

***Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Biotecnología***

**Localización de proteínas virales y celulares que
interaccionan con la E1B 55 kD de adenovirus a lo largo del
ciclo de replicación viral.**

TESIS

***Que para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias Bioquímicas***

***Presenta:
Valencia Antúnez Carlos Alberto***

Director de tesis: Dr. Ramón González

Cuernavaca, Mor.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

i. Abreviaturas.....	3
I. Resumen.....	4
II. Introducción.....	5
II. 1. Adenovirus.....	5
II.2. Estructura del virión.....	6
II.3. Genoma.....	7
II.4. Ciclo de replicación.....	8
II.4.1. Adsorción y entrada.....	8
II.4.2. Activación de genes tempranos.....	9
II.4.3. Replicación del DNA viral.....	11
II.4.4. Expresión de genes virales tardíos.....	12
II.4.5. Ensamblaje del virión y liberación del virus.....	13
II.4.6. Antagonistas virales del sistema inmune.....	13
II.4.7. Oncogénesis.....	13
II.5. La proteína E1B 55 kD.....	14
II.5.1. Estructura de la proteína E1B 55 kD.....	14
II.5.2. Localización de la proteína E1B 55 kD.....	16
II.5.3. Interacciones y funciones de la proteína E1B 55 kD.....	18
II.6. Sistema de expresión en baculovirus.....	22
II.6.1. Baculovirus recombinante.....	22
II.6.2. Ventajas del sistema de expresión.....	22
II.6.3. Baculovirus E1B recombinante.....	23
III. Justificación.....	24
IV. Objetivo.....	25
IV.1. Objetivos particulares.....	25
V. Metodología.....	25
VI. Resultados.....	28
VI.1. Expresión de la E1B recombinante en células SF9.....	28
VI.2. Detección de la E1B recombinante por western blot.....	29
VI.3. Inmovilización de la E1B recombinante.....	30
VI.4. Distribución de proteínas virales y celulares en células HFF infectadas con Ad5 wt, localización y fraccionamiento subcelular.....	31
VI.5. Análisis de interacciones.....	42
VI.5.1. E1B-E4orf6.....	42
VI.5.2. E1B-p53.....	44
VI.5.3. E1B-Rad 50.....	45
VII. Discusión.....	47
VIII. Conclusiones.....	53
IX. Perspectivas.....	53
X. Bibliografía.....	55

i. Abreviaturas

- A549: células humanas transformadas de epitelio de carcinoma alveolar (pulmones)
- AcNPV: baculovirus silvestre (Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus).
- Ad: adenovirus.
- Ad5wt: adenovirus humano tipo 5 silvestre.
- BacE1B: baculovirus con el gen recombinante E1B.
- Bacwt: baculovirus silvestre (wild type).
- CAR: receptor de adenovirus y coxsackie.
- DBP: proteína de unión a DNA.
- E1B AP5: proteína 5 asociada a E1B.
- E1Brec: E1B recombinante.
- E4orf6rec: E4orf6 recombinante.
- FFU: unidades formadoras de focos.
- HFF: fibroblastos humanos derivados de prepucio.
- hpi.: horas postinfección.
- MAb: anticuerpo monoclonal.
- Mdm2: murine double minute 2.
- MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.
- Mock: células no infectadas.
- MOI: multiplicidad de infección.
- MRN: complejo Mre11/Rad50/Nbs1.
- NES: señal de exportación nuclear.
- Ni NTA: resina con iones de níquel unidos al ácido nitrilotriacético.
- NLS: secuencia de localización nuclear.
- PML: proteína de leucemia promielocítica.
- POD: dominio oncogénico de PML.
- pRb: proteína de retinoblastoma.
- TNF- α : factor de necrosis tumoral.
- tpi.: tiempos postinfección.
- TP: proteína terminal.
- SF9: células de insecto (*Spodoptera frugiperda*).
- U2OS: células humanas derivadas de osteosarcoma.

I. Resumen

Durante más de 50 años los adenovirus han sido un modelo para el estudio de distintos procesos celulares. Entre estos mecanismos están la replicación, transcripción y splicing del material genético en células eucariontes. Otros procesos descritos han sido la regulación de la proliferación y del ciclo celular, así como la oncogénesis. Sin embargo, no ha sido posible describir a nivel molecular algunos fenómenos que resultan de una compleja red de interacciones entre las proteínas virales y celulares, por ejemplo la maduración y exportación selectiva de mensajeros virales al citoplasma. La proteína viral temprana E1B 55 kD participa directa e indirectamente en la inhibición de la apoptosis y la exportación de los mRNA virales. El poder detallar los mecanismos que permiten a la E1B 55 kD llevar a cabo sus funciones permitirá analizar desde nuevas perspectivas el tráfico intracelular de mRNA y la transformación celular. En este trabajo se analizó la expresión e inmovilización de la E1B 55 kD expresada en células de insecto para el estudio de sus interacciones con la E4orf6, p53 y las subunidades del complejo MRN. También se analizó la distribución intracelular de estas proteínas en células no transformadas infectadas con adenovirus humano tipo 5 por inmunofluorescencia y Western blot. A diferencia de lo que se tenía reportado en células transformadas, no se observó la degradación de p53 o alguna de las subunidades del MRN, sino cambios en la solubilidad de estas proteínas debido a la infección por adenovirus. Los resultados sugieren que además de las proteínas que se encuentran en nucleoplasma, una subpoblación de estas proteínas se encuentra asociada a la matriz nuclear, mientras que otra fracción es exportada al citoplasma. Los resultados permiten también sugerir que un análisis de las modificaciones postraduccionales de estas proteínas podría contribuir a esclarecer el mecanismo por el cual estas proteínas son relocalizadas e inactivadas durante el ciclo de replicación viral en células no transformadas.

II. Introducción

II.1. Adenovirus

Los adenovirus fueron descubiertos en 1953, al observarse la degeneración de células primarias obtenidas de adenoides humanos. La infección por adenovirus está asociada a diversos síndromes como gastroenteritis e infecciones del tracto respiratorio. En 1962 se observó la formación de tumores malignos en hamsters neonatos después de ser inoculados con adenovirus 12. Fue la primera vez que se inducía experimentalmente la transformación maligna de células en un organismo, utilizando virus que infectan a humanos. La transformación de células estableció a los adenovirus como un sistema modelo para el estudio de la oncogénesis. Los estudios con los adenovirus han hecho importantes contribuciones a la comprensión de la regulación de la expresión genética, replicación del DNA y splicing del RNA, control del ciclo y proliferación celular (24).

La familia *Adenoviridae* se compone principalmente de dos géneros: Mastadenovirus (virus de mamífero) y Aviadenovirus (limitado a aves). Se conocen 50 serotipos de adenovirus humanos. La clasificación por serotipos depende de la resistencia a la neutralización de la infección por anticuerpos. Los serotipos están clasificados a su vez dentro de 6 subgrupos basados en su habilidad para aglutinar eritrocitos (Tabla 1) (24).

Subgrupo	Grupos de hemaglutinación	Serotipo	Potencial oncogénico en animales	Transformación de cultivos celulares
A	IV (poca aglutinación)	12, 18, 31	Alto	+
B	I (alta aglutinación de eritrocitos de simio)	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	Moderado	+
C	III (aglutinación parcial de eritrocitos de rata)	1, 2, 5, 6	Bajo	+
D	II (alta aglutinación de eritrocitos de rata)	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42, 47	Bajo	+
E	III	4	Bajo	+
F	III	40, 41	ND	ND

Tabla 1. Clasificación de los adenovirus humanos (Mastadenovirus H). Se muestran los subgrupos y serotipos asociados y el potencial oncogénico de cada subgrupo. ND: no determinado.

II.2. Estructura del virión

La cápside de los adenovirus es icosaédrica y su diámetro puede ser de entre 70 y 100 nm de diámetro, dependiendo del serotipo. La cápside consta de 252 capsómeros formados por 240 hexones, 12 pentones y proteínas asociadas a los hexones que estabilizan la cápside (Figura 1 y Tabla 2). Los hexones son trímeros del polipéptido II. Los polipéptidos virales VI, VIII, IX, se asocian al capsómero hexón para estabilizar la cápside y unirla con la nucleocápside y los capsómeros pentón. Los pentones poseen una base de la cual se proyecta la proteína viral fibra, la cual es responsable de la adhesión a la membrana plasmática de la célula blanco vía el receptor CAR (coxsackie- adenovirus receptor). Tres polipéptidos IV forman a la proteína fibra que junto con cinco polipéptidos III forman el capsómero pentón (24).

La nucleocápside contiene cuatro proteínas encargadas de empaquetar el material genético viral. Alrededor de la proteína VII se envuelve el DNA viral. El polipéptido V interacciona con los capsómeros pentón, uniendo la cápside con la nucleocápside. La función de la proteína mu en el ciclo de replicación no ha sido completamente descrita, mientras que la proteína terminal sirve como primer durante la replicación del genoma y une el genoma viral a la matriz nuclear (24).

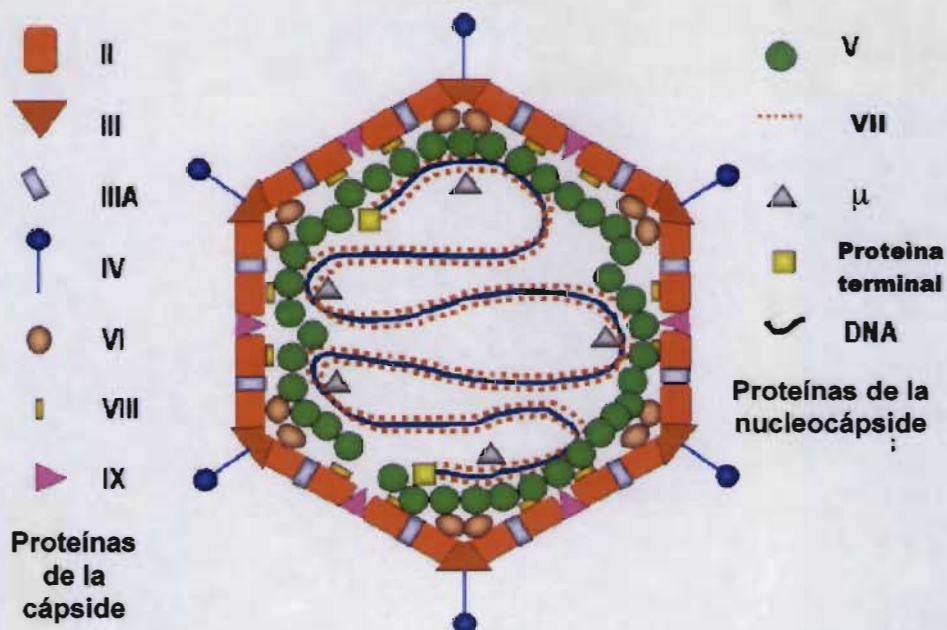


Figura 1. Ilustración que muestra los componentes de la cápside y la nucleocápside de adenovirus (30).

Proteína	Peso Molecular (kD)	Número de copias	Ubicación	Función
II	109.6	720	Hexón (trímero)	Formación de la cápside
III	63.2	60	Base del pentón (pentámero)	Formación de la cápside y adhesión a la célula
IV	61.9	36	Fibra (trímero)	Adhesión a la célula
IIIa	63.2	74	Bordes entre los hexones	Estabilización de la cápside
VI	23.5	342	Asociado al hexón	Estabilización de la cápside
VIII	14.5	211	Asociado al hexón	Estabilización de la cápside
IX	14.3	247	Superficie exterior de grupos de nueve hexones	Estabilización de la cápside
V	41.6	157	Nucleocápside	Empaquetamiento del genoma viral
VII	19.4	835	Nucleocápside, unido al DNA	Empaquetamiento del genoma viral
μ	2.4	120	Nucleocápside	Empaquetamiento del genoma viral
TP	74.5	2	Unido al DNA	Primer

Tabla 2. Proteínas estructurales de adenovirus. Se muestra la nomenclatura de las proteínas que forman el virión, el peso molecular de cada una, el número de copias, ubicación y función de cada polipéptido.

II.3. Genoma

El genoma de adenovirus es una molécula de DNA de doble cadena, de alrededor de 36,000 pares de bases (bp), que se organiza en unidades de transcripción tempranas y tardías, dispuestas como se ilustra en el diagrama de la figura 2.

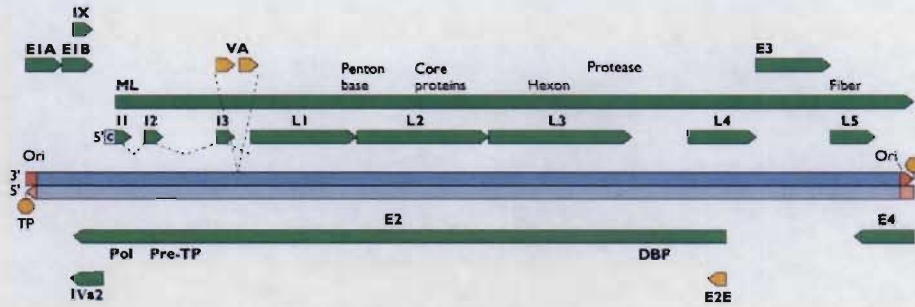


Fig. 2. Diagrama del genoma de adenovirus humano tipo 5. Se esquematiza la estructura de doble cadena mostrando el orden de los genes y sus productos. Por convención el genoma se ilustra con la unidad de transcripción de E1A en el extremo izquierdo (24).

El genoma contiene dos sitios de inicio para la replicación y secuencias repetidas terminales invertidas (ITR) de entre 100 y 140 bp que facilitan la circularización del genoma durante la replicación. El genoma viral contiene una secuencia que actúa *in cis* y dirige la encapsidación del DNA viral (24).

El cromosoma viral contiene 5 unidades de transcripción tempranas (E1A, E1B, E2, E3 y E4), dos unidades tempranas retrasadas (IX y IVa) y una unidad de transcripción tardía (ML) que por selección de sitios comunes de poliadenilación da origen a 5 familias de mRNA, todos transcritos por la RNA pol II y procesados por splicing alternativo (24).

II.4. Ciclo de replicación

El ciclo de replicación viral se ha dividido en dos fases separadas por el inicio de la replicación del genoma viral. Los eventos de la fase temprana comprenden la adsorción y la penetración de la partícula viral a la célula, la transcripción y la traducción de las unidades tempranas. Los productos de los genes tempranos regulan la expresión de los genes virales y la replicación del DNA, inducen la progresión del ciclo celular, bloquean la apoptosis y antagonizan los mecanismos antivirales de la célula y el sistema inmune del organismo (24, 26).

II.4.1. Adsorción y entrada

Los adenovirus se adhieren a las células mediante el carboxilo terminal de la proteína fibra proyectada de los pentones. La fibra reconoce el receptor CAR (receptor de coxsackie y adenovirus). Adicionalmente los polipéptidos III de los pentones contienen secuencias ricas en arginina, glicina y asparagina (secuencias RGD) que permiten la adhesión a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$. La unión a integrinas favorece la penetración del virus a las células, incluso en algunos casos a células que carecen del receptor CAR. La internalización del virus se da por endocitosis mediada por receptor. Este proceso es estimulado por la interacción integrina-pentón. La acidificación del endosoma estimula el desensamblaje de los pentones y los polipéptidos que sirven de cimentación. En el citoplasma la nucleocápside interacciona con los microtúbulos a través de los hexones para

llegar al núcleo. Fuera del núcleo, la nucleocápside se une al complejo del poro nuclear para introducir el genoma viral. En el núcleo la proteína terminal asocia el DNA viral con la matriz nuclear (24)(Figura 3).

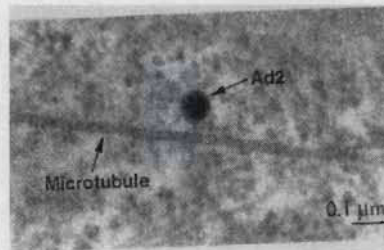


Figura 3. Micrografía de microscopio electrónico de transmisión en donde se muestra una nucleocápside de adenovirus adherida a un microtúbulo (31).

II.4.2. Activación de genes tempranos

En el ciclo de replicación, los genes tempranos que se encuentran en los extremos del genoma son los primeros en transcribirse. Como se mencionó arriba, los genes tempranos tienen tres funciones principales: i) inducir a la célula a entrar a la fase S del ciclo celular, ii) inhibir los mecanismos de defensa de la célula y iii) permitir la síntesis de los productos virales necesarios para la replicación del genoma.

❖ E1A

E1A está bajo el control de un promotor constitutivamente activo y es la primera unidad transcripcional en expresarse. La unidad E1A codifica para 2 mRNAs, productos de splicing alternativo. La traducción de los mRNAs genera las proteínas E1A 12S y 13S (nomenclatura asignada de acuerdo a sus coeficientes de sedimentación). La proteína E1A 13S posee tres regiones conservadas: CR1, CR2 y CR3 mientras que la proteína E1A 12S sólo tiene las regiones CR1 y CR2. La región CR3 permite la interacción con la proteína de unión a secuencias TATA (TBP) y AP1, para iniciar la transcripción.

Las regiones CR1 y CR2 permiten a la proteína E1A unirse a pRb -proteína supresora de retinoblastoma- e inducen la disociación de la proteína pRb de los factores de transcripción E2F (Figura 4). La proteína pRB forma un complejo con el factor transactivador de la transcripción E2F inhibiendo la transcripción de genes con promotores afines a E2F. En células no infectadas, la proteína pRB mantiene a la célula en la fase G1 del ciclo celular. La fosforilación de pRB libera al factor E2F que activa genes que inducen el avance del ciclo celular de G1 a S, tales como la DNA polimerasa alfa, ribonucleótido reductasa, c-myc, c-myb, cdc2, p14, ciclinas G1/S, y ciclinas S, entre otras. En células infectadas, la interacción E1A-pRB no sólo permite la expresión de genes celulares sino también virales. Entre los genes virales, la unidad transcripcional E2 posee dos sitios de unión a E2F. Una vez unidos los factores E2F al DNA, 2 proteínas virales (E4orf6/7) se unen a los E2F para formar un tetrámero. Los productos codificados por esta unidad de transcripción se encargan de replicar el genoma viral (como se verá en "Replicación del

DNA viral” más adelante). La formación del tetrámero favorece la transcripción continua de los genes de E2, lo cual asegura que haya proteínas suficientes para una replicación exponencial del genoma viral. El dominio CR1 también permite la interacción de E1A con p107 (la cual también inhibe la progresión del ciclo celular hacia fase S) y p300 (acetiladora de histonas que funciona como coactivadora de la transcripción de genes que detienen el ciclo celular). La región codificante para la proteína E1A contiene elementos que actúan *in cis* y estimulan la síntesis de la unidad transcripcional siguiente (E1B) (35). En conjunto, las proteínas de la unidad E1A funcionan como transactivadoras de genes virales y celulares, los cuales generan las condiciones celulares adecuadas para la replicación viral (2, 3, 24).

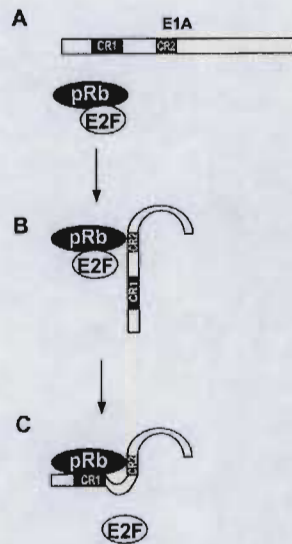


Figura 4. La E1A se une a la pRb mediante su dominio CR2. Después el dominio CR1 desplaza al factor E2F (40).

❖ E1B

La activación de genes que promueven el avance del ciclo celular hacia la fase S resulta en una señal genotóxica que estabiliza a la proteína p53. Normalmente la proteína celular Mdm2 ubiquitina a p53 para enviarla a degradación por el proteosoma (1). Al activarse el factor E2F se promueve la transcripción de p19, la cual secuestra a Mdm2. Como consecuencia del secuestro de Mdm2, aumenta la concentración de p53 en el núcleo; es decir, se estabiliza. La proteína p53 es un factor transcripcional cuyos genes blanco están involucrados en el control del ciclo celular y apoptosis. Uno de los genes activados por p53 es p21. La proteína p21 se une a las G1/S-Cdk y S-Cdk para inhibir sus actividades, y así evitar la entrada a la fase S del ciclo celular. Por otro lado, p53 también puede activar genes proapoptóticos de la familia de Bcl-2. Estas proteínas facilitan la salida del citocromo c de la mitocondria al citoplasma donde éste promueve la agregación y activación de caspasas. La activación de las caspasas promueve la degradación de proteínas en el citoplasma y la lamina nuclear que en conjunto comprometen la integridad de la célula e inducen su muerte (apoptosis). En respuesta a la activación de p53, la proteína viral E1B 55 kD se une al N-

terminal e inactiva a p53, antagonizando su actividad (24). De esta manera, la E1B 55 kDa inhibe la activación de la apoptosis y favorece el avance del ciclo celular hacia la fase S. Por otra parte la proteína E1B 19 kDa, la cual es homóloga de Bcl2, inhibe la actividad de Bax y Bak, evitando la salida de citocromo c de la mitocondria.

❖ E4

La unidad de transcripción E4 codifica para otras proteínas virales que también son necesarias para establecer las condiciones óptimas para la replicación del genoma viral. Entre ellas, la E4orf3 modula la organización de estructuras nucleares (POD o cuerpos de PML, como se describe en "Replicación del DNA viral"), se une e inactiva a la subunidad catalítica del complejo MRN (complejo de reparación de DNA de doble cadena) y favorece la estabilidad de los mRNA virales (14, 37, 42). Otro producto de la unidad de transcripción E4 es la proteína E4orf6, que regula la exportación de mensajeros virales tardíos hacia citoplasma y favorece la degradación tanto de p53 como del complejo MRN, mediante la formación de un complejo formado por las E1B 55 kD/E4orf6, como se describe más adelante (10, 14). La E4orf4 participa en el reclutamiento de la maquinaria de splicing para favorecer la modificación post-transcripcional de los mensajeros virales sobre los celulares (44). Por último la E4orf4 se une a la proteína supresora de tumores PP2A, activando la muerte celular de manera independiente de p53. De esta manera se propone que la actividad de la E4orf4 media la muerte celular y la liberación de la progenie viral en la fase tardía de la infección (57).

II.4.3. Replicación del DNA viral

La acumulación de los productos de la unidad de transcripción E2 y la entrada a la fase S del ciclo celular, favorecen la replicación del genoma viral, evento que marca el inicio de la fase tardía de la infección. La unidad de transcripción E2 codifica tres productos que median la replicación del DNA viral: la proteína de unión a DNA de cadena sencilla (DBP), la polimerasa viral de DNA (pol) y un precursor de la proteína terminal (pTP). La polimerasa de E2 posee actividad polimerasa 5' a 3' y actividad exonucleasa 3' a 5'. La proteína DBP tiene una alta afinidad por el DNA de cadena sencilla y estabiliza el complejo de inicio de la replicación junto con los factores nucleares I y II (NF I y II). La proteína terminal está unida covalentemente a los extremos 5' del DNA viral (24). Una serina en la proteína terminal se une a un dCMP que expone el 3'OH libre para funcionar como "primer" e iniciar la replicación. De acuerdo a estudios *in vitro* primero se inicia la síntesis de forma continua hasta completar la síntesis de una molécula de DNA formada por una cadena hija y una parental. La cadena parental que queda desplazada se circulariza para generar una estructura secundaria conocida como "panhandle", la cual sirve para crear un extremo que es reconocido por la maquinaria de replicación y se sintetiza otra copia del genoma. Los sitios donde se replica y transcribe el genoma dentro del núcleo se denominan centros de replicación viral o cuerpos de inclusión viral, en los que se localizan el DNA viral y, proteínas virales y celulares (Figura 5) (24). En estos sitios se acumulan las proteínas responsables de la replicación del genoma, además de las proteínas tempranas, E1B 55kD, E4 Orf3, E4 Orf6 y factores celulares de transcripción y procesamiento postranscripcional.

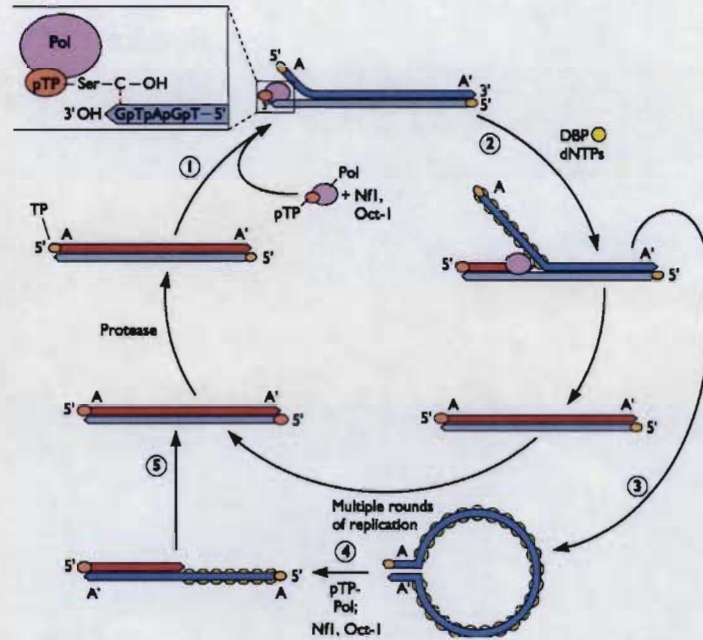


Figura 5. Modelo de la replicación del genoma de adenovirus. La replicación comienza en uno de los extremos, desplazando una de las cadenas parentales. La cadena desplazada se circulariza gracias a las secuencias repetidas terminales invertidas (ITR). La estructura de "panhandle" provee un extremo 3' OH reconocido por la maquinaria de replicación viral (32).

II.4.4. Expresión de genes virales tardíos

Al iniciar la síntesis de DNA viral, se activan los genes tardíos. La activación depende de un elemento en *cis* del cromosoma viral que queda accesible en la fase tardía y de los productos del gen temprano tardío IVa2. La proteína IVa2 se une a factores de transcripción que reconocen al promotor de la unidad mayor tardía. El transcrito de la unidad tardía (de 29,000 nucleótidos aproximadamente) es procesado por adición diferencial de poliA para generar 5 familias de mRNAs que son procesados por splicing; las familias de mRNAs se denominan L1, L2, L3, L4 y L5.

Los mRNA virales tardíos son exportados preferencialmente sobre los mRNAs celulares al citoplasma. Las proteínas E1B 55 kD y E4orf6 forman un complejo que es responsable de la acumulación citoplásmica de mensajeros virales maduros durante la fase tardía de la infección; simultáneamente, el mismo complejo es responsable de bloquear la exportación de los mRNA celulares. La síntesis de mensajeros celulares continúa, pero estos no se acumulan en el citoplasma; es decir, su exportación es inhibida. Se sabe que no existe una discriminación entre mensajeros celulares y virales a nivel de secuencia, ya que genes celulares integrados en la región tardía del cromosoma viral se exportan eficientemente al citoplasma. Otras observaciones sugieren que los factores celulares

encargados de la exportación de mRNA son secuestrados y dirigidos hacia los centros de replicación (58).

Finalmente, además de la exportación selectiva de mRNA, durante la fase tardía del ciclo de replicación, se establece también una expresión selectiva de genes virales por la traducción preferencial de los mRNAs virales sobre los celulares en el citoplasma. El genoma de adenovirus codifica para dos VA RNAs (RNA asociados a virus), pequeños RNAs transcritos por la RNA polimerasa III que inhiben la fosforilación del factor de inicio de la traducción, eIF-4F. El factor eIF-4F no fosforilado no reconoce el cap de los mRNA celulares y no se inicia la traducción. Los mRNAs virales tardíos cuentan con una secuencia líder en el extremo 5' conocida como líder tripartita, que permite el reconocimiento de los mensajeros virales por la subunidad ribosomal 40S y permite la traducción de los mRNA en ausencia del factor eIF-4F; es decir, el ribosoma se une al extremo 5' del mRNA y lo registra en busca del codón de inicio en un fenómeno conocido como "shunting" (cambio de vía) del ribosoma (24, 38). Finalmente VA 1 parece intervenir en la biogénesis de microRNA y siRNA por inhibición de Dicer (58). También se sabe que la proteína viral tardía L4 de 100 kDa se une a los mRNA virales para favorecer su traducción. Se ha observado que virus que no expresan la L4 100 kDa son defectuosos en la traducción de los mensajeros virales (58).

II.4.5. Ensamblaje del virión y liberación del virus

Los mensajeros tardíos codifican para las proteínas estructurales del virus; es decir, a las proteínas que forman la cápside y la nucleocápside. La proteína L4 100 kD sirve como proteína de andamiaje para la formación de la cápside. Sobre la L4 100 kD se ensamblan los polipéptidos que forman los capsómeros pentón y hexón dentro del núcleo. Las proteínas de la nucleocápside y un elemento en *cis* del genoma dirigen su encapsidación. La inhibición de la traducción de genes celulares y la desestabilización de los filamentos de actina e intermedios, facilita la liberación de la progenie viral, por lisis celular (24).

II.4.6. Antagonistas virales del sistema inmune

El genoma de adenovirus codifica para 4 productos que antagonizan las respuestas antivirales del sistema inmune. Mediante el dominio CR1, la E1A viral inhibe al factor ISG3 (factor transcripcional activado mediante interferón α y β). Entre los productos de la unidad de transcripción temprana E3, la proteína E3 14.5 kD forma un complejo con la E3 14.7 kD que inhibe la cascada de señalización inducida por el TNF- α (factor de necrosis tumoral); la proteína E3 de 19 kD evita la lisis celular mediada por células CTL (células T citotóxicas) al unirse y secuestrar al MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) clase I en el retículo endoplásmico (1, 24).

II.4.7. Oncogénesis

Todos los adenovirus humanos son capaces de transformar células en cultivo y existen tres evidencias que demuestran que los genes de E1A y E1B son suficientes para mediar la transformación celular debido a las alteraciones que provocan en los puntos de

control del ciclo celular : i) las células infectadas y transformadas expresan estos genes, ii) la sola transfección de estos genes induce la transformación y iii) adenovirus con mutaciones en estos genes no son tan eficientes en la transformación. También se ha observado la tumorigénesis asociada a la infección con adenovirus humano tipo 12 en neonatos de roedor; sin embargo, este fenómeno no ha sido reproducido en roedores adultos (24).

II.5. La proteína E1B 55 kD

Como se describió anteriormente, la proteína temprana E1B 55 kD participa, de manera directa e indirecta, en: i) el proceso de exportación selectiva de los mensajeros virales tardíos; ii) la inhibición y degradación de p53 y del complejo de reparación de DNA de doble cadena (MRN); iii) la progresión del ciclo celular hacia la fase S; y iv) en el proceso de oncogénesis.

II.5.1. Estructura de la proteína E1B 55 kD

La proteína E1B consta de 496 residuos de aminoácidos. No ha sido posible obtener la estructura terciaria de la proteína; sin embargo, se han identificado algunos dominios funcionales mediante la introducción de mutaciones, inserciones y deleciones en el gen (25). La región central de la proteína, entre los aminoácidos 215 y 345 presenta una alta hidrofobicidad, y se ha sugerido que podría funcionar como un “core” estructural importante para el plegamiento correcto de la proteína (Figura 6) (25). En el extremo amino terminal se localiza una señal de exportación nuclear entre los aminoácidos 83 y 93, mientras que en el carboxilo terminal se localiza una señal de importación al núcleo. La E1B 55 kD es modificada por sumo-1 (small ubiquitin-like protein modifier) en la lisina 104; y es fosforilada en tres sitios en los residuos serina 490, serina 491 y treonina 495 (19, 36). Se ha observado que la fosforilación de estos residuos es importante para inhibir la actividad transcripcional de p53 (19). Hacia el centro de la estructura primaria se localiza una región con similitud a los dominios RNP1 y RNP2 de las ribonucleoproteínas entre los aminoácidos 250 y 308, que coincide con la región core. Por comparación de secuencias se propone que entre los aminoácidos 350 y 376 podría haber un motivo de dedos de zinc tipo C2H2 (dos cisteínas y dos histidinas) (Figuras 7 y 8) (19, 25).

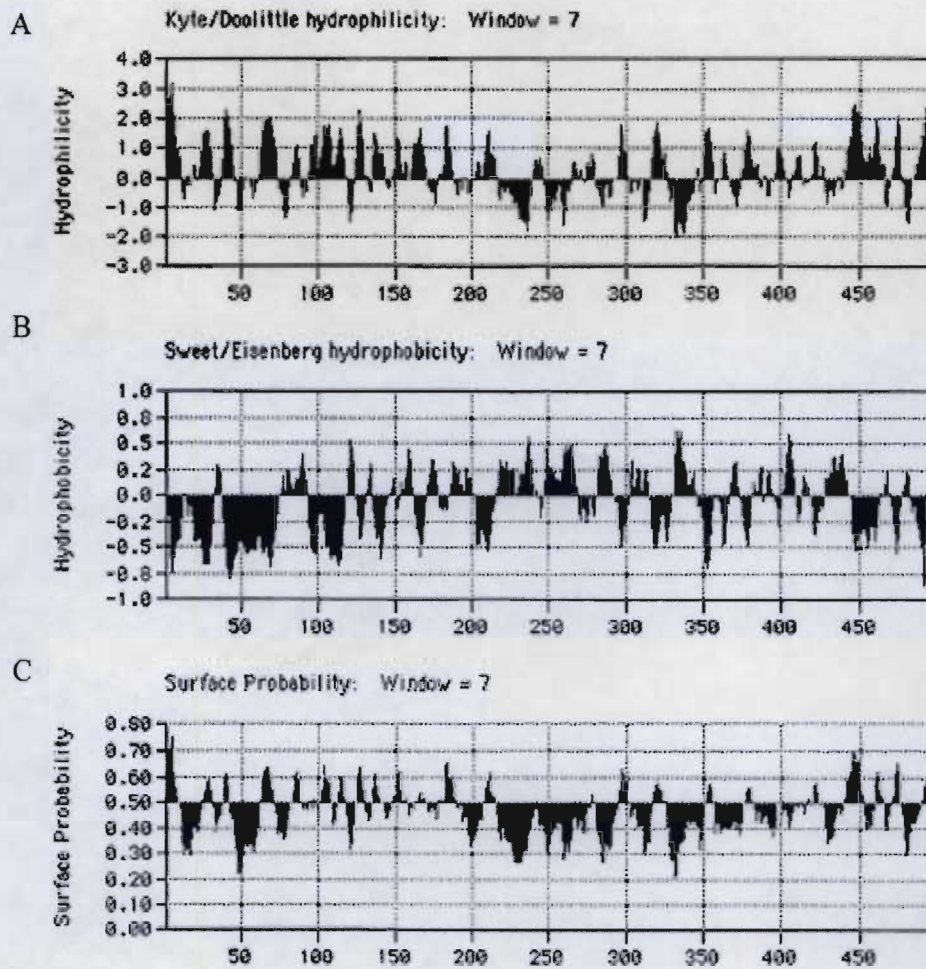


Figura 6. Predicción de las propiedades fisicoquímicas de la E1B 55 kD. Estas propiedades se basan en los 496 aminoácidos de la E1B. La gráfica A muestra un carácter hidrofílico hacia los extremos amino y carboxilo terminales. Por el contrario, en la gráfica B se observa un carácter hidrofóbico en la región central. La gráfica C muestra la probabilidad de que los aminoácidos estén expuestos hacia la superficie de la estructura terciaria (25).

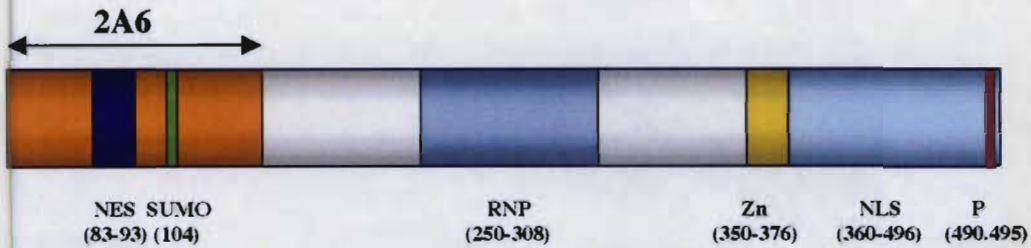


Figura 7. Esquema de la proteína E1B 55 kD. En el diagrama se ilustran las posiciones de los aminoácidos importantes en la señal de exportación (NES); para la sumoilación (SUMO); sitio de similitud a ribonucleoproteínas (RNP); motivo característico de dedos de zinc (Zn); señal de importación al núcleo (NLS); y sitios de fosforilación (P). También se muestra la región de aproximadamente 180 aminoácidos, que contiene el epítipo que es reconocido por el anticuerpo monoclonal anti-E1B, 2A6.

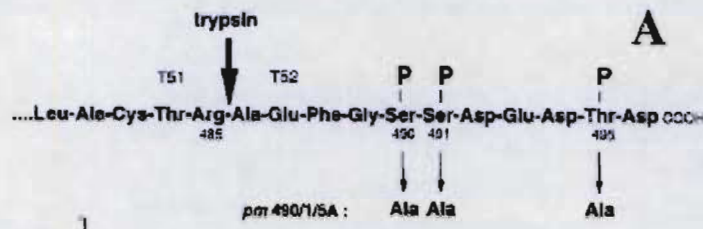


Figura 8. Secuencia primaria del carboxilo terminal de la proteína E1B 55 kD. Se indican los aminoácidos que son fosforilados. La fosforilación no afecta la estabilidad de la proteína, pero es importante para su actividad oncogénica (19).

II.5.2. Localización intracelular de la proteína E1B 55 kD

❖ Núcleo

En células no infectadas, la agrupación de proteínas celulares en espacios discretos en el núcleo facilita el ensamblaje de las maquinarias de replicación, transcripción, splicing y reparación de DNA. Algunas de estas estructuras subnucleares (también llamados organelos nucleares) son: los nucleólos, donde se producen los RNA ribosomales; los cuerpos de Cajal y los gránulos de intercromatina, donde se producen y almacenan los snRNP (ribonucleoproteínas reclutadas para formar el spliceosoma) respectivamente. Durante una infección viral, el núcleo adquiere una nueva organización que favorece la replicación del virus. En el caso de los adenovirus se forman los cuerpos de inclusión viral o centros de replicación (CR). En estos centros se secuestran proteínas celulares y se reclutan proteínas virales tempranas que participan en la replicación y transcripción del genoma viral, así como en la maduración y exportación selectiva de los mRNA virales. Algunas de las proteínas tempranas de E1 y E4 participan en la formación de los centros de replicación, entre ellas la E1B 55 kDa. Durante la fase temprana de la infección su

distribución en el núcleo es difusa y la proteína se encuentra asociada a la matriz nuclear junto con la E4orf3. Gradualmente, a medida que avanza el ciclo de replicación, la E1B se observa en puntos pequeños en el núcleo, hasta que en la fase tardía, se distribuye alrededor de los cuerpos de inclusión donde colocaliza con la proteína E4orf6 (Figura 9 panel A). La E4orf6 desplaza la interacción de la E1B con la E4orf3 para formar un complejo soluble que circula entre el núcleo y el citoplasma (8, 12, 19, 36).

❖ Citoplasma

Utilizando microscopía electrónica de transmisión y tinción con oro coloidal (el oro acoplado a un anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario dirigido contra la E1B), se describió que la E1B forma cuerpos citoplásmicos en la periferia del núcleo en formas filamentosas (Figura 9 panel B) (3, 19). Se ha propuesto que la E1B 55 kD participa en la formación de un cuerpo perinuclear denominado agresoma, en el que se asocia a Cullin 5, Rbx1 y a las Elonginas B y C, para formar la E3 ubiquitina ligasa que es responsable de la ubiquitinación de p53 y de componentes del complejo MRN en líneas celulares (8, 21, 29, 37).

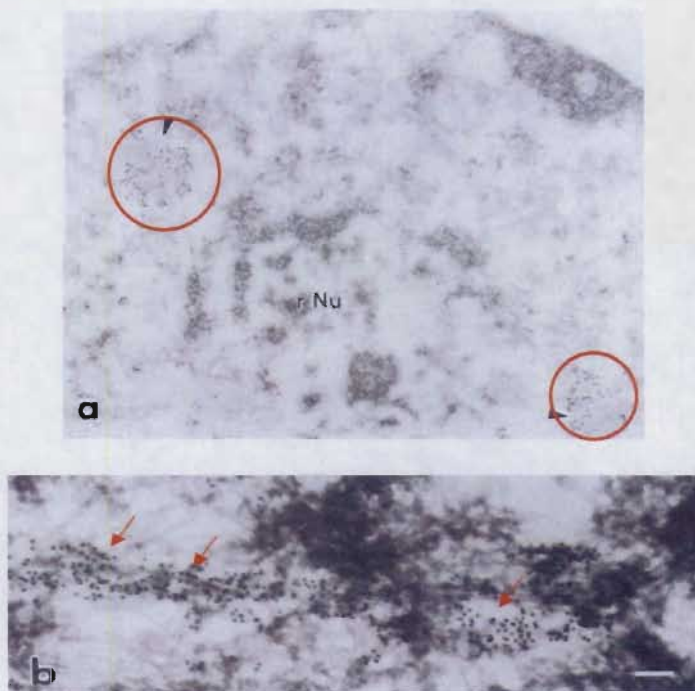


Figura 9. Localización de la E1B 55 kD en el interior del núcleo (A) y en la periferia del núcleo (B), por microscopía electrónica de transmisión. En el panel A se muestra la E1B 55 kD teñida con partículas de oro alrededor de los centros de replicación. En el panel B se observan filamentos de E1B 55 kD de 12 a 15 nm de diámetro en la periferia del núcleo (8).

II.5.3. Interacciones y Funciones de la proteína E1B 55 kD

Para el estudio de las funciones de la E1B se han utilizado mutantes de adenovirus con inserciones en el gen de la E1B. En algunos de los virus mutantes, la inserción en diferentes sitios de la proteína altera la unión específica con la E4orf6, p53 o AP5 (proteína celular de unión a RNA asociada a la E1B 55 kD). A partir de los fenotipos de estos mutantes se ha deducido que la E1B 55 kD está involucrada en tres funciones generales en el ciclo de replicación del virus: i) inactivación de p53; ii) inactivación del complejo de reparación de DNA de doble cadena (MRN y NHEJ); y iii) la exportación selectiva de mRNA virales tardíos (19, 26, 25, 27).

i) Inactivación de p53

Se han propuesto 2 vías de inactivación de p53 por la E1B; la primera por interacción directa con p53 durante la fase temprana; y la segunda por poliubiquitinación de un complejo E3 ubiquitina ligasa durante la fase tardía. Mediante ensayos de inmunoprecipitación y el uso del gen de luciferasa bajo un promotor inducible por p53 como reportero, se concluyó que la E1B 55 kD se une al extremo amino terminal de p53. Esta interacción enmascara el dominio de activación de p53 e inhibe la transcripción de genes que dependen de p53. La interacción es tan específica que la E1B 55 kD se une a p53 y no a la proteína homóloga p73, a pesar de que entre p53 y p73 hay sólo 5 aminoácidos diferentes entre las regiones de unión a la E1B de sus respectivas secuencias (21). En líneas celulares se detectó que la E1B 55 kD interacciona con la E4orf6 en el núcleo. La E1B, junto con la E4orf6 inducen la formación del complejo de E3 ubiquitina ligasa, formado por las proteínas celulares Rbx1, Cullin-5, Elongina B y C; sin embargo aún se desconocen las proteínas que participan en los complejos E1 y E2, que presentan y conjugan la ubiquitina (50, 51). Se ha propuesto que la E4orf6 interacciona con Cullin 5, Elonginas B y C para formar el complejo E3 ligasa, mientras que la E1B interacciona con la E4orf6 y es la responsable de presentar los sustratos para su ubiquitinación (47). La poliubiquitinación marca químicamente a las proteínas para su degradación en estructuras perinucleares llamadas agresomas. De esta manera, en los agresomas se favorece la degradación de p53 y otras moléculas ubiquitinadas, como se detallará más adelante (1, 3, 10).

ii) Inactivación del complejo de reparación de DNA de doble cadena

También en líneas celulares se ha observado que el complejo E1B 55 kD/E4orf6 promueve la degradación del complejo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) (9, 51). Este complejo está implicado en la reparación de DNA de doble cadena. La degradación del complejo MRN evita que se concatamere el DNA lineal de adenovirus y que se disocie la proteína terminal del genoma de adenovirus (14, 16). El complejo E3 ubiquitina ligasa también media la degradación de la DNA ligasa IV. Se ha observado que la E1B 55 kDa interacciona con esta proteína y se propone que la degradación de esta proteína evita que el complejo NHEJ ("non homologous end joining") concatamere el genoma viral (49).

iii) Exportación selectiva de mRNA viral

Por otra parte y como se había descrito anteriormente, el complejo E1B 55 kD/E4orf6 modula la acumulación citoplásmica de mRNA virales durante la fase tardía de la infección, a pesar de que la transcripción de los genes celulares no se abate, ni se altera la estabilidad de los mRNA celulares. En ausencia de la E1B 55 kD se reducen los niveles citoplásmicos de mRNA virales mientras que la acumulación de mRNA celulares no se ve abatida (8, 25). El modelo propuesto para el mecanismo responsable de la exportación selectiva de mRNA virales sugiere que las proteínas celulares de transcripción, maduración y exportación, son dirigidas a sitios específicos en el núcleo. Esta organización permite la generación de microambientes favorables para la exportación preferencial de mRNA virales (Figura 10). Este modelo se basa en la colocación de mRNA virales tardíos maduros con el complejo E1B 55 kD/E4orf6 y de los cuerpos de inclusión virales (donde el mRNA es producido) (8, 25). Un modelo alternativo propone que la degradación de componentes celulares, vía el complejo Cullin5 - E3 ubiquitina ligasa, facilita la exportación de los mensajeros virales mediante la degradación de factores necesarios para la exportación de mRNAs celulares; entendiéndose que estos factores no son indispensables para la exportación de los mensajeros virales (Figura 10). Sin embargo, no se ha encontrado evidencia directa que explique la degradación como un mecanismo que favorezca la exportación de mensajeros virales (45). Estos modelos no son excluyentes; sin embargo, la exportación selectiva de mRNA viral se establece, aún en ausencia de la formación del agresoma o de la degradación de p53 o el MRN (Cardoso, et. al.; resultados no publicados).

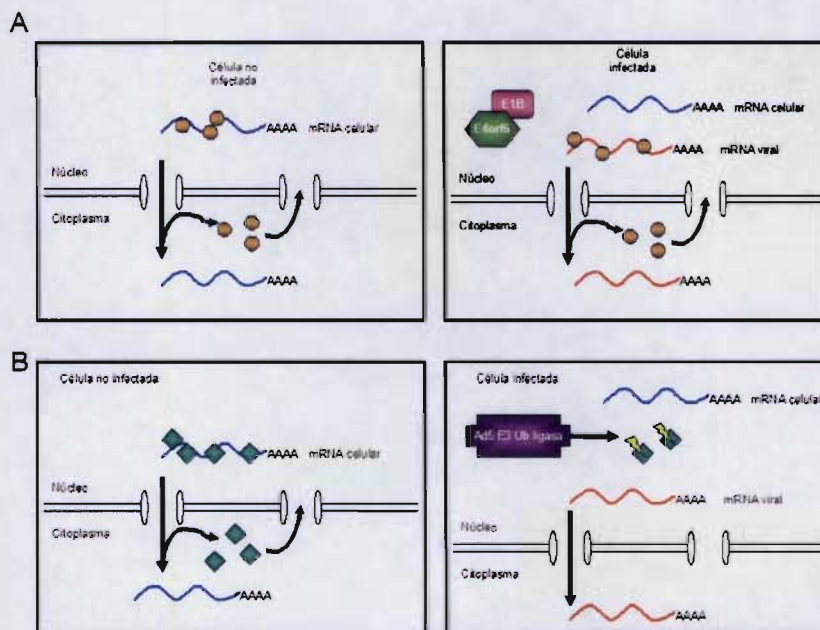


Figura 10. Modelos de exportación de mensajeros virales. El modelo en A postula que el complejo E1B/E4orf6 recluta factores celulares para favorecer la exportación de mRNA virales. El modelo en B propone que la degradación de componentes celulares facilita la acumulación citoplásmica de mensajeros virales (45).

Se ha observado la colocalización de la E1B con otras proteínas celulares, o bien se ha detectado la interacción física de la E1B con otras proteínas en distintas líneas celulares. Sin embargo, no hay evidencia directa sobre el impacto de estas interacciones en el ciclo de replicación viral. Algunas de estas proteínas son la E1B AP5, Daxx y PML.

La E1B interacciona con la E1B-AP5 (E1B associated protein 5); ésta es una proteína nuclear de unión a RNA de la familia de las hnRNP (ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas). Se ha propuesto que la E1B AP5 junto con E1B 55 kD participa en la exportación de mRNA virales en la fase tardía de la infección (11, 26), al facilitar la translocación de los mRNA de la matriz nuclear al poro nuclear, siendo la E1B AP5 una adaptadora del mRNA recién sintetizado a la maquinaria activa de exportación celular vía Tap. La proteína Tap es una exportadora nuclear de mensajeros procesados por splicing, cap y poliA (11). Finalmente también se propone que durante la infección, E1B AP5 recluta componentes de las vías de señalización por DNA dañado (ATR y RPA) a los centros de replicación. Esto no sólo interrumpe la cascada de señalización para reparar DNA sino también involucra a la E1B AP5 y las proteínas con las cuales interacciona en una replicación más eficiente del genoma, pues se postula que ATR y RPA se unen a las cadenas sencillas del genoma viral aumentando la procesividad de la polimerasa viral (52).

En el núcleo, la E1B 55 kD y la proteína Daxx ("Death associated protein"; proteína nuclear reguladora de apoptosis) colocalizan (Figura 11). A diferencia de p53, la interacción de Daxx con el extremo carboxilo terminal de la E1B, no requiere de la fosforilación de la E1B 55 kD (3). Se ha sugerido que la activación de Daxx es parte de la respuesta celular a la infección viral, al favorecer la activación de la apoptosis (el factor Daxx se une a p53 y estimula la transcripción de genes como Bax y la actividad de transactivación de p53) (3, 4, 5, 6, 48).



Figura 11. Colocalización de la E1B 55 kD y Daxx en el núcleo de células 293. Se muestra la proteína Daxx unida a GFP, la E1B 55 kD es reconocida por el anticuerpo 2A6 y el núcleo está teñido con DAPI. La última imagen es la sobreposición de las anteriores (3).

También se ha visto la colocalización de la E1B 55 kD en los cuerpos de PML. La proteína PML funciona como un coactivador de p53. Cuando no se requiere de p53, ésta es constantemente ubiquitinada por Mdm2 y degradada por el proteosoma, pero en condiciones de estrés, PML secuestra a Mdm2 y p53 se estabiliza en el núcleo (7). En células no infectadas, PML se distribuye en el núcleo en estructuras conocidas como "speckles" (puntitos); en células infectadas, PML es reorganizada en fibras, que participan en la organización de los centros de replicación. Como se mencionó antes, la proteína E4orf3

redistribuye a los cuerpos de PML, los cuales están fuertemente asociados a la matriz nuclear. Se ha propuesto que el secuestro de PML por la E4orf3 evita que interactúe con Mdm2. Así Mdm2 continuaría ubiquitinando a p53, como un mecanismo más del virus para inhibir la apoptosis mediada por p53.

Finalmente, se han obtenido varias proteínas en ensayos de coimmunoprecipitación con la E1B 55 kD y se ha observado que la proteína se asocia a RNA de manera secuencial no específica *in vitro* (10, 13). Sin embargo, las contribuciones de estas interacciones al ciclo de replicación viral no han sido completamente estudiadas. Por ejemplo, se logró la coimmunoprecipitación de la proteína pp32 con E1B 55 kD. La pp32 es una proteína capaz de modular de manera preferencial el tráfico de mRNA de núcleo a citoplasma al ligarse a la proteína HuR (HuR pertenece a la familia de proteínas de unión a RNA que estabilizan mRNA) (10). Otras proteínas que se han detectado por coimmunoprecipitación con E1B 55 kD son NuMA, E-MAP-115, y beta tubulina. La mayoría de estas proteínas están involucradas en la organización y estabilización de microtúbulos y empaquetamiento del DNA y se desconoce cuál puede ser la función de estas interacciones (10). También se analizó la interacción de la E1B 55 kDa con la proteína celular ssBP2. Se ha propuesto que la ssBP2; además de participar en la replicación del genoma celular, podría ser un supresor tumoral. Se observó que la sobreexpresión de esta proteína puede detener la proliferación y diferenciar parcialmente células de leucemia promielocítica. Se ha sugerido que la relocalización de esta proteína debido a la interacción con la E1B podría antagonizar la actividad de la ssBP2 como supresor tumoral (56).

Es claro que la presencia de la E1B es requerida para llevar a cabo la inactivación de p53 y de los complejos de reparación de DNA vía MRN y DNA ligasa IV, así como para favorecer la acumulación citoplásmica de mRNA viral en la fase tardía. Sin embargo, ni los mecanismos moleculares para llevar a cabo diversas funciones a lo largo del ciclo de replicación viral, ni la posibilidad de que las modificaciones postraduccionales que sufre la E1B tengan un efecto regulatorio en la misma E1B han sido descritas o estudiadas detalladamente. Por otra parte, son pocos los estudios sobre el impacto de la E1B dentro de la fase temprana. Es posible que el uso de células transformadas no permita hacer un análisis detallado de la inactivación de p53; por ejemplo, cuáles de los genes que son blanco de p53 se ven afectados por la E1B. Mediante el uso de líneas celulares tampoco es clara la función de la E1B en la progresión del ciclo celular, debido a que estas células ya tienen alteraciones en la regulación del ciclo celular. En otras palabras, estas células favorecen la replicación viral, incluso de mutantes que no expresan la E1B. Finalmente, de acuerdo con la hipótesis propuesta por el modelo 2 descrito arriba (Figura 9; 45), la degradación de los componentes del MRN, debería ocurrir antes de la replicación del genoma viral. Sin embargo, la inactivación del MRN ha sido observada en tiempos tardíos de la infección. En síntesis, el estudio de células no transformadas infectadas con adenovirus, permitirá observar el impacto de la E1B a lo largo del ciclo de replicación viral en un modelo que permita describir con más detalle las alteraciones celulares antes mencionadas, y posiblemente el estudio de funciones virales y celulares que en líneas celulares no son analizables (como la participación de la E1B en la fase temprana de la infección). Con la finalidad de describir procesos celulares y virales en los cuales está

involucrada la E1B 55 kD durante la infección de células no transformadas, se analizaron las interacciones de la E1B 55 kDa con proteínas celulares y virales en cultivos primarios infectados con Ad 5 wt. Como parte de la estrategia experimental, se utilizó un sistema para analizar interacciones in vitro con una E1B recombinante expresada en el sistema de baculovirus-células de insecto.

II.6. Sistema de expresión en baculovirus

II.6.1. *Baculovirus recombinante*

Los baculovirus pertenecen a la familia *Baculoviridae*, la cual está dividida en dos géneros: *Granulovirus* y *Nucleopolyhedrovirus* (*AcNPV* pertenece a este último género). Su genoma es una molécula circular de DNA de doble cadena.

El ciclo de replicación de baculovirus se divide en una fase temprana y una tardía. Durante la fase temprana se activan genes cuyos productos preparan a la célula para la síntesis de proteínas virales. La fase tardía inicia 6 horas postinfección con el inicio de la replicación del genoma y la síntesis de las proteínas estructurales para ensamblar el virión. Durante esta fase se forman cuerpos de inclusión debido a la sobreexpresión del gen que codifica para la proteína polihedrina. La sobreexpresión de esta proteína se debe a que el gen está río abajo de uno de los promotores más fuertes de la naturaleza, el promotor de *polH*. La polihedrina forma una barrera de cristales que protege la progenie viral (33).

II.6.2. *Ventajas del sistema de expresión*

La expresión de genes de interés en células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes presenta varias ventajas sobre otros sistemas de expresión heteróloga. Se pueden obtener niveles altos de expresión (ya que el gen recombinante está situado bajo el control del promotor de polihedrina, uno de los promotores virales más fuertes que se han descrito). También se pueden llevar a cabo modificaciones postraduccionales que no se presentan en bacterias, tales como, la N y O-glicosilación, fosforilación, sulfatación, beta hidroxilación y metilación (33). Las ventajas descritas permiten suponer que la E1B 55 kDa recombinante se puede sintetizar en cantidades superiores a las producidas durante la infección con Ad5. También se puede esperar obtener una proteína correctamente plegada y fosforilada como la proteína endógena de Ad5. Sin embargo, se ha reportado que la sumoilación de proteínas exógenas no es eficiente en las células de insecto y puede requerir la coexpresión de SUMO 1 y 3 (60). Aunque no se puede pronosticar que la sumoilación sea la misma que la observada en la proteína endógena, en trabajos previos se ha expresado a la E1B en células de insecto con buenos resultados (62). Además, no hay evidencia clara de que la sumoilación de la E1B sea indispensable para su interacción con otras proteínas. Finalmente, la adición de la secuencia de poli-histidina en el amino-terminal de la E1B recombinante, permite la inmovilización y enriquecimiento de la proteína recombinante en resina acoplada a iones de níquel.

II.6.3. Baculovirus E1B recombinante

El baculovirus recombinante usado en este proyecto lleva clonado el gen que codifica para la proteína E1B 55 kD bajo el control del promotor de la polihedrina, a fin de obtener altos niveles de expresión durante la fase tardía del ciclo de replicación del virus. En células en cultivo, la polihedrina no es necesaria para la replicación de baculovirus por lo que este gen puede ser reemplazado por el gen que se desea expresar. Para obtener progenie viral recombinante se insertó el gen de la E1B 55 kD en un plásmido, adicionando una serie de histidinas en el extremo amino terminal de la proteína recombinante (pfastBac). Éste fue transformado en una cepa de *E. coli* que porta un báculo (un plásmido con el genoma de baculovirus). El gen de interés está flanqueado por elementos Tn7 en el plásmido pfastBac que facilitan la recombinación con el báculo. El proceso de recombinación inactiva el gen *lacZ* en el báculo, lo cual permite la selección de bacterias que contienen el báculo con el gen recombinante. Después de extraer el báculo, éste se usó para transfectar células de insecto SF9 (Figura 12) y se obtuvo progenie viral recombinante (33).

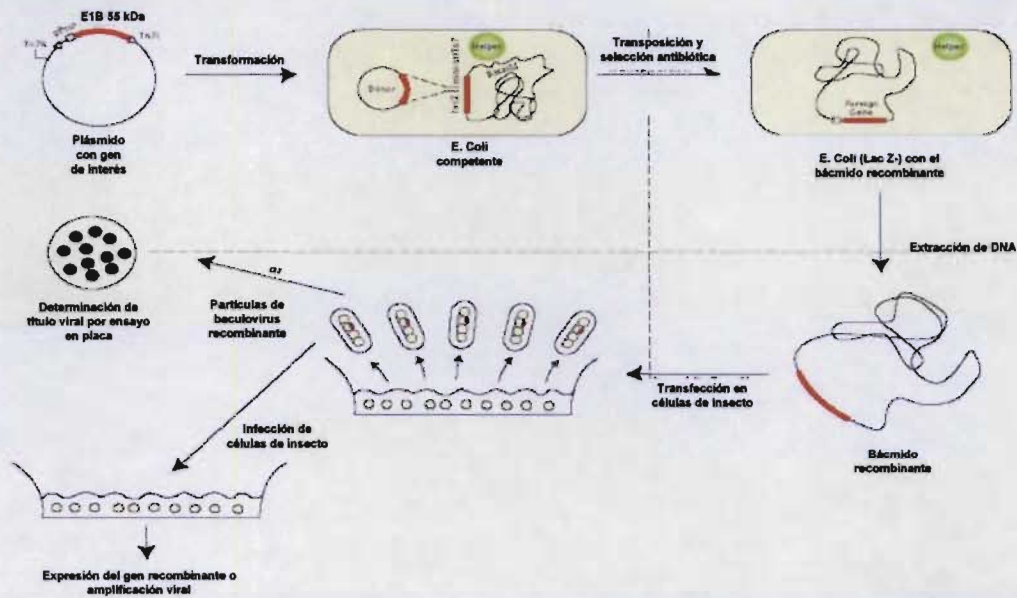


Figura 12. Diagrama de la construcción del baculovirus recombinante usando el sistema BAC to BAC (33).

III. Justificación

Los adenovirus han sido estudiados por más de cinco décadas. El continuo interés en estos virus radica en su utilidad para comprender y analizar muchos de los fenómenos que ocurren en las células eucariotes, por ejemplo: el splicing alternativo de mRNA, la replicación, transcripción y traducción, oncogénesis y, regulación del ciclo y la proliferación celular. Por otro lado, el conocimiento de la organización genética de los adenovirus y el amplio espectro de células susceptibles y permisivas a la infección, han contribuido al uso de adenovirus recombinantes como vectores, como alternativas para vacunas, terapia génica y más recientemente terapia anti-cáncer. Sin embargo, no ha sido posible describir a nivel molecular muchos de los procesos que son regulados por la compleja red de interacciones entre las proteínas virales y celulares que resultan, ya sea en la replicación productiva del virus, o en la transformación oncogénica de las células. No es claro cuáles son los mecanismos moleculares que son alterados para establecer la modificación postranscripcional y la exportación selectiva de los mensajeros virales; qué moléculas virales y celulares están a cargo de la inhibición de la apoptosis; y cuál es el impacto en la célula infectada, de la reorganización del núcleo por la infección. La mayor parte de la investigación hecha hasta ahora, está basada en experimentos cuyo diseño presenta varias limitantes. Por ejemplo, la mayoría de los experimentos utilizan células transformadas (10, 14); éstas predisponen un ambiente celular favorable para la replicación de adenovirus, tanto silvestre como mutantes, debido a alteraciones en el control del ciclo celular (sobrexpresión de proteínas que permiten la proliferación, como cMyc y ciclina E, y/o mutaciones de los puntos de control del ciclo celular, como p53 y hMdm2). En estas condiciones algunas proteínas virales como la E1A y la E1B no son indispensables para inducir a la célula a la fase S o inhibir apoptosis. Como prueba de lo anterior se ha observado que en cultivos primarios el ciclo de replicación viral se extiende y toma el doble de tiempo en completarse que en líneas celulares (59). Tampoco se ha observado la formación de agrosomas en la infección de cultivos primarios, con las características descritas en las líneas celulares infectadas. A pesar de la detección de algunos cuerpos perinucleares en la infección de cultivos primarios, no se observaron cambios en las redes de tubulina y vimentina que rodean a estos cuerpos perinucleares de líneas celulares infectadas. Las actividades aquí descritas, dependen, en todos los casos, de las interacciones que se establecen entre la E1B y, proteínas virales y celulares; sin embargo, no se ha estudiado cuáles de estas interacciones pueden ocurrir simultáneamente o si cada una de ellas compite con las demás. Tampoco es claro si estas interacciones pueden ocurrir en diferentes regiones del núcleo o del citoplasma, en la célula infectada (1, 8, 14, 25, 26). Los antecedentes sugieren que las interacciones de la E1B podrían ocurrir en una cinética espacio-temporal a lo largo del ciclo de replicación por lo que la caracterización de esta cinética permitirá aprender sobre las funciones de la E1B en el ciclo de replicación del virus y sobre su papel en la regulación de la proliferación celular. Con la finalidad de describir procesos celulares y virales en los cuales está involucrada la E1B 55 kD, en este trabajo utilizamos una E1B 55 kD recombinante expresada por baculovirus para describir las interacciones en las que está involucrada, con proteínas virales y celulares, en distintas ventanas de tiempo a lo largo del ciclo de replicación de adenovirus, en células humanas no transformadas.

IV. Objetivo:

Analizar la organización subcelular de proteínas que interaccionan con la E1B 55 kD durante el ciclo de replicación de adenovirus humano tipo 5 en células no transformadas (HFF).

IV.1. Objetivos particulares:

- ❖ Expresar a la E1Brec en células de insecto SF9 e inmovilizarla en resina con iones de níquel acoplados (Ni-NTA).
- ❖ Determinar la localización intracelular de p53, Mre11, Nbs1, Rad50 y la E4orf6 a lo largo del ciclo de replicación en células HFF infectadas y mock.
- ❖ Detectar la interacción *in vitro* de la E1B 55 kD con p53, E4orf6 y Rad50 obtenidas de células HFF a distintos tiempos post infección y mock.

V. Metodología

Células y virus

Las células de insecto SF9 se cultivaron a 29° C, en monocapa, en medio Grace suplementado con 10 % de suero bovino fetal. Los baculovirus (obtenidos en el lab. del Dr. Ramón A. González) recombinantes con E1B 55 kd (BacE1B), E4orf6 (Bacorf6) y silvestres (Bac wt) (donado por la Dra. Laura Palomares) se obtuvieron por una ronda de amplificación del stock maestro. Para la infección con baculovirus, se retiró el medio suplementado, se adsorbió el virus a una MOI=1; 1 hora a 29°C con agitación cada 15 minutos, se desechó el inóculo y se agregó medio suplementado con 10% de suero bovino fetal. El virus se cosechó del medio de cultivo entre 72 y 96 hpi (horas post infección).

Las células HFF, (fibroblastos humanos derivados de prepucio) se incubaron con medio DMEM (Gibco Invitrogen) con suero bovino fetal al 10%, a 37°C con 5% de CO₂. Las células se infectaron con adenovirus humano tipo 5 (Ad5) a una MOI de 30 unidades formadoras de placa/célula (PFU/célula) y se cosecharon a las 12, 24, y 36 horas postinfección.

Preparación de extractos celulares.

Células SF9 (2.2×10^7) infectadas con el baculovirus recombinante BacE1B se cosecharon en el medio de cultivo y se sedimentaron por centrifugación a 1,000 g, 5 min, a 4°C. El botón celular se lavó con PBS 1X y las células se lisaron con buffer de lisis de fosfatos (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 1% NP 40 (Nonidet P-40), 20µg/ml PMSF(fenilmetilsulfonilfluoruro), 10µg/ml aprotonina y 10µg/ml leupeptina). El lisado se centrifugó a 10,000 g por 15 min, a 4°C; se recolectó el sobrenadante (fracción soluble) y se guardó el botón a -20°C (fracción insoluble).

Las células HFF (1×10^6 células) infectadas con Ad5 o sin infectar (mock), se lisaron con 500 µl de buffer de lisis NP-40 (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.6% NP-40 5mM EDTA, 10µg/ml PMSF 10µg/ml leupeptina, 10µg/ml aprotinina), 10 minutos a 4° C y

se centrifugó a 10,000 g por 10 minutos. Se guardó el sobrenadante correspondiente a la fracción citoplásmica a -20°C y el botón celular se incubó con 250 μl de buffer de lisis Tritón X-100/SDS (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.5% SDS (Dodecilsulfato de sodio) 1% Tritón X-100, 5mM EDTA, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinina), sonicando durante 15 minutos en hielo. Se centrifugó a 10,000 g por 10 minutos. Se guardó el sobrenadante correspondiente a la fracción nuclear a -20°C . El botón celular se incubó en 200 μl de buffer de lisis Tritón X-100/SDS (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.5% SDS (Dodecilsulfato de sodio) 1% Tritón X-100, 5mM EDTA, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinina), sonicando 3 pulsos de 30 segundos con un tiempo refractario de 59 segundos y con una amplificación de 35% en Ultrasonic Processor GEX500. La fracción nuclear insoluble se guardó a -20°C .

Inmovilización de la E1B 55 kD recombinante y ensayos de interacción, por cromatografía de afinidad

A partir de la fracción soluble de lisados de células infectadas con el virus recombinante y el silvestre, se incubaron 4ml (aproximadamente 2.21×10^7 SF-9) de lisado con 200 μl de una resina de agarosa acoplada a ácido nitrilotriacético (NTA) con níquel. Posteriormente, la resina se lavó cuatro veces, resuspendiendo con buffer de lavado (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10mM de imidazol) y se centrifugó a 3,200 g, 5min, a 4°C . En cada uno de los lavados se guardó una alícuota, para su posterior análisis. Después de estos lavados, la proteína recombinante se eluyó con buffer de elusión (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM imidazol), según el protocolo del fabricante (QIAGEN). La resina se lavó con NaOH 0.5 M y se almacenó a -20°C con EtOH al 30%, para reutilizarse. Las fracciones recolectadas, los lavados y las eluciones se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%. Los geles se tiñieron con azul de coomassie y plata. Paralelamente, las muestras se analizaron por western blot.

Después de inmovilizar a la proteína E1B en la resina de níquel, la resina se incubó con extractos de células HFF infectadas con adenovirus o sin infectar (mock). Se añadió SDS a los extractos hasta alcanzar una concentración de 1% con la finalidad de descartar que haya competencia de interacción por las proteínas blanco (p53, Nbs1, Rad50) entre la E1B endógena y la recombinante. Posteriormente los extractos se diluyeron diez veces en 50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinina para permitir la reasociación de proteínas y disminuir la concentración de agentes quelantes. Después de 8 horas de incubación a 4°C , la resina se lavó de manera consecutiva con 2M NaCl, 1% Tritón X-100 y 250mM imidazol, en 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinina y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina. Las fracciones recolectadas durante la incubación, los lavados y las eluciones se analizaron por SDS-PAGE y tinción con coomassie azul o plata y, por western blot.

Inmunofluorescencia.

Para detectar la síntesis de la E1B recombinante (E1Brec) y la E4orf6 recombinante (E4orf6rec) en células SF9, se hicieron ensayos de inmunofluorescencia utilizando células de insecto infectadas con cada baculovirus recombinante (BacE1B y Bacorf6), coinfectadas

y mock. Asimismo para el análisis de la dinámica de distribución de las E4orf6, p53 y Mre11 (subunidad del MRN) en células HFF infectadas con adenovirus se hicieron ensayos de inmunofluorescencia. El procedimiento general en ambos casos fue el siguiente: Las células se fijaron a las h.p.i. (horas postinfección) deseadas, con etanol absoluto por 30 minutos en hielo o con paraformaldehído al 4%, 20 minutos a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS (0.18 mM K_2HPO_4 , 0.43 mM Na_2HPO_4 , 0.27 mM KCl y 13.7 mM NaCl, pH 7.4), las células se permeabilizaron con PBS-0.5% Triton X-100 y se incubaron con los anticuerpos monoclonales (MAb) primarios por 12 hrs a 4°C. Las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a fluoróforos (Molecular Probes), a una dilución 1 a 2,500, por 2 horas, a 4°C. Las muestras se lavaron con PBS 1X y se añadió DAPI a una dilución 1:10,000 para teñir los núcleos de las células. Las muestras montadas en portaobjetos con PBS-10% glicerol se analizaron en un microscopio Axiovert (Carl Zeiss Inc.).

Inmunodetección de proteínas (SDS-PAGE y Western blot)

Las proteínas obtenidas de los extractos celulares y de las columnas de resina acoplada a níquel, se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los extractos de células de insecto provienen de 2.1×10^7 células, mientras que las fracciones subcelulares de HFF infectadas con Ad5wt y mock se extrajeron de 1.5×10^6 células. Las bandas de los geles se tiñieron con azul de coomassie o plata. Paralelamente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, por electrotransferencia semiseca. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con PBS con 3% leche descremada/ 0.5% Tween 20, a 4°C, toda la noche (o/n) y posteriormente se incubó a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido en PBS/0.3% leche descremada/ 0.05% Tween 20. Después de 3 lavados con solución de bloqueo (PBS/0.3% leche descremada/ 0.05% Tween 20), la membrana se incubó 2 horas con el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa a una dilución 1:10,000 (Boehringer, Mannheim). La señal se reveló con un sustrato quimioluminiscente (ECL), como lo describe el fabricante (Invitrogen) y las membranas se expusieron a películas autorradiográficas. Para la identificación de las proteínas se utilizaron anticuerpos dirigidos contra la E1B 55 kDa (ratón MAb 2A6. Donado por T. Shenk); E4orf6 (ratón MAb RSA3. Donado por P. Hearing); DBP (ratón MAb B6-8. Donado por J. Flint); p53 (ratón MAb 421; Donado por A. Levine); Mre11, Rd50 y Nbs1 (ratón MAb, GeneTex).

VI. Resultados

VI.1. Expresión de la E1B recombinante en células SF 9

Para detectar la síntesis de la E1B dirigida por el baculovirus recombinante, se analizaron células SF9 infectadas con el baculovirus recombinante (BacE1B) y con el virus silvestre (Bacwt), por inmunofluorescencia. La E1B se detectó con el MA b 2A6, el cual es un anticuerpo monoclonal específico usado para detectar la proteína adenoviral. Las células infectadas con el BacE1B mostraron una señal positiva clara, tanto con 2A6 como un anti-gp64, codificada por el genoma de baculovirus. En contraste, las células mock (no infectadas) no mostraron señal específica con los anticuerpos, anti-E1B o anti-gp64. Las células infectadas con el baculovirus silvestre e incubadas con el anticuerpo 2A6 tampoco mostraron señal positiva, sugiriendo que la señal contra la E1B es específica (Figura 13). La proteína estructural gp64 es expresada tanto en el baculovirus recombinante como en el silvestre (Figura 13).

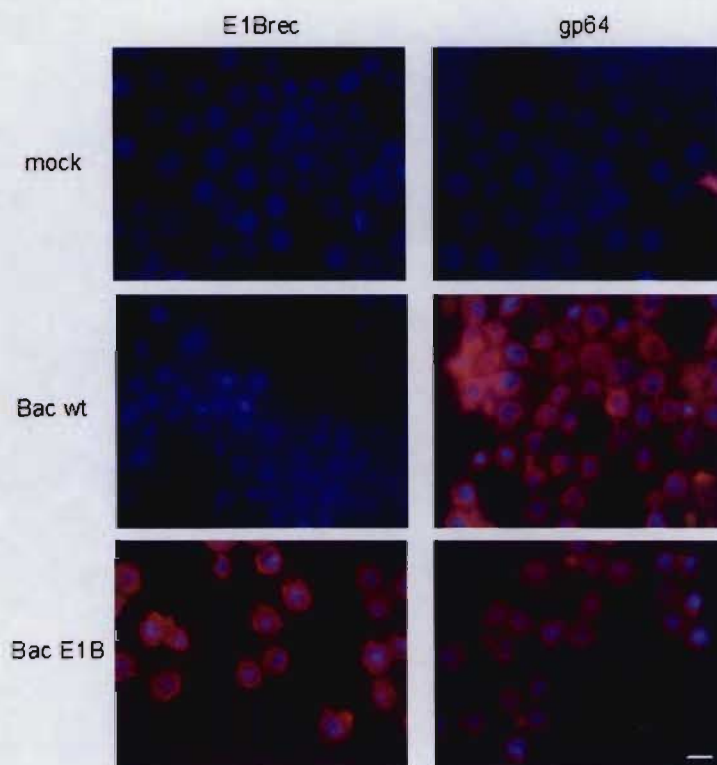


Figura 13. Síntesis de la E1B recombinante dirigida por BacE1B. Las imágenes muestran células sin infectar (mock) e infectadas con baculovirus silvestre y recombinante. Como control de especificidad, las células infectadas con el Bac wt se incubaron con anti-E1B. Las células infectadas con el BacE1B se incubaron con anti-gp64. El anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a Alexa 568 se muestra en rojo. El DNA teñido con DAPI se muestra en azul. Barra: 10 μ m.

Como se describió en la introducción de este trabajo, en células infectadas por adenovirus, la E1B se localiza en el núcleo; sin embargo, todavía no es claro si la localización nuclear de la proteína depende de otra(s) proteína viral(es) o celular(es). Decidimos analizar la localización intracelular de la E1B recombinante en células SF9 por inmunofluorescencia. El análisis de la distribución intracelular de la E1B reveló que la proteína permanece en el citoplasma, alrededor del núcleo (Figura 14).



Figura 14. Localización intracelular de la E1B 55 kDa recombinante. Las células en estas muestras fueron infectadas a una MOI de 1. En el panel izquierdo se muestra la sobreposición de las imágenes del DNA teñido con DAPI y la tinción con el anticuerpo 2A6 en rojo. En el panel derecho se muestra la distribución citoplasmática alrededor del núcleo de la E1B 55 kD en rojo.

El sistema de expresión de baculovirus nos permitió obtener una E1B 55 kD recombinante en niveles detectables por inmunofluorescencia. Además, estos resultados indican que el epítipo reconocido por el MAb, 2A6 está expuesto y es reconocido en la proteína recombinante.

VI.2. Detección de la E1B recombinante por Western blot

Además de observar la expresión de la E1Brec dentro de las células de insecto por inmunofluorescencia, también se analizaron extractos solubles de células SF9 infectadas. Las células fueron cosechadas a distintos tiempos postinfección para observar la síntesis y acumulación de la E1Brec en tres distintos tiempos postinfección. Se ha establecido que la polihedrina se sintetiza durante la fase tardía, aproximadamente desde las 12 hpi. Ya que el gen de la E1Brec está bajo el control del promotor de *polh* se eligió observar la expresión de la E1Brec a las 24, 48 y 72 hpi. Se detectó la presencia de la proteína recombinante en extractos totales de células infectadas con BacE1B y no en los controles, en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y western blot (Figura 15).

En los geles de poliacrilamida fue posible identificar una banda que no aparece en las muestras de células infectadas con el baculovirus silvestre. Esta banda tiene un peso molecular aparente de entre 50 y 60 kD, el cual corresponde al peso molecular esperado para la E1B fusionada a poli-His. Para confirmar que la banda sobresaliente obtenida en el análisis por SDS-PAGE corresponde a la E1B, las muestras fueron analizadas, usando el MAb anti-E1B, 2A6 por western blot. Como se muestra en la figura 15, se obtuvo una señal

positiva con las muestras de células infectadas con el Bac E1B. La señal se observó a las 24 hpi, e incrementó considerablemente a las 48 hpi.

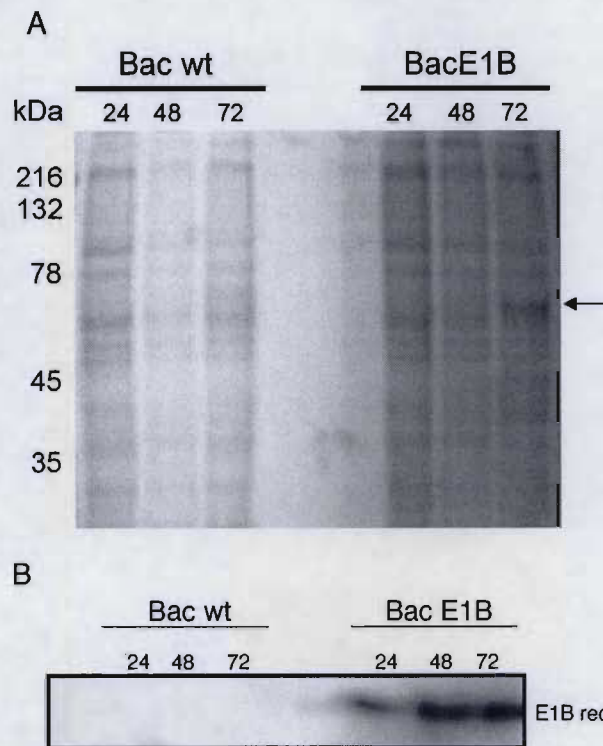


Figura 15. Detección de la E1B 55 kD recombinante. En el panel A se muestran extractos solubles de SF9 infectadas con Bacwt y BacE1B obtenidas a distintos tiempos post infección. Se observa una banda mayoritaria señalada por la flecha, que no está presente en los controles. En B se muestra el análisis por Western blot con el MAb 2A6 de extractos de células infectadas con Bacwt y BacE1B a distintos tiempos postinfección.

VI.3. Inmovilización de la E1B recombinante.

Después de confirmar la expresión de la proteína recombinante, se obtuvieron extractos de células SF9 infectadas con BacE1B para inmovilizar a la E1Brec a través de la fusión de poli-histidinas a agarosa-Ni-NTA, de acuerdo con el protocolo descrito en materiales y métodos. Durante el procedimiento se obtuvieron las siguientes fracciones: La fracción NP corresponde al sobrenadante recuperado después de incubar el extracto de las SF9 con la resina. Esta fracción contiene las proteínas que no se unieron a la resina. Enseguida, la resina se lavó 4 veces con 10 mM imidazol, para disociar proteínas unidas débilmente (interacción no específica) (lavados). Posteriormente, la resina se incubó con 250mM de imidazol para disociar a la E1Brec (elusiones). Como controles se incluyeron extractos del mismo número de células SF9 mock o infectadas con Bacwt; la fracción C+ corresponde a un lisado total de células HFF infectadas con Ad5wt. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y Western blot dirigido contra la proteína E1B 55 kD (Figura 16).

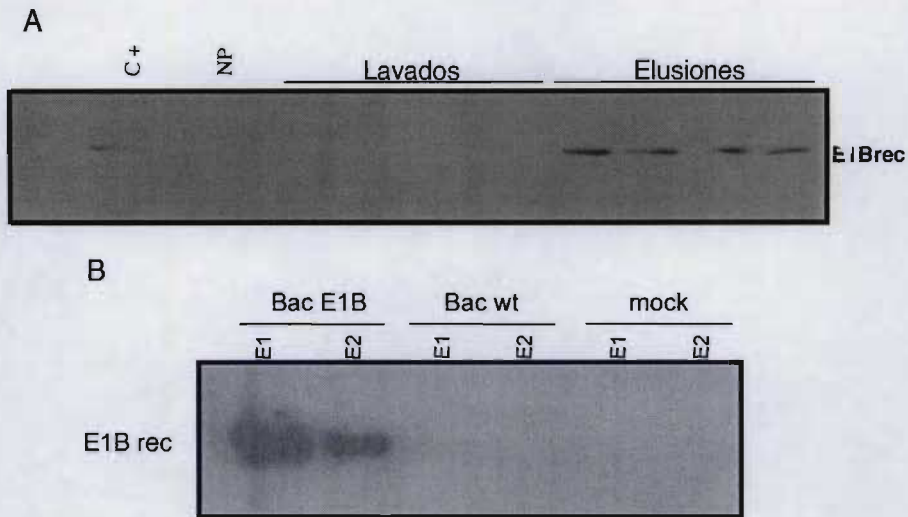


Figura 16. Inmovilización de la E1B recombinante en agarosa-Ni-NTA. En el panel A se muestra la inmunodetección de la E1B en las fracciones C+ (E1B endógena de adenovirus), NP (proteínas no pegadas a la resina), lavados (10 mM imidazol) y elusiones (250 mM imidazol), utilizando el MAb 2A6. En el panel B se muestran las elusiones (señaladas como E1 y E2 en cada caso) obtenidas con los extractos de SF9 infectadas con BacE1B, Bacwt y mock.

En estos experimentos se obtuvo una señal positiva en los carriles de elusión que corresponde al peso molecular esperado de la E1B. Se observó que del extracto de proteínas obtenido de células de insecto infectadas a una MOI de 1 y cosechadas a las 72 hpi, la mayoría de la E1Brec es inmovilizada en la resina. En contraste, no se detectó señal en las muestras de células infectadas con el Bac wt ni en mock. Estos datos nos permiten concluir que la E1Brec se une a la resina de manera específica y es posible disociarla con 250 mM imidazol. Asimismo, establecimos las condiciones cromatográficas para inmovilizar a la E1Brec en la resina y de esta manera contar con un sistema que nos permita detectar proteínas celulares y virales que interaccionan con la E1B (E1Brec-Ni-NTA).

VI.4. Distribución de proteínas virales y celulares en células HFF infectadas con Ad5wt, localización y fraccionamiento subcelular

Una vez montado el sistema E1Brec-Ni-NTA se determinó la localización subcelular de proteínas virales y celulares, que interaccionan con la E1B en células infectadas con adenovirus (E4orf6, p53, subunidades del complejo MRN), mediante el análisis por inmunofluorescencia y Western blot.

❖ Ensayos de inmunofluorescencia

Las actividades de la E1B, dependen de las interacciones que esta proteína establece con proteínas virales y celulares a lo largo del ciclo de replicación del virus; sin embargo, no es claro si cada una de estas interacciones ocurre en un orden cronológico particular y/o si se presentan en diferentes compartimentos celulares. Para conocer el papel que tiene cada una de estas interacciones, será necesario determinar la dinámica de distribución de cada una de las proteínas de interés a lo largo del ciclo de replicación viral. Utilizando ensayos de inmunofluorescencia y fraccionamiento subcelular, se analizó la distribución de la proteína viral E4orf6 y de las proteínas celulares p53 y MRN a tres tiempos post-infección: i) 12 hpi, correspondiente a la fase temprana del ciclo de replicación; ii) 24 hpi, tiempo en el que inicia la replicación del genoma viral; y iii) 36 hpi, correspondiente a la fase tardía.

Como se describió en la introducción, se sabe que la E1B 55 kDa se asocia con la E4orf6 y que esta interacción es determinante para las actividades de ambas proteínas, ya que como complejo son responsables de la exportación selectiva de los mRNAs virales y de la activación de la Cullin 5 - E3 ubiquitina ligasa. Se decidió inicialmente analizar la distribución intracelular de la proteína E4orf6, a lo largo del ciclo de replicación viral, en células HFF infectadas con Ad5wt. La E4orf6 se localizó preferencialmente en el núcleo y esta señal aumentó conforme avanza el ciclo de replicación del virus (Figura 17).

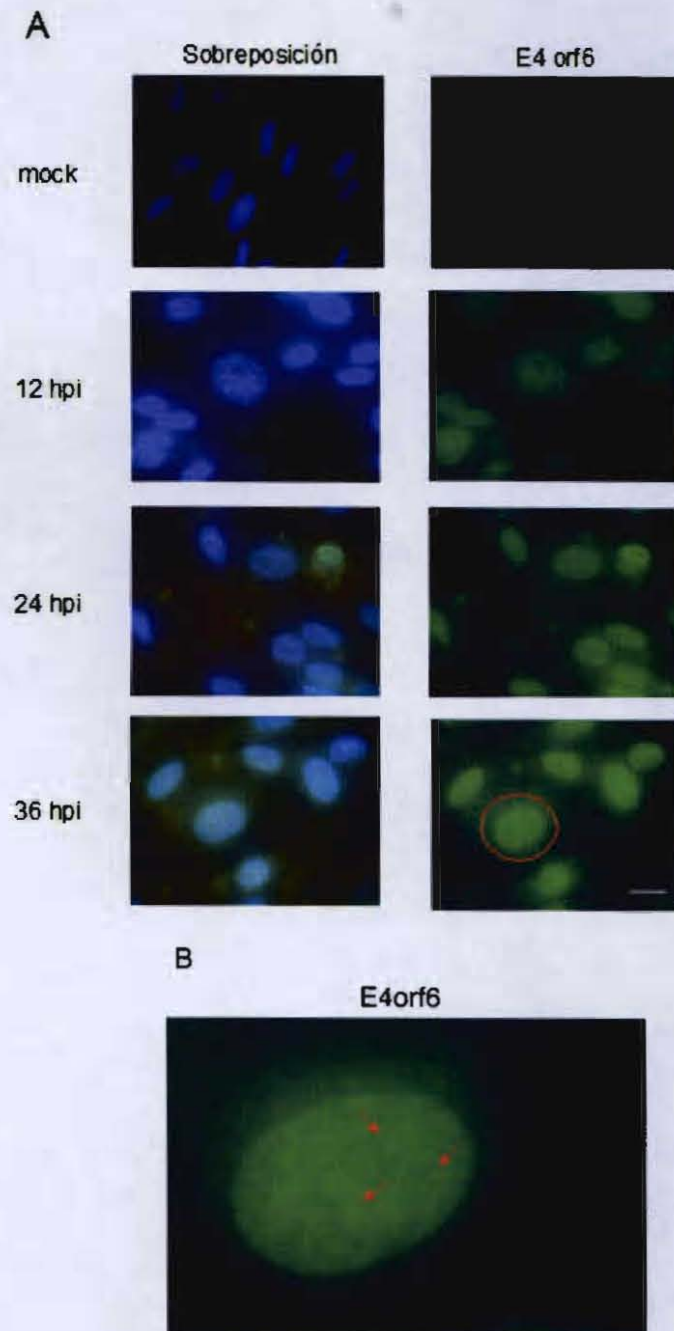


Figura 17. Localización intracelular de la E4 orf6 en células HFF infectadas con Ad5 wt. En verde se muestra la distribución intranuclear de la E4orf6 y el núcleo en azul con DAPI. En el panel A se observa la acumulación nuclear de la E4orf6. En el panel B se muestra una ampliación de la célula enmarcada en el panel A, y con flechas se muestran los centros de replicación donde se localiza la E4orf6. Barra: 25 μ m.

Pudimos observar que la E4orf6 se distribuye en el núcleo de las células infectadas, adquiriendo un patrón de distribución difuso a tiempos tempranos (12 hpi). El nivel de la señal obtenida aumentó conforme avanza el ciclo de replicación y para las 24 hpi fue posible detectar a la E4orf6 alrededor de los centros de replicación (Figura 17). Esto concuerda con la localización descrita para la E4orf6 en líneas celulares transformadas, en las cuales se localiza en los centros de replicación. Sin embargo, mientras que la localización de la proteína en centros de replicación se observa a partir de las 12 hpi en líneas celulares, en células HFF se observó hasta las 24 hpi y se vio más acentuada a las 36 hpi.

Se sabe también que la E1B interacciona con p53 y que esta interacción resulta en la inhibición de las actividades de este supresor tumoral. Durante la fase tardía, el complejo E1B 55 kD/E4orf6 induce su ubiquitinación y degradación. Se analizó la localización de la p53 en células HFF a las 24 hpi. En estos experimentos se utilizó a la E4orf3 como marcador de los cuerpos de PML en células infectadas (Figura 18).

Pudimos observar que en células mock, p53 tiene una distribución difusa en el citoplasma y en el núcleo. En células infectadas se observó una disminución de la señal de p53 y la proteína se detectó principalmente en el núcleo, en un patrón de puntos.

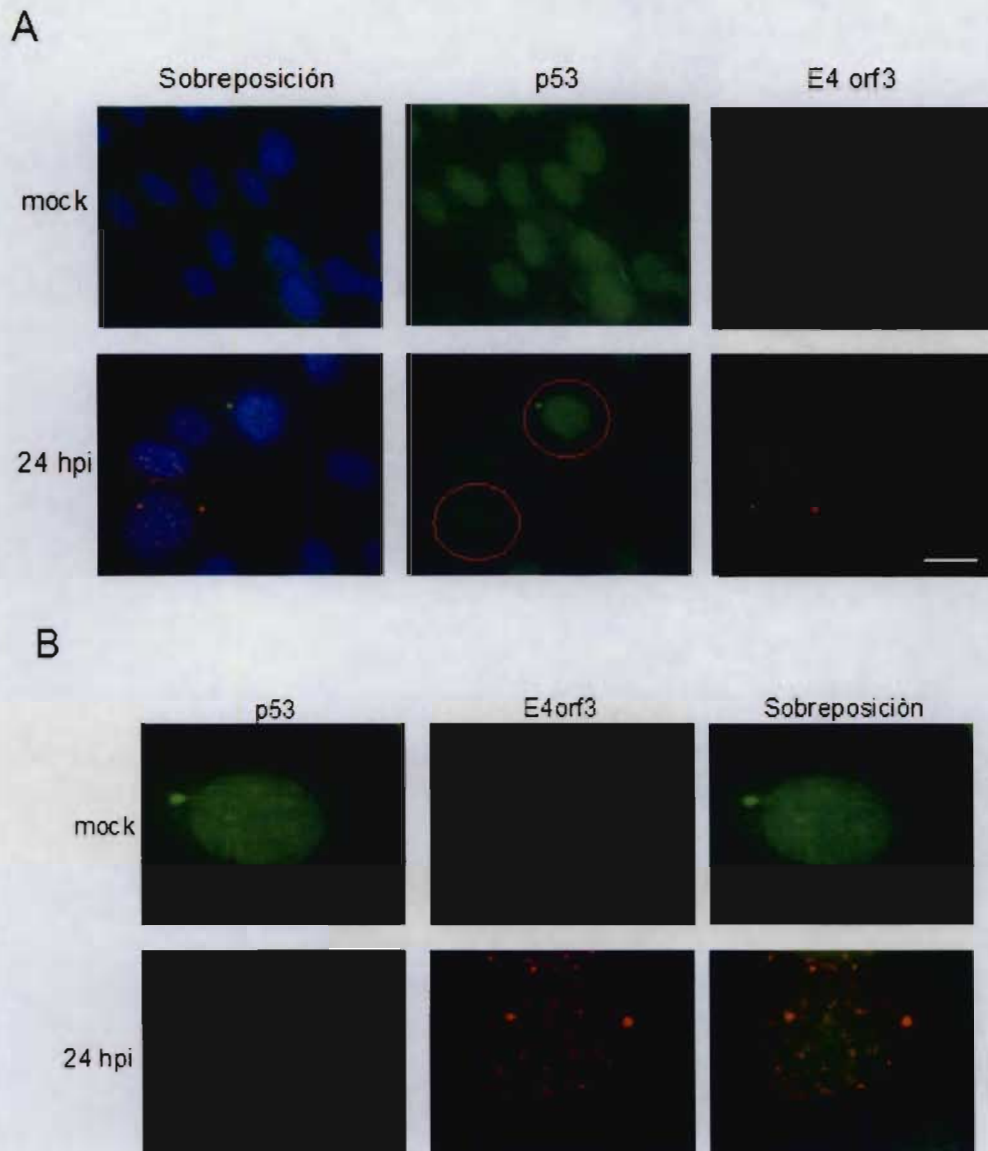


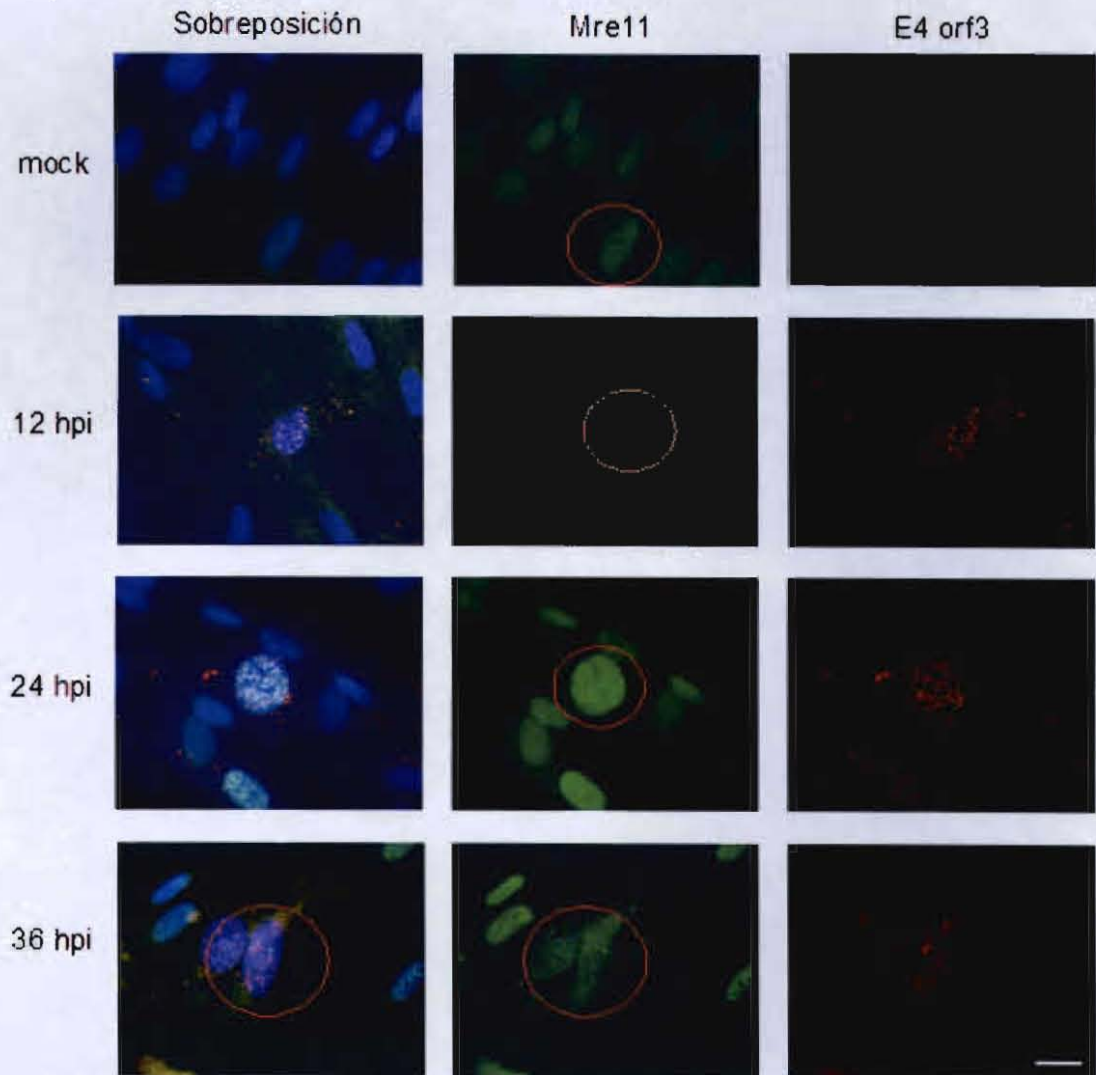
Figura 18. Localización intracelular de la p53 y de E4 orf3 en células HFF infectadas con Ad5 wt. En verde se muestra la distribución de p53 difusa en el núcleo y en citoplasma. En rojo se muestra la E4 orf3 y en azul el núcleo. Barra: 25 μ m.

Como se describió en la introducción, el complejo MRN debe ser inactivado para evitar la concatamerización de los genomas virales durante su replicación. A partir de los análisis en células transformadas, se ha propuesto que este complejo es inactivado por la redistribución intracelular de las subunidades del MRN por la E4orf3. Posteriormente el complejo es poliubiquitinado por el complejo E1B 55 kDa/E4orf6 - Cullin 5 - E3 ubiquitina ligasa y es degradado en agrosomas. Se analizó la distribución intracelular de Mre11, como marcador del complejo MRN. En el experimento se comparó la distribución intracelular de la Mre11 en células mock e infectadas con Ad5wt a las 12, 24 y 36 hpi. Al mismo tiempo, la localización de la Mre11 se comparó con la distribución intracelular de la E4orf3 (tal y como se hizo con p53) (Figura 19).

Se observó que aunque en células mock e infectadas, Mre11 se localiza en el núcleo, a las 12 y 24 hpi Mre11 adquiere un patrón de distribución en puntos. Algunos de estos puntos colocalizaron con la E4orf3 (Figura 19; 12 hpi). Se observó un cambio en la distribución intracelular de la proteína en las células infectadas, en el cual, Mre11 se relocalizó al citoplasma durante la fase tardía. No fue posible observar su distribución asociada a un cuerpo perinuclear que pudiera definirse como agrosoma. Estos resultados sugieren que la proteína es relocalizada durante la infección y que no es degradada.

Las tres proteínas, E4orf6, p53 y Mre11, cambian su distribución entre las 12 y las 36 hpi: durante la fase temprana se localizan en centros de replicación; sin embargo, en los tres casos, existen subpoblaciones que muestran una distribución difusa. Para la fase tardía, la Mre11 parece ser excluida de los centros de replicación y adquiere una distribución difusa en núcleo y citoplasma.

A



B

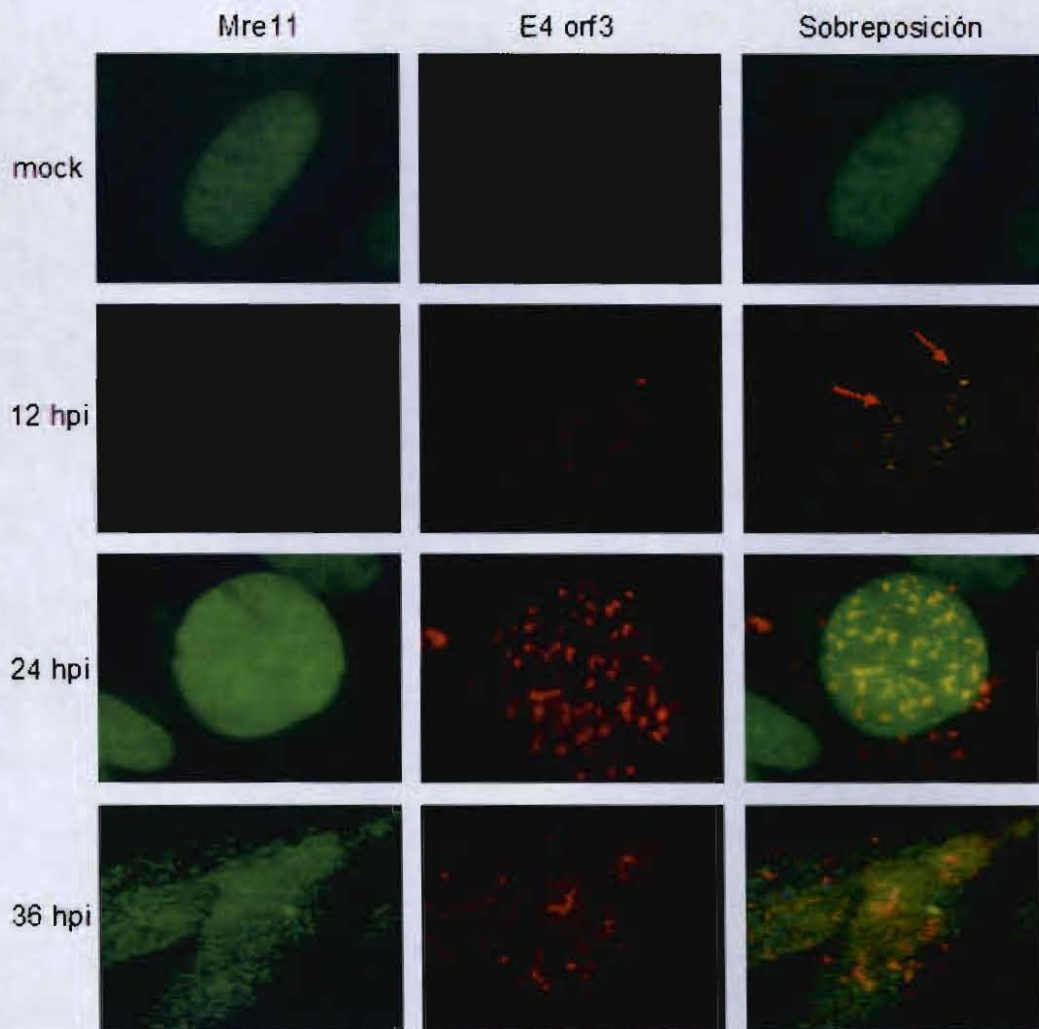


Figura 19. Localización intracelular de Mre11 y E4orf3 en células HFF mock e infectadas con Ad5 wt. En el panel A en verde se muestra la localización de Mre11, en rojo se observa la distribución de la E4orf3 y en azul, el núcleo teñido con DAPI. En el panel B se muestra un acercamiento de las células enmarcadas en el panel A. Con las flechas se indica la colocalización de la E4orf3 con Mre11. Barra: 25 μ m.

❖ Análisis de fracciones subcelulares por SDS-PAGE y Western blot.

Para describir las interacciones en las que está involucrada la E1B con proteínas virales y celulares en células humanas no transformadas, se obtuvieron fracciones subcelulares de células HFF mock e infectadas con Ad5wt, en distintas ventanas de tiempo a lo largo del ciclo de replicación. Estas fracciones se obtuvieron para utilizarse en el análisis de interacciones con la E1B asociada a agarosa-Ni-NTA, como se describe más adelante. Las células se lisaron como se describió en la sección de materiales y métodos, con la finalidad de obtener fracciones nucleares y citoplásmicas. Los cultivos fueron cosechados a las 12, 24 y 36 hpi para obtener muestras representativas de la fase temprana de la infección (12 hpi), al inicio de la replicación del genoma viral (24 hpi) y la fase tardía (36 hpi). En cada caso se obtuvo una fracción insoluble, la cual se resuspendió en buffer de carga 2x para su análisis por western blot. Una vez obtenidas las fracciones, se analizó la distribución de la E1B, p53, y actina, así como las subunidades del MRN, Nbs1 y Rad50. No fue posible analizar la presencia de la Mre11 por falta de disponibilidad del anticuerpo. Para corroborar que los extractos obtenidos, representan las fracciones de citoplasma y núcleo, también se detectó la proteína viral DBP (la cual es predominantemente nuclear; Figuras 20, 21 y 22).

Se analizó la distribución de la E1B en estas fracciones. La proteína mostró una distribución mayoritariamente nuclear; sin embargo, a las 36 hpi se detectó un incremento en la señal, en la fracción citoplásmica (Figura 21 y 22).

Como se muestra en la figura 21, se observó la presencia de las subunidades Rad50 y Nbs1 del MRN en la fracción citoplásmica, tanto en mock como en células infectadas. La Rad50 se detectó como un doblete alrededor de los 150 kDa. En ninguno de los dos casos se observó la degradación de estas proteínas como se ha reportado en células transformadas. Ninguna de las tres proteínas celulares de interés se detectó en la fracción nuclear. Estos resultados no se esperaban, ya que por reportes previos y por nuestros ensayos de inmunofluorescencia, la infección induce la relocalización de estas proteínas celulares al núcleo. Se ha reportado que en la célula infectada existen subpoblaciones de las proteínas E1B, E4orf6 y E4orf3 que están estrechamente asociadas a la matriz nuclear, por lo que decidimos analizar la fracción insoluble del núcleo (botón celular que quedó tras el fraccionamiento subcelular). Como se muestra en la figura 22, la E1B se detectó en la fracción insoluble del núcleo a las 12, 24 y 36 hpi. Adicionalmente, tanto la Rad50 como Nbs1 se detectaron en la fracción insoluble nuclear. Estas proteínas se detectaron exclusivamente en la fracción insoluble de los extractos provenientes de células infectadas y no de células mock. Estos resultados sugieren que las Nbs1 y Rad50 son relocalizadas durante la infección y permiten suponer que al igual que la E1B podrían estar asociadas a la matriz nuclear.

En el caso de p53, ésta fue detectada principalmente en la fracción insoluble nuclear y en la fracción soluble citoplásmica. Sin embargo, en células infectadas se observó una disminución en la cantidad de p53 en la fracción soluble nuclear. Además en la fracción insoluble obtenida a las 36 hpi se observaron bandas que no están presentes a las 12 y 24 hpi. Éstas podrían corresponder a p53 con modificaciones postraduccionales.

También se observó un cambio en el patrón de migración de actina en la fracción soluble nuclear. Es posible que el buffer en el que se encuentran las fracciones nucleares induzcan el patrón de migración observado. Alternativamente se sabe que la β actina es la isoforma más abundante en el núcleo; sin embargo, no se puede asegurar que la actina en la fracción soluble nuclear sea la β actina porque el anticuerpo usado reconoce todas las isoformas de actina, ó, si efectivamente los aminoácidos que son diferentes con respecto a la α actina modifiquen el patrón de migración. Otra posibilidad es que se trate de isoformas con modificaciones postraduccionales (como la fosforilación) (Figura 21) (61).

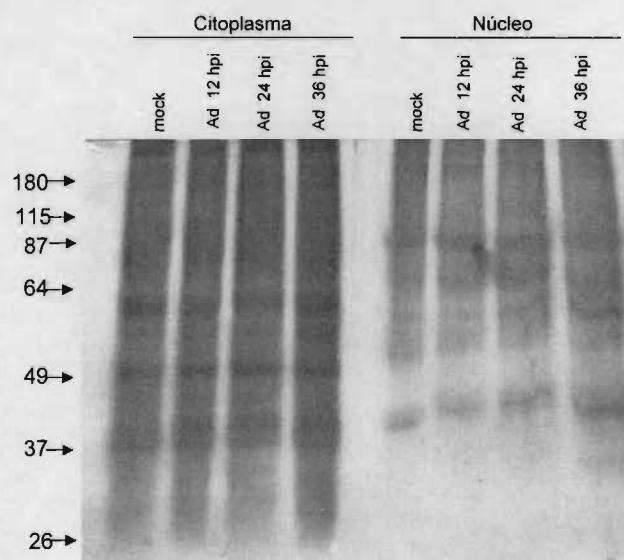


Figura 20. Extractos citoplásmicos y nucleares. SDS-PAGE con extractos de células HFF mock e infectadas con Ad5 wt teñido con plata. Las células infectadas se cosecharon a las 12, 24 y 36 hpi.

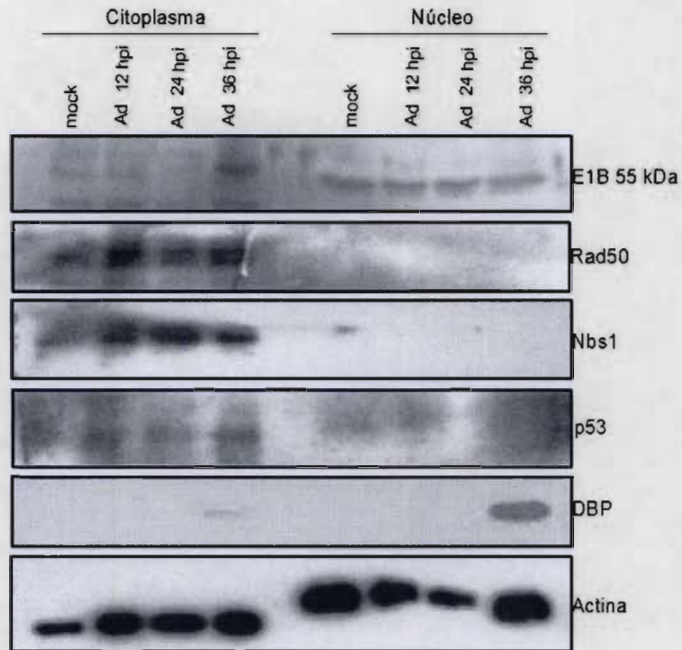


Figura 21. Inmunodetección de proteínas en las fracciones solubles citoplásmicas y nucleares.

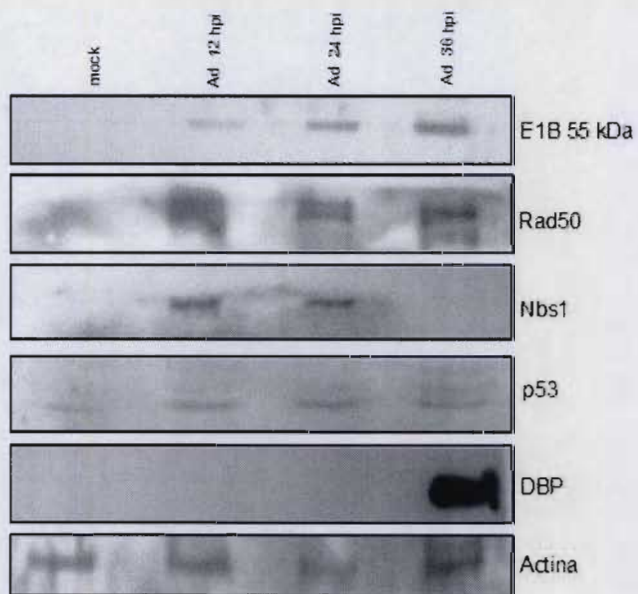


Figura 22. Inmunodetección de proteínas en la fracción nuclear insoluble.

VI.5. Análisis de interacciones

VI.5.1. E1B-E4orf6

Como se describió anteriormente, la interacción de la E1B con la E4orf6 es indispensable para una replicación viral eficiente. No se detectó la interacción de la E4orf6 con la E1B rec. Se utilizó el sistema de expresión en baculovirus para sintetizar a la E4orf6 recombinante fusionada a FLAG (E4orf6rec). Se obtuvieron extractos solubles de células SF9 infectadas con los baculovirus recombinantes BacE1B, Bacorf6 y ambos (coinfeción). En experimentos cromatográficos iniciales se observó que la E4orf6rec no se asocia con la E1Brec inmovilizada en la resina. Por otra parte, la E1Brec obtenida de células coinfectadas; es decir, en presencia de la E4orf6rec, no se une a la resina. Estos resultados sugieren que podría haber una competencia de interacción entre la E4orf6rec y la resina con la E1Brec, porque la E1Brec en presencia de la E4orf6rec no se une a la resina, a diferencia de la E1Brec en ausencia de la E4orf6rec; sin embargo, los resultados no son claros y habrá que repetir los experimentos.

Se ha sugerido que para la localización de la E1B en el núcleo, es necesario que ésta interactúe con la E4orf6. Para evaluar si las proteínas E1Brec y E4orf6rec pueden asociarse, se coinfectaron células SF9 con los baculovirus recombinantes BacE1B y Bacorf6 y la localización de las proteínas se analizó por inmunofluorescencia. Se comparó la distribución intracelular de las proteínas en células de insecto coinfectadas e infectadas sólo con cada uno de los baculovirus recombinantes (Figura 23). Los resultados mostraron que la E1B es relocalizada al núcleo sólo en presencia de la E4orf6 y permiten suponer que las proteínas interactúan en las células coinfectadas y que ambas proteínas recombinantes están correctamente plegadas.

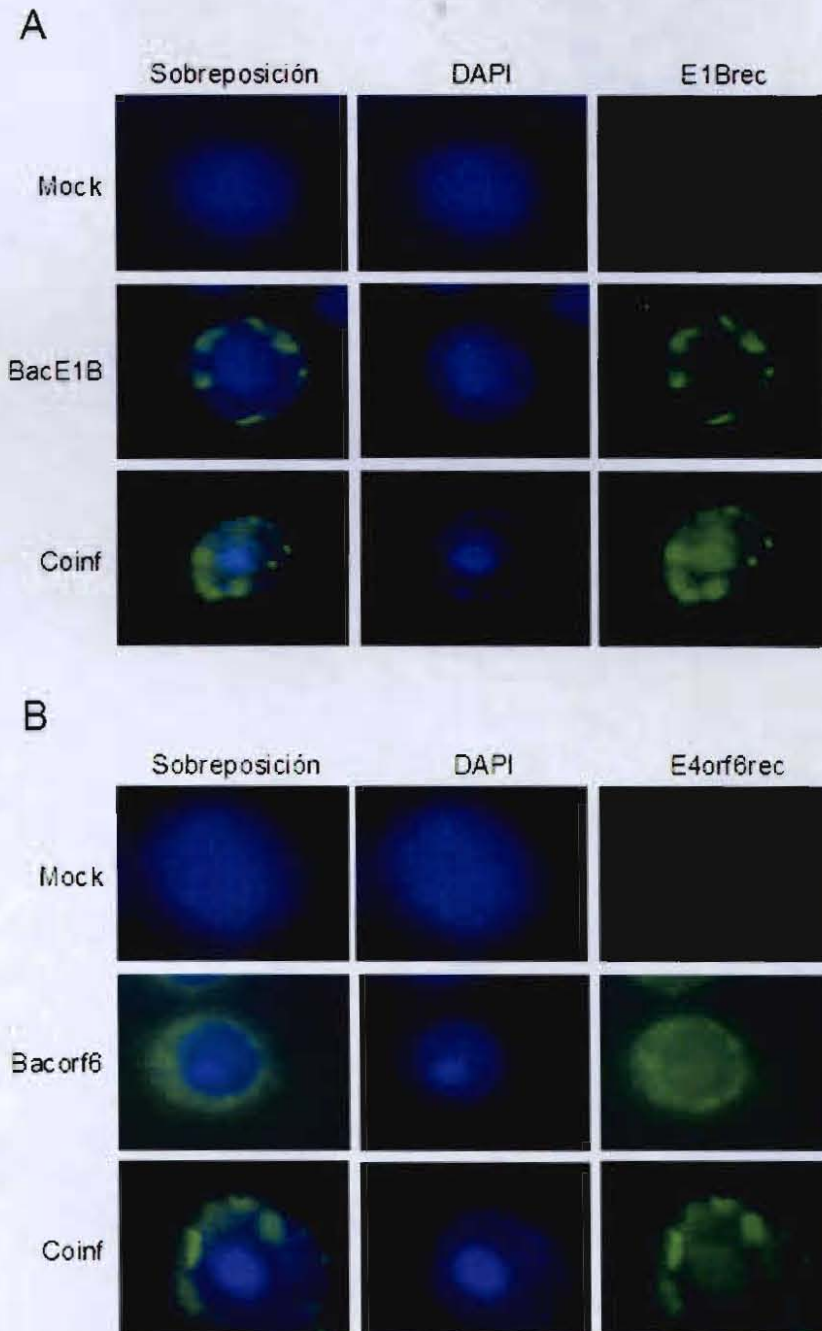


Figura 23. Localización intracelular de E1Brec y E4orf6rec. En el panel A se muestran los núcleos de células SF9, en azul el núcleo teñido con DAPI. En verde se muestra la localización de la E1Brec en ausencia y presencia (Coinf) de la E4orf6rec. En B también se muestran núcleos de células SF9. En azul se observa el núcleo y en verde a la E4orf6rec en ausencia y presencia (coinf) de la E1Brec. En ambos paneles se muestran células sin infectar (mock) como control.

VI.5.2. E1B-p53

Se sabe que en líneas celulares la E1B interacciona con p53 y se propone que la interacción inhibe la transcripción de genes blanco de p53 encargados de detener el avance del ciclo celular, o activar la apoptosis.

Para comprobar si p53 interacciona con la E1B en cultivos primarios, se incubaron los extractos subcelulares de células HFF con la E1Brec acoplada a la resina. Después de lavar la resina con 10 mM imidazol, se hicieron lavados consecutivos usando 2.3 M NaCl, 1% Tritón X 100 y finalmente se obtuvieron eluciones con 250 mM imidazol. La finalidad de estos lavados, es hacer una exploración inicial del tipo de interacción que establece la E1Brec con p53. Usando 2.3 M NaCl se buscó disociar interacciones iónicas, mientras que al usar Tritón X-100 se buscó la disociación de uniones hidrofóbicas. De esta manera, la elusión de p53 en presencia del agente iónico (NaCl) sugeriría que la interacción con la E1Brec es de carácter iónico. La elusión en presencia de Tritón X-100 sugeriría que la interacción es de carácter hidrofóbico.

Como se muestra en la figura 23, la p53 no fue eluida en altas concentraciones de NaCl y sí fue eficientemente eluida en presencia de Tritón X-100, lo que sugiere que la interacción podría tener un carácter hidrofóbico. No se observó la interacción entre la E1B rec con la p53 en la fracción citoplásmica; una posibilidad para interpretar este resultado es que la p53 citoplasmática sufra alguna modificación postraducciona que no permita la interacción con la E1Brec (Figura 24) (ver Discusión).

Los resultados sugieren que la E1B recombinante inmovilizada en la resina interacciona con la p53 obtenida de la fracción nuclear a las 24 hpi.

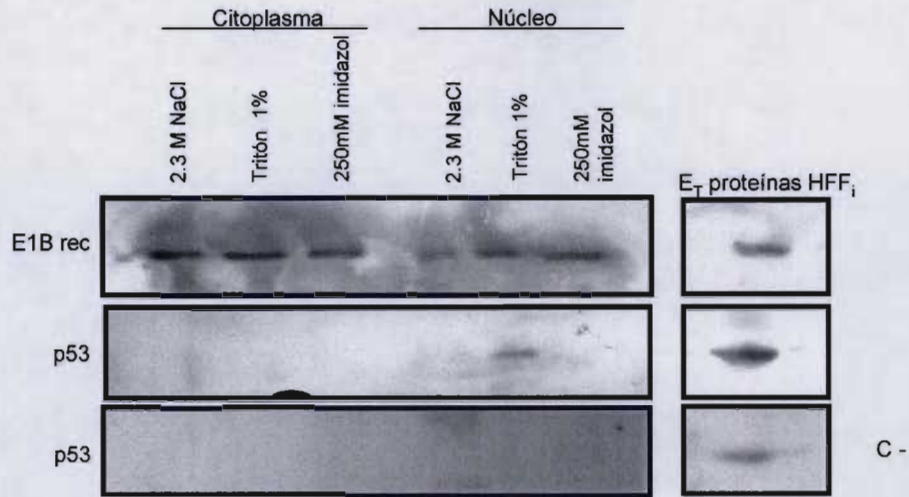


Figura 24. Interacción de la E1B recombinante con la p53 de células HFF infectadas con Ad5 wt. Después de inmovilizar a la E1B recombinante en la resina, ésta se incubó con extractos citoplásmicos y nucleares de cultivos primarios infectados con Ad5 wt. En los carriles se muestran los sobrenadantes recuperados después de incubar la resina consecutivamente con 2.3 M NaCl, 1% Tritón X-100 y 250 mM imidazol. La primera inmunodetección corresponde a la E1B, la siguiente a p53. La última inmunodetección también corresponde a p53 en el control negativo (C-); el cual no tiene E1B recombinante en la resina. El carril E₇ proteínas HFF_i corresponde a un lisado total de células HFF infectadas con Ad5wt (cosechadas a las 24 hpi), y se muestra como control positivo.

VI.5.3. E1B-Rad 50

Se buscó la interacción de Rad50 con la E1Brec porque en células transformadas se propone que como parte del complejo E3 ubiquitina ligasa, la E1B es la proteína que asocia a las proteínas celulares para su ubiquitinación. Con la finalidad de reproducir *in vitro* dicha interacción se incubaron extractos solubles de citoplasma y núcleo de células HFF, mock e infectadas con Ad5wt, con una resina con la E1Brec inmovilizada. Después de lavar la resina con 10 mM imidazol se obtuvieron eluciones con 250 mM imidazol.

Los resultados muestran que la Rad50 de las fracciones solubles no interacciona con la E1Brec (Figura 25 panel A). Entonces se analizaron las fracciones nucleares insolubles bajo las mismas condiciones cromatográficas. Los eluciones recuperados se analizaron por Western blot (Figura 25 panel B). Tampoco se observó que la E1Brec interaccione con la Rad50. La Rad50 se detectó en los sobrenadantes con las proteínas no asociadas a la resina o fracción NP (Figura 25 panel C). Estos resultados permiten concluir que la E1Brec no interacciona con Rad50 obtenida a lo largo del ciclo de replicación.

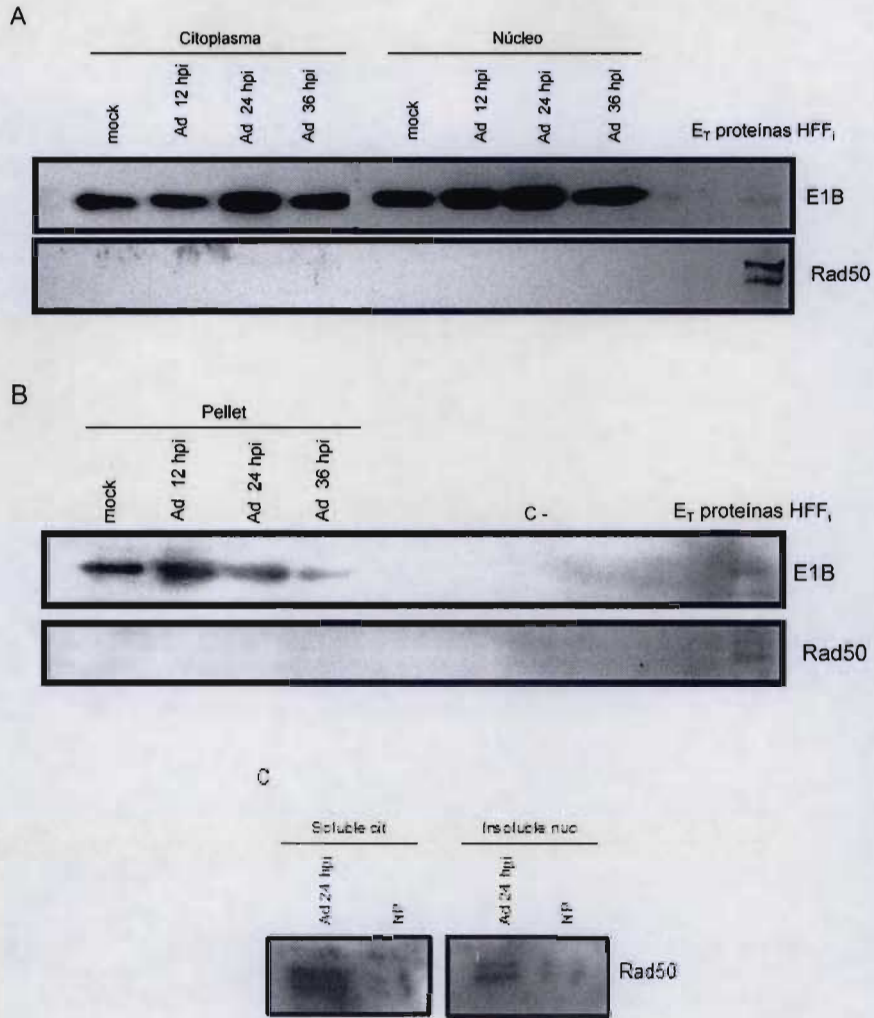


Figura 25. Interacción de la E1B recombinante con la Rad50 de células HFF infectadas con Ad5 wt. A) En los carriles se muestran las inmunodetecciones de la E1B y Rad50 en los sobrendadantes recuperados después de incubar la resina con 250 mM imidazol. Las eluciones provienen de fracciones solubles citoplásmicas y nucleares de células HFF mock e infectadas y cosechadas a 12, 24 y 36 hpi. B) Bajo el mismo proceso cromatográfico de las muestras solubles, se muestran las eluciones provenientes de las fracciones insolubles. La primera inmunodetección corresponde a la E1B y la segunda a la Rad50. EL carril C- corresponde al control negativo, en ausencia de E1Brec inmovilizada en la resina. En ambos paneles, el carril E_i proteínas HFF_i corresponde a un lisado total de células HFF infectadas con Ad5wt (cosechadas a las 24 hpi), y se incluyó como control positivo. En el panel C se muestra la presencia de la Rad50 en los lisados solubles e insolubles antes y después (NP) de ser incubados en la resina.

VII. Discusión

La proteína E1B 55kDa de adenovirus es una molécula cuyas actividades dependen, en todos los casos, de las interacciones que establece con proteínas virales y celulares. Algunas de las actividades de la E1B han sido asociadas a su interacción con proteínas específicas, como las E4orf6 y E4orf3 del virus, o la proteína celular p53; sin embargo, no se ha estudiado cuáles de estas interacciones pueden ocurrir simultáneamente, o si cada una de ellas compite con las demás. Tampoco es claro si estas interacciones pueden ocurrir en diferentes regiones del núcleo o del citoplasma. Por otra parte, se sabe que la E1B puede ser fosforilada y sumoilada; sin embargo, no es claro si ambas modificaciones resultan en la regulación de las actividades de la E1B (1, 8, 14, 25, 26). En este trabajo, se analizó la distribución intracelular de las proteínas que se asocian a la E1B, durante la fase temprana y tardía del ciclo de replicación de adenovirus y, se estableció un sistema que permitió reproducir la interacción de la E1B con p53 y E4orf6 *in vitro*.

El baculovirus recombinante BacE1B, construido previamente en el laboratorio, se diseñó para obtener altos niveles de expresión de una proteína de fusión que comprende a la E1B con un péptido de poli-histidina en el amino terminal. Una vez que se verificó la expresión de la proteína por inmunofluorescencia, se establecieron las condiciones que permiten obtener cantidades suficientes de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad en resina acoplada a níquel. Las células se cosecharon a las 72 hpi usando una MOI baja para evitar la formación de cuerpos de inclusión que se han visto al sobreexpresar a la proteína en otros sistemas (bacteria y levadura). Bajo estas condiciones, los niveles de expresión de la E1Brec son menores que los de otras proteínas expresadas en células de insecto. Sin embargo la cantidad de E1Brec sintetizada fue suficiente para los experimentos planteados para este proyecto.

Los resultados de la inmovilización de la E1B 55 kD recombinante indican que la unión de la proteína a la resina con níquel es específica y estable, pues sólo se detectó la E1B en los carriles de elusión, con una concentración de 250 mM de imidazol. La unión a la resina indica además que la región de polihistidinas de la proteína recombinante está expuesta.

Una vez montadas las condiciones para inmovilizar a la E1Brec, se procedió a identificar la localización intracelular de la E4orf6, p53 y las subunidades del MRN a lo largo del ciclo de replicación de Ad5wt en células normales.

Se observó que la E4orf6 se localiza en el núcleo de células infectadas y, de una distribución difusa durante la fase temprana, adquiere una distribución en puntos conforme avanza el ciclo de replicación. Esta distribución es similar a la observada con la E1B y DBP (proteína adenoviral de unión a DNA de cadena sencilla). Se ha propuesto que la colocalización de la E1B y DBP en sitios en donde se replica y transcribe el genoma viral y, en donde los mensajeros son modificados y seleccionados para su exportación, es necesaria para que se formen los centros de replicación. La evidencia sugiere que la E4orf6 también está presente en los centros de replicación en células normales infectadas con Ad5wt. Como se mencionó en los antecedentes, la E4orf6 junto con la E1B son necesarias para la acumulación citoplásmica de mensajeros virales tardíos y, la presencia de la E4orf6 en los

centros de replicación, junto con la E1B, sugiere que estas proteínas participan activamente en la selección de los mRNA que son exportados durante la fase tardía.

Dado que la formación del complejo E1B/E4orf6 es necesaria para estas actividades, se buscó reproducir la interacción de la E1Brec con la E4orf6, con el sistema E1Brec-Ni-NTA. Al no obtener la interacción de estas proteínas, se utilizó un sistema alternativo desarrollado en el laboratorio por Mayra Cobaxin, en el que se expresó una E4orf6 recombinante (E4orf6rec) en células de insecto. Esta proteína tiene fusionado un péptido FLAG para poder inmovilizarla en una resina con anti-FLAG acoplado. La E4orf6rec inmovilizada en resina anti-FLAG interaccionó específicamente con la E1B endógena de adenovirus a distintos tiempos postinfección, demostrando que la E4orf6rec está correctamente plegada (resultados de Mayra Cobaxin). Sin embargo no se logró obtener resultados claros que mostraran la interacción *in vitro* de la E1Brec con la E4orf6rec. Se ha propuesto que el amino terminal de la E1B está involucrado en la interacción con la E4orf6, por lo que es posible que la E1Brec inmovilizada en la resina por el epítipo de polihistidinas, no se asocie con la E4orf6rec debido a un impedimento estérico en el extremo amino. Paralelamente, resultados preliminares sugieren que en la coinfección, ambas proteínas recombinantes se asocian y la E1Brec no se puede inmovilizar en la resina. Se ha propuesto que la localización nuclear de la E1B depende de su interacción con la E4orf6. Por lo tanto, la detección de cambios en la distribución intracelular de la E1Brec, inducidos por la E4orf6rec en células coinfectadas con los baculovirus BacE1B y Bacorf6, indicarían que la E1Brec puede interaccionar con la E4orf6 dentro de las células coinfectadas y que está correctamente plegada, tal y como se observó en nuestros experimentos.

Posteriormente se observó que en células infectadas la p53 es relocada al núcleo, hacia los centros de replicación, ya que la distribución observada es similar a la que se ha reportado para la E1B, E4orf6 y DBP (8, 43, 59). Por otra parte, no se observó evidencia de que p53 es degradada a lo largo del ciclo de replicación del virus, ni por los ensayos de inmunofluorescencia, ni en el fraccionamiento subcelular, confirmando que a diferencia de lo que sucede en células transformadas, en células normales el virus no induce la degradación de este supresor tumoral (64). Adicionalmente, los resultados obtenidos con el fraccionamiento subcelular sugieren que la infección induce un cambio en la solubilidad de p53 nuclear (Figuras 21 y 22). Es interesante notar que se ha reportado que la p53 detectada en los centros de replicación podría estar asociada a la matriz nuclear, como se ha reportado para la E1B y la E4orf3. Sin embargo, no es claro si la redistribución de p53 podría deberse a su interacción con alguna proteína o si alguna modificación postraduccional es responsable de su relocalización.

En nuestros experimentos, no detectamos la interacción de p53 de la fracción citoplasmática con la E1Brec. Una posibilidad para esta falta de interacción podría ser que otra(s) proteínas interfieren; sin embargo, esto es poco probable, ya que los extractos usados en todos los experimentos se obtuvieron en concentraciones de detergentes que disociarían cualquier interacción previa, por lo que es más probable que la subpoblación de p53 citoplasmática sufra una modificación postraduccional que no permite la interacción con la E1B. Tomando en cuenta que p53 es una proteína sujeta a múltiples modificaciones postraduccionales, es posible que las p53 de citoplasma y núcleo difieran en las

modificaciones a las que están sujetas y que esto resulte en su interacción diferencial con la E1B (Figura 24). Nuestros experimentos no nos permiten discernir entre estas posibilidades y es necesario hacer experimentos adicionales para determinar si la p53 en la fracción insoluble interacciona con la E1B y si esta p53 sufre modificaciones postraduccionales.

En síntesis, observamos una redistribución de p53 en las células infectadas, que la E1B puede interaccionar con la p53 presente de manera soluble en el núcleo y no se detectó la degradación de p53. Es probable que la redistribución de p53 en los centros de replicación sea responsable de su inactivación como inductor de apoptosis. Se sabe que en células eucariotas no infectadas hay proteínas en el núcleo que son inactivadas al asociarse a la matriz. Durante la infección, la asociación de p53 con los centros de replicación, los cuales están asociados a la matriz nuclear, probablemente la inactive. Al mismo tiempo, p53 quedaría secuestrada e inaccesible para la activación de sus genes blanco. Sin embargo, hay proteínas que en la matriz nuclear son activas; es decir, la asociación a matriz nuclear no siempre significa la inactivación de proteínas. Se ha reportado que los factores transcripcionales Nfl y Oct-1 permiten una replicación más eficiente del genoma viral; es decir, son proteínas celulares, que durante la infección participan en una función ajena a la que llevan cabo en las células sin infectar. Entonces existe la posibilidad de que p53 sea reclutada a los centros de replicación, donde lleve a cabo una función no descrita. De hecho, se ha reportado que los adenovirus completan su ciclo de replicación en líneas celulares que tiene a una p53 funcional con mayor eficiencia que en líneas con la p53 mutada; y que, al expresar una p53 funcional en estas líneas, se incrementa la expresión de los genes virales tardíos y la progenie viral (65). Harán falta experimentos para determinar si la asociación de la p53 soluble en el núcleo con la E1B resulte en alguna modificación que asocia a p53 con la matriz nuclear, y el análisis de las poblaciones citoplásmicas y nucleares de p53 para saber si son proteínas funcionales o si se encuentran inactivas.

Se analizó la distribución intracelular de las subunidades del complejo MRN, pues son proteínas que en células transformadas, infectadas con adenovirus, son poliubiquitinadas por el complejo E3 ubiquitina ligasa para su posterior degradación. Cabe mencionar que aunque en este trabajo sólo se analizó la distribución de la Mre11 por inmunofluorescencia, las Nbs1 y Rad50 también adquieren una distribución intracelular similar a Mre11 (trabajo realizado en el laboratorio por Elizabeth Castillo) y que durante el análisis del fraccionamiento subcelular, no se analizó a Mre11 por falta de disponibilidad del anticuerpo.

En un trabajo realizado por Berk y colaboradores, observaron que en células A549 (células humanas transformadas de epitelio de carcinoma alveolar) infectadas con Ad5wt la Mre11 colocaliza con la E1B a tiempos tempranos y para la fase tardía ésta no es detectable, concluyendo que la Mre11 es marcada químicamente para degradación por la E3 ubiquitina ligasa (29). En contraste, en células HFF se detectó a la Mre11 a lo largo de la infección, lo que sugiere que esta proteína no es degradada (Figuras 19 y 26). Por otra parte, Weitzman y colaboradores reportaron que en células U2OS (células humanas derivadas de osteosarcoma), Nbs1, Rad50 y p53 son degradadas durante la fase tardía (64). En nuestros experimentos, en el análisis del fraccionamiento subcelular de células HFF no se observó una desaparición de dichas proteínas a lo largo del ciclo de replicación, sugiriendo que no se induce su degradación (Figura 27). Cabe señalar que a partir de sus

resultados, el grupo de Weitzman sugiere que tanto p53 como las subunidades del complejo MRN podrían tener destinos distintos al ser degradadas de manera diferencial. Nuestros resultados concuerdan con esta observación y sugieren que estas proteínas son alteradas independientemente; por ejemplo, observamos una reducción en la señal de Nbs1 a las 36 hpi que no se observó para la Rad50 en la fracción nuclear insoluble. Junto con el cambio de distribución observado por inmunofluorescencia, estos resultados indican que el complejo MRN no es inactivado por la degradación de sus componentes, sino que la redistribución intracelular inducida en la infección, podría resultar en su inactivación, a diferencia de lo que se ha reportado en células transformadas.

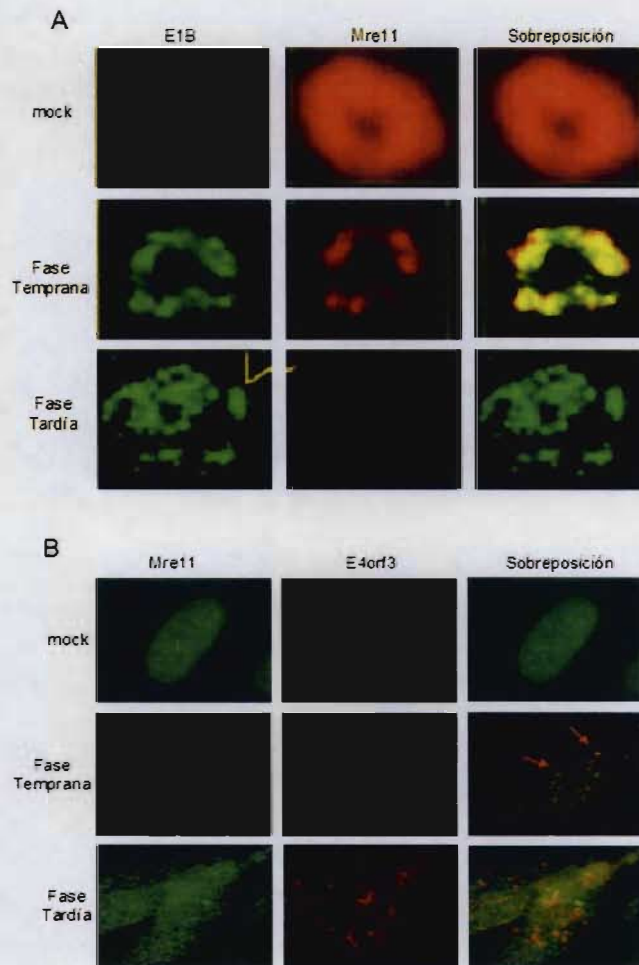


Figura 26. Imágenes de Ensayos de inmunofluorescencia, reproducidos de Berk y colaboradores en el panel A, y obtenidos en nuestro laboraotrio en B. Comparación de la presencia del MRN y p53 entre células transformadas y normales infectadas con Ad5wt. En el panel A se muestran núcleos de células A549 mock e infectadas, en verde se observa la localización de la E1B y en rojo la Mre11 (modificada de Berk et. al. 2005). En el panel B se muestran los núcleos de células HFF mock e infectadas. En verde se muestra la localización de la Mre11 y en rojo a la E4orf3.

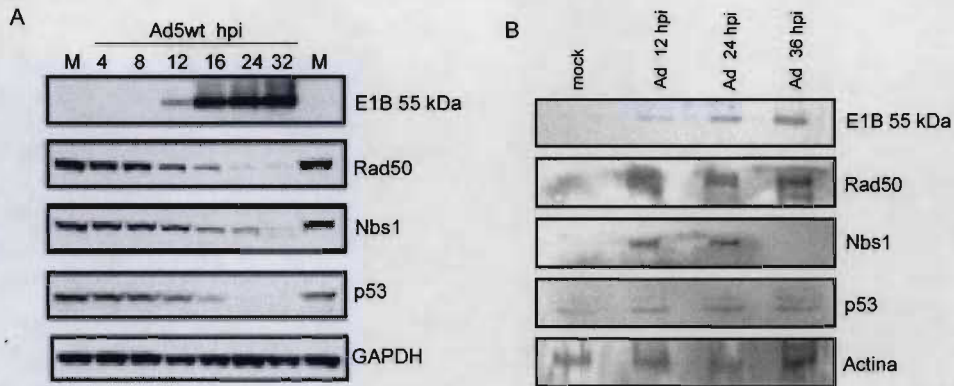


Figura 27. Imágenes de WB reproducidas de Weitzman y colaboradores, y de la figura 22 en este trabajo. Presencia del complejo MRN y p53 en células transformadas y normales, infectadas con A5wt. En el panel A se muestra la inmunodetección de Rad50, Nbs1 y p53 en extractos de células U2OS. También se muestra la presencia de la E1B y GAPDH como control de carga (reproducida de Weitzman et. al. 2008). En el panel B se reproduce la figura 22 en donde se muestra la inmunodetección de Rad50, Nbs1, p53 y E1B provenientes de células HFF (ver también Figura 22). Actina se usa como control de carga.

Como en el caso de p53, la relocalización e inactivación del complejo MRN podría deberse a la sola interacción proteína-proteína, de las subunidades del MRN con las proteínas virales E1B y/o E4orf3. Alternativamente, la asociación de la E1B y/o E4orf3 podría inducir alguna modificación postraduccional del MRN que resulte en su relocalización e inactivación, ya que se ha reportado que la sumoilación de la E1B determina su localización en el núcleo y, que la E1B es directamente responsable de la sumoilación de p53 (63). Nuestros resultados indican que durante la fase temprana, las subunidades del MRN colocalizan con la E4orf3 (Figura 19). Estos resultados coinciden con la colocalización reportada, en la que se conoce la asociación de la E4orf3 con el MRN, en líneas celulares. La asociación del MRN con la E4orf3 en células HFF podría inducir el cambio de solubilidad que se observó en el fraccionamiento subcelular, asociando al MRN a la matriz nuclear. Sin embargo, en la fase tardía no se detectó la colocalización de estas proteínas celulares con la E4orf3. Una posibilidad es que la Nbs1 se exporte hacia citoplasma (pues ésta no se detectó en ninguna fracción nuclear en la fase tardía); a diferencia de la Rad50 que permanece en la fracción nuclear insoluble a las 36 hpi (Figuras 21 y 22). Las evidencias sugieren que las subunidades del MRN son alteradas de manera independiente, y probablemente la redistribución diferencial de cada subunidad evite que se agrupen para formar el complejo MRN. Esto no descarta que (como en el caso de p53), durante la fase temprana las subunidades se requieran en los centros de replicación para favorecer alguna actividad viral. Al igual que con p53 harán falta experimentos para determinar si alguna de las subunidades (o todas) está inactivada en los centros de replicación.

En nuestros experimentos, no se observó la interacción de la E1Brec con la Rad50, ni en las fracciones solubles, ni en las insolubles. La ausencia de interacción de la Rad50 con la E1Brec inmovilizada en la resina podría deberse a que la E1B no esté involucrada particularmente en la redistribución de Rad50, y es entonces indispensable analizar si la redistribución de Mre11 o Nbs1 sí es inducida por la E1B. Debido a las condiciones disociantes en las fracciones subcelulares, resulta poco probable que Rad50 no interaccione con la E1Brec por una competencia de interacción con alguna otra proteína en los extractos. Por otra parte, a partir de los análisis en células transformadas se sugiere que la E1B se asocia con la Rad50. Será necesario repetir el experimento cromatográfico y detectar la interacción de la E1Brec con la Rad50 de células transformadas, para determinar si la E1B en células normales no interacciona con la Rad50 a diferencia de lo que ocurre en líneas celulares, lo cual, podría implicar que la asociación E1B-Rad50 requiere de alguna modificación post traduccional en Rad50, o de otra proteína presente sólo en las células transformadas.

Una opción que no se puede descartar es que la E1B no sólo medie la ubiquitinación de proteínas celulares, sino otra modificación que resulte en la redistribución intracelular que hemos analizado, no sólo del MRN sino de p53. Se ha reportado que el patrón de sumoilación es modificado ante condiciones de estrés (como una infección). En el caso particular de adenovirus, p53 es sumoilada en presencia de la E1B 55 kD (69). Las evidencias permiten suponer que la E1B 55 kD no sólo participa en la ubiquitinación sino también en la sumoilación de proteínas celulares en líneas celulares. En este escenario y de acuerdo con nuestros resultados, la E1Brec se asociaría con las proteínas nucleares no modificadas (como se observó con p53), y al modificarlas postraduccionalmente se alteraría la distribución intracelular de las mismas y la asociación con la E1Brec.

Finalmente, los experimentos realizados en este trabajo permiten concluir que durante el ciclo de replicación viral en células normales, no se lleva a cabo la degradación de p53 ni del complejo MRN y sugieren que la inactivación se da por la alteración en la distribución intracelular de estas proteínas. Esta alteración es inducida por la interacción con proteínas virales y es importante determinar si las E1B y E4 están implicadas en la modificación postraduccional de las proteínas celulares. Los resultados en este trabajo muestran que las alteraciones celulares inducidas por adenovirus, y que han sido analizadas en líneas celulares no son necesariamente similares a las que se llevan a cabo durante la infección de células normales.

VIII. Conclusiones

- ❖ El baculovirus recombinante expresa eficientemente a la E1B 55 kDa.
- ❖ El tramo de polihistidinas en el extremo amino terminal permite la interacción específica de la proteína recombinante a la resina con níquel.
- ❖ La redistribución de la E1Brec de citoplasma a núcleo, en presencia de la E4orf6rec, sugiere que estas proteínas interactúan dentro de las células coinfectadas.
- ❖ Los resultados sugieren que la E1B recombinante permite reproducir la interacción con la p53 nuclear *in vitro*.
- ❖ La interacción entre la E1Brec y p53 podría tener carácter hidrofóbico.
- ❖ No se observó la degradación de p53 ni del complejo MRN en células humanas no transformadas infectadas con Ad5wt.
- ❖ Durante el ciclo de replicación de Ad5wt en cultivos primarios hay un cambio en la distribución intracelular de la Mre11 y de solubilidad de Nbs1, Rad50 que podría resultar de la asociación de estas proteínas con la matriz nuclear.

IX. Perspectivas

Se observó que ni p53, ni las subunidades del MRN son degradadas durante la infección con adenovirus en células normales, sino redistribuidas hacia los centros de replicación en la fase temprana. El hecho que estas proteínas sean inactivadas y reclutadas a los centros de replicación sugiere que se requieran para llevar a cabo funciones específicas que permitan completar eficientemente el ciclo de replicación viral, como se discutió antes para p53 (65). En este trabajo, el fraccionamiento subcelular, se diseñó buscando que las soluciones de extracción utilizadas no interfirieran la interacción de la E1Brec con la resina. Sin embargo, es necesario buscar condiciones más astringentes que nos permitan confirmar los cambios de distribución intracelular y de solubilidad de las proteínas de interés. Una vez que se obtenga el fraccionamiento se podría determinar si p53, Mre11, Nbs1 y Rad50 participan en la expresión o replicación del genoma viral. Por ejemplo, se podría evaluar la asociación de p53 y Nbs1 con ácidos nucleicos; la formación del complejo Mre11-Nbs1-Rad50 asociado a DNA; y la activación de genes blanco de p53.

El sistema montado durante este trabajo, E1Brec-Ni-NTA, permite reproducir la interacción de la E1Brec con otras proteínas, por lo que es una herramienta útil para la identificación de proteínas asociadas a la E1B. Sin embargo, será necesario repetir los experimentos cromatográficos para confirmar las interacciones observadas con p53 y la E4orf6, además de incluir a la E4orf3 y las subunidades del MRN, Mre11 y Nbs1. Estos resultados se deberán comparar con aquellos que arroje la repetición de las cromatografías utilizando extractos de células transformadas. Paralelamente se podrá analizar el tipo de modificación postraduccional de las proteínas asociadas a la E1B, en particular la sumoilación y ubiquitinación.

Se ha reportado que la E1B puede asociarse a RNA de manera inespecífica *in vitro*, pero no se sabe si la proteína interactúa con ácidos nucleicos en la célula, o qué papel podría tener esta interacción en el mecanismo de exportación selectiva de mensajeros

virales. El sistema E1Brec-Ni-NTA podrá utilizarse para reproducir la interacción de la E1B con ácidos nucleicos (secuencias específicas de mRNA y/o DNA).

La E1Brec podrá utilizarse como antígeno en la obtención de anticuerpos específicos que sirvan como herramientas adicionales para su estudio; en particular, el análisis, en la misma célula, de la distribución y tránsito intracelular de la E1B junto con una o más de las proteínas de interés: DBP, E4orf6, p53, Mre11, Nbs1 y Rad50 por inmunofluorescencias.

X. Bibliografía

- 1.- Urs Hobom, Matthias Döbelstein. E1B-55-Kilodalton Protein Is Not Required To Block p53-Induced Transcription during Adenovirus Infection. *Journal of Virology*. Julio 2004: 7685–7697.
- 2.- Joanna Shisler, Penny Duerksen-Hughes, Terry M. Hermiston, William S. M. Wold, Linda R. Gooding. Induction of Susceptibility to Tumor Necrosis Factor by E1A Is Dependent on Binding to either p300 or p105-Rb and Induction of DNA Synthesis. *Journal of Virology*. Enero 1996: 68–77.
- 3.- Lisa Y. Zhao, April L. Colosimo, Yue Liu, Yanping Wan, and Daiqing Liao. Adenovirus E1B 55-Kilodalton Oncoprotein Binds to Daxx and Eliminates Enhancement of p53-Dependent Transcription by Daxx. *Journal of Virology*. Noviembre 2003: 11809–11821.
- 4.- Paul M. Lieberman. Chromatin regulation of virus infection. *TRENDS in Microbiology*. Vol.14 No.3 . Marzo 2006: 132–140.
- 5.- Roger D Everett. DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene*. 2001 Vol. 20: 7266–7273.
- 6.- Gerd G. Maul. Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *BioEssays* . 1998. Vol. 20:660–667.
- 7.- Teresa Carvalho, Jacob Seeler, et. al. Targeting of Adenovirus E1A and E4orf3 Proteins to Nuclear Matrix-Associated PML bodies. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 131. Octubre 1995: 45–55.
- 8.- David A. Ornelles , Thomas Shenk. Localization of the Adenovirus Early Region 1B 55-Kilodalton Protein during Lytic Infection: Association with Nuclear Viral Inclusions Requires the Early Region 4 34-Kilodalton Protein. *Journal of Virology*. Enero 1991: 424–439.
- 9.- Robin N. Shepard y David A. Ornelles. Diverse Roles for E4orf3 at Late Times of Infection Revealed in an E1B 55-Kilodalton Protein Mutant Background. *Journal of Virology*. Sept. 2004: 9924–9935.
- 10.- Josephine N. Harada, Anna Shevchenko, Andrej Shevchenko, David C. Pallas, Arnold J. Berk. Analysis of the Adenovirus E1B-55K-Anchored Proteome Reveals Its Link to Ubiquitination Machinery. *Journal of Virology*. Sept. 2002: 9194–9206.
- 11.- Stefan Gabler, Holger Schu, Peter Groitl, Hans Wolf, Thomas Shenk, Thomas Dobner. E1B 55-Kilodalton-Associated Protein: a Cellular Protein with RNA-Binding Activity Implicated in Nucleocytoplasmic Transport of Adenovirus and Cellular mRNAs. *Journal of Virology*. Oct. 1998: 7960–7971.

- 12.- Jean K. Smiley, T Marjorie A. Young, S. J. Flint. Intranuclear Location of the Adenovirus Type 5 E1B 55-Kilodalton Protein. *Journal of Virology*. Sept. 1990: 4558-4564.
- 13.- Keith N. Leppard, Roger D. Everett. The adenovirus type 5 E1b 55K and E4 Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components. *Journal of general Virology*. Vol. 80. 1999: 997-1008.
- 14.- Lori S. Hart, Steven M. Yannone, Christine Naczki, Joseph S. Orlando, Stephen B. Waters, Steven A. Akman, David J. Chen, David Ornelles, Constantinos Koumenis. The Adenovirus E4orf6 Protein Inhibits DNA Double Strand Break Repair and Radiosensitizes Human Tumor Cells in an E1B-55K-independent Manner. *The journal of biological chemistry*. Vol. 280 Enero 2005: 1474-1481.
- 15.- Stephen Pilder, Mary Moore, John Logan, Thomas Shenk. The Adenovirus E1B-55K Transforming Polypeptide Modulates Transport or Cytoplasmic Stabilization of Viral and Host Cell mRNAs. *Molecular and cellular biology*. Feb. 1986: 470-476.
- 16.- Jared D. Evans, Patrick Hearing. Relocalization of the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex by the Adenovirus E4 orf3 Protein Is Required for Viral Replication. *Journal of Virology*. Mayo 2005: 6207-6215.
- 17.- Jared D. Evans, Patrick Hearing. Distinct Roles of the Adenovirus E4 ORF3 Protein in Viral DNA Replication and Inhibition of Genome Concatenation. *Journal of Virology*. Mayo 2003: 5295-5304.
- 18.- Wilma T. Steegenga, Avi Shvarts, Nicole Riteco, Johannes L. Bos, Aart G. Jochemsen. Distinct Regulation of p53 and p73 Activity by Adenovirus E1A, E1B, and E4orf6 Proteins. *Molecular and cellular biology*. Mayo 1999: 3885-3894.
- 19.- Jose G. Teodoro, Philip E. Branton. Regulation of p53-Dependent Apoptosis, Transcriptional Repression, and Cell Transformation by Phosphorylation of the 55-Kilodalton E1B Protein of Human Adenovirus Type 5. *Journal of Virology*. Mayo 1997: 3620-3627.
- 20.- Lisa Y. Zhao, Daiqing Liao. Sequestration of p53 in the Cytoplasm by Adenovirus Type 12 E1B 55-Kilodalton Oncoprotein Is Required for Inhibition of p53-Mediated Apoptosis. *Journal of Virology*. Dic. 2003: 13171-13181.
- 21.- Judith Roth, Claudia Ko, Sandra Wienzek, Silke Weigel, Susanne Ristea, Matthias Dobbelstein. Inactivation of p53 but Not p73 by Adenovirus Type 5 E1B 55-Kilodalton and E4 34-Kilodalton Oncoproteins. *Journal of Virology*. Nov. 1998: 8510-8516.
- 22.- Felicia D. Goodrum, David A. Ornelles. Roles for the E4 orf6, orf3, and E1B 55-Kilodalton Proteins in Cell Cycle-Independent Adenovirus Replication. *Journal of Virology*. Sept. 1999: 7474-7488.

- 23.- Bac-to-Bac Baculovirus Expression System, Life Tech.
- 24.- Shenk T. 1996. *Adenoviridae* and their replication, p. 2111-2148. in B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Raven Press, New York, N. Y.
- 25.- Gonzalez R., S. J. Flint. Effects of mutations in the Adenoviral E1B 55-Kd protein coding sequence on viral late mRNA metabolism. *Journal of Virology*. Mayo 2002: 4507-4519.
- 26.- Gonzalez R., Wenyng H, Finnen R., Bragg C., S. J. Flint. Adenovirus E1B 55-Kd protein is required for both regulation of mRNA export and efficient entry into the late phase of infection in normal human fibroblast. *Journal of Virology*. Enero 2006: 964-974.
- 27.- Rubenwolf S., Scutt H., Nevels M., Wolf H., Dobner T. Structural analysis of the adenovirus type5 E1B 55 kD-E4 orf6 protein complex. *Journal of virology*. Vol. 2. Feb. 1997:1115-1122.
- 28.- O'Shea C., Jonson L., Bagus B., Choi S., Nicholas C., Shen A., Boyle L., Pandey K., Soria C., Shen Y., Habets G., Ginzinger D., McCormick F. Late viral export, rather than p53 inactivation, determine ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer cell*. Vol. 6. Dic 2006: 611-620.
- 29.- Liu Y, Shevchenko A, Shevchenko A, Berk AJ. Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex. *Journal of Virology*. Nov. 2005:14004-16.
- 30.- Weizao Chen, Mingqiu Liu, Ye Jiao, Weiyao Yan, Xuefeng Wei, Jiulian Chen, Liang Fei, Yang Liu, Xiaoping Zuo, Fugui Yang, Yonggan Lu, Zhaoxin Zheng. Adenovirus-Mediated RNA Interference against Foot-and-Mouth Disease Virus Infection both In Vitro and In Vivo. *Journal of virology*, Apr. 2006, p. 3559–3566.
- 31.- Imagen obtenida de internet:[http:// www.zool.unizh.ch/ Research/ CellBiology/ Researchgroups/ Cytoplasmic/ 3a.html? ersion=simple](http://www.zool.unizh.ch/Research/CellBiology/Researchgroups/Cytoplasmic/3a.html?ersion=simple)
- 32.- L. W. Enquist, R. M. Krug, V. R. Racaniello, A. M. Skalka, S. J. Flint (Ed), *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. ASM Press, 2000, Washington, D.C.
- 33.- A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, QIAexpressionist, Junio, 2003.
- 34.- Lawrence M., González R, Jiri N, S. J. Flint. Structure of the Adenovirus E4orf6 Protein predicted by fold recognition and comparative Modeling. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. May 2001: 97-109.

- 35.- Christopher L. Parks,T, David J. Spector. cis-Dominant Defect in Activation of Adenovirus Type 5 Elb Early RNA Synthesis. *Journal of Virology*, Junio 1990, p. 2780-2787.
- 36.- Katherine J. Lethbridge, Gillian E. Scott and Keith N. Leppard. Nuclear matrix localization and SUMO-1 modification of adenovirus type 5 E1b 55K protein are controlled by E4 Orf6 protein. *Journal of General Virology* (2003), 84, 259–268.
- 37.- Keith N. Leppard, Roger D. Everett. The adenovirus type 5 E1b 55K and E4 Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components. *Journal of General Virology* (1999), 80, 997–1008.
- 38.- John S. Logan, Thomas Shenk. Transcriptional and Translational Control of Adenovirus Gene Expression. *Microbiological Reviews*. Dic. 1982, p. 377-383.
- 39.- Shawn P. Fessler, C. S. H. Young. Control of Adenovirus Early Gene Expression during the Late Phase of Infection. *Journal of Virology*. Vol. 72, No. 5. Mayo 1998, p. 4049–4056.
- 40.- Anna-Marija Helt, Denise A. Galloway. Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis* vol.24 no.2. 2003, pp.159–169.
- 41.- Amy M. Chastain-Moore, Terry Roberts, Deborah A. Trott, Robert F. Newbold, David A. Ornelles. An Activity Associated with Human Chromosome 21 Permits Nuclear Colocalization of the Adenovirus E1B-55K and E4orf6 Proteins and Promotes Viral Late Gene Expression. *Journal of Virology*, Vol. 77, No. 14, Julio 2003, p. 8087–8098.
- 42.- Mark A. Yondola, Patrick Hearing. The Adenovirus E4 ORF3 Protein Binds and Reorganizes the TRIM Family Member Transcriptional Intermediary Factor 1 Alpha. *Journal of Virology*, Vol. 81, No. 8. Abril. 2007, p. 4264–4271.
- 43.- Silke Weigel And Matthias Döbelstein. The Nuclear Export Signal within the E4orf6 Protein of Adenovirus Type 5 Supports Virus Replication and Cytoplasmic Accumulation of Viral mRNA. *Journal Of Virology*, Vol. 74, No. 2. Jan. 2000, p. 764–772.
- 44.- Rozanne M. Sandri-Goldin. Viral Regulation of mRNA Export. *Journal of Virology*, Vol. 78, No. 9. May 2004, p. 4389–4396.
- 45.- Jennifer L. Woo, Arnold J. Berk. Adenovirus Ubiquitin-Protein Ligase Stimulates Viral Late mRNA Nuclear Export. *Journal of Virology*, January 2007, p. 575-587, Vol. 81, No. 2.
- 46.- David T. Rowe, Philip E. Branton , Frank L. Graham. The Kinetics of Synthesis of Early Viral Proteins in KB Cells Infected with Wild-type and Transformation-defective Host-range Mutants of Human Adenovirus Type 5. *J. gen. Virol.* (1984), 65, 585-597.

- 47.- Paola Blanchette, Kathrin Kindsmuller, Peter Groitl, Frederic Dallaire, Thomas Speiseder, Philip E. Branton, and Thomas Dobner. Control of mRNA Export by Adenovirus E4orf6 and E1B55K Proteins during Productive Infection Requires E4orf6 Ubiquitin Ligase Activity. *Journal Of Virology*, vol. 82, Mar. 2008, p. 2642–2651.
- 48.- Timo Sieber, Thomas Dobner. Adenovirus Type 5 Early Region 1B 156R Protein Promotes Cell Transformation Independently of Repression of p53-Stimulated Transcription. *Journal Of Virology*, Vol. 81, No. 1, Jan. 2007, p. 95–105.
- 49.- Amy Baker, Kent J. Rohleder, Les A. Hanakahi, and Gary Ketner. Adenovirus E4 34k and E1b 55k Oncoproteins Target Host DNA Ligase IV for Proteasomal Degradation. *Journal Of Virology*, Vol. 81, No. 13, July 2007, p. 7034–7040.
- 50.- Emmanuelle Querido, Paola Blanchette, Qin Yan,, Takumi Kamura, Megan Morrison, Dominique Boivin, William G. Kaelin, Ronald C. Conaway,, Joan Weliky Conaway, Philip E. Branton. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes & Dev.* 2001 15: 3104-3117
- 51.- Ramnath Nayak, K. David Farris, David J. Pinte. E4Orf6-E1B-55k-Dependent Degradation of De Novo-Generated Adeno-Associated Virus Type 5 Rep52 and Capsid Proteins Employs a Cullin 5-Containing E3 Ligase Complex. *Journal Of Virology*, Vol. 82 Apr. 2008, p. 3803–3808.
- 52.- Andrew N. Blackford, Rachel K. Bruton, Orkide Dirlik, Grant S. Stewart, A. Malcolm R. Taylor, Thomas Dobner, Roger J. A. Grand. A role for E1B-AP5 in ATR signalling pathways during adenovirus infection. *JVI Accepts*, May, 2008.
- 53.- Amanda J. Ullman, Patrick Hearing. The cellular proteins PML and Daxx mediate an innate antiviral defense antagonized by the adenovirus E4 ORF3 protein. *JVI Accepts*, May, 2008.
- 54.- Xinyu Zheng, Xiao-Mei Rao, Jorge G. Gomez-Gutierrez, Hongying Hao, Kelly M. McMasters, H. Sam Zhou. Adenovirus E1B55K region is required to enhance cyclin E expression for efficient viral DNA replication. *JVI Accepts*, Jn. 2008.
- 55.- Michael T. Tetzlaff, Wei Yu, Mamie Li, Pumin Zhang, Milton Finegold, Kathleen Mahon, J. Wade Harper, Robert J. Schwartz, Stephen J. Elledge. Defective cardiovascular development and elevated cyclin E and Notch proteins in mice lacking the Fbw7 F-box protein. *PNAS* , vol. 101 no. 10, March 9, 2004 , pp. 3338–3345 .
- 56.- HB Fleisig, NI Orazio, H Liang, AF Tyler, HP Adams, MD Weitzman, L Nagarajan. Adenoviral E1B55K oncoprotein sequesters candidate leukemia suppressor sequence-specific single-stranded DNA-binding protein 2 into aggresomes. *Oncogene* (2007) 26, 4797–4805.

- 57.- Marcellus RC, Chan H, Paquette D, Thirlwell S, Boivin D, Branton PE.. Induction of p53-independent apoptosis by the adenovirus E4orf4 protein requires binding to the Balph subunit of protein phosphatase 2A. *J Virol.* 2000 Sep;74(17):7869-77.
- 58.- Shihua Lu, Bryan R. Cullen. Adenovirus VA1 Noncoding RNA Can Inhibit Small Interfering RNA and MicroRNA Biogenesis. *Journal Of Virology*, Dec. 2004, p. 12868–12876.
- 59.- Cardoso FM, Kato SE, Huang W, Flint SJ, Gonzalez RA. An early function of the adenoviral E1B 55 kDa protein is required for the nuclear relocalization of the cellular p53 protein in adenovirus-infected normal human cells. *Virology.* 2008 Sep 1;378(2):339-46.
- 60.- Langereis MA, Rosas-Acosta G, Mulder K, Wilson VG. Production of sumoylated proteins using a baculovirus expression system. *Journal of virology methods.* Feb 2007 189-94.
- 61.- Percipalle P., Visa N. Molecular functions of nuclear actin in transcription. *Journal of Cell Biology.* vol. 172. Mar 2007 967-971.
- 62.- William G. Kaelin, Ronald C. Conaway, Joan Weliky Conaway, Philip E. Branton, Emmanuelle Querido, Paola Blanchette, Qin Yan, Takumi Kamura, Megan Morrison, Dominique Boivin. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes & Dev.* 2001 15: 3104-3117.
- 63.- Muller S, Dobner T. The adenovirus E1B-55K oncoprotein induces SUMO modification of p53. *Cell Cycle.* 2008. Mar 15;7(6):754-758.
- 64.- Schwartz R., Lakdawala S., Eshleman H., Russell T., Carson C., Weitzman M. Distinct Requirements of Adenovirus E1b55K Protein for Degradation of Cellular Substrates. *Journal Of Virology.* Sept. 2008, 9043–9055.
- 65.- Royds J. A., Hibma M., Dix B., Hananeia L., Russell I.A., Wiles A. p53 promotes adenoviral replication and increases late viral gene expression. *Oncogene.* 2006 Mar., 9; 25: 1509-1520.