al.* Multifaceted Roles of GSK-3 in Cancer and Autophagy-Related Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–14 (2017).
346. Kmiecik, T. E. & Shalloway, D. Activation and suppression of pp60c-src transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell* **49**, 65–73 (1987).
347. Du, J. *et al.* Bead-based profiling of tyrosine kinase phosphorylation identifies SRC as a potential target for glioblastoma therapy. *Nat. Biotechnol.* **27**, 77–83 (2009).
348. Weissenberger, J. *et al.* Development and malignant progression of astrocytomas in GFAP-v-src transgenic mice. *Oncogene* **14**, 2005–2013 (1997).
349. Thomas, S. M. & Brugge, J. S. CELLULAR FUNCTIONS REGULATED BY SRC FAMILY KINASES. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 513–609 (1997).
350. Yousuf, M. A. *et al.* Protein Kinase C Signaling in Adenoviral Infection. *Biochemistry* **55**, 5938–5946 (2016).
351. Liao, Y. & Hung, M.-C. Role of Protein Phosphatase 2A in Adenoviral E1A Protein-Mediated Sensitization to Anticancer Drug-Induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **64**, 5938–5942 (2004).
352. Jiang, H. *et al.* Downmodulation of E1 A Protein Expression as a Novel Strategy to Design Cancer-Selective Adenoviruses. *Neoplasia* **7**, 723–729 (2005).
353. Liao, Y. & Hung, M.-C. Regulation of the Activity of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase by Akt in Cancer and Adenoviral Protein E1A-Mediated Sensitization to Apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6836–6848 (2003).
354. Kleinberger, T. Mechanisms of Cancer Cell Killing by the Adenovirus E4orf4 Protein. *Viruses* **7**, 2334–2357 (2015).
355. Hill, T. A. *et al.* Heterocyclic substituted cantharidin and norcantharidin analogues—synthesis, protein phosphatase (1 and 2A) inhibition, and anti-cancer activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 3392–3397 (2007).
356. Milano, V., Piao, Y., LaFortune, T. & de Groot, J. Dasatinib-induced autophagy is enhanced in combination with temozolomide in glioma. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 394–406 (2009).
357. Ozaki, K. & Leonard, W. J. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *Journal of Biological Chemistry* (2002). doi:10.1074/jbc.R200003200
358. Huang, R. *et al.* Cytokine Antibody Arrays in Biomarker Discovery and Validation. *Curr. Proteomics* (2012). doi:10.2174/157016412799746209
359. Avril, T. *et al.* Distinct effects of human glioblastoma immunoregulatory molecules programmed cell death ligand-1 (PDL-1) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on tumour-specific T cell functions. *J. Neuroimmunol.* (2010). doi:10.1016/j.jneuroim.2010.04.003
360. Kjellman, C. *et al.* Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int. J. cancer* **89**, 251–8 (2000).
361. Bodmer, S. *et al.* Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J. Immunol.* (1989). doi:10.1016/S0044-8486(99)00279-3

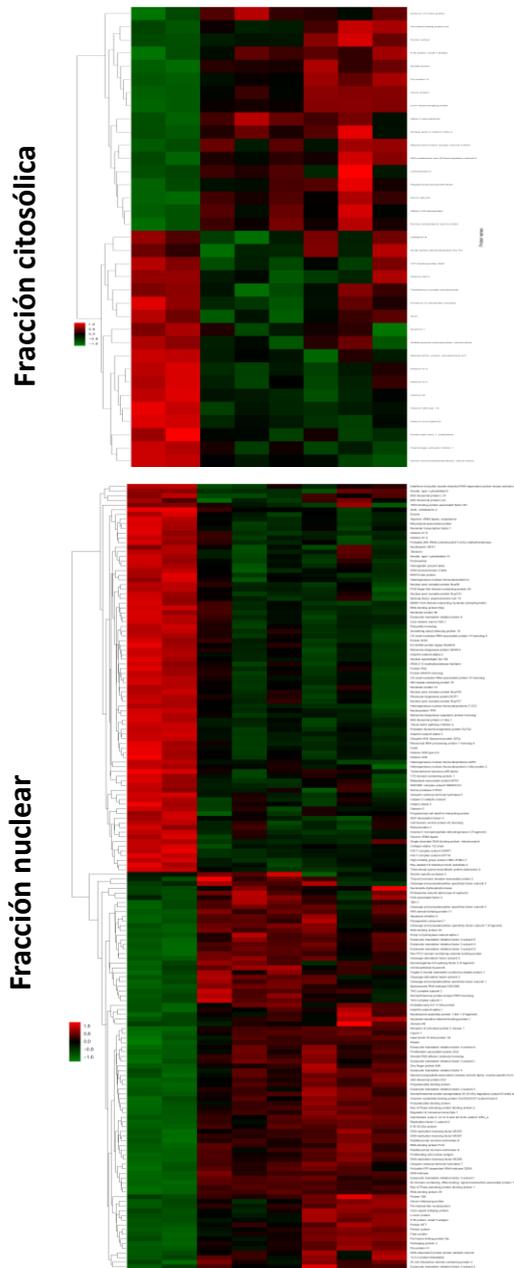
362. Jennings, M. T. & Pietsenpol, J. A. The role of transforming growth factor beta in glioma progression. *J. Neurooncol.* **36**, 123–40 (1998).
363. Jachimczak, P. *et al.* The effect of transforming growth factor-beta 2-specific phosphorothioate-anti-sense oligodeoxynucleotides in reversing cellular immunosuppression in malignant glioma. *J. Neurosurg.* (1993). doi:10.3171/jns.1993.78.6.0944
364. Gorelik, L. & Flavell, R. A. Transforming growth factor- β in T-cell biology. *Nature Reviews Immunology* (2002). doi:10.1038/nri704
365. Thomas, D. A. & Massagué, J. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* (2005). doi:10.1016/j.ccr.2005.10.012
366. Eisele, G. *et al.* TGF- β and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* (2006). doi:10.1093/brain/awl205
367. Zhou, Y. *et al.* The chemokine GRO- α (CXCL1) confers increased tumorigenicity to glioma cells. *Carcinogenesis* **26**, 2058–2068 (2005).
368. Lu, K. V, Jong, K. A., Rajasekaran, A. K., Cloughesy, T. F. & Mischel, P. S. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line. *Lab. Investig.* **84**, 8–20 (2004).
369. Aaberg-Jessen, C. *et al.* Low expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in glioblastoma predicts longer patient survival. *J. Neurooncol.* **95**, 117–128 (2009).
370. Crocker, M. *et al.* Serum angiogenic profile of patients with glioblastoma identifies distinct tumor subtypes and shows that TIMP-1 is a prognostic factor. *Neuro. Oncol.* **13**, 99–108 (2011).
371. ROOMI, M. W., KALINOVSKY, T., NIEDZWIECKI, A. & RATH, M. Modulation of uPA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human glioblastoma cell lines. *Int. J. Oncol.* **45**, 887–894 (2014).
372. Wang, Z. *et al.* Oncogenic miR-20a and miR-106a enhance the invasiveness of human glioma stem cells by directly targeting TIMP-2. *Oncogene* **34**, 1407–1419 (2015).
373. Higginbotham, J. N., Seth, P., Blaese, R. M. & Ramsey, W. J. The Release of Inflammatory Cytokines from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells In Vitro Following Exposure to Adenovirus Variants and Capsid. *Hum. Gene Ther.* **13**, 129–141 (2002).
374. Muruve, D. A., Barnes, M. J., Stillman, I. E. & Libermann, T. A. Adenoviral Gene Therapy Leads to Rapid Induction of Multiple Chemokines and Acute Neutrophil-Dependent Hepatic Injury in Vivo. *Hum. Gene Ther.* (1999). doi:10.1089/10430349950018364
375. Amin, R., Wilmott, R., Schwarz, Y., Trapnell, B. & Stark, J. Replication-deficient adenovirus induces expression of interleukin-8 by airway epithelial cells in vitro. *Hum Gene Ther* (1995). doi:10.1089/hum.1995.6.2-145
376. Bruder, J. T. & Kovesdi, I. Adenovirus infection stimulates the Raf/MAPK signaling pathway and induces interleukin-8 expression. *J Virol* (1997).
377. Bowen, G. P. *et al.* Adenovirus vector-induced inflammation: capsid-dependent

induction of the C-C chemokine RANTES requires NF-kappa B. *Hum. Gene Ther.* (2002).
doi:10.1089/10430340252792503

378. Smith, J. S. *et al.* The Role of Endosomal Escape and Mitogen-Activated Protein Kinases in Adenoviral Activation of the Innate Immune Response. *PLoS One* **6**, e26755 (2011).
379. Kleijn, A. *et al.* The in vivo therapeutic efficacy of the oncolytic adenovirus Delta24-RGD is mediated by tumor-specific immunity. *PLoS One* **9**, (2014).
380. Villano, J. L., Seery, T. E. & Bressler, L. R. Temozolomide in malignant gliomas: Current use and future targets. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (2009).
doi:10.1007/s00280-009-1050-5

Anexos

Cambios en el proteoma a las 6hpi



Cambios en el proteoma 10hpi

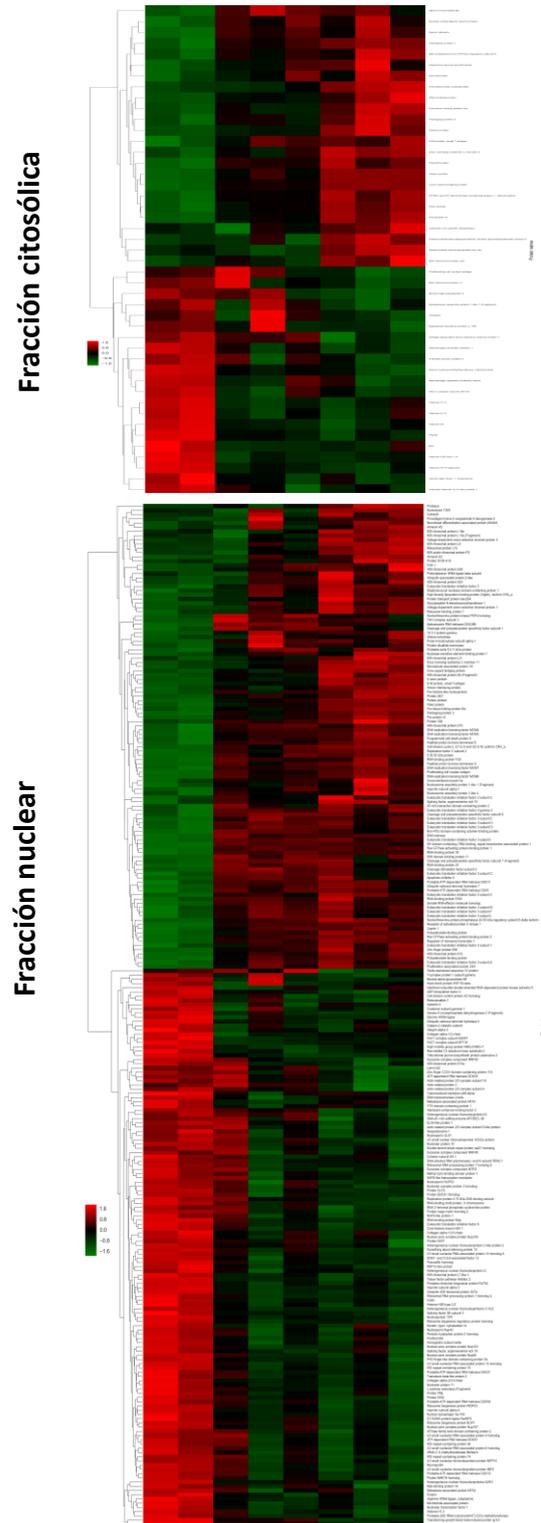


Figura suplementaria 1. Representación mediante heat-maps de la tasa de cambio de las proteínas significativamente diferenciales ($pVal < 0,05$) tras la infección con del adenovirus Delta-24-RGD (6 y 10hpi). La leyenda lateral indica el color asociado a la tasa de cambio, representada en Log10. En verde se representa las proteínas que disminuyen su expresión, en rojo las que la aumentan, con respecto a las células sin infectar (mock).

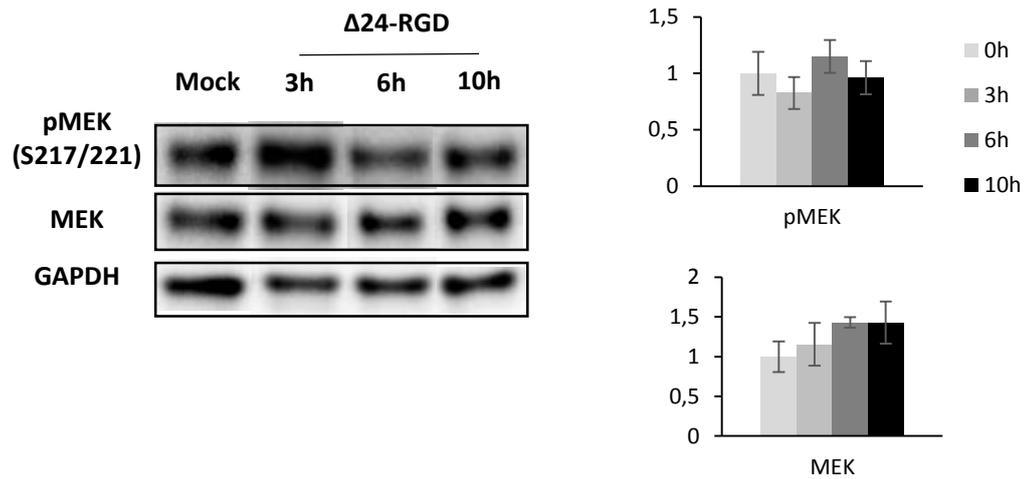
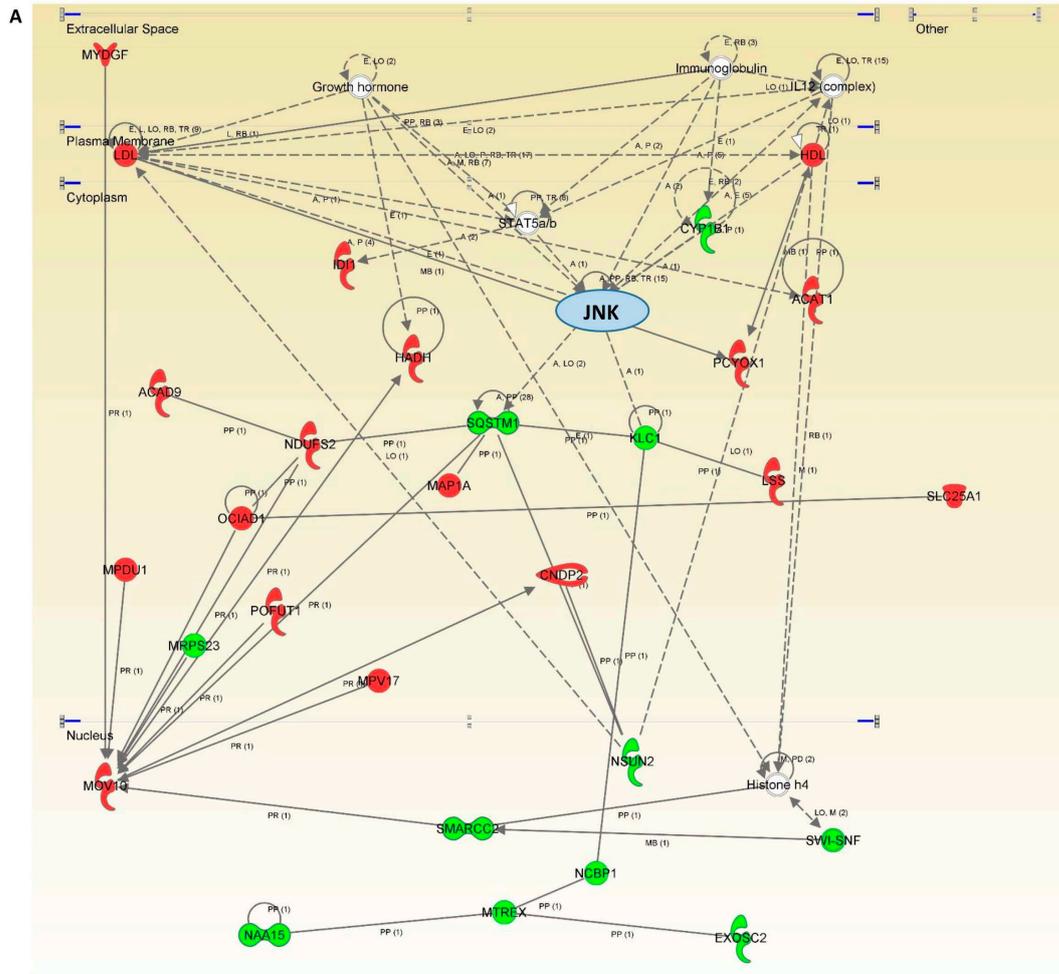
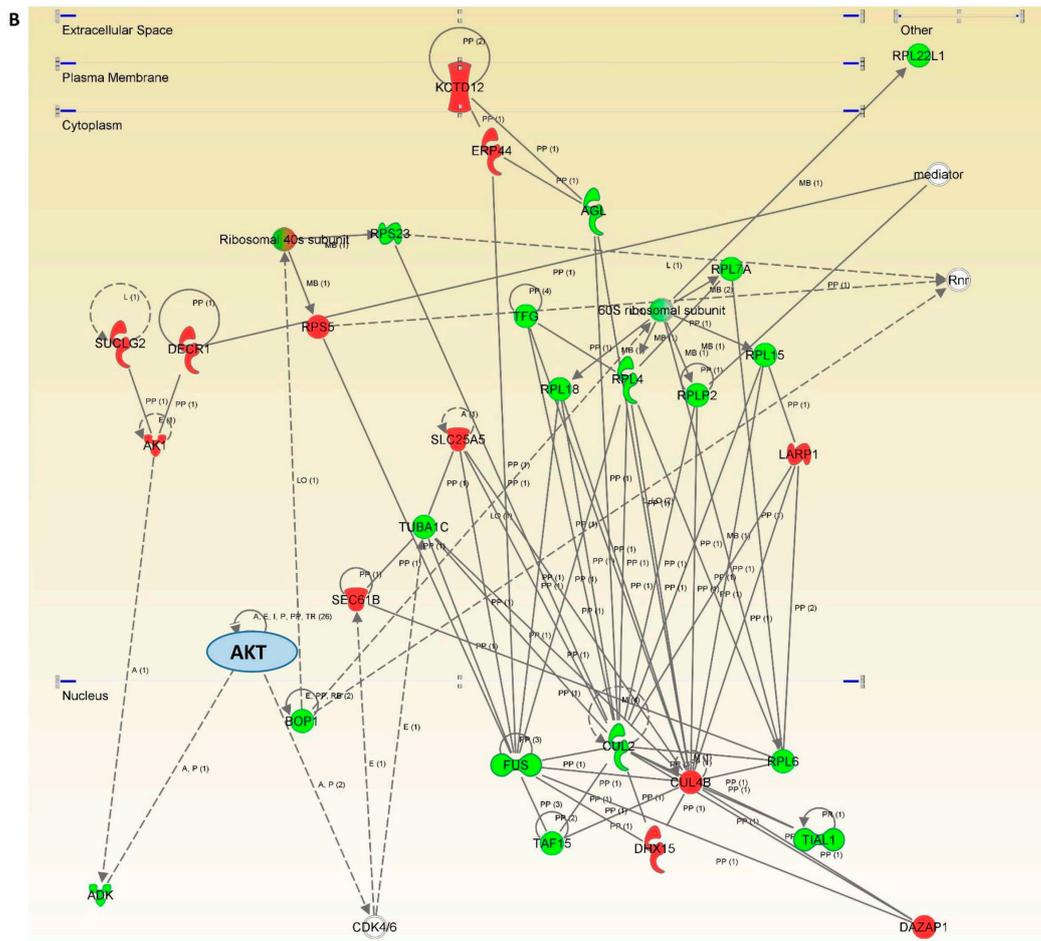


Figura suplementaria 2. Patrón de fosforilación y expresión de MEK durante la replicación del genoma adenoviral (3, 6 y 10hpi). Las muestras de los WBs son representativas de tres experimentos independientes donde la carga equitativa de los geles se evaluó mediante Ponceau y las intensidades de las bandas se normalizaron con los niveles de GAPDH.





Anexos

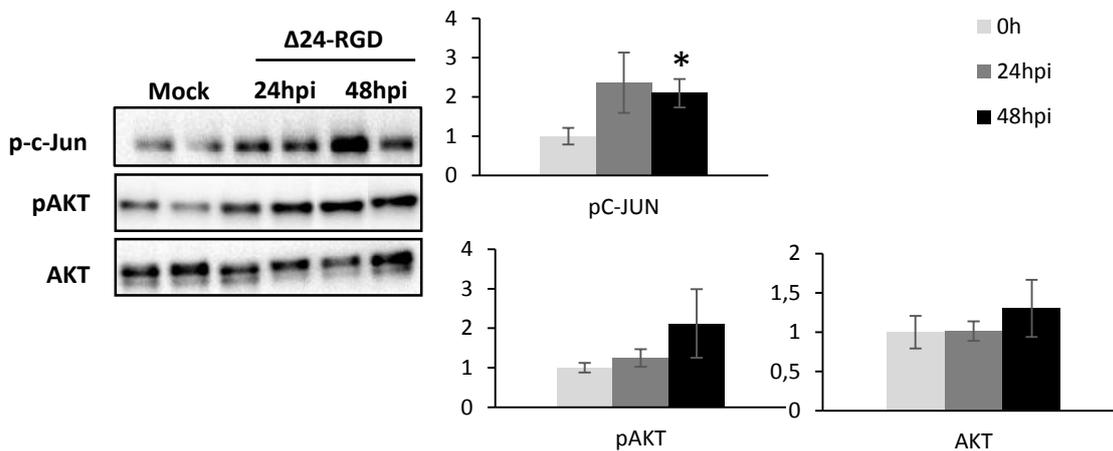


Figura suplementaria 3. Interacciones proteómicas alteradas por la infección del adenovirus Delta-24-RGD al inicio del proceso autofágico. Activación de AKT y c-Jun. Las muestras de los WBs son representativas de tres experimentos independientes donde la carga equitativa de los geles se evaluó mediante Ponceau y las intensidades de las bandas se normalizaron con los niveles de GAPDH. *(pVal<0.05) IPA Network score: A) 47 B) 55

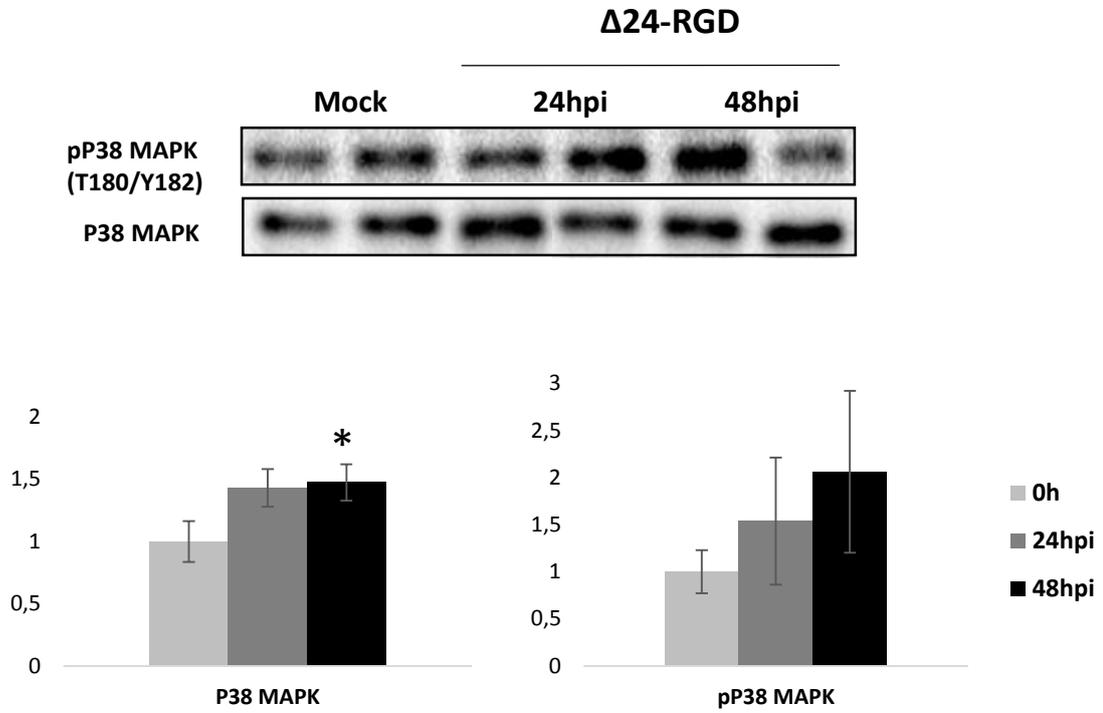


Figura suplementaria 4. Patrón de fosforilación y expresión de p38 MAPK el proceso autofágico (24 y 48hpi). Las muestras de los WBs son representativas de tres experimentos independientes donde la carga equitativa de los geles se evaluó mediante Ponceau y las intensidades de las bandas se normalizaron con los niveles de GAPDH. *(pVal<0.05)

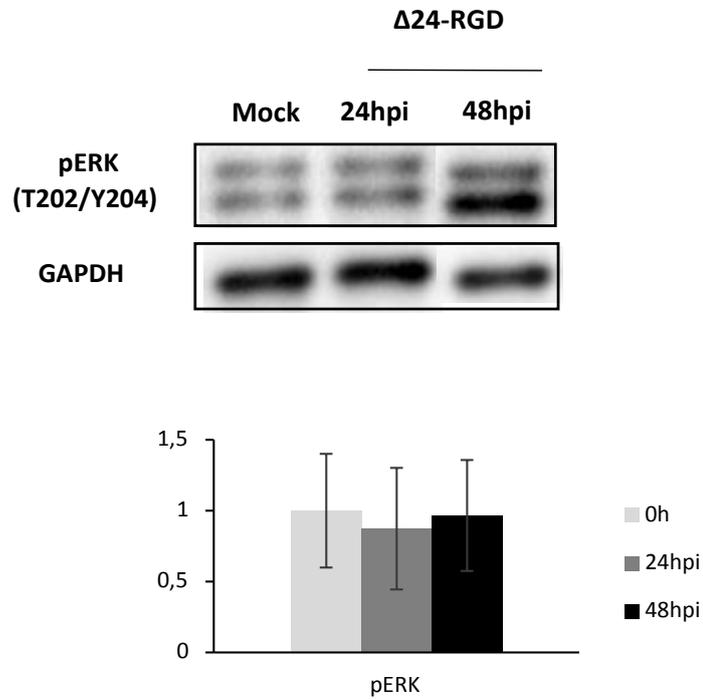


Figura suplementaria 5. Patrón de fosforilación de ERK durante el proceso autofágico (24 y 48hpi). Las muestras de los WBs son representativas de tres experimentos independientes donde la carga equitativa de los geles se evaluó mediante Ponceau y las intensidades de las bandas se normalizaron con los niveles de GAPDH.

Tabla suplementaria 1

Estudios proteómicos en astrocitoma

Manuscrito	Muestras	Metodología proteómica	Resultados	Resultados II
<i>Petrik et al. 2008</i>	Suero (N=200) Glioma grado II-III, GBM y controles	SELDI-TOF-MS Chips CM10	Identificación de AHSG como marcador de supervivencia. Sus niveles en suero disminuyen con la progresión tumoral	Marcador validado en una nueva cohorte de 72 pacientes de GBM
<i>Li et al. 2008</i>	Biopsia (N=4) GBM y controles	CIEF-nRPLC-MS/MS	104 proteínas identificadas exclusivamente en GBM	La expresión de WHSC1 aumenta con la proliferación tumoral
<i>Seyfried et al. 2008</i>	Células de astrocitoma (CT-2A) vs astrocitos de ratón	LC-MS/MS trampa de iones lineal LTQ	25 proteínas alteradas en astrocitoma	Cspg4; IFITM1; IFITM2; IFITM3 validadas
<i>Fischer et al. 2008</i>	Plasma (N=10) GBM	2D-DIGE	Disminución de antitrombina y aumento de fibrinógeno tras el tratamiento con alcohol perílico	
<i>Bian et al. 2008</i>	Células CHG-5, sHG-44 y U87 tratadas con Nordy	2DE MALDI-TOF	Alteración en los niveles de expresión de 10 proteínas	PAG-A; ASF-3; beta-GBL; EIF-5A; cofilina-1; GST-p; GAPDH; ciclofilina; alfa-enolasa
<i>Hill et al. 2009</i>	Células U87. Tratamiento con cAMP	NanoLC-MS LC-MS/MS	35 proteínas diferenciales. Entre ellas, sobreexpresadas: catepsina-L, FSTL1, NBL1, TFP12, colágeno IV, estaniocalcina; disminuidas: tenascina-C, IGF2R	Proteínas validadas por WB y/o microarrays de ADN
<i>Park et al. 2009</i>	Biopsia GBM. Pacientes con una supervivencia larga vs pacientes con una supervivencia corta	2DE MALDI-TOF	Ausencia de sobreexpresión de MnsOD en pacientes con alta tasa de supervivencia. Posible marcador pronóstico	Resultados confirmados por WB, RT-PCR e IHQ
<i>Schuhmann et al. 2009</i>	FCE (N=24). GBM vs control	HPLC-MALDI-TOF	Sobreexpresión del C-terminal de α 1ACT, osteopontina, TTR y del N-terminal de albúmina	
<i>Koncarevic et al. 2009</i>	Células NCH82, NCH89. Respuesta a fármacos con base de platino	2DE MALDI-TOF	Alteración en proteínas relacionadas con: regulación del ciclo celular, estrés del retículo	Validación de GR, TrxR, p53 (phospS15) por WB

			endoplasmático, citoesqueleto, metabolismo redox	
<i>Ohnishi et al. 2009</i>	FCE (N=2) (Astrocitoma grado II y GBM)	2DE	Disminución de los niveles de gelsolina conforme el tumor progresa (potencial marcador pronóstico)	Validación de gelsolina por IHQ
<i>Fischer et al. 2010</i>	Células A172. Células sin tratar y tratadas con alcohol perillil (1min, 10min, 30min, 60min, 4h, y 24h)	2D-LC-MS	Caracterización del proteoma de la línea A172. Cambios en proteínas específicas en tiempos concretos tras el tratamiento	Validación por WB de los cambios en la fosforilación de GSK3-beta y ERK después de 10 minutos de tratamiento
<i>Goplen et al. 2010</i>	Modelo animal (ratón) + biopsia GBM (N=4). Comparación de GBM infiltrativos vs angiogénico	2DE MALDI-TOF	Identificación de proteínas diferenciales. Entre ellas, aumento de alfa-beta-cristalina en GBM muy infiltrativo	Validación de la proteína mediante Western-blot e IHQ
<i>Fischer et al. 2011</i>	Células A172 y A172r (resistente al tratamiento con alcohol perillil)	2D-LC-MS/MS	57 proteínas diferenciales. Aumento de HSP70 en A172r	HSP70 validada por WB
<i>Thakkar et al. 2011</i>	Células U87. Inhibición de la telomerasa con sihTERT o sihsp90alfa vs sin tratar	2D-DIGE MALDI-TOF	Identificación de 26 spots (20 proteínas diferentes) con una tasa de cambio >2. Vimentina disminuida por la inhibición de la telomerasa	La expresión de vimentina aumenta con la graduación del glioma. Validación en líneas celulares y biopsias
<i>Fang et al. 2011</i>	Células LN229. SOX2-IP vs IgG-IP	LC-MS/MS	Identificación de 144 proteínas potenciales interactoras con SOX2 (ribonucleoproteínas reparadoras de ADN y helicasas)	Identificación de SOX2 como posible regulador de regulaciones post-transcripcionales
<i>Collet et al. 2011</i>	Biopsia GBM (N=5) vs control (epilepsia)(N=5)	2D-DIGE MALDI-TOF	Identificación de 22 proteínas diferentes sobreexpresadas en GBM	HSP27, ALDH, Mn-SOD, DRP-2 y DRP-3 validadas por WB e IHQ
<i>Polisetty et al. 2011</i>	Secretoma de las células HNGC2, LN229 y U87MG	LC-MS/MS	Identificación de 148 proteínas diferentes-96 identificadas por primera vez en este estudio	
<i>Polisetty et al. 2012</i>	Biopsia GBM (N=6) vs control (N=6)	Enriquecimiento de proteínas de membrana iTRAQ LC-MS/MS	Más del doble de cambio en la expresión de 356 proteínas. Entre ellas ANXA2, XRCC6, SCARB2, GOLIM4, CAMKIIA, RAB3A y SV2A	Resultados validados por WB e IHQ

<i>Com et al. 2012</i>	Biopsia de 4 regiones (necrótica, tumoral, interfaz tumor-parénquima, parénquima) del tumor GBM (N=5)	ICPL LC-MS/MS	Identificación de 584 proteínas. 31 de ellas sobreexpresadas en la región tumoral. Entre ellas ACTB, proteínas 14-3-3, HSP90AA1, HSPA8, ATP1A1, ATP1A2 y ATP1A3	ACTB y proteínas 14-3-3 validadas por WB y/o IHQ
<i>Xu et al. 2012</i>	Células madre de GBM vs células de GBM diferenciadas	CIEF-nRPLC-MS/MS	174 proteínas de membrana cambian. 2 isoformas de neuronatina se expresan exclusivamente en las células madre de GBM	Posteriores estudios relacionan la expresión de neuronatina con la disminución de la esperanza de vida de los pacientes. Posible biomarcador de riesgo y diana terapéutica
<i>Banerjee et al. 2012</i>	Células HTB12 vs astrocitos	2D-DIGE MALDI-TOF	Cambios en lactoferrina, precursor de lactotransferrina, TMC03, homólogo de proteína PET117, CSAD y HHZ168 entre otras	
<i>Kozuka-Hata et al. 2012</i>	Células primarias de GBM estimuladas con EGF vs sin estimular	SILAC Enriquecimiento de fosfoproteínas (TiO ₂) LC-MS/MS	791 cambios en los patrones de fosforilación. Algunas de las proteínas pertenecientes a la señalización de mTOR y ErbB	
<i>Gollapalli et al. 2012</i>	Biopsia de GBMs (N=40) vs control (N=40)	2-DE 2D-DIGE MALDI-TOF	Identificación de 55 proteínas diferenciales. Haptoglobina, precursor de plasminógeno, apolipoproteína A-1 y M y TTR	Resultados validados por WB e IHQ
<i>Gautam et al. 2012</i>	Plasma GBM (N=3) vs sanos (N=3)	iTRAQ LC-MS/MS	Confirmación de biomarcadores de cáncer o GBM en suero. Identificación de cambios en FTL, S100A9, CNDP1	
<i>Sun et al. 2012</i>	Células D54-P5 y D54-P10 (resistencia TMZ) vs control (D54-C0 y D54-C10)	2DE LC-MS/MS	Aumento de vimentina, catepsina D, prolil 4-hidroxilasa y polipéptido beta	Resultados validados en otras líneas de GBM. Posibles marcadores de resistencia y dianas terapéuticas

<i>Hoelscher et al. 2013</i>	Fluidos quísticos de GBM primario y recurrente (N=21). Control (FCE N=15)	SELDI-TOF	Identificación de 28 proteínas exclusivas de fluidos quísticos. Basigina significativamente más presente en GBM recurrente que primario	
<i>Ylivinkka et al. 2013</i>	Células U251 y U251 sobreexpresando NTN1	TAP LC-MS/MS	Identificación de las integrinas $\alpha 3\beta 1$ y $\beta 4$, Notch1-3, Jagged1, ligasas E3, proteasas, proteínas de endocitosis	
<i>Gupta et al. 2013</i>	Secretoma de las células HNGC-2	SDS-PAGE (15 fracciones) LC-MS/MS	996 proteínas identificadas. 348 previamente identificadas en el secretoma de otras células tumorales	
<i>Neidert et al. 2013</i>	Biopsia de GBM (inmunoprecipitación de las células con péptidos de los MHC1)	Purificación por afinidad LC-MS/MS	Los péptidos identificados pertenecen a proteínas con funciones decritas en GBM como PTPRZ1, EGFR, SEC61G y TNC. Péptidos candidatos para inmunoterapia	
<i>Heroux et al. 2014</i>	Biopsia GBM (N=10) vs control (N=10)	SDS-PAGE (3 fracciones) LC-MS/MS	Identificación de 278 proteínas diferenciales en todas las biopsias de GBM. Algunas de las proteínas sobreexpresadas: nestina, p195, nampt, anexina A1, periferina-2, catepsina B, fetuina A	Proteínas validadas por WB
<i>Autelitano et al. 2014</i>	Células primarias de GBM (SID227, SID238, SID233, SID186) vs ASG6 vs ASG7 vs U373	Etiquetado y enriquecimiento de sialoglicoproteínas LC-MS/MS	Identificación de 843 sialoglicoproteínas. Aumento en la expresión de 35 sialoproteínas de membrana en GBM en comparación con los astrocitos y células madre neuronales (posibles dianas teraéuticas), algunas de ellas: SLC1A3, PTPRZ1, EPDR1, AGT, GPR56, CRYAB, ANGPTL2, CLU and EXTL2	
<i>Ait-Belkacem et al. 2014</i>	Biopsida de tumor U87 en ratón	MALDI-IDS-IMS	Obtención de imágenes moleculares del tejido tumoral-Se diferencian regiones dentro del tejido y diferencias entre	

			tumor y tejido sano (aumento en la subunidad alfa de la hemoglobina, calciclina, timosina beta-4)	
<i>Deighton et al. 2014</i>	Biopsias jóvenes (<45 años) de GBM (N=7) vs controles (N=10); Biopsias ancianas (>60 años) de GBM (N=7) vs controles (N=10)	2DE LC-MS/MS	*Identificación de 68 proteínas alteradas en GBM joven. *Identificación de 55 proteínas alteradas en GBM anciano. En ambos casos la mayoría de ellas descritas como alteradas en GBM por primera vez (24 comunes)	PEBP1, NDUFA10 y PGK1 cambian entre GBM joven y anciano
<i>Sangar et al. 2014</i>	Secretoma de células U87-(EGFR), (EGFRvIII), (PE) y (PTEN)	LC-MS/MS LC-MRM/MS	Las U87-EGFRvIII secretan la mayoría de proteínas seleccionadas que se relacionan con invasión en mayor medida que el resto	
<i>Deighton et al. 2014</i>	Biopsia de GBM (N=6) y controles (N=6). Enriquecimiento de la fracción mitocondrial	LC-MS/MS	117/256 proteínas mitocondriales significativamente alteradas en GBM (ej. Catalasa, SOD2, peroxiredoxina 1, peroxiredoxina 4)	
<i>Mallawaaratchy et al. 2015</i>	Células de GBM: A172, LN229, MO59K, MO59J, U98MG, T98G, U251, CCF-STTG1 y DBTRG	Enriquecimiento de proteínas de membrana iTRAQ LC-MS/MS	444 proteínas se identificaron en las 9 líneas celulares de GBM. 49 de ellas relacionadas con invasión	Validación por Western-blot: ITGA5, ANXA1, and CD97. Potenciales dianas terapéuticas para inhibir la invasión del GBM
<i>Guo et al. 2015</i>	Biopsia de GBM (N=1)	2DE LC-MS/MS (proteínas fosforiladas en tirosina, reconocidas mediante inmunorreactividad)	Identificación de 24 proteínas con fosforilación en tirosina. Proteínas relacionadas con migración celular, estrés oxidativo y respuesta a estrés	
<i>Peng et al. 2015</i>	Biopsias GBM (N=5) vs control (N=4)	2DE LC-MS/MS (nitroproteínas/nitrotirosina, reconocidas mediante inmunorreactividad)	18 proteínas identificadas como nitroproteínas. Nitrosorcina participa en la resistencia a quimioterapia, metástasis	Proteína validada en astrocitomas I-III y GBM. Potencial diana terapéutica
<i>Lescarbeau et al. 2016</i>	Tumores de ratón MGPP6, MGPP7 vs cerebro. 2 análisis (N=7 vs N=1) y (N=8 vs N=1)	iTRAQ IP anticuerpos anti-fosfotirosina IMAC LC-MS/MS	La mayoría de sitios de fosforilación identificados, presenta mayores niveles de fosforilación en tejido sano. Se identificaron señales de fosforilación	

			características de este modelo de ratón: aumento de la fosforilación de PDGFR alfa (Y742), subunidad P85 de PI3K y activación de la cascada de las MAPKs	
<i>Ghosh et al. 2016</i>	Células madre neuronales (Millipore) vs células madre de cáncer (Celprogen). Identificación de 30 proteínas transmembrana de la superficie celular	LC-MRM/MS	La mayoría de proteínas presentan diferente patrón de expresión entre las células madre neuronales y las de cáncer. SLC16A1, HMOX1, CADMI, SCAMP3 y CLCC1 se encuentran aumentadas en las células cancerígenas, por lo que resultan potenciales marcadores	SLC16A1 y HMOX1 validadas en otras muestras por IHQ
<i>Ren et al. 2016</i>	Biopsia de astrocitomas grados I-III y GBM (N=5 cada uno)	iTRAQ 60 fracciones combinadas para un total de 15 LC-MS/MS	Aumento del número de proteínas alteradas conforme el tumor progresa (comparación vs grado I)	Validación por WB: EGFR se encuentra aumentada en los grados II-GBM, MMP9 y TIMP1 aumentan en GBM y las fibulinas 5 y 2 disminuyen su expresión conforme el grado de malignidad aumenta
<i>Mallawaarachy et al. 2017</i>	VE de A172, LN229, U87, U251, T98G y CCF-STTG1 VE mediante CUSA de astrocitoma grado II y GBM (pacientes)	LC-MS/MS	*Identificación de 145 proteínas en todas las VE de las líneas. Correlación de los niveles de expresión de 14 proteínas con invasión celular. *917 proteínas comunes en las VE de pacientes. 25 exclusivas de GBM	*9/14 proteínas significativamente aumentadas en paciente de GBM vs grado II (ANXA1, IGF2R, ITGB1, PDCD6IP, ACTR3, CALR, IPO5, MVP, PSMD2)
<i>Gollapalli et al. 2017</i>	Biopsia de astrocitomas grados I-III y GBM vs tejido peritumoral (N=5 cada uno)	iTRAQ LC-MS/MS	Alteración en proteínas pertenecientes a diferentes rutas metabólicas, aumento de proteínas relacionadas con el procesamiento de RNAm, pliegue de proteínas e inhibición de la apoptosis	

<i>Petushkova et al. 2017</i>	Biopsia de GBM (N=3) vs astrocitoma grado II (N=4)	LC-MS/MS	Muchas de las proteínas alteradas en GBM están relacionadas con el procesamiento de RNA (aumento de RPS5, RPL15, NCL, SF3B2), transducción de señales y desarrollo y función neuronal (EGFR, STAT1, MAPK1)	
<i>Zhang et al. 2017</i>	Células U87 y U251 Hipoxia vs normoxia	SILAC TMT LC-MS/MS	Se identificaron alteraciones producidas por hipoxia en proteínas relacionadas con inflamación (GLUT1, DUSP4/MKP2, RelA), cambios en el metabolismo (aumento de enzimas de glicólisis) y disminución de TCN2 (proteína transportadora de la vitamina B12)	
<i>Chiasserini et al. 2017</i>	Células GL15 tratadas con 3BP vs sin tratar	2DE LC-MS/MS	Identificación de 42 proteínas alteradas. Estas proteínas participan en el metabolismo celular (ej. glicólisis), respuesta a estrés (HSPB1 pSer82)	
<i>Jain et al. 2017</i>	U87 tratadas con S31201 vs sin tratar	2DE MALDI-TOF // iTRAQ LC-MS/MS	Los procesos más alterados: metabolismo (SOD1, HEXB, GOT2), apoptosis y respuesta inmune (PHB, HSPA9, CALR), reacciones redox (P4HB, PDIA4, PRDX3)	
<i>Miyauchi et al. 2018</i>	Plasma de GBM (N=14) vs sanos (N=15)	SWATH-MS	Las proteínas LRG1, C9, CRP, SERPINA3, APOB se encuentran aumentadas en plasma de GBM, mientras que GSN, IGHA1 y APOA4 se encuentran disminuidas	Las concentraciones en plasma de LRG1, CRP y C9 correlacionan con el tamaño del tumor
<i>Choi et al. 2018</i>	VE de células U373vIII (EGFvIII) vs U373	LC-MS/MS	La mayoría de las proteínas identificadas son comunes a ambas VE. Identificación de 25 proteínas nuevas como cargo en VE. La mayoría específicas de tejido (ej. Neurotrimin y GPM6B)	Disminución de CALD1, GPC1, GJA1 y GCLM (entre otras); aumento de LAMA5, TGFBI, SLC16A3 y DBN1 en las VE de U373vIII

<p><i>André-Grégoire et al. 2018</i></p>	<p>VE de sangre periférica GBM vs sanos VE de células madre de GBM (GSC4) tratadas con TMZ vs sin tratar</p>	<p>LC-MS/MS</p>	<p>Mayor concentración de VE en los pacientes. Identificación de 110 proteínas exclusivas del tratamiento y 66 del control</p>	<p>110 proteínas relacionadas con: redes de interacción de ribosomas, proteosoma y adhesión celular. 66 proteínas relacionadas con: redes de interacción de ribosomas, proteosoma</p>
<p><i>Gabrusiewicz et al. 2018</i></p>	<p>Exosomas de células madre de GBM (GSC20,17, 267) vs de fibroblastos</p>	<p>LC-MS/MS</p>	<p>Aumento en la expresión de los exosomas tumorales de proteínas relacionadas con EIF2, eIF4/mTOR, Eph, señalización de IGF-1 y G-beta gama. Estas vías reflejan la reprogramación transcripcional generalizada para el crecimiento, la proliferación y la motilidad de monocitos por las células madre de GBM</p>	

2D-DIGE 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis; 2DE 2 dimensional electrophoresis; 2D-LC 2 dimensional liquid chromatography ; cAMP Cyclic adenosine monophosphate; CIEF Capillary isoelectric focusing; CUSA Cavitron Ultrasonic Surgical Aspirator; FCE Fluido cerebrospinal; ICPL Isotope coded protein labeling; IDS In-source decay; IHQ Inmunohistoquímica; IMAC Metal affinity chromatography; IMS Imaging mass spectrometry; IP Inmunoprecipitación; MALDI Matrix-assisted laser desorption/ionization; MRM Multiple reaction monitoring; MS Mass spectrometry; nRPL Nano-reversed-phase liquid chromatography; RT-PCR Real time-polymerase chain reaction; SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SELDI Surface-enhanced laser desorption/ionization; SILAC Stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture; SWATH-MS Sequential window acquisition of all theoretical mass spectra; TAP Tandem affinity purification; TMT Tandem mass tags; VE Vesículas extracelulares. Las abreviaturas usadas en esta tabla que no aparecen en el pie de esta misma, se encuentran en el apartado de abreviaturas del manuscrito principal.

Tabla suplementaria 2

Estudios proteómicos en adenovirus

Manuscrito	Muestras	Metodología proteómica	Resultados	Resultados II
<i>Huang et al. 2005</i>	Tumores de ratones con adenocarcinoma (JC-hCEA) tratados con AdCMV-hCEA (parche cutáneo) vs sin tratar (9 semanas después)	2DE MALDI-TOF MS LC-MS/MS	Aumento de AK-1, beta-enolasa, cadena beta de la hemoglobina, CPK-M y prohibitina; disminución de creatina quinasa en los tumores tratados	
<i>Dallaire et al. 2009</i>	Células H1299 + Adv5 (No modificado; AdE4orf6; AdE1B55K); (MOI=35) (24 y 48hpi)	Marcaje (fluorocromo) 2DE LC-MS/MS	E4orf6Identificación de proteínas que disminuyen (DCTN1,cortactin isoforma alfa, citoqueratina 8) y aumentan (EEF1D, GAPDH, anexina A1) debido a E4orf6 y E1B55K	Validación de algunas proteínas por WB, y confirmación de un descenso en los niveles de Mre11 y otras proteínas en respuesta a E4orf6 y E1B55K
<i>Lam et al. 2010</i>	Células HeLa + Adv5 vs Mock; (MOI=5) (18hpi); Estudio del nucleolo	SILAC 2DE LC-MS/MS MALDI-MS	Cuantificación: 351 proteínas. Disminución en proteínas como: UBF, L29, SFPQ y eIF6 ; Aumento en: MFHAS1, DUSP11, C-NAP1 y hnRNPA2/B1	
<i>Lu et al. 2014</i>	Células H1299 + Ad (E4orf4)	IP (E4orf4) LC-MS/MS	Identificación de 10 proteínas formando complejo con E4orf4 (Nup205)	Identificación del motivo de E4orf4 necesario para la interacción con Nup205 y su localización en el núcleo. El complejo que forman ambas proteínas regula la expresión del genoma viral
<i>Wang et al. 2015</i>	Medio de cultivo de células A549 (cancer de pulmón) + PtDd (Ad3); (MOI=200) (11hpi)	IP (DSG2) SDS-PAGE (80KDa) LC-MS/MS	Identificación de péptidos del dominio extracelular de DSG2-La escisión de la proteína ocurre probablemente en el dominio de anclaje extracelular	Validaciones con otras líneas celulares e <i>in vivo</i> - La fibra del Ad3 provoca el acúmulo extracelular de DSG2; Identificación de rutas de señalización alteradas por Ad3, Ad14 y Ad14P1
<i>Sohn et al. 2015</i>	Células HeLa (His6-SUMO3(T90R)) + Ad5 o Ad5(E4-ORF3); (MOI=200) (7hpi)	IP (Ubiquitina) LC-MS/MS	Las modificaciones Ubl de 166 residuos de Lys de 51 proteínas se ven afectados por E4-ORF3 (MRE11, Nbs1, TIF1, TFII-I)	
<i>Subramanian et al. 2015</i>	Células HeLa + Adv (BCLxL-GFP o E1B19K-GFP); (MOI=5) (24hpi)	Cromatografía de afinidad LC-MS/MS	BCLxL: ATP sintasa, PKcs, HSP27, PHB2, BID y BIK. E1B19K: ATP sintasa y HSP27	Validaciones por WB. Estudios de localización de proteínas pro-apoptóticas al tratarse con Ad (BCLxL-GFP o E1B19K-GFP)
<i>DeHart et al. 2015</i>	Fibroblastos (HFF) + Ad (Δ E1B/ Δ Orf3); (MOI=200) (44hpi)	Inmunofinidad (p53) SDS-PAGE (50KDa) LC-MS/MS (búsqueda MPT- acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinilación)	Identificación de 85 residuos modificados y un total de 163 modificaciones. Comparaciones con un trabajo previo con Ad(Δ E1B): Diferencias en el grado relativo de MPT en residuos,	Posteriores experimentos revelan que la ausencia de la proteína E4Orf3 aumenta la expresión de algunos genes respondedores a p53

			pero similitud en las modificaciones específicas de aminoácidos concretos	cuando E1B también se encuentra ausente
<i>Fu et al. 2017</i>	Células A549 + Adv5 o Adv5 (E1B-55k) vs Mock; (6-24hpi) (MOI=10)	TMT LC-MS/MS	Identificación de las proteínas que cambian debido a la infección Adv5. Identificación de proteínas degradadas mediante E1B-55K: MRE11, RAD50, NBN,ALCAM, EPHA2 y PTPRF	Resultados validados mediante WB
<i>Zhao et al. 2017</i>	Células IMR-90 + Adv2 vs Mock; (MOI=100) (24 y 36hpi)	SILAC LC-MS/MS	659 y 645 (24 y 36hpi) proteínas diferenciales (25% de las cuantificadas). Las proteínas desreguladas se mantienen en el tiempo y se relacionan con metabolismo y migración celular	
<i>Hung et al. 2017</i>	Fibroblastos (HFF) + Ad5 o Adev5 (E1B 55kDa); (MOI=200) (44hpi)	Inmunoafinidad (E1B-55K) LC-MS/MS	Identificación de 92 proteínas asociadas a E1B-55KDa (proteosoma, ciclo celular y metabolismo de ARN)	Inhibición severa de la replicación viral con siARN específicos e inespecíficos, e interferón

Adv Adenovirus; 2DE 2 dimensional electrophoresis; hpi Horas posteriores a la infección; IP Inmunoprecipitación; LC *Liquid chromatography*; MALDI *Matrix-assisted laser desorption/ionization*; SDS-PAGE *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SILAC *Stable isotope labeling by/ with amino acids in cell culture*; TMT *Tandem mass tags*. Las abreviaturas usadas en esta tabla que no aparecen en el pie de esta misma, se encuentran en el apartado de abreviaturas del manuscrito principal.

Tabla suplementaria 3

Proteoma citosólico diferencial a las 6 y 10hpi de las células U87 con el adenovirus Delta-24-RGD

Descripción	Acceso Uniprot	Gen	6hpi		10hpi	
			pVal	TC	pVal	TC
Alpha-2-macroglobulin	P01023	A2M	0,006483999	1,591262724	0,021809962	1,434247216
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	J3KN29	PSMD9	0,037587326	1,331308195	0,020893148	1,552106721
Hepatoma-derived growth factor	P51858	HDGF	0,025393116	1,367429689	0,033157415	1,645765938
E1B protein, small T-antigen	P03246		0,035179138	1,559734022	0,02383532	1,736657369
Core-capsid bridging protein	P24938	L2	0,009199208	1,619871053	0,012074412	2,129116208
Shutoff protein	P24933	L4	0,024647474	1,789466138	0,006557602	2,181952419
Pre-hexon-linking protein IIIa	P12537	L1	0,031647637	1,365338082	0,008771763	2,209339836
Penton protein	P12538	L2	0,000939442	1,361583345	0,010705207	2,351636442
Hexon protein	P04133	L3	0,009082023	1,978571233	0,002206669	3,00808656
Nuclear autoantigenic sperm protein	P49321	NASP	0,009995118	3,180279099	0,026039657	3,35561875
Pre-protein VI	P24937	L3	0,00142823	2,017419577	0,002966487	3,736759595
Mitochondrial import receptor subunit TOM70	O94826	TOMM70	0,043164789	1,429357612		
Sorting nexin 6, isoform CRA_b	AOA0A0MRI2	SNX6	0,006917273	1,515108869		
Lactotransferrin	E7ER44	LTF	0,001159309	1,855258635		
Early E3 14.5 kDa protein	P04493		0,025187081	2,214624657		
Alpha-2-HS-glycoprotein (Fetuin-A)	P02765	AHSG	0,022841843	3,656719979		
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	P62316	SNRPD2			0,012333648	1,308083245
60S ribosomal protein L23	P62829	RPL23			0,015254449	1,311357611
DnaJ homolog subfamily C member 8	O75937	DNAJC8			0,024697523	1,351804322
Kynureninase	Q16719	KYNU			0,035215098	1,400245902
Packaging protein 1	P03271	Iva2			0,04306746	1,429406755
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	P04844	RPN2			0,003066475	1,451687523
Cytosolic non-specific dipeptidase	Q96KP4	CNDP2			0,028746589	1,459519176
DNA-binding protein	P03265	DBP			0,031746166	1,640908111
Packaging protein 3	P04496	L1			0,015399619	1,684229679
Pre-histone-like nucleoprotein	P68951	L2			0,002755386	2,057375012
LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1, mitochondrial	O95202	LETM1			0,003059787	2,730364873
Fiber protein	P11818	L5			0,007963804	2,887183904
A-kinase anchor protein 2	Q9Y2D5	AKAP2			0,012216176	0,621947626
FACT complex subunit SPT16	Q9Y5B9	SUPT16H			0,009689744	0,625327122
Proliferating cell nuclear antigen	P12004	PCNA			0,031663023	0,694444799
Nucleosome assembly protein 1-like 1 (Fragment)	H0YIV4	NAP1L1			0,044500578	0,707694651
Epididymis secretory protein Li 109	V9HW75	HEL-S-109			0,027299403	0,716899334
MIC	Q16891	IMMT			0,022966833	0,72232497
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	VDAC1			0,016016366	0,732155873
Plectin	Q15149	PLEC			0,009309817	0,737753212
Chloride channel CLIC-like protein 1	Q96S66	CLCC1			0,006247362	0,740904782
Myosin light polypeptide 6	G8JLA2	MYL6			0,008855231	0,742335821
Macrophage migration inhibitory factor	P14174	MIF			0,04934411	0,747320416
60S ribosomal protein L7	P18124	RPL7			0,012645055	0,759204673
Tenascin	P24821	TNC			0,047600644	0,762953633
Enhancer of rudimentary homolog	P84090	ERH	0,022823393	0,639247462		
Histone H2A.V	Q71UI9	H2AFV	0,042594847	0,652948726		
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	P23246	SFPQ	0,001587105	0,68696898		
Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	Q9Y6N5	SQRDL	0,026063124	0,688348417		
Zyxin	Q15942	ZYX	0,019163071	0,720874142		
Secernin-1	Q12765	SCRN1	0,042933302	0,725511365		
Transformer-2 protein homolog beta	P62995	TRA2B	0,034032954	0,72634651		
GTP-binding protein RAD	P55042	RRAD	0,005823562	0,728029206		
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	P62318	SNRPD3	0,044475466	0,756406822		
Cathepsin B	P07858	CTSB	0,026979106	0,760797946		
Histone H4	P62805	HIST1H4A	0,005419271	0,353389303	0,015252521	0,318998428
Histone H3 (Fragment)	K7EK07	H3F3B	0,001332397	0,397481749	0,009510964	0,354875779
Histone H1.4	P10412	HIST1H1E	0,001953275	0,419638266	0,024429155	0,473363523
Histone H1.5	P16401	HIST1H1B	0,009567662	0,456539111	0,035539557	0,479861669
Histone H2B type 1-K	O60814	HIST1H2BK	0,002565623	0,465397924	0,003963718	0,492531432
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	P34897	SHMT2	0,002916249	0,640018109	0,018339839	0,534566439
Plasminogen activator inhibitor 1	P05121	SERPINE1	0,036629522	0,692021891	0,003307107	0,603343109
Dynein light chain 1, cytoplasmic	P63167	DYNLL1	0,045156164	0,757205652	0,036402312	0,744486745



Disminución en los niveles de expresión

Aumento en los niveles de expresión

Proteínas adenovirales



Tasa de cambio

Tabla suplementaria 4

Proteoma nuclear diferencial a las 6 y 10hpi de las células U87 con el adenovirus Delta-24-RGD

Descripción	Acceso Uniprot	Gen	6hpi		10hpi	
			pVal	TC	pVal	TC
Histone H1.2	P16403	HIST1H1C	0,040320455	0,35634094	0,006296133	0,27836932
Prothrombin	E9PIT3	F2	0,015009397	0,3125538	0,032192698	0,30794202
Core histone macro-H2A.1	O75367	H2AFY1	0,027468192	0,39188779	0,001320439	0,32382578
Splicing factor, arginine/serine-rich 19	Q9H7N4	SCAF1	0,016791372	0,34924289	0,043233318	0,33661936
Nuclear pore complex protein Nup50	Q9UKX7	NUP50	0,028893345	0,46021792	0,024637823	0,37826243
FACT complex subunit SSRP1	Q08945	SSRP1	0,025522115	0,3240597	0,049012693	0,38998179
Nuclear autoantigen Sp-100	P23497	SP100	0,025836591	0,48960337	0,01374135	0,40362495
FACT complex subunit SPT16	Q9Y5B9	SUPT16H	0,007247081	0,34073742	0,01957422	0,40517279
Probable ribosome biogenesis protein RLP24	Q9UHA3	RSL24D1	0,015760254	0,42811853	0,012678997	0,40711123
Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	P46087	NOP2	0,02960559	0,4832093	0,020989072	0,42391366
Metastasis-associated protein MTA1	E7ESY4	MTA1	0,044113392	0,35537943	0,04210754	0,42722996
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	P45974	USP5	0,01000447	0,48443146	0,013810416	0,42841343
Tissue factor pathway inhibitor 2	P48307	TFPI2	0,002337927	0,46009821	0,010845957	0,42876412
60S ribosomal protein L7-like 1	Q6DK11	RPL7L1	0,011825543	0,49674048	0,004836693	0,43715691
Integrin alpha-3	P26006	ITGA3	0,032469093	0,45629339	0,029324991	0,43879576
Actin, cytoplasmic 2	P63261	ACTG1	0,008358958	0,52967331	0,018876172	0,44648691
Protein MAK16 homolog	Q98XV0	MAK16	0,049073885	0,54793186	0,010902943	0,44705483
Histone H2B type 2-E	Q16778	HIST2H2BE	0,026466361	0,50924488	0,027439935	0,46208859
Ribosomal RNA processing protein 1 homolog A	P56182	RRP1	0,021589659	0,48993937	0,046423238	0,46494533
Nuclear transcription factor 1	E9PKP7	UTFB	0,013400955	0,43484241	0,019293645	0,46630691
PHD finger-like domain-containing protein 5A	Q7RTV0	PHF5A	0,005450554	0,5410822	0,035303662	0,4716387
Microtubule-associated protein	E7EVA0	MAP4	0,010625214	0,45082129	0,006279175	0,47171113
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	P62979	RPS27A	0,009944954	0,4703121	0,005176501	0,47463994
Protein SON	P18583	SON	0,035773793	0,6413623	0,030180285	0,48321972
U3 small nucleolar RNA-associated protein 15 homolog	Q8TED0	UTP15	0,020821805	0,55110063	0,010930679	0,49498826
Ribosome biogenesis protein BOP1	Q14137	BOP1	0,029077979	0,63332199	0,015683707	0,50991114
Ribosome biogenesis protein WDR12	Q9GZL7	WDR12	0,010414162	0,63449401	0,004937894	0,5123262
Hemoglobin subunit delta	E9PFT6	HBD	0,034128428	0,50979348	0,011735415	0,51841763
ADP-ribosylation factor 4	P18085	ARF4	0,015930677	0,61935396	0,028906032	0,52830594
Calpain-2 catalytic subunit	P17655	CAPN2	0,032177711	0,52480299	0,026289553	0,5305901
Keratin, type I cytoskeletal 14	P02533	KRT14	0,010366298	0,47654037	0,043443145	0,53238515
Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	P54136	RARS	0,009043724	0,55052883	0,006591809	0,53524055
RNA-binding protein Raly	Q9UKM9	RALY	0,035843564	0,62925643	0,000319959	0,54267421
Something about silencing protein 10	Q9NQZ2	UTP3	0,041096112	0,66235103	0,000556357	0,54348313
U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A	Q9BVJ6	UTP14A	0,041489694	0,64330748	0,002161529	0,54560425
Eukaryotic translation initiation factor 6	P56537	EIF6	0,019468327	0,6419525	0,00308077	0,55386458
Importin subunit alpha-4	O00505	KPNA3	0,004295765	0,6398836	0,00391002	0,56066755
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	G3V4C1	HNRNPC	0,012972512	0,64318812	0,007134601	0,5610362
Coilin	P38432	COIL	0,013090822	0,5672033	0,028150231	0,5641919
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	B1AH80	RAC2	0,013897312	0,5281303	0,045460704	0,56433324
Cell division control protein 42 homolog	P60953	CDC42	0,046635557	0,56313243	0,030223794	0,57473985
Transcriptional repressor p66-alpha	Q86YPA	GATAD2A	0,032822473	0,52265556	0,011114769	0,57626693
Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	P22102	GART	0,009676679	0,58629251	0,010080401	0,57637788
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	B72645	SYNCRIP	0,046762406	0,58949422	0,032741449	0,58082504
Importin subunit alpha-3	O00629	KPNA4	0,005997834	0,58243551	0,00296703	0,59034107
WD repeat-containing protein 75	Q8IWA0	WDR75	0,011424146	0,65444732	0,0071548	0,60570043
Nuclear pore complex protein Nup153	P49790	NUP153	0,013686634	0,61261673	0,024929567	0,60690867
rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar	P22087	FBL	0,049814185	0,68141569	0,01754425	0,61288627
Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 (Fragment)	H0Y4R1	IMPDH2	0,02393757	0,65698295	0,004346322	0,61298086
E3 SUMO-protein ligase RanBP2	P49792	RANBP2	0,045493005	0,70125849	0,027146628	0,61350425
Reticulocalbin-1	Q15293	RCN1	0,04571084	0,64583087	0,032857379	0,61874667
High mobility group protein HMG-I/HMG-Y	P17096	HMG1	0,001677475	0,56252201	0,001787566	0,62268553
DNA topoisomerase 2-beta	Q02880	TOP2B	0,03016823	0,55770966	0,007897905	0,62713491
Collagen alpha-1(I) chain	P02452	COL1A1	0,013092437	0,55268104	0,0022767	0,62828617
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	P22626	HNRNPA2B1	0,008346042	0,72430205	0,013457613	0,63126946
Galectin-3	P17931	LGALS3	0,038857478	0,55820418	0,00408595	0,64110947
Glycine--tRNA ligase	P41250	GARS	0,024394643	0,65964569	0,023664724	0,65121557
RRP12-like protein	Q5JTH9	RRP12	0,014801308	0,69315838	0,012782672	0,65719879
Pescadillo homolog	B5MCF9	PE51	0,038761931	0,71281022	0,001706384	0,65959146
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	Q1KMD3	HNRNPUL2	0,006578576	0,76753971	0,043218896	0,66333259
Nuclear pore complex protein Nup107	P57740	NUP107	0,020368197	0,75531963	0,016601308	0,66539477
Ribosome biogenesis regulatory protein homolog	Q15050	RRS1	0,011246539	0,69717508	0,003519632	0,67475702
Nucleoprotein TPR	P12270	TPR	0,009466677	0,72567919	0,009162895	0,68207871
Emerin	P50402	EMD	0,0114487	0,69064792	0,008346649	0,68847197
Nuclear pore complex protein Nup155	Q75694	NUP155	0,021859475	0,76019176	0,021005321	0,70692648
Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A	Q75569	PRKRA	0,036247105	0,62843034	0,034059784	0,71392003
Protein PML	P29590	PML	0,029051336	0,76112134	0,022738362	0,71518115
YTH domain-containing protein 1	J3QR07	YTHDC1	0,015296274	0,70097086	0,04000581	0,71680432
Histone H1.5	P16401	HIST1H1B	0,040355123	0,3589477		
Histone H2B	U3KQ03	HIST1H2BN	0,036766726	0,45172955		
MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein	Q9BYG3	NIFK	0,042418269	0,48154194		
Keratin, type I cytoskeletal 9	P35527	KRT9	0,000220356	0,50617971		
60S ribosomal protein L24	C9JXB8	RPL24	0,036664076	0,50642752		
Nucleolar protein 56	O00567	NOP56	0,046288461	0,51071134		
Programmed cell death 6-interacting protein	Q8WUM4	PDCD6IP	0,029368075	0,51934489		
Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	Q04837	SSBP1	0,000700307	0,53621191		
SWI/SNF complex subunit SMARCC2	F8VXC8	SMARCC2	0,02844174	0,5415715		
60S ribosomal protein L14	E7EPB3	RPL14	0,018827964	0,59145062		
Tenascin	J3QSU6	TNC	0,01136289	0,631525		
Nucleoporin SEH1	Q96EE3	SEH1L	0,043455961	0,67004342		
Nucleolar protein 14	P78316	NOP14	0,030129979	0,70519511		
TATA-binding protein-associated factor 2N	Q92804	TAF15	0,034817535	0,70779556		
Serine protease HTRA1	Q92743	HTRA1	0,022377672	0,72478504		
Ribosomal RNA-processing protein 7 homolog A	Q9Y3A4	RRP7A			0,022126942	0,24651049
Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	F8WCF6	ARPC4-TTL3			0,026283562	0,36342645
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP3	Q9NV31	IMP3			0,006839668	0,36345019
U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog	Q9NVH9	UTP6			0,015911409	0,3825095
Neuroguidin	Q8NEJ9	NGDN			0,002582908	0,44777242
ATPase family AAA domain-containing protein 2	Q6PL18	ATAD2			0,018918483	0,44859234

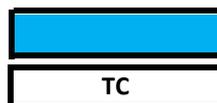
Anexos

Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56	Q9NY93	DDX56			0,045694134	0,4631565
Protein ELYS	Q8WYP5	AHCTF1			8,7691E-05	0,46844483
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX10	Q13206	DDX10			0,005400985	0,4734506
L-xylulose reductase (Fragment)	J3KRZ4	DCXR			0,025062009	0,48080795
Nucleoporin GLE1	Q53GS7	GLE1			0,012050158	0,48359297
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	Q9BXP5	ARPC5L			0,028971984	0,48494735
Nucleolar complex protein 3 homolog	Q8WTT2	NOC3L			0,00217902	0,48586016
Exosome complex component RRP42	Q15024	EXOSC7			0,010063992	0,49786
Zinc finger CCCH domain-containing protein 11A	Q75152	ZC3H11A			0,023835512	0,50591926
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27	B726D5	DDX27			0,031362445	0,50646888
Nucleoporin Nup43	Q8NFH3	NUP43			0,02763222	0,51911855
RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein	Q9Y2P8	RCL1			0,016785316	0,5262793
DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3B	B0QYD3	APOBEC3B			0,035036658	0,53968653
Protein BUD31 homolog	P41223	BUD31			0,000251979	0,54466121
DDB1- and CUL4-associated factor 13	A0A087WT20	DFAF13			0,00049543	0,54798008
ATP-dependent RNA helicase DDX51	Q8N8A6	DDX51			0,020686181	0,55118787
Transducin beta-like protein 3	Q12788	TBL3			0,046840795	0,55250999
Splicing factor 3B subunit 3	Q15393	SF3B3			0,037835412	0,55356776
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10	O00566	MPHOSPH10			0,026140945	0,56044058
Nucleolar protein 11	Q9H8H0	NOL11			0,025365672	0,57851774
WD repeat-containing protein 74	Q6RFH5	WDR74			0,011222591	0,57982599
Interleukin enhancer-binding factor 2	B4DY09	ILF2			0,002465621	0,58381638
Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A	Q92747	ARPC1A			0,023320582	0,58547426
WD repeat-containing protein 36	A0A0A0MTB8	WDR36			0,027314989	0,58605529
RNA-binding motif protein, X chromosome	P38159	RBMX			0,010006871	0,59308023
Sequestosome-1	Q13501	SQSTM1			0,044162272	0,5991015
Periodic tryptophan protein 2 homolog	Q15269	PWP2			0,012224727	0,60546629
NHP2-like protein 1	B1AHD1	SNU13			0,048840486	0,61206373
U3 small nucleolar RNA-associated protein 4 homolog	Q969X6	UTP4			0,020779267	0,63115726
Exosome complex component MTR3	Q5RKY6	EXOSC6			0,049533304	0,63326919
Protein AATF	Q9NV61	AATF			0,027639165	0,64580986
Metastasis-associated protein MTA2	Q94776	MTA2			0,049023276	0,65351712
Protein mago nashi homolog 2	Q96A72	MAGOHB			0,00549457	0,65885778
Methyl-CpG-binding domain protein 1	Q9UIS9	MBD1			0,044833068	0,66359416
Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	P27694	RPA1			0,031044804	0,67318439
Actin-related protein 2	P61160	ACTR2			0,027127153	0,68069879
Double-strand-break repair protein rad21 homolog	Q60216	RAD21			0,020749496	0,68226546
U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein	Q96D17	SNRNP40			0,012886467	0,68333981
ELAV-like protein 1	Q15717	ELAVL1			0,009892386	0,68369864
Myb-binding protein 1A	Q9BQGO	MYBBP1A			0,028886287	0,68574351
SAFB-like transcription modulator	Q9NWH9	SLTM			0,010763874	0,68942761
Nucleolar protein 10	Q9B5CA	NOL10			0,012800216	0,69115114
Coatomer subunit gamma-1	Q9Y678	COPG1			0,039885384	0,69298651
DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1	Q15160	POLR1C			0,041532696	0,69477753
Exosome complex component RRP40	Q9NQJ5	EXOSC3			0,040924869	0,69990663
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	P51991	HNRNPA3			0,013899463	0,70060611
40S ribosomal protein S15a	P62244	RPS15A			0,019289558	0,70629244
Cohesin subunit SA-1	Q8WVM7	STAG1			0,049602712	0,71190705
Nucleoporin NUP53	Q8NFH5	NUP53			0,002492283	0,72281229
T-complex protein 1 subunit gamma	P49368	CTC3			0,022116626	0,72282103
Collagen alpha-1(VI) chain	A0A087X0S5	COL6A1			0,029462379	0,72339997
Collagen alpha-2(VI) chain	P12110	COL6A2			0,020749725	0,72448032
Testis-expressed sequence 10 protein	Q9NXF1	TEX10			0,034466306	0,72798988
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	Q15582	TGFB1			0,001209153	0,73857466
Lamin-B2	Q03252	LMNB2			0,006410181	0,74289252
ATP-dependent RNA helicase DDX18	Q9NVP1	DDX18			0,026519876	0,76347309
Neutral alpha-glucosidase AB	Q14697	GANAB			0,001545634	0,76608556
Heat shock protein HSP 90-beta	P08238	HSP90AB1			0,012624656	0,76627544
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1	Q10570	CPSF1	0,014256685	1,63540089	0,041136152	1,38396864
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	J3KTA4	DDX5	0,025026872	1,4425733	0,014798513	1,4203806
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	P13674	P4HA1	0,029718457	1,48534779	0,008328206	1,42916856
THO complex subunit 3	Q96101	THOC3	0,019103585	1,82331329	0,042391335	1,46514674
Spliceosome RNA helicase DDX39B	Q13838	DDX39B	0,004333862	1,87910191	0,003952353	1,49260276
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	P67809	YBX1	0,013695788	1,30649058	0,046132006	1,49731581
Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog	Q13523	PRPF4B	0,004513751	2,25758814	0,032694262	1,49733675
RNA-binding protein 39	Q14498	RBM39	0,001137234	1,54694456	0,011543908	1,50927488
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	Q93009	USP7	0,014759878	1,48970065	0,007767447	1,53520282
E1B 55 kDa protein	Q03243		0,011653821	1,46459346	0,000441063	1,53849587
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	P20042	EIF2S2	0,046013208	1,32510352	0,024280213	1,56194184
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	P41091	EIF2S3	0,00519827	1,38509951	0,004849171	1,58789382
Regulator of nonsense transcripts 1	Q92900	UPF1	0,006410682	1,47985793	0,001120582	1,64033583
Importin subunit alpha-1	P52292	KPNA2	0,009911843	1,53039995	0,014609449	1,70933836
WW domain-binding protein 11	Q9Y2W2	WBP11	0,009167993	1,93855846	0,039297125	1,72995238
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B delta isoform	Q66LE6	PPP2R2D	0,003965751	1,5763958	0,013407925	1,77691231
Proliferation-associated protein 2G4	Q9UQ80	PA2G4	0,027249675	1,58247365	0,010235816	1,78313838
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	Q13347	EIF3I	0,001993912	1,90668817	0,002144152	1,82298407
DNA replication licensing factor MCM6	Q14566	MCM6	0,004226275	1,67665797	0,006047395	1,8576511
RNA-binding protein 25	P49756	RBM25	0,001828645	2,07582275	0,026265461	1,86074309
Polyadenylate-binding protein	A0A087WTT1	PABPC1	0,007008166	1,69090225	0,000759833	1,87755267
Polyadenylate-binding protein	B1ANR0	PABPC4	0,008862175	1,59308726	0,003820877	1,90251899
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	P23284	PIPB	0,043066927	1,69152464	0,034563187	1,91974367
Proliferating cell nuclear antigen	P12004	CNCA	0,004375988	1,70032181	0,000373489	1,94644757
40S ribosomal protein S12	P25398	RPS12	0,003674907	1,65045513	0,004642233	1,96711629
Cleavage stimulation factor subunit 2	E7EWR4	CSTF2	0,004435319	2,44278671	0,028981497	1,98732044
Nucleosome assembly protein 1-like 1 (Fragment)	HOYIV4	NAP1L1	0,043160223	1,63760882	0,0385071	2,03309785
DNA helicase	B1AHB1	MCM5	0,00494949	2,06937719	0,002746026	2,04216282
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	Q15371	EIF3D	0,005567952	2,21636487	0,004639469	2,05089343
Serrate RNA effector molecule homolog	Q9BXP5	SRRT	0,003489871	2,02697462	0,005030685	2,05449427
Protein SET	A0A0C4DFV9	SET	0,010594153	1,54328577	0,006124525	2,07088668
KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	Q00648263	KHDRBS1	0,000648263	2,28261217	0,000472212	2,09291777
Probable early E4 11 kDa protein	P04489		0,018940823	2,25207691	0,024926823	2,12661089
Eukaryotic translation initiation factor 5	P55010	EIF5	0,026732213	1,67539099	0,005853113	2,14179998
Pre-histone-like nucleoprotein	P68951	L2	0,023082899	1,58784947	0,00234074	2,16140021
DNA replication licensing factor MCM7	P33993	MCM7	0,021652837	1,94478305	0,003667401	2,20026079
Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M, isoform CRA a	A0A024QZP7	CDC2	0,010349106	1,86496965	4,82474E-05	2,2808445

RNA-binding protein FUS	P35637	FUS	0,001766064	2,14970879	0,009395407	2,30117596
DNA replication licensing factor MCM3	P25205	MCM3	0,031222594	1,952148	0,006582157	2,32083739
Apoptosis inhibitor 5	G3V1C3	API5	0,00197317	2,56296298	0,04332785	2,32735419
Caprin-1	Q14444	CAPRN1	0,003540051	2,20155709	0,002934236	2,36750213
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	Q14152	EIF3A	0,005617454	2,20305184	0,006876267	2,37519305
Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	Q9UN86	G3BP2	0,001904494	2,02390406	0,003299272	2,40751523
Cleavage and polyadenylation-specificity factor subunit 7 (Fragment)	F5H669	CPSF7	0,006817237	3,53879047	0,049868999	2,52641892
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	P60228	EIF3E	0,00690389	2,86830008	0,002304124	2,65369613
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G	Q13427	PP1G	0,01508566	2,23026099	0,009692827	2,686552
Core-capsid bridging protein	P24938	L2	0,03135731	1,53894575	0,002075312	2,69776458
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	BOQY89	EIF3L	0,029765118	2,92504	0,019244358	2,77043255
Hexon-interlacing protein	PQ0281	IX	0,046684283	1,58243469	0,009142858	2,77677802
Pre-hexon-linking protein IIIa	P12537	L1	0,033680312	1,73793673	0,034180223	2,85419896
Zinc finger protein 638	Q14966	ZNF638	0,000510377	2,18302967	0,017466342	2,86961912
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	B3K598	EIF3H	0,044071865	3,07147568	0,007102174	2,89515294
Protein 33K	P24940	L4	0,028909858	1,95516163	0,007624569	2,97362587
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	Q13283	G3BP1	0,000142218	3,14207335	0,000211732	3,12139641
Non-POU domain-containing octamer-binding protein	Q15233	NONO	0,003661592	4,30557387	0,00252579	3,1228417
Fiber protein	P11818	L5	0,01142675	1,98101285	0,035625264	3,13457557
Penton protein	P12538	L2	0,005606435	2,07009481	0,000116612	3,34002839
Pre-protein VI	P24937	L3	0,009846894	2,08534302	0,003990711	3,47629575
Receptor of activated protein C kinase 1	P63244	RACK1	0,001510375	3,07721616	1,65219E-05	3,52390509
Packaging protein 3	PQ0496	L1	0,001230108	2,44437241	0,000426919	3,672146
Replication factor C subunit 2	P35250	RFC2	0,012282438	2,72838258	0,008287288	3,68554736
U exon protein	A8W995		0,007310173	1,78719014	0,000967111	3,83349878
AT-rich interactive domain-containing protein 2	Q68CP9	ARID2	0,046905453	3,03341636	0,041558774	4,33417889
E1B protein, small T-antigen	PQ0246		0,000958062	2,20165761	0,002015241	5,84039475
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	P78527	PRKDC	0,003569176	1,32178887		
Guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(t) subunit beta-2	P62879	GNB2	0,037068791	1,32436643		
Thyroid hormone receptor-associated protein 3	Q9Y2W1	THRAP3	0,045994964	1,33090802		
Heat shock 70 kDa protein 1B	AOA0G2J1W1	HSPA1B	0,02972766	1,33296214		
FAS-associated factor 2	Q96CS3	FAF2	0,049048358	1,40282013		
THO complex subunit 1	AOA087WWS1	THOC1	0,010500614	1,44893454		
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2	Q9P210	CPSF2	0,012963886	1,47938485		
Talin-1	Q9Y490	TLN1	0,005479866	1,48224303		
Sentrin-specific protease 3	Q9H4L4	SEN3	0,043614856	1,51009246		
14-3-3 protein beta/alpha	P31946	YWHA8	0,018459137	1,51559913		
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	B4DXZ6	FXR1	0,022455403	1,52160432		
Annexin A6	P08133	ANXA6	0,044949845	1,52572854		
Nucleoside diphosphate kinase	Q32Q12	NME1-NME2	0,042659304	1,57865807		
Unconventional myosin-Ib	E9PDF6	MYO1B	0,021356389	1,65973518		
Plectin	Q15149	PLEC	0,013123919	1,67306447		
Proteasome subunit alpha type (Fragment)	HOYM21	PSMA4	0,007711724	2,08373663		
Paraspeckle component 1	Q8WXF1	PSP1	0,006969409	2,11726382		
Cleavage stimulation factor subunit 3	Q12996	CSTF3	0,005028342	2,32070402		
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	Q43809	NUDT21	0,041033601	2,32121927		
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	E9PAV3	NACA	0,019978376	2,50399529		
Serine/arginine-rich-splicing factor 2 (Fragment)	J3QL05	SRSF2	0,020444202	3,66246286		
40S ribosomal protein S26	P62854	RPS26			0,042604367	1,32421108
Protein disulfide-isomerase	P07237	P4HB			0,014245144	1,32829131
Erlin-1	O75477	ERLIN1			0,034965152	1,33782298
60S ribosomal protein L13a (Fragment)	MOQY51	RPL13A			0,011946468	1,35013087
60S ribosomal protein L18a	Q02543	RPL18A			0,011983517	1,35428716
Nucleolysin TIAR	Q01085	TIAL1			0,007204327	1,38592986
40S ribosomal protein S23	P62266	RPS23			0,028437145	1,38917592
Procollagen-lysine-2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	E7ETU9	PLOD2			0,032584434	1,39078799
60S ribosomal protein L21	P46778	RPL21			0,021084401	1,39628439
Calnexin	P27824	CANX			0,039467274	1,42609069
40S ribosomal protein S5 (Fragment)	MOR0F0	RPS5			0,012181815	1,43777354
Aldose reductase	P15121	AKR1B1			0,035760436	1,46796734
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	HOY3P2	EIF4G2			0,033760894	1,49797034
Annexin A5	P08758	ANXA5			0,031822683	1,53492129
Ribosomal protein L19	J3KTE4	RPL19			0,006532896	1,54533994
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	P05198	EIF2S1			0,040585427	1,57748842
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	Q09666	AHNAK			0,036378384	1,61198278
Unconventional myosin-Va	G3V394	MYO5A			0,04454417	1,61873917
60S ribosomal protein L8	P62917	RPL8			3,75663E-05	1,63349133
Protease	P03253	L3			0,013750198	1,67165181
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	H3BLZ8	DDX17			0,046192361	1,78675005
High density lipoprotein binding protein (Vigilin), isoform CRA_a	AOA024R4E5	HLDBP			0,029107484	1,79072223
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	Q99613	EIF3C			0,024431805	1,80894591
14-3-3 protein gamma	P61981	YWHA8			0,011962241	1,81373004
Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	Q9NSD9	FAR5B			0,031478414	1,83310723
Nucleosome assembly protein 1-like 4	Q99733	NAP1L4			0,047046703	1,95566083
Protein transport protein Sec23A	F5H365	SEC23A			0,039509163	2,00822194
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	P55884	EIF3B			0,045625421	2,10680636
Ubiquitin-associated protein 2-like	F8W726	UBAP2L			0,026062345	2,16959523
DnaJ homolog subfamily C member 11	Q9NVH1	DNAJC11			0,033618217	2,17673165
Splicing factor, arginine/serine-rich 15	O95104	SCAF4			0,040376439	2,20955084
Cleavage and polyadenylation-specificity factor subunit 6	F8WJN3	CPSF6			0,035485832	2,31688772
RNA-binding protein EWS	BOQYK0	EWSR1			0,023569995	2,36412436
Microtubule-associated protein 1A	E9PGC8	MAP1A			0,003618577	2,43656738
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	Q9Y277	VDAC3			0,004858432	2,47995376
Protein S100-A10	P60903	S100A10			0,030242594	2,50800077
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	Q7KZF4	SND1			0,032746597	2,55157343
60S acidic ribosomal protein P2	P05387	RPLP2			0,00313933	2,5753046
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	VDAC1			0,005213946	2,97617821
DNA replication licensing factor MCM4	P33991	MCM4			0,026526191	3,067578
Ribosome-binding protein 1	AOA0A0MRV0	RBP1			0,033180786	3,18397305
Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	P30419	NMT1			0,016396305	3,51250682
Annexin A2	P07355	ANXA2			0,010973266	3,56454104
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	Q00303	EIF3F			0,038063847	4,5793787
Programmed cell death protein 6	O75340	PDC6D			0,014013354	4,93363002
40S ribosomal protein S15	K7EQJ5	RPS15			0,032241515	6,42895075



Disminución en los niveles de expresión
Aumento en los niveles de expresión



Proteínas adenovirales
Tasa de cambio

Tabla suplementaria 5

Proteínas celulares y adenovirales diferencialmente expresadas por las células de glioblastoma U87 infectadas con el adenovirus Delta-24-RGD a las 48hpi

Descripción	Acceso Uniprot	Gen	pVal	TC
Neuropilin-1	O14786	NRP1	0,013698699	0,1368839
Cytochrome P450 1B1	Q16678	CP1B1	0,004012326	0,225904644
Protein kinase C alpha type	P17252	KPCA	0,00482473	0,327731962
Histone H3.1	P68431	H31	0,032519743	0,336989151
Galectin-3-binding protein	Q08380	LG3BP	0,011297542	0,37350953
Cleavage stimulation factor subunit 1	Q05048	CSTF1	0,026705112	0,390004614
DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1	O15160	RPAC1	0,000608016	0,419512066
DNA topoisomerase 2-alpha	P11388	TOP2A	0,02581777	0,427256106
60S acidic ribosomal protein P2	P05387	RLA2	0,041150203	0,433614938
Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog	Q8TDN6	BRX1	0,005380752	0,444622111
Cyclin-dependent kinase 11B	P21127	CD11B	0,014602231	0,445067463
Beta-2-syntrophin	Q13425	SNTB2	0,009932567	0,447772489
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	P30876	RPB2	0,000797679	0,497359819
Four and a half LIM domains protein 2	Q14192	FHL2	0,021169789	0,503760163
Sorting nexin-9	Q9Y5X1	SNX9	0,010964925	0,516286687
Leucyl-cystinyl aminopeptidase	Q9UIQ6	LCAP	6,69849E-05	0,524280241
Signal recognition particle subunit SRP68	Q9UHB9	SRP68	0,004045665	0,550947833
Pumilio homolog 3	Q15397	PUM3	0,000929979	0,552451221
Transducin beta-like protein 2	Q9Y4P3	TBL2	0,013480931	0,553174771
Angio-associated migratory cell protein	Q13685	AAMP	0,002513468	0,566329991
Prostaglandin synthase 2	Q9H7Z7	PGES2	0,008162884	0,57585569
SWI/SNF complex subunit SMARCC2	Q8TAQ2	SMRC2	0,003591485	0,577630526
Cullin-2	Q13617	CUL2	0,00302238	0,580165602
Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	Q16186	ADRM1	0,004891689	0,587235528
Tight junction protein ZO-2	Q9UDY2	ZO2	0,003733884	0,590691049
pre-rRNA processing protein FTSJ3	Q8IY81	SPB1	0,001789694	0,595233696
60S ribosomal protein L22-like 1	Q6P5R6	RL22L	0,001320004	0,60183497
Hepatoma-derived growth factor	P51858	HDGF	0,012686816	0,603817723
General transcription factor II-I	P78347	GTF2I	0,007781638	0,606505413
Beta-parvin	Q9HBI1	PARVB	0,012406727	0,608942962
Pyridoxal kinase	O00764	PDXK	0,004802618	0,611598345
Syntenin-1	O00560	SDCB1	0,015806763	0,619103011
60S ribosomal protein L6	Q02878	RL6	0,047236148	0,621076962
EH domain-containing protein 2	Q9NZN4	EHD2	0,005258738	0,622071299
CD2-associated protein	Q9Y5K6	CD2AP	0,035446324	0,6237142
Importin subunit alpha-1	P52292	IMA1	0,036631508	0,624303102
Protein TFG	Q92734	TFG	0,002658221	0,633533569
U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	O43172	PRP4	0,043450924	0,635531824
Protein phosphatase methyltransferase 1	Q9Y570	PPME1	0,024016324	0,635935538
GPI transamidase component PIG-T	Q969N2	PIGT	0,045967346	0,638854587
Ubiquitin-associated protein 2-like	F8W726	UBAP2L	0,000243685	0,641199583
Dihydropteridine reductase	P09417	DHPR	0,01750727	0,646051934
DnaJ homolog subfamily B member 6	O75190	DNJB6	0,00431861	0,648853695
RNA-binding protein NOB1	Q9ULX3	NOB1	0,002153725	0,649471915
Cold-inducible RNA-binding protein	K7ELT6	K7ELT6	0,000259323	0,654077362
ER membrane protein complex subunit 3	Q9POI2	EMC3	0,006961674	0,654781926
Exosome complex component RRP4	Q13868	EXOS2	0,001470624	0,657183793
60S ribosomal protein L4	P36578	RL4	0,008698866	0,65943113
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	Q13151	ROA0	0,000448608	0,661032272
Cancerostesin antigen family 45 member A8	P0DMV1	CT458	0,004756314	0,662534812
Prolyl endopeptidase-like	Q4J6C6	PPCEL	0,002920131	0,670089593
Aldo-keto reductase family 1 member C1	Q04828	AK1C1	0,047422372	0,671072637
Nuclear mitotic apparatus protein 1	A0A087WY61	A0A087WY61	0,005320995	0,67108284
cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	P10644	KAPO	0,042411955	0,672389212
F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1XR1	Q9BZK7	TBL1R	0,02887232	0,672818192
Ankyrin	Q9P0K7	RAI14	0,007855964	0,677614496
Golgi phosphoprotein 3	Q9H4A6	GOLP3	0,013089989	0,678535315
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial	O76031	CLPX	0,000130448	0,681633532
Coatome subunit gamma-2	Q9UBF2	COPG2	0,032775762	0,684009391
28S ribosomal protein S23, mitochondrial	Q9Y3D9	RT32	0,010397332	0,684872044
RNA-binding protein EWS	Q01844	EWS	0,001466126	0,688114116
60S ribosomal protein L18	Q07020	RL18	0,012780784	0,690882694
DNA topoisomerase 1	P11387	TOP1	0,005677572	0,69097541
Nucleolysin TIAR	Q01085	TIAR	0,002430176	0,692106817
39S ribosomal protein L44, mitochondrial	Q9H9J2	RM44	0,034086748	0,692349186
Tubulin alpha-1C chain	Q9BQE3	TBA1C	0,001518676	0,693461908
Translational activator of cytochrome c oxidase 1	Q9BSH4	TACO1	0,000622817	0,693758711
Condensin complex subunit 1	Q15021	CND1	0,007285638	0,696047376
Protein ABHD11	Q8NFV4	ABHDB	0,022079347	0,6968773
Developmentally-regulated GTP-binding protein 2	P55039	DRG2	0,021590706	0,697985303
MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein	Q9BYG3	MK67I	0,030176445	0,702631401
Pescadillo homolog	O00541	PESC	0,04028721	0,704968598
Pre-mRNA-splicing factor 38A	Q8NAV1	PR38A	0,040518341	0,705463052
Mitogen-activated protein kinase 1	P28482	MK01	0,025409079	0,706666761
TATA-binding protein-associated factor 2N	Q92804	RBP56	0,049483094	0,709262546
Inositol monophosphatase 3	Q9NX62	IMPA3	0,00469689	0,710134045
RNA-binding protein FUS	P35637	FUS	0,004788865	0,711395099
Hexokinase-2	P52789	HXK2	0,002526164	0,711645478
Adenosine kinase	P55263	ADK	0,014824756	0,713562995
60S ribosomal protein L7a	P62424	RL7A	0,048513743	0,713674637
Double-stranded RNA-binding protein Staufin homolog 1	Q95793	STAU1	0,003582628	0,717676792
Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	Q9NS69	TOM22	0,022021722	0,718361852
Splicing factor 3B subunit 4	Q15427	SF3B4	0,012008675	0,71948277
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	P62314	SMD1	0,039738315	0,729585282
40S ribosomal protein S23	P62266	RS23	0,00384315	0,730859781
Beta/gamma crystallin domain-containing protein 1	A0A0I9YWLO	A0A0I9YWLO	0,016264534	0,731427512
Kinesin light chain 1	G3V5R9	G3V5R9	0,017654983	0,731462486

Ribosomal RNA small subunit methyltransferase NEP1	Q92979	NEP1	0,024286348	0,733672782
N-alpha-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit	Q9BXJ9	NAA15	0,001225422	0,733709156
Adenylosuccinate lyase	P30566	PUR8	0,006107064	0,733887176
Neurochondrin	Q9UBB6	NCDN	0,009307135	0,73906565
Septin-10	Q9POV9	SEP10	0,029521613	0,740872883
Elongation factor 1-alpha 2	Q05639	EF1A2	0,011702539	0,741451497
Nuclear cap-binding protein subunit 1	Q09161	NCPB1	0,007673618	0,742351752
60S ribosomal protein L15	P61313	RL15	0,004091756	0,743102281
DNA replication licensing factor MCM4	P33991	MCM4	0,029032802	0,748446371
V-type proton ATPase subunit d 1	P61421	VAOD1	0,038354001	0,751262995
Exosome RNA helicase MTR4	P42285	MTREX	0,000547813	0,753877729
Glycogen debranching enzyme	P35573	GDE	0,015879646	0,753894507
Ras GTPase-activating protein 1	P20936	RASA1	0,041911852	0,755497413
Ribosome biogenesis protein BOP1	Q14137	BOP1	0,001020587	0,760174336
14-3-3 protein theta	P27348	1433T	0,003107498	0,761554456
Paxillin	P49023	PAXI	0,020760257	0,763038626
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	Q3ZCQ8	TIM50	0,002042434	0,763215185
Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	Q7L576	CYFP1	0,049746094	0,763382366
Sequestosome-1	Q13501	SQSTM1	0,047860547	0,763883453
Protein flightless-1 homolog	Q13045	FLII	0,005910047	0,764272031
Protein quaking	Q96PU8	QKI	0,042601389	0,764642272
tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	Q08J23	NSUN2	0,005797248	0,766869012
Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2	Q9Y6W5	WASF2	0,024721885	0,767239159
Serine	Q13177	PAK2	0,04467625	0,767567032
Liprin-beta-1	Q86W92	LIPB1	0,003248264	0,767882862
Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	Q9H2U2	IPYR2	0,045890482	0,768406544
Succinate-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	Q96I99	SUCB2	0,017260837	1,302584444
Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	P53007	TXTP	0,036055201	1,3026872
Prenylcysteine oxidase 1	Q9UHG3	PCYOX	0,020444228	1,302788817
Myeloid-derived growth factor	Q969H8	MYDGF	0,005682774	1,303270025
Serine/threonine-protein kinase PAK 2 /threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	P62140	PP1B	0,005512615	1,306003872
Catenin delta-1	O60716	CTND1	0,004519545	1,306173669
COP9 signalosome complex subunit 3	Q9UN52	CSN3	0,023520255	1,307022695
Secretory carrier-associated membrane protein 3	O14828	SCAM3	0,016642697	1,308994077
5'-nucleotidase domain-containing protein 1	Q5TFE4	NTSD1	0,003922599	1,312555267
Inverted formin-2	Q27J81	INF2	0,007022607	1,313183594
Protein disulfide-isomerase A3	P30101	PDIA3	0,029179944	1,313309469
Extended synaptotagmin-1	Q9BSJ8	ESYT1	0,006440678	1,315747457
Proteasome assembly chaperone 1	O95456	PSMG1	0,020931367	1,317560119
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3	Q01970	PLCB3	0,020443527	1,319089242
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	O75368	SH3L1	0,041102039	1,324099169
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	P04844	RPN2	0,005189401	1,325793039
ATP-dependent RNA helicase DDX54	Q8TDD1	DDX54	0,004404229	1,328226669
Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial	Q9Y3E5	PTH2	0,004029186	1,330786493
Cancer-related nucleoside-triphosphatase	Q9BSD7	NTPCR	0,033930055	1,330864496
Adenine phosphoribosyltransferase	P07741	APT	0,008080778	1,335270524
Rho guanine nucleotide exchange factor 2	Q92974	ARHG2	0,015557903	1,335591263
Transmembrane protein 214	Q6NUQ4	TM214	0,017173368	1,335594206
Dipeptidyl peptidase 3	Q9NY33	DPP3	0,016754327	1,338243106
Pre-mRNA splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	O43143	DHX15	0,040438255	1,338753338
Calreticulin	P27797	CALR	0,018817869	1,344986157
Presequence protease, mitochondrial	Q5JRX3	PREP	0,04436028	1,345161614
Endoplasmic reticulum resident protein 44	Q9BS26	ERP44	0,021700567	1,347706244
Neuroplastin	Q9Y639	NPTN	0,006907731	1,348310101
AMP deaminase 2	Q01433	AMPD2	0,00704558	1,35002126
Gelsolin	P06396	GELS	0,034875745	1,35008611
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A	P46977	STT3A	0,001279772	1,35064282
Translationally-controlled tumor protein	P13693	TCTP	0,008702022	1,353615919
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	P09936	UCHL1	0,002567512	1,358642315
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	O75746	CMC1	0,031846978	1,366455219
Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit	O00743	PPP6	0,017928135	1,369451357
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	P24752	THIL	0,015246238	1,374018739
DnaJ homolog subfamily B member 11	Q9UBS4	DJB11	0,029996089	1,375739789
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	Q02809	PLOD1	0,025172784	1,378698867
Drebrin-like protein	Q9UJU6	DBNL	0,016898442	1,379917908
Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2	Q03169	TNAP2	0,013241306	1,386927483
NudC domain-containing protein 3	Q8IVD9	NUDC3	0,005701057	1,387346834
Protein transport protein Sec23A	Q15436	SC23A	0,023040469	1,388669598
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	P23284	PPIB	0,015115206	1,389340484
Acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial	Q9H845	ACAD9	0,00353577	1,390054575
Protein Mpv17	P39210	MPV17	0,019587588	1,390552389
Protein FAM49B	Q9NUQ9	FA49B	0,015335907	1,394057135
Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	P55145	MANF	0,036903405	1,395235031
Endoplasmic reticulum resident protein 29	P30040	ERP29	0,003348692	1,397701291
Matrix metalloproteinase-14	P50281	MMP14	0,006938844	1,4063792
U2 small nuclear ribonucleoprotein A'	P09661	RU2A	0,002432252	1,406441799
Ornithine aminotransferase, mitochondrial	P04181	OAT	0,006717838	1,406957263
Vacuolar protein sorting-associated protein 51 homolog	Q9UID3	VPS51	0,003169653	1,407807896
Argininosuccinate synthase	P00966	ASSY	0,030854267	1,408998032
Reticulocalbin-2	Q14257	RCN2	0,035640948	1,414975044
Vacuolar protein sorting-associated protein 29	Q9UBQ0	VPS29	0,04385254	1,423185898
Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	P13473	LAMP2	0,025652485	1,428170696
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	AOA0A0MSE2	AOA0A0MSE2	0,015334185	1,42851438
ATP-dependent RNA helicase DDX50	Q9BQ39	DDX50	0,010677226	1,435443409
Bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase	P07814	SYEP	0,029492548	1,437061529
UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	Q9NYU2	UGGG1	0,015952617	1,43870842
Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	Q13907	IDI1	0,013027772	1,439936735
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	P11177	ODPB	0,012457881	1,441198173
Microsomal glutathione S-transferase 3	O14880	MGST3	0,010244212	1,450426399
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	O60568	PLOD3	0,037201876	1,452619198
60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog	J3QLW7	J3QLW7	0,045949874	1,4561485
Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic	P54687	BCAT1	0,049863069	1,456606754

OcIA domain-containing protein 1	Q9NX40	OCAD1	0,010354933	1,461608769
Cleavage stimulation factor subunit 3	Q12996	CSTF3	0,014816685	1,463179328
Sideroflexin-3	Q9BWM7	SFXN3	0,028343036	1,472811472
Cullin-4B	Q13620	CUL4B	0,034907792	1,476193355
Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	P30837	AL1B1	0,046474524	1,487595359
Galactokinase	P51570	GALK1	0,00699006	1,488697781
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10	Q96AY3	FKB10	0,024665021	1,492988654
Minor histocompatibility antigen H13	Q8TCT9	HM13	0,003844513	1,493574341
Adenylate kinase isoenzyme 1	P00568	KAD1	0,001664037	1,495810949
Recombining binding protein suppressor of hairless	Q06330	SUH	0,017064014	1,504075557
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	O75306	NDUS2	0,00501379	1,510824703
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6	AOAVT1	UBA6	0,001403819	1,516972255
2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	Q16698	DECR	0,012318673	1,520970562
Methyltransferase-like protein 7A	Q9H8H3	MET7A	0,029820008	1,535588076
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	Q01581	HMCS1	0,015457944	1,54787648
BRIS and BRCA1-A complex member 1	Q9NWW8	BABA1	0,01703272	1,556589611
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	O75822	EIF3J	0,028094159	1,58034395
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2	Q8N5K1	CISD2	0,010206681	1,586310473
Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	P56192	SYM	0,024241335	1,595153134
Malectin	Q14165	MLEC	0,01113923	1,60090569
Cytosolic non-specific dipeptidase	Q96KP4	CNDP2	0,000507265	1,60387827
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	P45877	PPIC	0,021901294	1,62877662
Putative helicase MOV-10	Q9HCE1	MOV10	0,030687388	1,647175806
Mannose-P-dolichol utilization defect 1 protein	O75352	MPU1	0,004970927	1,651922004
Rho-related GTP-binding protein RhoC	P08134	RHOC	0,000515553	1,666108072
Glutamine--tRNA ligase	P47897	SYQ	0,003601587	1,688675122
Reticulon-3	O95197	RTN3	0,004282072	1,700585923
Very-long-chain enoyl-CoA reductase	Q9NZ01	TECR	0,011825905	1,709019904
Catechol O-methyltransferase	P21964	COMT	0,000704248	1,760923822
Histone-arginine methyltransferase CARM1	Q86X55	CARM1	0,007090303	1,78582979
ADP/ATP translocase 2	P05141	ADT2	0,007724425	1,786579564
Actin, alpha cardiac muscle 1	P68032	ACTC	0,015609428	1,793930591
40S ribosomal protein S5	P46782	RS5	0,007198988	1,805935849
La-related protein 1	Q6PKG0	LARP1	0,002184763	1,808368838
Cell division cycle 5-like protein	Q99459	CDC5L	0,001017125	1,81355912
Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	Q9P035	HACD3	0,00632301	1,850858649
Lanosterol synthase	P48449	ERG7	0,000369734	1,870827666
DnaJ homolog subfamily C member 13	O75165	DJC13	0,001042089	1,879210095
Dihydropyridyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	P10515	ODP2	0,014494024	1,90635732
Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	Q9Y323	SAMH1	0,006098188	1,91701107
Protein AHNAK2	Q8IVF2	AHNAK2	0,002317928	1,958150053
Protein transport protein Sec61 subunit beta	P60468	SEC61B	3,95161E-07	2,014083604
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3	O95573	ACSL3	0,02616664	2,034254541
Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	Q6IN85	P4R3A	0,000221528	2,072554956
DnaJ homolog subfamily C member 11	Q9NVH1	DJC11	0,016379406	2,098654973
Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	P08754	GNAI3	0,000595168	2,269944842
DAZ-associated protein 1	Q96EP5	DAZP1	0,004335934	2,352010769
Myelin expression factor 2	Q9P2K5	MYEF2	0,002710948	2,43488697
BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	Q96CX2	KCD12	0,001705834	2,69260292
Golgin subfamily A member 3	Q08378	GOGA3	0,002127203	2,732261662
Microtubule-associated protein 1A	E9PGC8	MAP1A	0,013976429	3,109403848
Heat shock 70 kDa protein 1A	PODMV8	HS71A	1,6875E-05	3,179433025
GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 1	Q9H488	OFUT1	0,000918176	3,238264052
Protease	P03253	L3	0,000478636	3,422414641
Protein CutA	O60888	CUTA	0,003691939	5,98245941
Preterminal protein	P04499	PTP	6,97869E-06	7,065164814
Proteasome adapter and scaffold protein ECM29	Q5VYK3	ECM29	0,002074669	8,666582802
Packaging protein 3	P04496	L1	0,000249191	9,083559458
E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	Q14669	TRIPC	0,000106776	9,211380962
Acetoacetyl-CoA synthetase	Q86V21	AACS	0,000712074	13,07111049
AH receptor-interacting protein	O00170	AIP	3,96384E-05	13,56363256
Microtubule-associated protein 2	P11137	MTAP2	0,00015582	14,47391438
E1B protein, small T-antigen	P03246		0,000293208	15,29483969
DNA-binding protein	P03265	DBP	6,40242E-05	15,4993919
Pre-hexon-linking protein IIIa	P12537	L1	4,78215E-05	17,69878847
Core-capsid bridging protein	P24938	L2	4,34012E-05	18,57458767
Protein 33K	P24940	L4	4,07347E-05	18,97663442
Pre-hexon-linking protein VIII	P24936	L4	8,77848E-05	19,43044521
Pre-histone-like nucleoprotein	P68951		5,41039E-05	21,52643226
Fiber protein	P11818	L5	6,82322E-06	23,55894033
Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	Q9BTU6	P4K2A	0,00080228	30,40952141
Shutoff protein	P24933	L4	1,65134E-05	30,78060534
Hexon-interlacing protein	P03281	IX	1,01595E-05	33,81085714
Penton protein	P12538	L2	8,28041E-05	34,5471533
Packaging protein 1	P03271	Iva2	0,000115196	35,12970881
Hexon protein	P04133	L3	3,3863E-05	52,0809696
Pre-protein VI	P24937	L3	7,65774E-05	54,33971482
UBX domain-containing protein 6	Q9BZV1	UBXN6	5,77343E-05	376,1441302
Early E3 14.5 kDa protein	P04493		2,6474E-06	1307,886202



Disminución en los niveles de expresión

Aumento en los niveles de expresión

Proteínas adenovirales



Tasa de cambio

Tabla suplementaria 6

Proteínas celulares y adenovirales diferencialmente expresadas por las células de glioblastoma U87 infectadas con el adenovirus Delta-24-RGD a las 24hpi

Descripción	Acceso Uniprot	Gen	pVal	TC
Histone H3.1	P68431	H31	0,040257423	0,365862221
DNA topoisomerase 2-alpha	P11388	TOP2A	0,044520067	0,682203159
General transcription factor II-I	P78347	GTF2I	0,007145903	0,716225774
GPI transamidase component PIG-T	Q969N2	PIGT	0,048243844	0,727312135
Cleavage stimulation factor subunit 1	Q05048	CSTF1	0,019041346	0,747484041
Serine/threonine-protein kinase VRK1	Q99986	VRK1	0,001863468	0,762731342
Ankyrin repeat and MYND domain-containing protein 2	Q8IV38	ANKY2	0,006616405	1,316917801
Protease	P03253	L3	0,029513223	1,332702976
Lanosterol synthase	P48449	ERG7	0,00127799	1,333368565
BRISC and BRCA1-A complex member 1	Q9NWX8	BABA1	0,017779195	1,349219516
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	Q02809	PLOD1	0,04378948	1,360671767
NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	Q13423	NNTM	0,003004697	1,384063579
U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A	Q9BVI6	UT14A	0,036465006	1,486234691
Proteasome adapter and scaffold protein ECM29	Q5VYK3	ECM29	0,021514558	1,501778609
THUMP domain-containing protein 1	Q9NXG2	THUM1	0,018504476	1,542046362
BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	Q96CX2	KCTD12	0,018945581	1,625740341
E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	Q14669	TRIPC	0,038316675	1,685337782
Heat shock 70 kDa protein 1A	P0DMV8	HS71A	0,00843428	1,778910552
HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-15 beta chain	P01911	2B1F	0,019348888	1,870215607
Lysophospholipase-like protein 1	Q5VWZ2	LYPL1	0,039279459	1,99283401
Preterminal protein	P04499	PTP	0,005809213	2,037224946
Acetoacetyl-CoA synthetase	Q86V21	AACS	0,00931967	2,070716729
Packaging protein 3	P04496	L1	0,019150044	2,162273693
Pre-hexon-linking protein VIII	P24936	L4	0,009639636	2,485675096
Pre-hexon-linking protein IIIa	P12537	L1	0,011715421	2,539204454
Core-capsid bridging protein	P24938	L2	0,00941268	2,812126297
Fiber protein	P11818	L5	0,004059411	3,086174257
Protein 33K	P24940	L4	0,005533574	3,169302785
Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	Q9BTU6	P4K2A	0,005891302	3,397079034
E1B protein, small T-antigen	P03246		0,011485977	3,406046652
Pre-histone-like nucleoprotein	P68951		0,004341075	3,687912822
Hexon-interlacing protein	P03281	IX	0,002760258	3,967956822
Penton protein	P12538	L2	0,006370116	3,974188629
DNA-binding protein	P03265	DBP	0,002853539	4,550620037
Microtubule-associated protein 2	P11137	MTAP2	0,002867056	4,568403646
Shutoff protein	P24933	L4	0,002841799	4,870266487
Hexon protein	P04133	L3	0,003231738	5,362556202
Pre-protein VI	P24937	L3	0,004542031	5,730881973
Packaging protein 1	P03271	IVa2	0,003406341	7,91319114
Early E3 14.5 kDa protein	P04493		0,000121682	121,6197408

	Disminución en los niveles de expresión
	Aumento en los niveles de expresión
	Proteínas adenovirales
	TC
	Tasa de cambio

Tabla suplementaria 7

Proteoma diferencial común a las 24 y 48hpi de las células U87 con el adenovirus Delta-24-RGD

Acceso Uniprot	Gen	24hpi		48hpi	
		pVal	TC	pVal	TC
P03246		0,011485977	3,406046652	0,000293208	15,29483969
P03253	L3	0,029513223	1,332702976	0,000478636	3,422414641
P03265	DBP	0,002853539	4,550620037	6,40242E-05	15,4993919
P03271	IVa2	0,003406341	7,91319114	0,000115196	35,12970881
P03281	IX	0,002760258	3,967956822	1,01595E-05	33,81085714
P04133	L3	0,003231738	5,362556202	3,3863E-05	52,0809696
P04493		0,000121682	121,6197408	2,6474E-06	1307,886202
P04496	L1	0,019150044	2,162273693	0,000249191	9,083559458
P04499	PTP	0,005809213	2,037224946	6,97869E-06	7,065164814
P0DMV8	HS71A	0,00843428	1,778910552	1,6875E-05	3,179433025
P11137	MTAP2	0,002867056	4,568403646	0,00015582	14,47391438
P11818	L5	0,004059411	3,086174257	6,82322E-06	23,55894033
P12537	L1	0,011715421	2,539204454	4,78215E-05	17,69878847
P12538	L2	0,006370116	3,974188629	8,28041E-05	34,5471533
P24933	L4	0,002841799	4,870266487	1,65134E-05	30,78060534
P24936	L4	0,009639636	2,485675096	8,77848E-05	19,43044521
P24937	L3	0,004542031	5,730881973	7,65774E-05	54,33971482
P24938	L2	0,00941268	2,812126297	4,34012E-05	18,57458767
P24940	L4	0,005533574	3,169302785	4,07347E-05	18,97663442
P48449	ERG7	0,00127799	1,333368565	0,000369734	1,870827666
P68951		0,004341075	3,687912822	5,41039E-05	21,52643226
Q02809	PLOD1	0,04378948	1,360671767	0,025172784	1,378698867
Q14669	TRIPC	0,038316675	1,685337782	0,000106776	9,211380962
Q5VYK3	ECM29	0,021514558	1,501778609	0,002074669	8,666582802
Q86V21	AACS	0,00931967	2,070716729	0,000712074	13,07111049
Q96CX2	KCD12	0,018945581	1,625740341	0,001705834	2,69260292
Q9BTU6	P4K2A	0,005891302	3,397079034	0,00080228	30,40952141
Q9NWV8	BABA1	0,017779195	1,349219516	0,01703272	1,556589611
P01911	2B1F	0,019348888	1,870215607		
Q13423	NNTM	0,003004697	1,384063579		
Q5VWZ2	LYPL1	0,039279459	1,99283401		
Q8IV38	ANKY2	0,006616405	1,316917801		
Q9BVJ6	UT14A	0,036465006	1,486234691		
Q9NXG2	THUM1	0,018504476	1,542046362		
A0A0A0MSE2	A0A0A0MSE2			0,015334185	1,42851438
A0AVT1	UBA6			0,001403819	1,516972255
E9PGC8	E9PGC8			0,013976429	3,109403848
J3QLW7	J3QLW7			0,045949874	1,4561485
O00170	AIP			3,96384E-05	13,56363256
O00743	PPP6			0,017928135	1,369451357
O14828	SCAM3			0,016642697	1,308994077
O14880	MGST3			0,010244212	1,450426399
O43143	DHX15			0,040438255	1,338753338
O60568	PLOD3			0,037201876	1,452619198

O60716	CTND1	0,004519545	1,306173669
O60888	CUTA	0,003691939	5,98245941
O75165	DJC13	0,001042089	1,879210095
O75306	NDUS2	0,00501379	1,510824703
O75352	MPU1	0,004970927	1,651922004
O75368	SH3L1	0,041102039	1,324099169
O75746	CMC1	0,031846978	1,366455219
O75822	EIF3J	0,028094159	1,58034395
O95197	RTN3	0,004282072	1,700585923
O95456	PSMG1	0,020931763	1,317560119
O95573	ACSL3	0,02616664	2,034254541
P00568	KAD1	0,001664037	1,495810949
P00966	ASSY	0,030854267	1,408998032
P04181	OAT	0,006717838	1,406957263
P04844	RPN2	0,005189401	1,325793039
P05141	ADT2	0,007724425	1,786579564
P06396	GELS	0,034875745	1,35008611
P07741	APT	0,008080778	1,335270524
P07814	SYEP	0,029492548	1,437061529
P08134	RHOC	0,000515553	1,666108072
P08754	GNAI3	0,000595168	2,269944842
P09661	RU2A	0,002432252	1,406441799
P09936	UCHL1	0,002567512	1,358642315
P10515	ODP2	0,014494024	1,90635732
P11177	ODPB	0,012457881	1,441198173
P13473	LAMP2	0,025652485	1,428170696
P13693	TCTP	0,008702022	1,353615919
P21964	COMT	0,000704248	1,760923822
P23284	PPIB	0,015115206	1,389340484
P24752	THIL	0,015246238	1,374018739
P27797	CALR	0,018817869	1,344986157
P30040	ERP29	0,003348692	1,397701291
P30101	PDIA3	0,029179944	1,313309469
P30837	AL1B1	0,046474524	1,487595359
P39210	MPV17	0,019587588	1,390552389
P45877	PPIC	0,021901294	1,62877662
P46782	RS5	0,007198988	1,805935849
P46977	STT3A	0,001279772	1,35064282
P47897	SYQ	0,003601587	1,688675122
P50281	MMP14	0,006938844	1,4063792
P51570	GALK1	0,00699006	1,488697781
P53007	TXTP	0,036055201	1,3026872
P54687	BCAT1	0,049863069	1,456606754
P55145	MANF	0,036903405	1,395235031
P56192	SYMC	0,024241335	1,595153134
P60468	SC61B	3,95161E-07	2,014083604
P62140	PP1B	0,005512615	1,306003872
P68032	ACTC	0,015609428	1,793930591
Q01433	AMPD2	0,00740558	1,35002126
Q01581	HMCS1	0,015457944	1,54787648

Q01970	PLCB3	0,020443527	1,319089242
Q03169	TNAP2	0,013241306	1,386927483
Q06330	SUH	0,017064014	1,504075557
Q08378	GOGA3	0,002127203	2,732261662
Q12996	CSTF3	0,014816685	1,463179328
Q13620	CUL4B	0,034907792	1,476193355
Q13907	IDI1	0,013027772	1,439936735
Q14165	MLEC	0,01113923	1,60090569
Q14257	RCN2	0,035640948	1,414975044
Q15436	SC23A	0,023040469	1,388669598
Q16698	DECR	0,012318673	1,520970562
Q27J81	INF2	0,007022607	1,313183594
Q5JRX3	PREP	0,04436028	1,345161614
Q5TFE4	NT5D1	0,003922599	1,312555267
Q6IN85	P4R3A	0,000221528	2,072554956
Q6NUQ4	TM214	0,017173368	1,335594206
Q6PKG0	LARP1	0,002184763	1,808368838
Q86X55	CARM1	0,007090303	1,78582979
Q8IVD9	NUDC3	0,005701057	1,387346834
Q8IVF2	AHNK2	0,002317928	1,958150053
Q8N5K1	CISD2	0,010206681	1,586310473
Q8TCT9	HM13	0,003844513	1,493574341
Q8TDD1	DDX54	0,004404229	1,32822669
Q92974	ARHG2	0,015557903	1,335591263
Q969H8	MYDGF	0,005682774	1,303270025
Q96AY3	FKB10	0,024665021	1,492988654
Q96EP5	DAZP1	0,004335934	2,352010769
Q96I99	SUCB2	0,017260837	1,302584444
Q96KP4	CNDP2	0,000507265	1,60387827
Q99459	CDC5L	0,001017125	1,81355912
Q9BQ39	DDX50	0,010677226	1,435443409
Q9BS26	ERP44	0,021700567	1,347706244
Q9BSD7	NTPCR	0,033930055	1,330864496
Q9BSJ8	ESYT1	0,006440678	1,315747457
Q9BWM7	SFXN3	0,028343036	1,472811472
Q9BZV1	UBXN6	5,77343E-05	376,1441302
Q9H488	OFUT1	0,000918176	3,238264052
Q9H845	ACAD9	0,00353577	1,390054575
Q9H8H3	MET7A	0,029820008	1,535588076
Q9HCE1	MOV10	0,030687388	1,647175806
Q9NUQ9	FA49B	0,015335907	1,394057135
Q9NVH1	DJC11	0,016379406	2,098654973
Q9NX40	OCAD1	0,010354933	1,461608769
Q9NY33	DPP3	0,016754327	1,338243106
Q9NYU2	UGGG1	0,015952617	1,43870842
Q9NZ01	TECR	0,011825905	1,709019904
Q9P035	HACD3	0,00632301	1,850858649
Q9P2K5	MYEF2	0,002710948	2,43488697
Q9UBQ0	VPS29	0,04385254	1,423185898
Q9UBS4	DJB11	0,029996089	1,375739789

Q9UHG3	PCYOX			0,020444228	1,302788817
Q9UID3	VPS51			0,003169653	1,407807896
Q9UJU6	DBNL			0,016898442	1,379917908
Q9UNS2	CSN3			0,023520255	1,307022695
Q9Y3E5	PTH2			0,004029186	1,330786493
Q9Y3Z3	SAMH1			0,006098188	1,91701107
Q9Y639	NPTN			0,006907731	1,348310101
P11388	TOP2A	0,044520067	0,682203159	0,02581777	0,427256106
P68431	H31	0,040257423	0,365862221	0,032519743	0,336989151
P78347	GTF2I	0,007145903	0,716225774	0,007781638	0,606505413
Q05048	CSTF1	0,019041346	0,747484041	0,026705112	0,390004614
Q969N2	PIGT	0,048243844	0,727312135	0,045967346	0,638854587
Q99986	VRK1	0,001863468	0,762731342		
A0A087WY61	A0A087WY61			0,005320995	0,67108284
A0A0J9YWLO	A0A0J9YWLO			0,016264534	0,731427512
F8W726	F8W726			0,000243685	0,641199583
G3V5R9	G3V5R9			0,017654983	0,731462486
K7ELT6	K7ELT6			0,000259323	0,654077362
O00541	PESC			0,04028721	0,704968598
O00560	SDCB1			0,015806763	0,619103011
O00764	PDXK			0,004802618	0,611598345
O14786	NRP1			0,013698699	0,1368839
O15160	RPAC1			0,000608016	0,419512066
O43172	PRP4			0,043450924	0,635531824
O75190	DNJB6			0,00431861	0,648853695
O76031	CLPX			0,000130448	0,681633532
O95793	STAU1			0,003582628	0,717676792
P05387	RLA2			0,041150203	0,433614938
P09417	DHPR			0,01750727	0,646051934
PODMV1	CT458			0,004756314	0,662534812
P10644	KAPO			0,042411955	0,672389212
P11387	TOP1			0,005677572	0,69097541
P17252	KPCA			0,00482473	0,327731962
P20936	RASA1			0,041911852	0,755497413
P21127	CD11B			0,014602231	0,445067463
P27348	1433T			0,003107498	0,761554456
P28482	MK01			0,025409079	0,706666761
P30566	PUR8			0,006107064	0,733887176
P30876	RPB2			0,000797679	0,497359819
P33991	MCM4			0,029032802	0,748446371
P35573	GDE			0,015879646	0,753894507
P35637	FUS			0,004788865	0,711395099
P36578	RL4			0,008698866	0,65943113
P42285	MTREX			0,000547813	0,753877729
P49023	PAXI			0,020760257	0,763038626
P51858	HDGF			0,012686816	0,603817723
P52292	IMA1			0,036631508	0,624303102
P52789	HXK2			0,002526164	0,711645478
P55039	DRG2			0,021590706	0,697985303
P55263	ADK			0,014824756	0,713562995

P61313	RL15	0,004091756	0,743102281
P61421	VAOD1	0,038354001	0,751262995
P62266	RS23	0,00384315	0,730859781
P62314	SMD1	0,039738315	0,729585282
P62424	RL7A	0,048513743	0,713674637
Q01085	TIAR	0,002430176	0,692106817
Q01844	EWS	0,001466126	0,688114116
Q02878	RL6	0,047236148	0,621076962
Q04828	AK1C1	0,047422372	0,671072637
Q05639	EF1A2	0,011702539	0,741451497
Q07020	RL18	0,012780784	0,690882694
Q08380	LG3BP	0,011297542	0,37350953
Q08J23	NSUN2	0,005797248	0,766869012
Q09161	NCBP1	0,007673618	0,742351752
Q13045	FLII	0,005910047	0,764272031
Q13151	ROAO	0,000448608	0,661032272
Q13177	PAK2	0,04467625	0,767567032
Q13425	SNTB2	0,009932567	0,447772489
Q13501	SQSTM	0,047860547	0,763883453
Q13617	CUL2	0,00302238	0,580165602
Q13685	AAMP	0,002513468	0,566329991
Q13868	EXOS2	0,001470624	0,657183793
Q14137	BOP1	0,001020587	0,760174336
Q14192	FHL2	0,021169789	0,503760163
Q15021	CND1	0,007285638	0,696047376
Q15397	PUM3	0,000929979	0,552451221
Q15427	SF3B4	0,012008675	0,71948277
Q16186	ADRM1	0,004891689	0,587235528
Q16678	CP1B1	0,004012326	0,225904644
Q3ZCQ8	TIM50	0,002042434	0,763215185
Q4J6C6	PPCEL	0,002920131	0,670089593
Q6P5R6	RL22L	0,001320004	0,60183497
Q7L576	CYFP1	0,049746094	0,763382366
Q86W92	LIPB1	0,003248264	0,767882862
Q8IY81	SPB1	0,001789694	0,595233696
Q8NAV1	PR38A	0,040518341	0,705463052
Q8NFV4	ABHDB	0,022079347	0,6968773
Q8TAQ2	SMRC2	0,003591485	0,577630526
Q8TDN6	BRX1	0,005380752	0,444622111
Q92734	TFG	0,002658221	0,633533569
Q92804	RBP56	0,049483094	0,709262546
Q92979	NEP1	0,024286348	0,733672782
Q96PU8	QKI	0,042601389	0,764642272
Q9BQE3	TBA1C	0,001518676	0,693461908
Q9BSH4	TACO1	0,000622817	0,693758711
Q9BXJ9	NAA15	0,001225422	0,733709156
Q9BYG3	MK67I	0,030176445	0,702631401
Q9BZK7	TBL1R	0,02887232	0,672818192
Q9H2U2	IPYR2	0,045890482	0,768406544
Q9H4A6	GOLP3	0,013089989	0,678535315

Q9H7Z7	PGES2		0,008162884	0,57585569
Q9H9J2	RM44		0,034086748	0,692349186
Q9HBI1	PARVB		0,012406727	0,608942962
Q9NS69	TOM22		0,022021722	0,718361852
Q9NX62	IMPA3		0,00469689	0,710134045
Q9NZN4	EHD2		0,005258738	0,622071299
Q9P0I2	EMC3		0,006961674	0,654781926
Q9P0K7	RAI14		0,007855964	0,677614496
Q9P0V9	SEPT_10		0,029521613	0,740872883
Q9UBB6	NCDN		0,009307135	0,73906565
Q9UBF2	COPG2		0,032775762	0,684009391
Q9UDY2	ZO2		0,003733884	0,590691049
Q9UHB9	SRP68		0,004045665	0,550947833
Q9UIQ6	LCAP		6,69849E-05	0,524280241
Q9ULX3	NOB1		0,002153725	0,649471915
Q9Y3D9	RT23		0,010397332	0,684872044
Q9Y4P3	TBL2		0,013480931	0,553174771
Q9Y570	PPME1		0,024016324	0,635935538
Q9Y5K6	CD2AP		0,035446324	0,6237142
Q9Y5X1	SNX9		0,010964925	0,516286687
Q9Y6W5	WASF2		0,024721885	0,767239159

	Disminución en los niveles de expresión
	Aumento en los niveles de expresión
	No hay cambios en los niveles de expresión
	Proteínas adenovirales
	Tasa de cambio

Tabla suplementaria 8

Proteoma diferencial común durante la replicación adenoviral y el inicio del proceso autofágico

Acceso Uniprot (Proteínas celulares)	Gen	Descripción	TC			
			6hpi	10hpi	24hpi	48hpi
Q14137	BOP1	Ribosome biogenesis protein BOP1	0,633321988	0,509911136		0,760174336
Q9BVJ6	UT14A	U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A	0,643307479	0,545604248	1,486234691	
Q92804	RBP56	TATA-binding protein-associated factor 2N	0,707795564			0,709262546
Q9BYG3	MK671	MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein	0,481541942			0,702631401
Q12996	CSTF3	Cleavage stimulation factor subunit 3	2,320704025			1,463179328
P23284	PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	1,691524644	1,919743668		1,389340484
P35637	FUS	RNA-binding protein FUS	2,14970879	2,301175963		0,711395099
P52292	IMA1	Importin subunit alpha-1	1,530939952	1,709338365		0,624303102
P51858	HDFG	Hepatoma-derived growth factor	1,367429689	1,645765938		0,603817723
O15160	RPAC1	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1		0,694777527		0,419512066
Q13501	SQSTM1	Sequestosome-1		0,599101502		0,763883453
E9PGC8	MAP1A	Microtubule-associated protein 1A		2,436567383		3,109403848
F8W726	UBAP2L	Ubiquitin-associated protein 2-like		2,169595231		0,641199583
P05387	RLA2	60S acidic ribosomal protein P2		2,575304602		0,433614938
P33991	MCM4	DNA replication licensing factor MCM4		3,067577996		0,748446371
P62266	RS23	40S ribosomal protein S23		1,389175921		0,730859781
Q01085	TIAR	Nucleolysin TIAR		1,385929862		0,692106817
Q9NVH1	DJC11	DnaJ homolog subfamily C member 11		2,176731652		2,098654973
P04844	RPN2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 2		1,451687523		1,325793039
Q96KP4	CNDP2	Cytosolic non-specific dipeptidase		1,459519176		1,60387827
Acceso Uniprot (Proteínas adenovirales)	Gen	Descripción	6hpi	10hpi	24hpi	48hpi
P03246	N/A	E1B protein, small T-antigen		1,671651805	3,406046652	15,29483969
P03281	IX	Hexon-interlacing protein	1,582434687	2,776778022	3,967956822	33,81085714
P04496	L1	Packaging protein 3	2,444372409	3,672146001	2,162273693	9,083559458
P11818	L5	Fiber protein	1,981012848	3,134575571	3,086174257	23,55894033
P12537	L1	Pre-hexon-linking protein IIIa	1,737936731	2,854198958	2,539204454	17,69878847
P12538	L2	Penton protein	2,070094811	3,340028387	3,974188629	34,5471533
P24938	L2	Core-capsid bridging protein	1,538945746	2,697764585	2,812126297	18,57458767
P24940	L4	Protein 33K	1,955161626	2,973625873	3,169302785	18,97663442
P68951	N/A	Pre-histone-like nucleoprotein	1,587849472	2,161400206	3,687912822	21,52643226
P24937	L3	Pre-protein VI	2,085343021	3,476295746	5,730881973	54,33971482
P04493	N/A	Early E3 14.5 kDa protein	2,214624657		121,6197408	1307,886202
P24933	L4	Shutoff protein	1,789466138	2,181952419	4,870266487	30,78060534
P04133	L3	Hexon protein	1,978571233	3,00808656	5,362556202	52,0809696
P03253	L3	Protease		1,671651805	1,332702976	3,422414641
P03265	DBP	DNA-binding protein		1,640908111	4,550620037	15,4993919
P03271	IVa2	Packaging protein 1		1,429406755	7,91319114	35,12970881



Disminución en los niveles de expresión
 Aumento en los niveles de expresión
 No hay cambios en los niveles de expresión



Tasa de cambio

Navarrabiomed - Centro de Investigación Biomédica
Universidad Pública de Navarra
Complejo Hospitalario de Navarra
Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra

