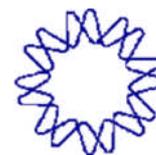




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“LA REPLICACION DE ADENOVIRUS EN CELULAS NO TRANSFORMADAS, DEPENDE DE UNA ACTIVIDAD NO CARACTERIZADA DE LA PROTEINA E1B 55 kDa, DURANTE LA FASE TEMPRANA DEL CICLO DE REPLICACION”.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
PRESENTA: BIÓL. NORMA ANGÉLICA RAMÍREZ PÉREZ

TUTOR:
DR. RAMÓN GONZÁLEZ GARCÍA-CONDE

Cuernavaca, Mor., Junio 2011



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.

El trabajo de investigación presentado en esta tesis fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de Adenovirus de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) bajo la dirección del Dr. Ramón González García-Conde.

Agradecimientos

Al Dr. Ramón González por su guía en este proyecto

A “los chicos del lab” May, Francisco, Carlitos, Rita, Ely, Mario.

A cada uno de los investigadores que formaron parte del comité de evaluación:

Dr. Ernesto Méndez

Dr. Enrique Reynaud

Dr. Pavel Isa

Dra. Liliana Pardo

Dra. Isabel Gómez

Dra. Martha Vázquez

Con dedicatoria ...

A mi esposo

A mis padres ¡¡Siempre!!

A Quienescita

A mis hermanos

A mis amigos y amigas.

ÍNDICE

Resumen.	8
Introducción	9
Características generales de adenovirus	
El virión	10
Genoma	10
Ciclo de replicación de Ad.	11
Proteínas que participan durante el ciclo de replicación de Ad	
Proteínas virales.	14
Proteína de unión a ADN (DBP)	14
E1A.	14
E1B-55kDa	14
Complejo E1B-E4Orf6	14
E4Orf3.	14
Proteínas celulares	
p53.	15
PML	15
E1B-AP5	15
Antecedentes	
Características generales de la E1B.	16
Mutantes de la E1B.	16
Hipótesis.	18
Objetivos	
Objetivo general.	18.
Objetivos particulares.	18.

Materiales y métodos

Células.	19
Virus	19
Localización intracelular de proteínas virales y celulares.	19
Estudio de la cinética de acumulación de la DBP por Western blots	20
Inicio de síntesis de ADN.	22

Resultados

Distribución de la proteína E1B-55kDa en células HFF infectadas.	25
Distribución de la proteína DBP en células HFF infectadas.	27
Distribución de la proteína PML en células HFF	
PML en células HFF sin infectar.	28
PML en células HFF infectadas.	29
Distribución de la proteína p53 en células HFF	
p53 en células HFF sin infectar.	30
p53 en células HFF infectadas.	31
Distribución de la proteína E4Orf3 en células HFF infectadas.	32
Distribución de la proteína E1B-AP5.	34
E1B-AP5 en células HFF sin infectar.	34
E1B-AP5 en células HFF infectadas.	34
Análisis de la eficiencia de síntesis de ADN viral en células infectadas con Ad5 y mutantes de E1B.	36
Síntesis de ADN en células HFF infectadas con el virus Ad5wt y mutantes.	36
Síntesis de proteínas.	39
Medición de los niveles de DBP	39
Discusión y conclusiones.	40
Perspectivas.	44
Referencias.	45

Anexos.	49
Anexo I. Resumen de distribución de proteínas virales y celulares.	49
Anexo II. Glosario y abreviaturas.50

RESUMEN

Está bien establecido que la proteína E1B-55kDa (E1B) de adenovirus 5 (Ad5) del subgrupo C es una de las proteínas tempranas responsables de la inhibición de las actividades de p53 y exportación selectiva de los ARNms virales tardíos. Sin embargo, los mecanismos celulares que son alterados por esta proteína viral no han sido elucidados. La mayoría de los experimentos diseñados para estudiar la estructura y funciones de la E1B durante el ciclo de replicación de adenovirus han demostrado que la participación de esta proteína está restringida a la fase tardía del ciclo de replicación; principalmente a la exportación selectiva de los ARNms virales tardíos.

Recientemente se encontró que en células humanas normales infectadas con Ad silvestre, la proteína E1B es requerida para el inicio eficiente de la replicación de ADN viral, un fenotipo que no había sido observado en líneas de células transformadas. Estas observaciones indican que la replicación de adenovirus en células normales (HFF, SAEC, NHBE) depende de una actividad de la E1B durante la fase temprana del ciclo de replicación que no ha sido caracterizada.

Para estudiar esta actividad, utilizamos mutantes de Ad5 (cuyos fenotipos se describen en la introducción), que tienen una alteración en la secuencia que codifica para la E1B (A143, S380), y un mutante nulo (Hr6) que no sintetiza la E1B. Además del análisis de la distribución intracelular de la E1B, realizamos el análisis de distribución de las proteínas virales (como DBP y E4Orf3) y celulares (p53 y PML) que interactúan con ésta, y que se sabe participan en la organización de estructuras nucleares características de la célula infectada, donde se replica el genoma viral.

Como complemento de los experimentos de distribución de proteínas, diseñamos un experimento para poder analizar la cinética de replicación del genoma viral por PCR. Y a la par con este experimento el análisis de síntesis de proteínas virales tempranas y tardías.

Los resultados obtenidos sugieren que la proteína E1B participa en la formación eficiente de los centros de replicación viral y que la interrelación molecular que se establece entre las proteínas virales E1B y E4Orf6 (Orf6), y las proteínas celulares p53 y AP5 durante la fase temprana del ciclo de replicación, es esencial para la formación de estructuras que llevan a una replicación eficiente del ADN viral. Por lo tanto, la replicación de adenovirus en células no transformadas depende de la actividad de la E1B durante la fase temprana del ciclo de replicación.

INTRODUCCIÓN.

Los virus son parásitos intracelulares que requieren de las funciones de la célula huésped para reproducirse (replicarse). Deben modificar el ambiente de la célula huésped para maximizar su replicación e impedir la activación de la respuesta antiviral; mientras simultáneamente mantienen viva a la célula el tiempo suficiente para producir progenie viral (Flint *et al.*, 2002).

Muchos de los productos de los oncogenes virales de los virus de ADN actúan interrumpiendo los procesos celulares, tales como la apoptosis y la activación de los “check points” dentro del ciclo celular. El estudio de estos genes, y las proteínas que codifican, ha hecho posible conocer el cómo trabajan las rutas celulares fundamentales, muchas de las cuales dejan de ser reguladas en células cancerígenas. Como por ejemplo, la proteína p53, que originalmente fue identificada en complejo con el antígeno mayor del virus SMV40, y posteriormente se observó que esta proteína interactuaba con el antígeno tumoral de otro virus, el adenovirus (Shenk, 1996).

Los adenovirus (Ad) fueron de los primeros virus aislados y caracterizados, como distintos agentes virales, por dos grupos de investigación que buscaban los agentes etiológicos de las infecciones respiratorias agudas. En 1953 Rowe y colaboradores (Rowe *et al.*, 1953; Shenk, 1996) aislaron el primer miembro representativo de la familia *Adenoviridae* a partir de tejido adenoide; observaron la degeneración espontánea de cultivos de células primarias derivadas de adenoides humanos, y concluyeron que los cambios patogénicos eran resultado de la replicación de virus no identificados, presentes en tejidos de adenoides. Mientras que en 1954, Hilleman y Werner estudiaron la epidemia de una enfermedad respiratoria aguda en los reclutas del ejército, y aislaron agentes a partir de secreciones respiratorias que indujeron cambios citopáticos en los cultivos de células humanas. Inicialmente estos agentes recibieron varios nombres: agente de degeneración adenoide (AD), agente de la enfermedad respiratoria (RI), agente adenoidal-faríngeo-conjuntivo (APC), o agente de enfermedad respiratoria aguda (ARD). Pero, pronto se demostró que estaban relacionados, y en 1956 todos estos agentes fueron denominados adenovirus (Shenk, 1996).

La investigación realizada, a lo largo de cinco décadas, con Ad ha permitido un importante progreso en el entendimiento de procesos celulares como el “splicing” de transcritos de ARN, la función de supresores tumorales; como p53 y Rb, y la primera descripción de las proteínas como cebadores en la iniciación de la replicación del ADN, entre muchos otros (Shenk, 1996).

Los Ad han sido aislados de varias especies de mamíferos placentarios, marsupiales, aves y anfibios. Dos géneros son los más importantes: *Mastadenovirus* (mamíferos) y *Aviadenovirus* (solo aves), de los cuales se han reconocido por lo menos 57 tipos diferentes para *Mastadenovirus* y 21 para *Aviadenovirus*. Los Ad humanos inicialmente fueron clasificados de acuerdo a su capacidad de inducir tumores malignos en ratones neonatos. El Ad5 pertenece a

un grupo que posee baja oncogenicidad (Shenk, 1996), mientras que el Ad12 induce tumores en animales. Una diferencia importante entre estos dos virus se encontró en la proteína E1B-55kDa (E1B).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE ADENOVIRUS

El virión. Está formado por una cápside icosaédrica de un diámetro de 75-90 nm y una nucleocápside o “core” que contiene el ADN viral asociado a proteínas (ver figura 1). En conjunto, cápside y nucleocápside están constituidas por 11 polipéptidos distintos (ver tabla 1); siete de estos forman la cápside: II, VI, VIII, IX, III, IV, y IIIa (Shenk, 1996), mientras que el “core” está formado por los polipéptidos V (368 a.a), VII (174 a.a) y μ (72 a.a), la proteína terminal (671 a.a) y el genoma viral (Shenk, 1996).

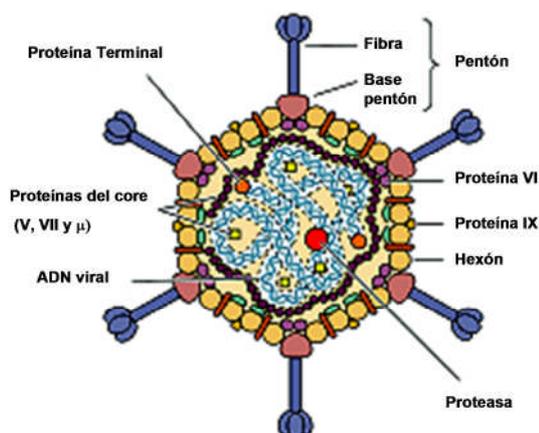


FIGURA 1. ESQUEMA DE LOS COMPONENTES DEL VIRIÓN DE Ad.

Polipéptido	Tamaño	Localización	Función
II	967 a.a	Cápside	Hexón (trímero de polipéptido II)
III	571 a.a	Cápside	Forma la base pentón
IIIa	566 a.a	Asociada con hexón	Puente core-cápside
IV	582 a.a	Fibra	Forma la fibra
V	368 a.a	Core	Puente core-cápside
VI	217 a.a	Cápside	Puente cápside-core
VII	174 a.a	Core	Empaquetamiento de ADN
VIII	134 a.a	Cápside	Puente cápside-core
IX	139 a.a	Cápside	Asociada a hexón
Mu	19 a.a	Core	Cimentación de la cápside
TP	671 a.a	Core (Extremo 5' del ADN viral)	Cebador en la replicación del ADN viral

TABLA 1. PROTEÍNAS QUE CONSTITUYEN EL VIRIÓN DE Ad. Descripción, localización y función de cada una de las proteínas estructurales de Ad.

Genoma. El genoma de Ad5 es una molécula de ADN lineal de doble cadena, que se organiza en cinco unidades de transcripción temprana (E1A, E1B, E2, E3 y E4) y una unidad tardía principal (ver figura 2), la cual es procesada para generar cinco familias de ARN mensajeros (ARNm) tardíos (L1 a L5), todos transcritos por la ARN polimerasa II. Además, contiene uno o dos genes VA (Virus Associated), dependiendo del serotipo, que son transcritos por la ARN polimerasa III (Shenk, 1996).

El genoma contiene dos orígenes de replicación idénticos, uno presente en cada extremo, lo que permite que ambas cadenas del ADN viral se repliquen (Shenk, 1996).

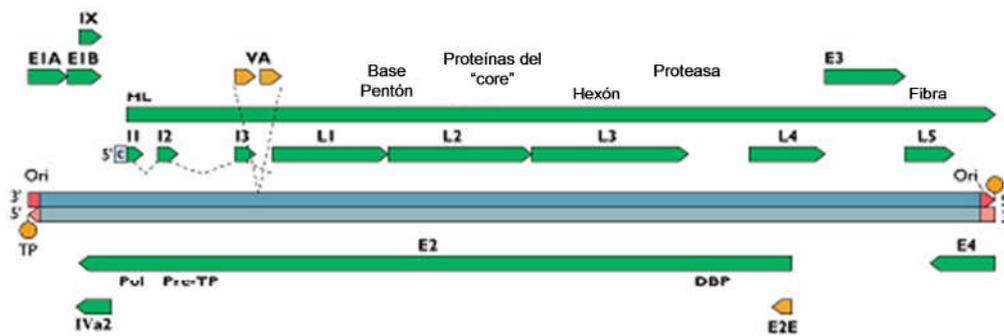


FIGURA 2. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DE Ad5 (modificado de Flint et al; 2002). Se muestran los orígenes de replicación (ori) en los extremos de cada una de las cadenas de ADN; la proteína terminal (TP) enlazada al 5' de cada cadena. Las 8 unidades de transcripción (E1A, E1B, E2, E3, E4, IX, IVa2 y ML) dependientes de la ARN polimerasa II (líneas verdes); y las 2 unidades de transcripción (VA y E2E) dependientes de la ARN polimerasa III (líneas naranjas). En la figura también podemos observar las cinco familias de mensajeros (L1, L2, L3, L4 y L5) que derivan del "splicing" de la unidad principal tardía (ML) y que codifican las proteínas virales tardías de Ad. Las puntas de flecha indican la dirección de la transcripción. Y en el caso de ML y E2 se identifican, a grosso modo, las proteínas para las que codifican.

CICLO DE REPLICACIÓN DE Ad.

En el proceso de infección, el reconocimiento de las partículas virales por el receptor celular, CAR (Coxsackie-Adenovirus Receptor), está mediado por la proteína viral, fibra. La internalización de Ad, por endocitosis, es mediada por un segundo evento de reconocimiento proteína-proteína que involucra a la base pentón y a miembros específicos de la familia de las integrinas como $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ (Heise & Kirn, 2000; Flint *et al.*, 2002).

El transporte intracelular del virus se da a través de endosomas, donde la cápside experimenta múltiples pasos de desensamblaje, mediante los cuales las proteínas estructurales son secuencialmente eliminadas (ver figura 3).

En el endosoma, la fibra, las proteínas IIIa y VIII se disocian de la cápside. Conforme el endosoma se acidifica, la disminución en el pH libera la base pentón y a la proteína IX. La base pentón media la lisis de la membrana del endosoma, liberando al resto de la nucleocápside en el citoplasma.

Al ser liberada del endosoma, la nucleocápside carece de la mayoría de sus componentes, excepto el ADN viral y las proteínas del "core", las cuales se internalizan en el núcleo a través

del complejo del poro nuclear; una vez en el núcleo, inicia la transcripción del genoma viral (Flint *et al.*, 2002).

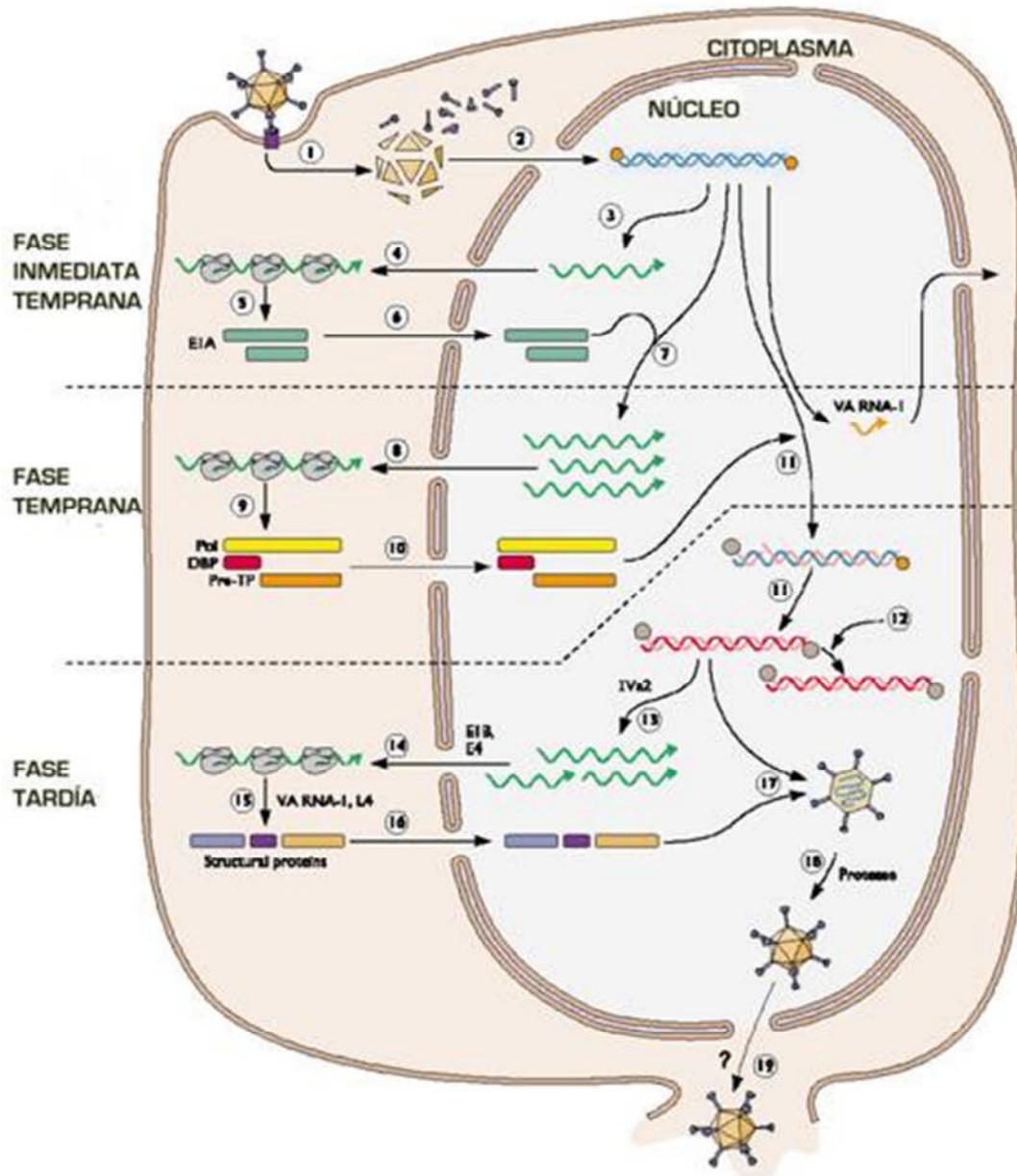


FIGURA 3. CICLO DE REPLICACIÓN DE ADENOVIRUS. (Modificado de Flint, 2002). El virus se une a la célula (1) por una interacción entre la fibra y el receptor que se encuentra en la superficie celular, y entra por endocitosis. El genoma viral se asocia a la proteína VII del "core" y es importado al núcleo (2). Se transcribe el gen E1A (3). Ocurre la exportación de ARNm de E1A a citoplasma (4). La proteína E1A es sintetizada por la maquinaria de traducción celular (5). Las proteínas, ya modificadas, son importadas al núcleo (6). La proteína E1A estimula la transcripción de los genes tempranos de Ad (7), los ARNm son exportados al citoplasma (8) y traducidos a proteínas tempranas (9). Las proteínas que participan en la replicación son importadas al núcleo (10), y cooperan con proteínas celulares en la síntesis de ADN viral (11). Las moléculas de ADN replicado pueden servir como molde para la replicación (12), o para la transcripción de los genes tardíos (13). El transporte selectivo de los ARNm desde el núcleo, como resultado de la acción de las proteínas E1B-55kDa (E1B) y E4Orf6 (Orf6) (14). La traducción de los ARNm virales en el citoplasma (15). Las proteínas estructurales son importadas al núcleo (16). Dentro del núcleo se ensambla la cápside (17), se forman los viriones maduros (18), y la progenie viral es liberada (19).

El ciclo de replicación está dividido en dos fases: temprana y tardía; la transición a la fase tardía está definida por el inicio de la replicación de ADN viral. (Shenk, 1996; Flint *et al.*, 2002).

La replicación del ADN inicia dentro de las secuencias terminales invertidas (ITRs) del genoma lineal y continúa por un mecanismo de desplazamiento de cadena. La proteína de unión a ADN (DBP), la proteína preterminal (pTP) y la ADN polimerasa viral (Ad pol), codificadas en la región E2, son responsables de la replicación del ADN viral (ver figura 3).

El inicio de la replicación es dependiente de un mecanismo de proteína-“primer” y requiere de la proteína preterminal, (pTP), para unirse covalentemente a desoxicitidina monofosfato (dCMP) en el extremo 5´ del genoma. La pTP interactúa con Ad pol, iniciando la elongación por adición de nucleótidos en el OH del extremo 3´ libre de dCMP que está covalentemente unido a la serina 580 de la proteína terminal, TP, (Shenk, 1996).

La elongación requiere de Ad pol y DBP (Shenk, 1996; Flint *et al.*, 2002), y de los factores nucleares I, II y III (NFI, Oct1, NFII), que son esenciales para la replicación del ADN viral. Estos factores se unen específicamente al origen de replicación (ori) y forman un complejo estable de preiniciación en el ori con las tres proteínas virales. NFII está relacionado a la topoisomerasa I y es importante para la elongación y la procesividad del complejo de la polimerasa (Flint *et al.*, 2002).

PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN DURANTE EL CICLO DE REPLICACIÓN DE Ad.

PROTEÍNAS VIRALES

La proteína de unión a ADN (DBP) es una proteína de 529 aminoácidos (a.a), con un peso molecular de 59 kDa. Es codificada por la unidad de transcripción viral E2A, una unidad de transcripción que es transcrita temprano en la infección por Adenovirus (Ad). Esta proteína juega un papel importante en el ciclo de replicación de Ad, ya que está involucrada en la replicación del ADN, el control transcripcional, la estabilidad de los ARNm, la especificidad del hospedero, la transformación de la célula y el ensamblaje del virus (Flint *et al.*, 2002; Hoopes *et al.*, 2006).

La proteína E1A. El primer gen en ser transcrito después de la entrada del genoma de ADN en el núcleo de la célula huésped es el gen inmediato temprano E1A. Las dos proteínas E1A más abundantes, son producidas por traducción de ARN mensajero (ARNm) procesado alternativamente por "splicing", y difieren sólo en la presencia de una secuencia de 43 aminoácidos. Este segmento es una de las cuatro secuencias de la proteína E1A que están conservadas entre Ad de primates y son conocidas como regiones conservadas (CR) de 1 a 4 (Schaeper *et al.*, 1998; Awakumov *et al.*, 2004). Los productos del gen E1A promueven la replicación del ADN viral y celular, lo que resulta en la inducción de apoptosis a través de las vías dependiente e independiente de p53 (Debbas *et al.*, 1993).

La proteína E1B-55kDa (E1B) modula la progresión del ciclo celular al formar un complejo específico con la proteína p53 (Sarnow, *et al.* 1982). Se ha establecido que la proteína E1B de Ad interactúa físicamente con el dominio de transactivación (TAD) de p53, mientras que la E1B y otra proteína temprana, E4Orf6 (como complejo), median la ubiquitinación y degradación de p53. (Yew & Berk, 1992; Yew *et al.*, 1992).

El complejo E1B-E4Orf6 (E1B-E4) está directamente involucrado en el transporte de ARNm virales, desde los centros de replicación al citoplasma (Ornelles & Shenk, 1991) y, se ha propuesto que funciona como transportador núcleo-citoplásmico, ya que es continuamente transportado entre el núcleo y el citoplasma ("shuttling") (Dobbelstein, *et al.*, 1997).

La proteína E4Orf3 (Orf3) es un efector viral en el cambio dentro del núcleo de la célula, durante la fase temprana del ciclo de replicación (Goodrum *et al.*, 1999). A esta proteína se le han identificado varias funciones las cuales se pueden resumir en: i) Influencia el proceso de "splicing" diferencial de la unidad de transcripción principal tardía "major late"; ii) evita la activación y reclutamiento de componentes de la célula huésped, que forman parte de la vía de reparación de ruptura de ADN de doble cadena, hacia los centros de replicación viral (lo que resulta en la inhibición de la concatenación del genoma viral lineal); iii) es necesaria y suficiente para la reorganización de estructuras nucleares conocidas como PODs (Hoppe *et al.*,

2006) ; iv) es una proteína necesaria para que la E1B, se localice en los PODs, y para bloquear el efecto de la E1B sobre la activación de p53 (Ko-Ning *et al.*, 1999).

PROTEÍNAS CELULARES.

La proteína celular p53 es un supresor tumoral que induce la detención del ciclo celular y apoptosis al funcionar como regulador transcripcional (Woods & Vousden 2001). Se sabe que los niveles intracelulares de p53 activada son regulados por una variedad de mecanismos, incluyendo fosforilación, acetilación, y marcaje por ubiquitinación para su degradación (Querido *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2005; Yew *et al.*, 1999). En la mayoría de las células, p53 es degradada, al menos en parte, mediante proteólisis dependiente de ubiquitina involucrando a HDM2, la cual funciona como una E3 ubiquitin ligasa para p53 (Honda *et al.*, 1997; Querido & Marcellus 1997; Querido *et al.*, 2001).

La infección de células por muchos virus induce la estabilización y activación de p53 (Roulston *et al.*, 1999). En el caso de los Ad humanos, la unión de la proteína E1A con cualquiera de los miembros de la familia de supresores tumorales, retinoblastoma, o las histona acetil transferasas p300/CBP/p400, inducen la activación, estabilización y acumulación de p53 (Chiou & White 1997).

La proteína PML es una fosfoproteína nuclear, contiene un motivo característico tripartita que consiste de un dedo de zinc C3HC4, dos dominios alternados de unión a zinc, ricos en cisteína-histidina, las cajas B1 y B2, y un dominio de dimerización alfa-hélice (Melnick *et al.*, 1999; Weidtkamp *et al.*, 2008). El “splicing” alternativo de la región carboxilo terminal resulta en la generación de más de 15 isoformas diferentes cuyas funciones específicas apenas han empezado a ser identificadas (Fogal *et al.*, 2000). Esta proteína se encuentra dentro de estructuras nucleares definidas, conocidas como dominios oncogénicos de PML (PODs), que varían en número y tamaño de acuerdo al tipo celular (Everett *et al.*, 1999; Doucas *et al.*, 1996).

La proteína E1B-AP5 (AP5) es una proteína celular que interacciona con la E1B de Ad. Se ha propuesto que la unión entre E1B y AP5 puede jugar un papel importante en el transporte núcleo-citoplasma de ARNm, ya que la AP5 interacciona con la proteína celular Tap, un factor de exportación nuclear indispensable para el transporte nucleocitoplásmico de ARNm celulares (Gabler *et al.*, 1998).

2. ANTECEDENTES

Características generales de la E1B. Es una fosfoproteína de 496 aminoácidos que contiene tres sitios de fosforilación carboxilo terminales: en serina 490 y serina 491 (en una secuencia consenso para caseína la cinasa II), y treonina 495, para la caseína cinasa I (Malette *et al.*, 1983; Sarnow *et al.*, 1982); esta modificación es necesaria para la actividad transformante de la E1B (Teodoro & Branton, 1997; Teodoro *et al.*, 1994). La proteína E1B también es modificada por SUMO-1.

Además de las secuencias para modificación post-traducciona, por proteínas celulares, la proteína E1B contiene una secuencia característica de dedos de zinc, un dominio de unión a ARN (RNP), una señal de localización nuclear (NLS) y, una señal de exportación nuclear rica en leucina (NES). Se ha reportado que la secuencia de la región de E1B implicada en la unión a ARN se encuentra entre los residuos 284 y 287, los cuales, se ha demostrado que son cruciales para la replicación normal del virus (Yew *et al.*, 1990).

Mutantes de la E1B. Con el fin de disectar dominios funcionales de la proteína E1B, Yew y colaboradores (Yew *et al.*, 1990) utilizaron el método de Lobel y Goff (Lobel & Goff, 1984) para hacer inserciones de 12 pb en el marco de lectura en la secuencia de ADN que codifica para la E1B. Los genes modificados se fusionaron a la región E1B del genoma de adenovirus tipo 2 (Ad2), resultando en genomas híbridos, Ad2-Ad5. En total se construyeron 13 mutantes con inserciones que corresponden a cuatro a.a en sitios definidos, a lo largo de la E1B.

Los virus mutantes se han utilizado en un intento por identificar regiones de la proteína a las que se le puedan asociar funciones definidas. A la fecha se han analizado diversos fenotipos, como: eficiencia de síntesis de proteínas virales tardías, inhibición de síntesis de proteínas celulares, eficiencia de replicación viral, transporte de ARNm y la interacción de la E1B con las proteínas AP5, p53 y Orf6 (Gonzalez & Flint, 2002).

Algunos de los mutantes útiles por el fenotipo que expresan son: el de la inserción en la posición 143 (A143), la cual evita la formación del complejo E1B-E4; el de la inserción en la posición 380 (S380) que interrumpe específicamente la interacción de la E1B con AP5 (Gabler *et al.*, 1998) y, el mutante Hr6, nulo para la producción de la E1B.

Cabe mencionar que en el caso de la mutación en S380, se ha reportado que existe un incremento de por lo menos dos veces el rendimiento del virus en células HeLa, sin tener efecto en la síntesis de proteínas virales tardías o en la inhibición de la síntesis de proteínas celulares (Yew *et al.*, 1990). Mientras que la unión a p53 sólo se reduce ligeramente (Kao *et al.*, 1990).

Se sabe que la proteína E1B es multifuncional, dos de las funciones asociadas a esta son: i) la estimulación del transporte de ARNm virales de núcleo a citoplasma e inhibición simultánea

del transporte de ARNms celulares desde el núcleo; ii) y su participación en la unión e inactivación de la proteína p53, funcionando como represor dirigido de los genes de respuesta a p53 (inhibición de apoptosis), durante la fase tardía del ciclo de replicación (Gonzalez *et al.*, 2002).

Sin embargo, recientemente se encontró que, además de sus funciones durante la fase tardía, la proteína E1B es requerida durante la fase temprana del ciclo de replicación de Ad en fibroblastos humanos (HFF) infectados con Ad5, ya que la ausencia de la proteína E1B resulta en una síntesis de ADN viral muy ineficiente (González *et al.*, 2006).

Lo anterior, en conjunto con las observaciones del trabajo de Ramírez (Ramírez 2006) sugiere que la E1B es necesaria para el progreso eficiente de la fase temprana del ciclo de replicación del virus. Esta observación es importante ya que no se ha observado dicha función en células transformadas.

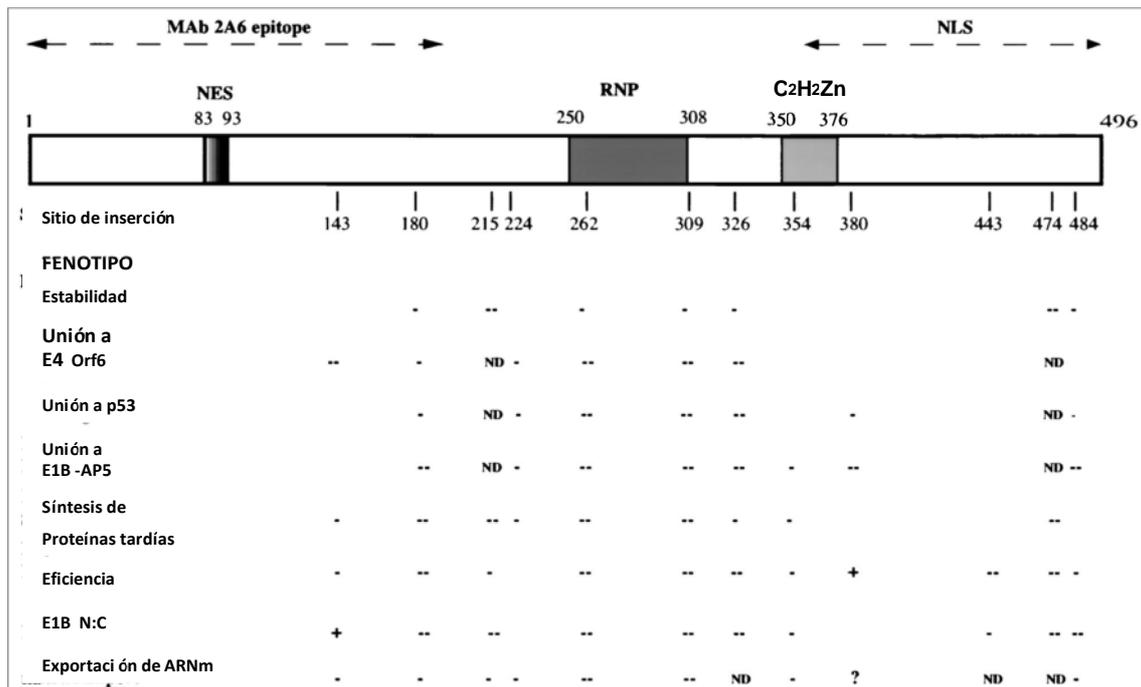


FIGURA 4. FENOTIPOS QUE PRESENTAN LAS MUTANTES DE INSERCIÓN DE LA PROTEÍNA E1B-55kDa. Se muestra la proteína de 496 aminoácidos y la posición de las secuencias NES, RNP, una secuencia consenso C2H2, la región que contiene el epitope reconocido por el anticuerpo monoclonal 2a6. Se indican los sitios de las mutaciones de inserción y con la siguiente simbología la alteración provocada por la mutación. (- -) defectos severos, (-) defectos moderados, (ND) no determinado y (?) efecto incierto. (Tomado de González & Flint 2002).

3. HIPÓTESIS

La actividad de la proteína E1B, durante la fase temprana del ciclo de replicación de adenovirus, es determinante para inducir la replicación eficiente del virus, en células no transformadas.

4. OBJETIVO

Determinar el efecto de alteraciones en la proteína E1B sobre su actividad durante la fase temprana del ciclo de replicación de adenovirus, en células no transformadas.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar la localización de la E1B, a tiempos tempranos del ciclo de replicación, en células primarias (HFFs) infectadas con los virus wt, S380, A143 y Hr6.
- 2) Comparar los patrones de síntesis de proteínas virales tempranas y la eficiencia de síntesis de ADN viral en células infectadas con Ad5 y mutantes de E1B.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

Células. Se utilizó la línea celular 293, derivada de tejido embrionario de riñón humano. Esta línea expresa los genes E1A y E1B de Ad, fue usada para amplificar el virus silvestre Ad5 (adenovirus humano tipo 5), y los mutantes S380, A143 y Hr6. Estas células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO) suplementado con 5% de suero bovino fetal (FBS, GIBCO). Las células HFF "Human Foreskin Fibroblasts" se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal. Todos los cultivos de células fueron incubados a 37°C con 5% CO₂.

Virus. Se utilizaron los virus: silvestre Ad5 (Ad5wt), S380, A143 y Hr6. Los virus mutantes S380 y A143 contienen una inserción de 12pb, las cuales fueron insertadas por el método de Lobel y Goff (Lobel & Goff, 1984) que emplea mutagénesis dirigida; mientras que en el mutante Hr6 hay una delección en el gen que codifica para E1B. Tanto el virus silvestre como cada uno de los virus mutantes fueron amplificados en células 293. Para esto se infectaron células 293 cultivadas en cajas de 100 mm a 90% de confluencia con una multiplicidad de infección (moi) de 0.1 unidades formadoras de placas por mililitro del virus (pfu/ml); las células se cosecharon después de 48 horas post-infección, (hpi), con un gendarme. Se recuperaron las células en un tubo Falcon de 50mL y se centrifugaron a 4,500g por 5 min a 4°C.

La pastilla se resuspendió en buffer USB IV (Tris HCl 0.025 M pH 7.5, NaCl 0.15 M, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0.55 mM y dextrosa 0.1% w/v) y se recuperó el virus lisando las células (por congelación-descongelación), congelando con una mezcla hielo seco-etanol y descongelando a 37°C, este procedimiento se repitió cinco veces. Se centrifugó a 4,500 g durante 5 min, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C.

Localización intracelular de proteínas virales y celulares.

a) Cultivo celular. Las células confluentes (100%), de una caja de 100mm, se lavaron con PBS, a 37°C, se retiró el PBS y se desprendieron añadiendo 1mL de solución tripsina / EDTA (tripsina 0.5%, EDTA 5 mM), 5 min a 37°C. Se agregaron 5 ml de DMEM con suero, para desactivar la tripsina, se recuperaron las células y se colocaron en un frasco de cultivo que contenía DMEM + 10% suero bovino fetal + penicilina (10,000 unidades/ml) – estreptomycin (10,000 µg/ml).

Para montar los cubreobjetos en cajas de 12 pozos (C-12), se colocó el cubreobjetos en el fondo de cada pozo y se añadieron 750 µl de DMEM con suero en cada pozo, después se

distribuyeron aproximadamente 1.5×10^5 células en medio de cultivo en cada pozo (en 250 μ l) y se incubaron por 24 h a 37°C.

b) Infección. Para las células sin infectar “mock” se usó sólo DMEM sin suero, pero el protocolo es el mismo que en las células infectadas. Para poder infectar las células se retiró el medio DMEM con suero de cada uno de los pozos de la caja de C-12 y se lavaron las células dos veces con PBS a 37°C. Se inoculó cada uno de los pozos con 0.5 ml de DMEM con la cantidad necesaria del virus correspondiente y se adsorbió durante 1 h a 37°C, meciendo ligeramente cada 15 min; transcurrido el tiempo de adsorción, se retiró el inóculo y se colocaron 2 ml de DMEM (5% suero para HeLa y 10% para HFFs) por pozo.

c) Fijado de células y procesamiento por inmunofluorescencia. Una vez transcurrido el tiempo post-infección se retiró el medio de cada uno de los pozos y las células se lavaron una vez con PBS frío, se retiró el PBS y se fijaron las células adicionando 1ml de formaldehído al 3.8% en PBS, incubando a temperatura ambiente por 30 min.

Se retiró el formaldehído y se hicieron tres lavados con 2 ml de PBS por pozo, se permeabilizó con 400 μ l de PBS-Tritón X-100 (PBS, Tritón X-100 0.5% ICN Biomedical Inc.) incubando por 5 min a temperatura ambiente. Se lavó dos veces con 2 ml de PBS por pozo, se adicionaron 500 μ l del anticuerpo primario, en PBS, y se incubó toda la noche a 4° C.

Transcurrido el tiempo de incubación, con el anticuerpo primario, se lavó tres veces con PBS, se adicionaron 400 μ l de un anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón, conejo o rata, producido en cabra acoplado a un fluoróforo (Molecular Probes) en una dilución 1:1000 y se incubó por 4 h a 4° C. Se lavó dos veces con 2 ml de PBS por pozo, se retiró el PBS del segundo lavado y se adicionó 1 ml por pozo de DAPI (4'6-diamidino-2-fenil-indol, 1mg/ml, SIGMA) en una dilución 1:12,000 en PBS y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se hicieron dos lavados con PBS (2 ml de PBS por pozo).

d) Montaje y análisis de muestras: En un portaobjetos, se invirtió cada cubreobjetos sobre 2 μ l de una solución PBS 10% glicerol y se selló con barniz. Cada una de las muestras fue analizada por microscopía de fluorescencia, con los objetivos 20x y 63x, en un microscopio Axiovert Zeiss. El mismo procedimiento se usó en la preparación de las muestras en las que se estudió la localización de proteínas virales y celulares por separado.

Estudio de la cinética de acumulación de DBP por análisis tipo Western

a) Infección. Se infectaron 2.5×10^6 células HFF, usando el procedimiento descrito anteriormente, con el virus correspondiente (Ad5, S380, A143, y Hr6), se cosecharon a las 8, 12, 16, 24, 36, 48 y 72 hpi, en cada caso.

b) Lisis. Las células de la pastilla, obtenida al cosechar, se lisaron en 200 μ l de buffer de lisis NP-40 (Tris HCl 25mM pH 8.0, NaCl 50 mM, NP-40 0.5% (Nonidet P-40), SDS 0.1% (Dodecilsulfato de sodio), 20 μ g/ml PMSF (Fenilmetilsulfonilfluoruro), 20 μ g/ml Leupeptina, 20 mg/ml aprotinina, 30 min a 4°C y se centrifugaron a 800g por 10 min. El sobrenadante se recuperó y se guardó a -20°C hasta utilizarse.

c) Análisis por Western. Para el análisis de las proteínas por electroforesis en geles desnaturalizantes, se tomaron 25 μ l de cada muestra y se mezclaron con 5 μ l de buffer de carga Laemmli 6x (Tris HCl 125 mM pH 6.7, SDS 6%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.1% y beta-mercaptoetanol 250 mM). Se incubaron las muestras por 5 min a 95°C, y se centrifugaron 30 seg a 14000 rpm y se cargaron en geles de poliacrilamida al 10%.

Las proteínas fueron transferidas por electrotransferencia semiseca a membranas de nylon (Millipore) utilizando un sistema de tres buffers: i) Buffer ánodo I (Tris 0.3 M, metanol 10%, pH 10.4); ii) Buffer ánodo II (Tris 25 mM, metanol 10%, pH 10.4); iii) Buffer cátodo (Tris base 25 mM, glicina 40 mM, metanol 10%, pH 9.4) a 120mA, por 2 h.

La membrana de nylon fue teñida, con una solución de rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.1%, ácido acético 1%), para verificar la transferencia de las proteínas. Se lavó con agua destilada hasta eliminar el exceso de rojo de Ponceau, y se incubó por 12 h en solución de bloqueo (leche 3.0%, Tween 20 0.5%; en PBS) a 4°C.

Después de tres lavados con solución de lavado (leche descremada 0.03%, Tween 20 0.05%, en PBS), se incubó la membrana por 2 h con el anticuerpo primario (diluido en solución de lavado), y se lavó tres veces 5 min por lavado. Se incubó por 2 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón producido en cabra, acoplado a peroxidasa a una dilución de 1:1000; transcurrido el tiempo de incubación se lavó tres veces y se reveló utilizando un sustrato quimioluminiscente ECL Western Blotting Detection (Amersham Biosciences) y se expuso sobre películas autoradiográficas (Kodak).

d) Anticuerpos. Los anticuerpos utilizados fueron diluidos (a las diluciones correspondientes) en una solución de lavado. El anticuerpo monoclonal B6-8 anti-DBP (Donado por A. Levine) se utilizó a una dilución 1:100; el anticuerpo monoclonal anti-actina (Ac 40 Sigma), 1:1000; el monoclonal anti-p53, 421 (donado por A. Levine), 1:50; y el monoclonal anti-E1B, 2a6 (donado por T. Shenk), 1:50.

e) Eficiencia de síntesis de proteínas. Simultáneamente, para poder verificar la eficiencia de la transferencia, se tiñó el gel con 100 ml de una solución de azul de Coomassie (ácido acético 10%, Coomassie G-250 125 mg) y se eliminó el exceso de colorante con lavados en ácido

acético al 10%. Para determinar la eficiencia de síntesis de proteínas tardías se empleó el protocolo descrito para DBP, utilizando células cosechadas a 28, 36, 48 y 72 hpi.

Inicio de Síntesis de ADN.

a) Infección. Se infectaron células HFF, a 90% de confluencia con una moi de 30 pfu/célula de cada uno de los virus. Después de los tiempos post-infección determinados (8, 12, 16, 24 y 36 hpi) se retiró el medio (DMEM 10% FBS) y se lavó la monocapa con 5 ml de PBS (a 37°C). El contenido de cada caja se cosechó en 1.5 ml de PBS y se centrifugó a temperatura ambiente, por 5 min a 14,000 rpm.

b) Extracción de ADN. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µl de una solución de proteinasa K 100 mg/ml (en un buffer de digestión de proteinasa que contiene: Tris-HCl 20 mM, pH 7.4; EDTA 20 mM, pH 8.0 y SDS 0.5%). Se homogenizó con ayuda del vórtex y movimientos suaves. Y se incubó a 50°C por 12 h.

Pasado el tiempo de incubación con proteinasa K se mezcló suavemente, invirtiendo el tubo, y se agregaron 100 µl de fenol, se agitó suavemente y se agregaron 100 µl de una solución 24:1 de cloroformo/alcohol isoamílico. La mezcla de reacción se agitó suavemente y después se centrifugó por 5 min a 4°C y 14,000 rpm.

Se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo, y se extrajo la fase orgánica (del tubo donde se preparó la mezcla de reacción) con un medio del volumen original, de buffer de digestión de proteinasa K.

Se centrifugó durante 5 min a 4°C y 14,000 rpm, se recuperó la fase acuosa y se colocó en el mismo tubo en el que se recuperó la fase acuosa del primer paso. Se extrajo dos veces más la fase acuosa con un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1, se centrifugó por 5 min a 4°C y 14,000 rpm para separar las fases. A la fase acuosa obtenida al final de estas dos extracciones se le agregaron 300 µl de acetato de amonio a una concentración de 10 M y se mezcló suavemente, después se agregaron 2.5 volúmenes (750µl) de etanol absoluto frío y se mezcló suavemente para después almacenarlo a -70°C por 12 h.

Pasadas las 12 h se centrifugó por 15 min a 4°C y 14,000 rpm para obtener una pastilla de ADN y desechar el sobrenadante. Se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70%, invirtiendo varias veces el tubo, después se centrifugando por 15 min a 4°C y 14,000 rpm (se repitió dos veces más el lavado). Se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla por 15 min a temperatura ambiente. Por último se resuspendió el ADN en 100 µl buffer TE, pH 7.5 (Tris-HCl 100 mM, pH 7, y EDTA 10 mM pH 8) y se almacenó a 4°C.

PCR. De cada uno de los virus se tenían 5 tiempos post-infección (8 h, 12 h, 16 h, 24 h y 36 h) y de cada tiempo se hicieron 5 diluciones (10, 100, 1000, 10 000, y 100 000). Además se tuvo como control negativo el ADN de células HFF no infectadas, “mock” 8h y “mock” 36h, y como control positivo el ADN genómico de Ad5 que se sabe que está a una concentración de 95 ng/μl; de ambos controles se hizo el mismo número de diluciones que para cada uno de los virus.

Otro control negativo utilizado en este experimento fue el producto de PCR de una mezcla de reacción en la cual no se adicionó templado.

Oligos. Los oligos que se utilizaron para amplificar secuencias de ADN viral hibridan en la región central del genoma, cercano al promotor ML. La secuencia seleccionada para el diseño de los oligos abarcó un segmento del genoma de Ad5 que va del par de bases 6000 al 7000 (dentro de esta secuencia cae el ML). Dicha secuencia fue introducida en un programa llamado amplifex, como resultado se generaron un grupo de posibles pares de oligos, a los cuales se les hicieron pruebas para determinar el porcentaje de formación de dímeros y formación de estructuras secundarias que interferían con la reacción de PCR y síntesis del amplicón de interés. Se seleccionaron los siguientes oligos:

F3´-5´ML6000961: TGGCGCGCACGTAATCGTATAG (T_m= 68.09) y

R5´-3´ML6000961: TCCAACCTCACATGCCATCTTCAGG (T_m=68.01).

Estos oligos fueron sintetizados en la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT/UNAM). Cada oligo se diluyó a una concentración 60pM para poder ser usado en la mezcla de reacción de PCR. La composición de la mezcla de reacción utilizada para todas las muestras se muestra en la tabla 2.

	[] Final	Vol. Reacción 100μl	Vol. Reacción 25μl
Buffer PCR 10x	1x	10 μl	2.5 μl
MgCl₂ 50mM	4.5mM	9μl	2.25 μl
Primer 1	0.5μM	2μl	0.5 μl
Primer 2	0.5μM	2μl	0.5 μl
Templado	100ng	8μl	2.0 μl
4 dNTP´s 10mM	0.2 mM	2μl	0.5 μl
Taq Pol 5u/μl	2.5 u	0.5μl	0.125 μl
Agua	Cbp vol Rxn	66.5μl	16.225 μl

TABLA 2. COMPONENTES DE LA MEZCLA DE REACCIÓN UTILIZADA PARA EL PCR.

Las condiciones de reacción utilizadas en el termociclador en el que se corrió el PCR fueron: 29 ciclos, 1 min 94°C (desnaturalizar), 1 min 55°C (annealing), 1 min 72°C (extensión), 1 ciclo 7 min 72°C (extensión).

RESULTADOS

Distribución de la proteína E1B-55kDa en células HFF infectadas con el virus silvestre (Ad5wt), y los mutantes A143, Hr6 y S380. En células HFF infectadas con el virus silvestre, se identificaron tres distribuciones generales: i) distribución difusa de la proteína en todo el núcleo; ii) en estructuras en forma de puntos; y iii) en estructuras en forma de anillos (Figura 5). Dichas estructuras coinciden con las que ya han sido descritas para la distribución de E1B en células HeLa infectadas con el virus wt.

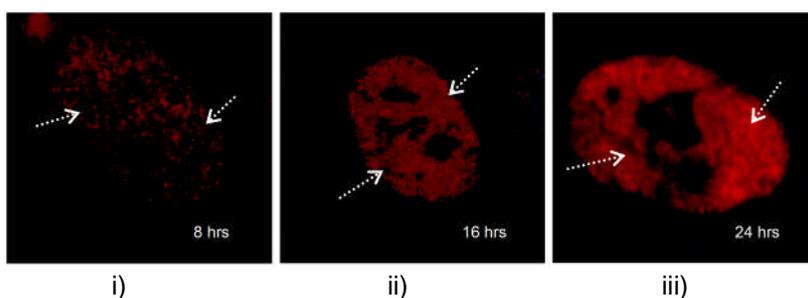


FIGURA 5. DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA E1B.

Imágenes representativas de la distribución de la proteína E1B, observada en las células infectadas con el virus wt. Se identificaron 3 patrones o estructuras: i) puntos, ii) difusa en todo el núcleo, y iii) anillos.

Sabemos que la E1B tiene una cinética de acumulación cronológica que se puede resumir en tres pasos: i) La proteína entra al núcleo y se distribuye en todo el núcleo, dando una apariencia difusa relativamente homogénea, ii) al aumentar la concentración de la proteína, ésta se acumula formando puntos y por último, iii) la acumulación y reorganización de la E1B en estructuras con forma de anillos. Esta cinética de distribución es dinámica y se sabe que estos anillos son los sitios en los que se replica y transcribe el genoma viral, y que la localización de la proteína E1B en estos anillos es necesaria para que se lleve a cabo la exportación selectiva de los ARNm virales tardíos.

La cuantificación del número de células que presentó cada una de las distribuciones de la E1B (ver materiales y métodos), nos permitió medir la eficiencia con la cual es reclutada a los centros de replicación.

Cada una de las distribuciones descritas para la E1B se observó a lo largo del ciclo de infección. La distribución difusa en núcleo se observó a partir de las 8 hpi, alrededor de las 16 hpi, la proteína E1B se acumuló en el núcleo de todas las células infectadas. A la par con este incremento de concentración de E1B en el núcleo, y desde las 8 hpi, observamos la formación de puntos. Mientras que la formación de anillos la observamos inicialmente a las 16 hpi, tiempo en el cual disminuyó la distribución difusa, y la distribución en forma de puntos.

Los patrones de distribución descritos durante la infección con Adwt son observados durante la infección con los mutantes A143 y S380 (excepto en el caso del mutante Hr6 que no sintetiza la E1B). Observamos que la síntesis de la proteína E1B no es alterada durante las fases

temprana y tardía del ciclo de replicación, en los mutantes (A143 y S380), con respecto a Ad5wt, pero la eficiencia con la que la E1B se redistribuyó en el núcleo de las células infectadas mostró marcadas diferencias, entre el Ad5wt y los mutantes.

En las células infectadas con el virus A143, en ausencia de la interacción con la proteína Orf6, no se observa a la E1B en los anillos, sino que se mantiene en puntos y difusa, indicando que la E1B no es reclutada a los centros de replicación. En contraste, en las células infectadas con el mutante S380, la proteína E1B se observó en anillos en un mayor porcentaje de las células infectadas, por lo que parece ser reclutada con mayor eficiencia a los centros de replicación.

Además, en las células infectadas con el mutante S380, la E1B no se localizó en puntos para la fase tardía, lo que sugiere que la proteína es reclutada a los centros de replicación con mayor eficiencia que en la infección con Ad5wt (ver Figura 6).

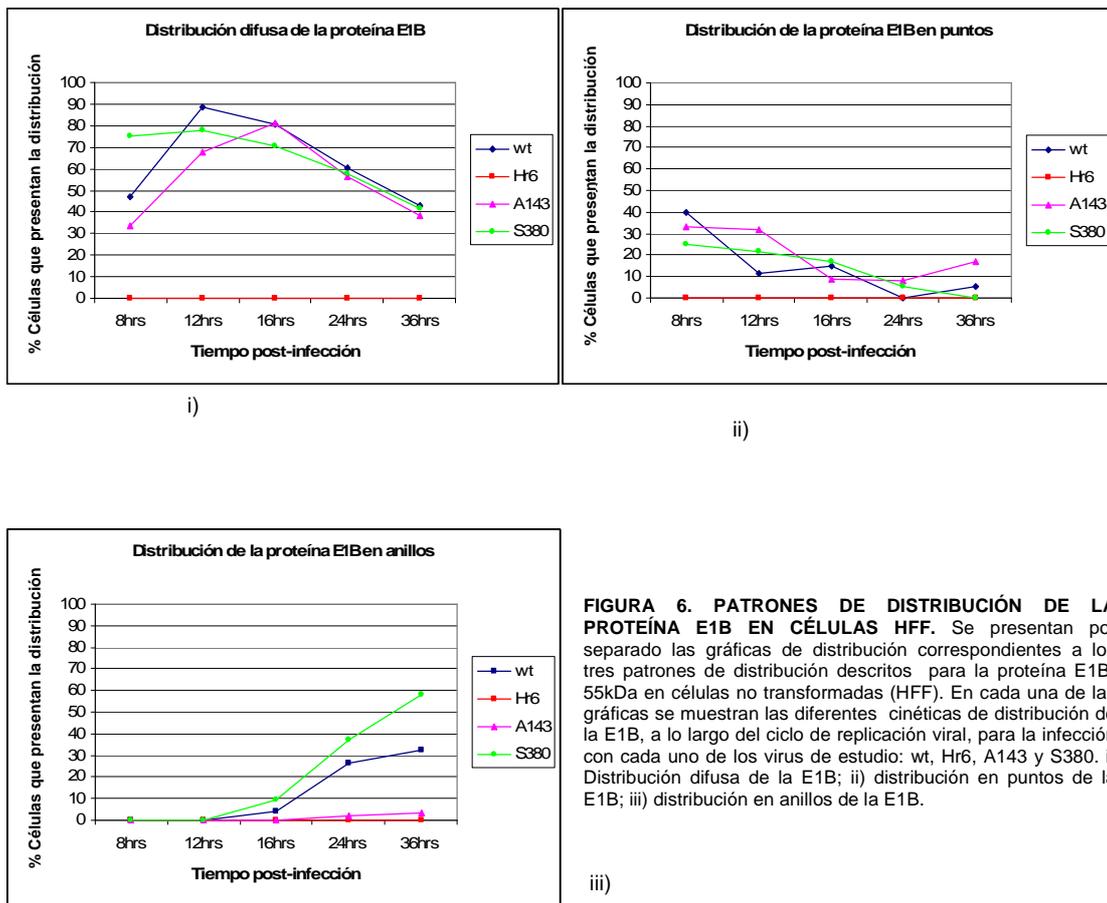


FIGURA 6. PATRONES DE DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA E1B EN CÉLULAS HFF. Se presentan por separado las gráficas de distribución correspondientes a los tres patrones de distribución descritos para la proteína E1B-55kDa en células no transformadas (HFF). En cada una de las gráficas se muestran las diferentes cinéticas de distribución de la E1B, a lo largo del ciclo de replicación viral, para la infección con cada uno de los virus de estudio: wt, Hr6, A143 y S380. i) Distribución difusa de la E1B; ii) distribución en puntos de la E1B; iii) distribución en anillos de la E1B.

Distribución de la proteína DBP en células HFFs infectadas con el virus wt, y en los mutantes Hr6, A143 y S380. Se identificaron tres patrones diferentes de distribución en el núcleo de las células infectadas con el virus silvestre (Ad5wt), los cuales coinciden con los descritos en células transformadas (HeLa): i) distribución difusa en el núcleo, ii) puntos, y iii) anillos (ver Figura 7).

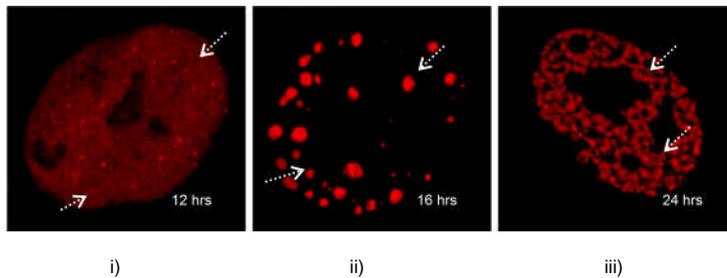


FIGURA 7. PATRONES DE DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA DBP. Imágenes representativas de la distribución de DBP, en la infección de células HFF con el virus wt (moi30). i) Difusa en todo el núcleo, ii) en forma de puntos, y iii) formando anillos (centros de replicación viral).

En los mutantes S380 y Hr6, el inicio de la formación de anillos se observó desde antes de las 16 h, es decir, durante la fase temprana del ciclo de replicación viral. Es importante notar que la ausencia de la proteína E1B, en el mutante Hr6, no limitó la formación de anillos de DBP (zonas de replicación del genoma viral), ya que se observaron porcentajes de incidencia similares a los observados en la infección con el Ad5wt (ver Figura 8).

En contraste, la ausencia de la interacción entre las proteínas E1B y AP5, característica del fenotipo del mutante S380, parece haber favorecido el reclutamiento de DBP a los anillos. La formación más eficiente y a tiempos más tempranos de las estructuras de anillos en células infectadas con S380 correlacionó con una mayor eficiencia de reclutamiento de la E1B a los anillos descrita en la sección anterior.

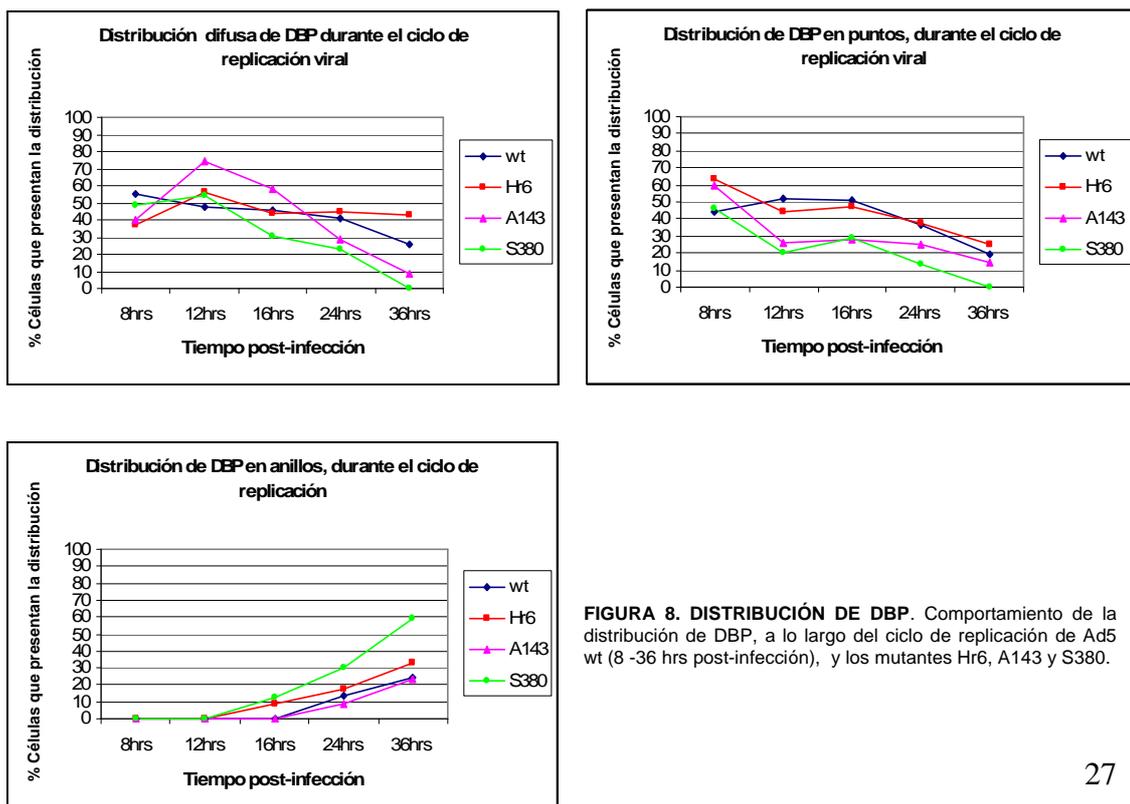


FIGURA 8. DISTRIBUCIÓN DE DBP. Comportamiento de la distribución de DBP, a lo largo del ciclo de replicación de Ad5 wt (8 -36 hrs post-infección), y los mutantes Hr6, A143 y S380.

Distribución de PML en células HFFs no infectadas. Se observó la presencia de estructuras descritas para la proteína PML en el núcleo de células normales, conocidas como PODs. Se ha reportado que los PODs se encuentran en un número que varía con el tipo celular entre 10 y 30. En el caso de las células HFF se observó que este número está por encima del reportado (Figura 9).

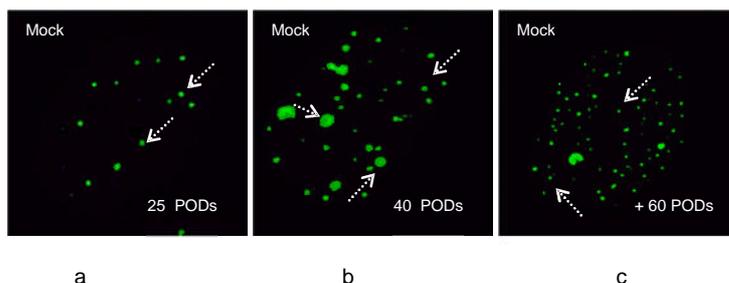


Figura 9. DISTRIBUCIÓN DE PML EN EL NÚCLEO DE CÉLULAS HFF NO INFECTADAS. Imágenes representativas de la distribución de los PODs en células mock. a) En las células con núcleos “pequeños” 25 PODs, b) células con núcleos de tamaño intermedio, el número de PODs es 40, c) en células con núcleo “grande” el número es superior a los 60 PODs.

Se ha reportado que en las células no infectadas, a 80-90% de confluencia, la proteína PML se encuentra sólo en el núcleo (Melnick & Licht, 1999) y conserva la estructura en forma de puntos. Los experimentos realizados en células transformadas han permitido determinar que la infección por Ad induce una reorganización drástica de la proteína PML que altera la forma de puntos a “tracks” (Doucas *et al.*, 1996).

Este cambio es detectado durante la fase temprana de la infección, antes de la formación de los centros de replicación viral, y es inducida por la proteína viral Orf3; la reorganización de PML no ha sido observada en células infectadas por virus mutantes incapaces de dirigir la síntesis de la proteína Orf3, y la síntesis de esta proteína, en ausencia de las demás proteínas virales es suficiente para la formación de los tracks que contienen PML (Doucas *et al.*, 1996).

La reorganización dinámica de los PODs podría estar estrechamente relacionada con la organización de los centros de replicación viral. Por lo tanto, la cuantificación de las estructuras que contienen PML nos permitió analizar si existen cambios en la dinámica de alteración de PML (ver Figura 10), comparando lo que sucede en wt y relacionando esos cambios con los fenotipos conocidos de los mutantes.

Esto último es especialmente importante, ya que las interacciones que se establecen entre E1B, Orf6, Orf3, p53 y AP5, son determinantes para la eficiencia de exportación de los ARNm, síntesis de proteínas tardías, producción de progenie, y posiblemente, para una síntesis eficiente de ADN viral.

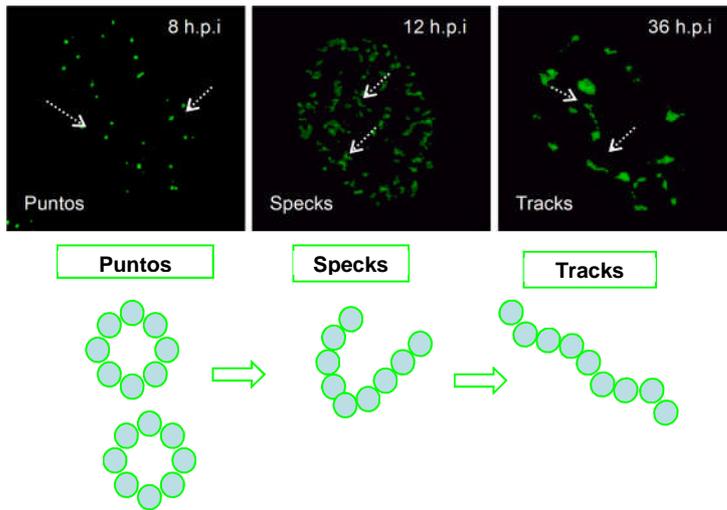


Figura 10. DISTRIBUCIÓN DE PML. Imágenes representativas de la alteración en la organización nuclear de PML en células HFF infectadas con Ad wt. i) puntos, ii) specks, iii) tracks. En esta misma figura, se muestra debajo de cada una de las fotos de microscopía de fluorescencia una caricatura de la alteración correspondiente de PML,

Distribución de PML en células infectadas con Ad5wt y los mutantes Hr6, A143 y S380.

Se establecieron tres estructuras características en las que se distribuye la proteína PML dentro del núcleo de la célula infectada a lo largo del ciclo de replicación viral. Estas tres estructuras son: puntos, “specks”, y “tracks”.

A las 8 hpi la PML se encontró en puntos al igual que en las células no infectadas, pero se observó una ligera alteración de estas estructuras, ya que aparecen como puntos alargados (para facilitar la distinción entre las estructuras de los patrones de distribución identificados, se consideran como puntos).

A partir de las 12 hpi se observó que los puntos coexistían con estructuras aún más alargadas identificadas como “specks”. De igual manera, conforme avanzó el ciclo de replicación, incrementó la presencia de estructuras de PML en forma de “tracks” (ver Figura 11).

La presencia y distribución de cada una de las estructuras alteradas de PML difiere entre el virus silvestre y los mutantes a lo largo del ciclo de replicación. Sin embargo, las diferencias son difíciles de interpretar (ver Figura 12).

En la infección con el mutante A143 parece haber una alteración en la dinámica de distribución de la PML en comparación con la del virus wt, ya que la transición de “specks” y la de “tracks” se ve favorecida, ya que no observamos puntos en ninguna de las células analizadas a las 8 hpi (Figura 11). El fenotipo característico de este mutante es la inhibición de la interacción entre las proteínas virales Orf6 y E1B, por lo que esta distribución correlaciona con la ausencia del complejo E1B-E4 (ver discusión).

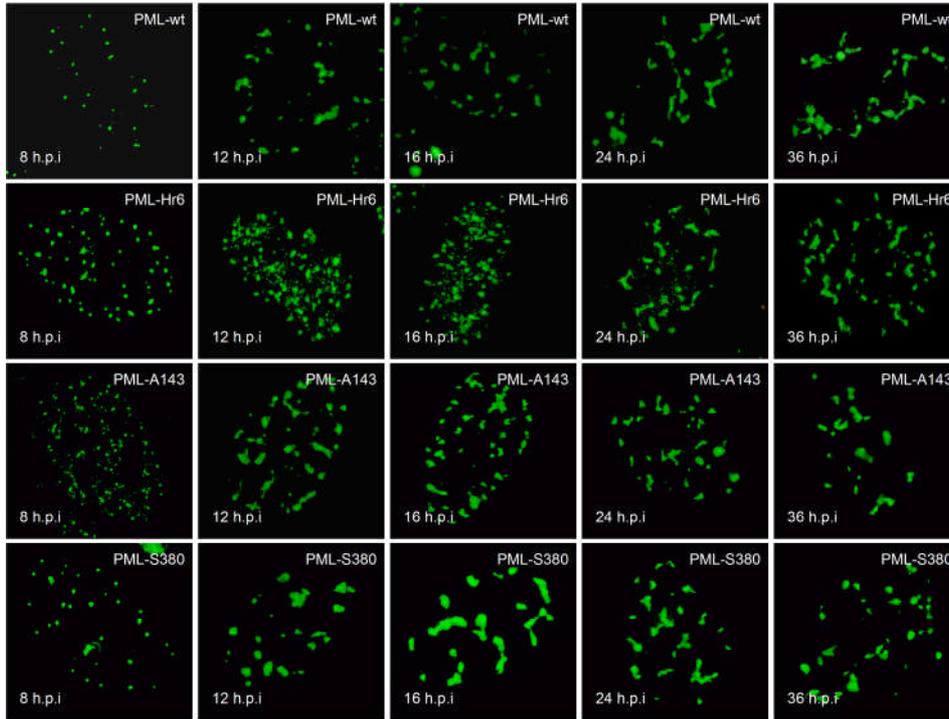


FIGURA 11. DISTRIBUCIÓN DE PML EN CÉLULAS HFF INFECTADAS. Imágenes de inmunofluorescencia representativas para la distribución de PML en la infección con Ad5wt, Hr6, A143 y S380, a lo largo del ciclo de replicación (8-36 horas post-infección).

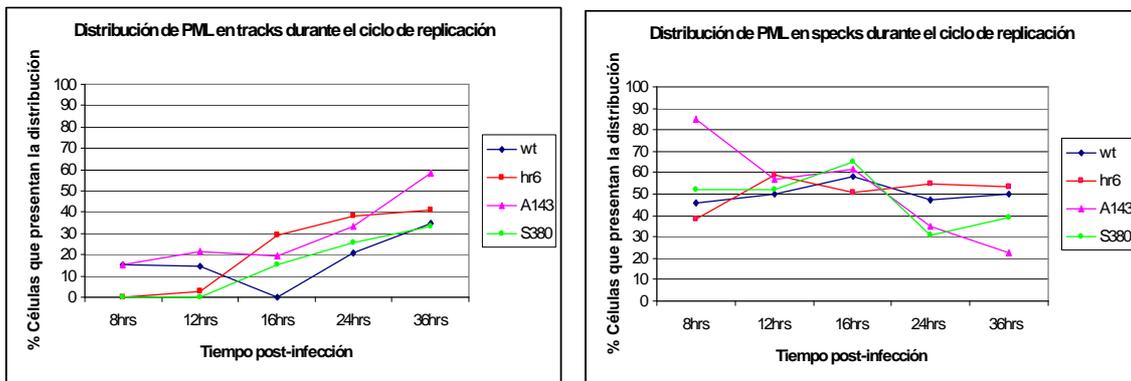


FIGURA 12. CINÉTICA DE LAS ESTRUCTURAS DE PML A LO LARGO DEL CICLO DE REPLICACIÓN. Cuantificación del porcentaje de estructuras de PML (puntos, specks, tracks) en células infectadas con el virus wt y los mutantes Hr6, A143 y S380.

Distribución de la proteína p53 en células HFF infectadas con Ad5wt y los mutantes.

En células no infectadas la proteína p53 se localiza tanto en núcleo como en citoplasma en una distribución punteada difusa. En la figura 13 se muestran las imágenes representativas.

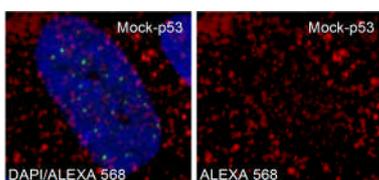


FIGURA 13. DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA p53 EN CÉLULAS HFF NO INFECTADAS (mock). Se muestra un campo de células teñidas con DAPI (azul), y anti-p53 (Alexa 568 (rojo) (izquierda). Y el mismo campo con la tinción específica para p53, Alexa 568 (derecha).

En la infección con el virus Ad5wt se observó acumulación de la p53, en núcleo, a partir de las 8 hpi. Observándose una tendencia de distribución de la proteína p53 de citoplasma a núcleo, durante la fase temprana del ciclo de replicación de Ad.

Durante el inicio de la fase tardía, 24 hpi, la señal de la p53 en el núcleo disminuyó, y aumentó el número de cuerpos citoplásmicos. Estos cuerpos citoplásmicos se localizaron en la periferia del núcleo como se puede observar en la figura 14.

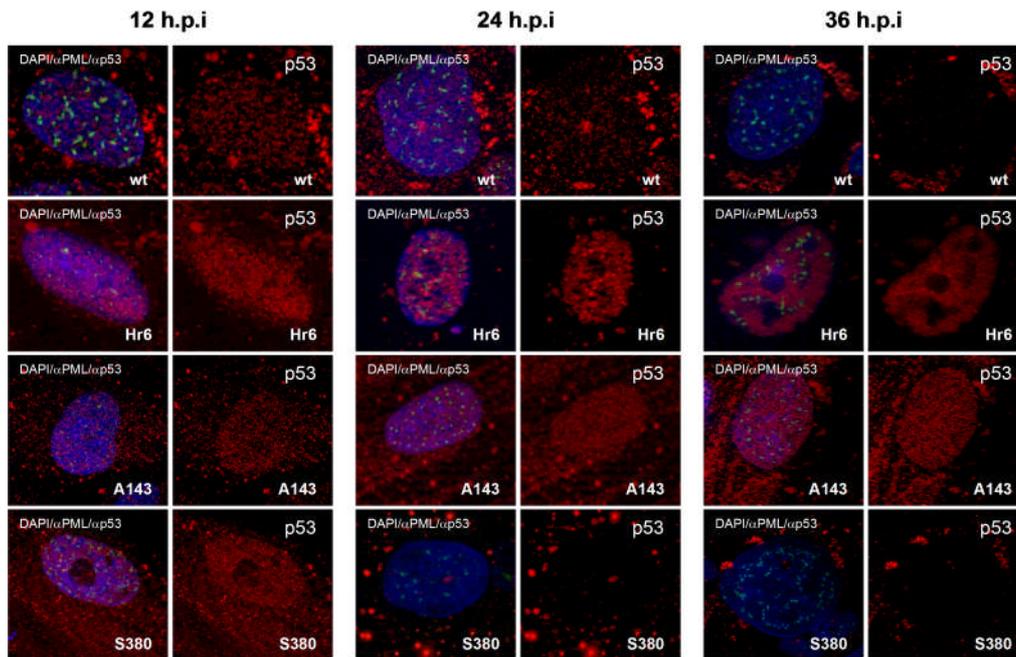


FIGURA 14. DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA p53 EN LAS CÉLULAS INFECTADAS CON EL VIRUS wt Y LOS MUTANTES Hr6, A143 Y S380. Imágenes representativas de la distribución intracelular de la proteína p53 en células infectadas con adenovirus. Para cada uno de los virus se seleccionaron sólo las imágenes representativas de la distribución de p53, aquellas en las que se tiene un patrón característico de distribución observado a las 12, 24 y 36 horas post-infección. Dos paneles por tiempo post-infección: en el izquierdo se muestra la sobreposición de las señales para DAPI, en azul (DNA); Alexa 568, en rojo (p53); y Alexa 488, en verde, (PML). En el panel de la derecha, sólo se muestra la señal de Alexa 568, correspondiente a la distribución en núcleo y citoplasma de la proteína p53 (en rojo).

En las células infectadas con el virus mutante S380, después de las 16 hpi, se observó una redistribución de la p53 a cuerpos citoplásmicos localizados en la periferia nuclear; tal como describimos para las muestras de células HFF infectadas con el virus silvestre. En las células infectadas con los mutantes Hr6 y A143 (ver Figura 14), observamos que la acumulación nuclear de p53 se mantuvo a lo largo del ciclo de replicación. Con la diferencia de que en las células infectadas con el virus A143 la p53 se acumuló en núcleo y aumentó en citoplasma a lo largo del ciclo de replicación, mientras que en Hr6, la proteína se acumuló sólo en el núcleo y no se observó en citoplasma (ver Figura 15).

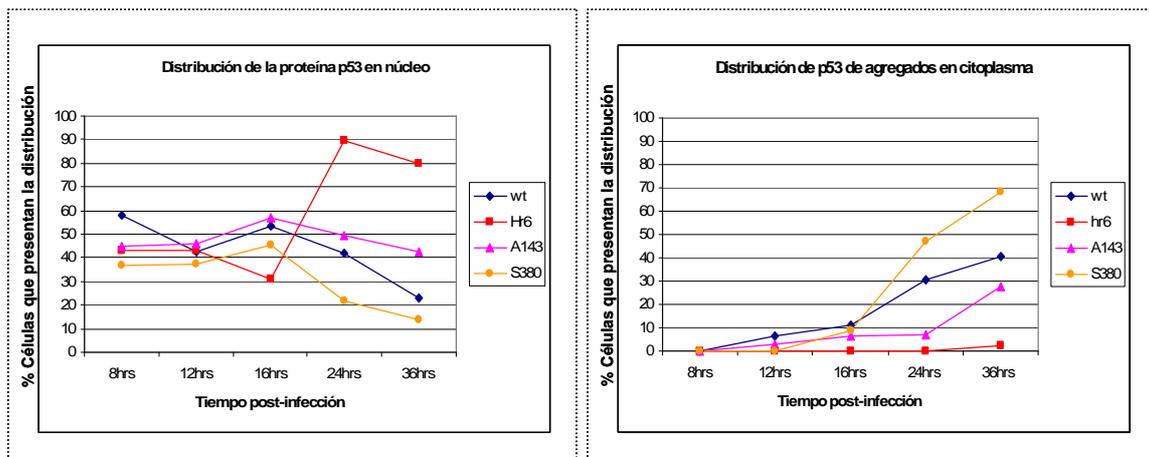


FIGURA 15. CINÉTICA DE LA REDISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA p53 A LO LARGO DEL CICLO DE REPLICACIÓN. Comportamiento de la cinética de redistribución de p53 en las células infectadas con wt y los mutantes a lo largo del ciclo de replicación.

Distribución de la proteína Orf3 en células HFF infectadas con el virus Ad5wt y los mutantes Hr6, A143 y S380. La proteína Orf3 se encuentra tanto en núcleo como en citoplasma. En núcleo se encontró en “tracks” y “specks” (que co-localizaron con las estructuras de PML), y en citoplasma en puntos pequeños y grandes. Se detectó dentro del núcleo desde el primer tiempo analizado, 8 hpi, tanto en células infectadas con el virus Ad5wt, como con cada uno de los mutantes (ver Figuras 16 y 17). A partir de las 24 hpi, (tiempo en el que inicia la fase tardía del ciclo de replicación de adenovirus en células HFF) se observaron pequeños agregados de la proteína Orf3, que rodean el núcleo de la célula, y que presentaron una mayor intensidad de señal.

La distribución citoplasmática de la proteína en células infectadas con wt, A143 y S380 fue muy similar; en contraste, como se muestra en la figura 16, con el mutante Hr6, los agregados citoplasmáticos fueron de mayor tamaño y abundancia, formando casi una envoltura perinuclear.

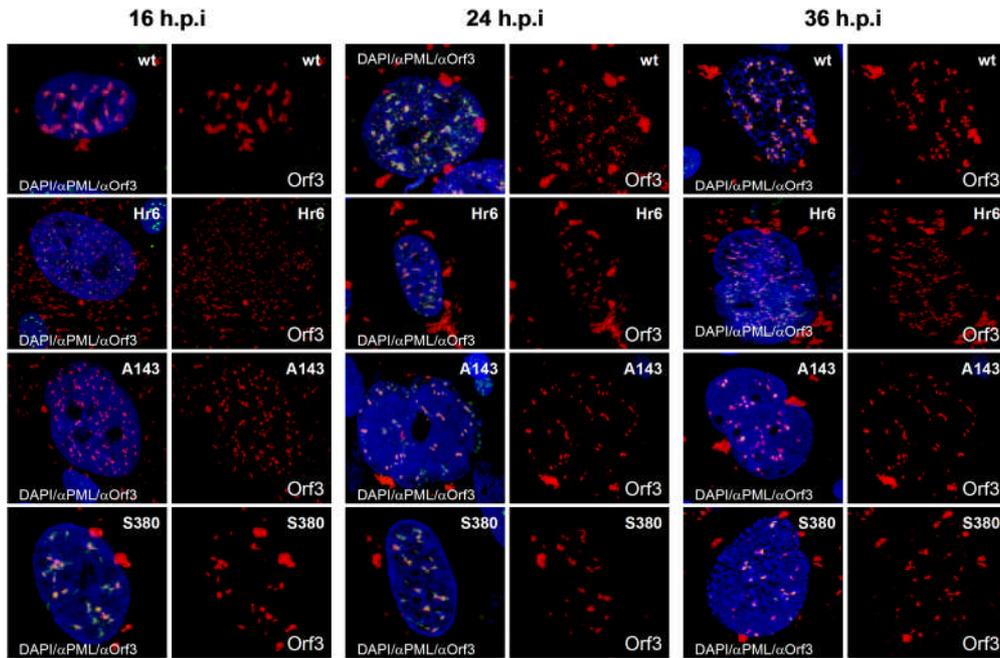


FIGURA 16. DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA Orf3 EN LAS CÉLULAS INFECTADAS CON EL VIRUS wt Y LOS MUTANTES Hr6, A143 Y S380. Imágenes representativas de la distribución intracelular de la proteína Orf3 en células infectadas con adenovirus. Para cada uno de los virus se seleccionaron sólo las imágenes representativas de la distribución de Orf3, aquellas en las que se tiene un patrón característico de distribución, observado a las 16, 24 y 36 horas post-infección. Dos paneles (por cada tiempo post-infección): en el de la izquierda se muestra la sobreposición de las señales para DAPI, (en azul); Orf3, Alexa 568 (en rojo); y PML, Alexa 488, en verde). En el panel de la derecha, se muestra sólo la señal de Orf3 (Alexa 568, en rojo), correspondiente a la distribución en núcleo y citoplasma de la proteína.

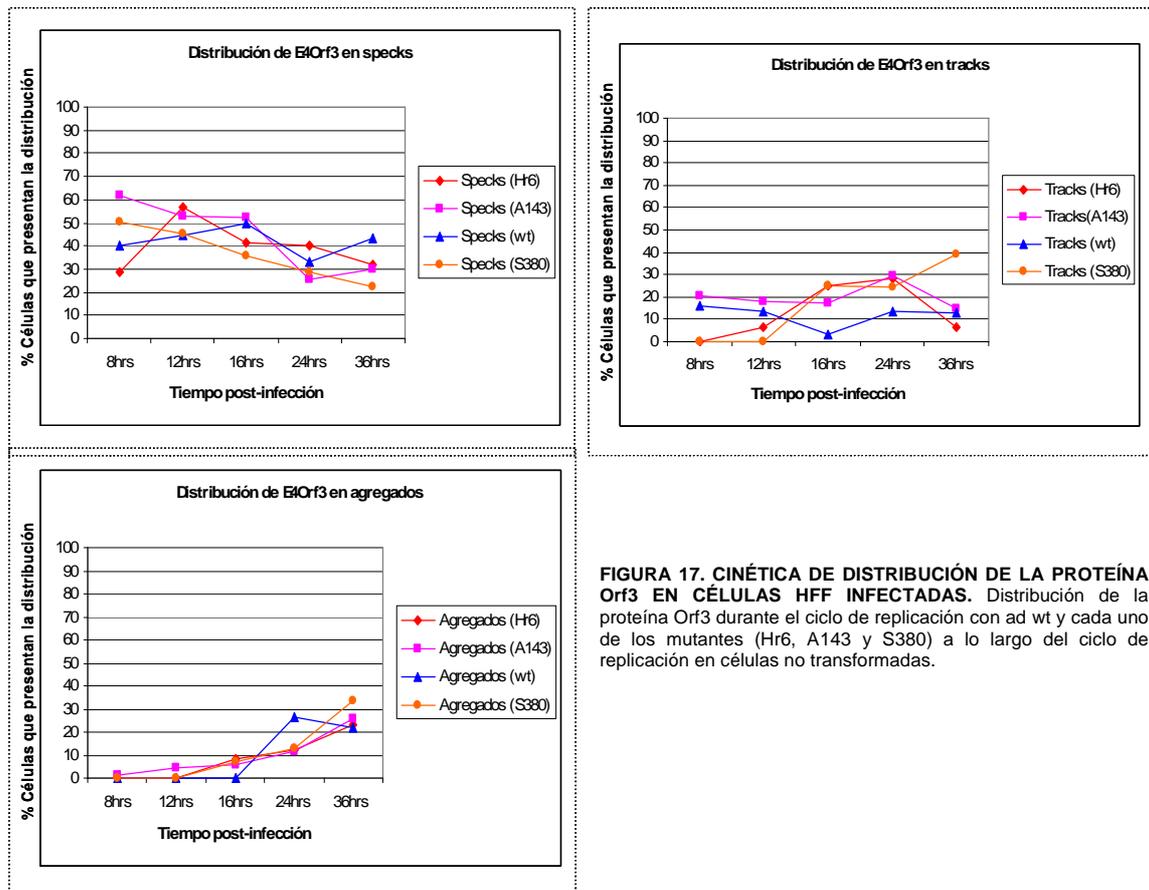


FIGURA 17. CINÉTICA DE DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA Orf3 EN CÉLULAS HFF INFECTADAS. Distribución de la proteína Orf3 durante el ciclo de replicación con ad wt y cada uno de los mutantes (Hr6, A143 y S380) a lo largo del ciclo de replicación en células no transformadas.

Distribución de E1B-AP5 en células HFFs no infectadas. La mayoría de los experimentos para estudiar la distribución de esta proteína se han realizado en líneas de células transformadas (Barral *et al.*, 2005) como HeLa, A549 (derivadas de carcinoma de pulmón), C33A (derivadas de un carcinoma cervical negativo a HPV), MCF7 (tumor de mama); y en cada uno de los casos el análisis de resultados de los ensayos de inmunofluorescencia muestra que en células no infectadas la AP5 se localiza predominantemente en el núcleo.

La distribución de la proteína AP5 en las células HFF se observó en núcleo (Figura 18), tal como se ha descrito para las células transformadas. Sin embargo, no se observó la presencia del fondo difuso de AP5 en citoplasma, presente en algunas líneas celulares como HeLa y A549 (Gabler *et al.*, 1998). Es decir que, la totalidad de la AP5 presente en las células HFF se localizó distribuida de manera homogénea en todo el núcleo de la célula.

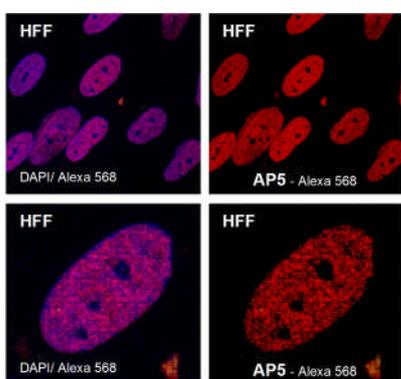


FIGURA 18. DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA AP5 EN CÉLULAS HFFs NO INFECTADAS. Imagen representativa de células sin infectar, muestra la sobreposición de las señales de DAPI (en azul), Alexa 568 (rojo), que corresponden al núcleo de las células y a la distribución de la proteína AP5, respectivamente (panel izquierdo). Se muestra la distribución de la proteína AP5 (panel derecho).

Distribución de AP5 en células infectadas con Ad5wt y los mutantes Hr6, A143 y S380.

La distribución de la AP5 se vio visiblemente alterada a partir de las 12 hpi, pasando de una distribución homogénea a la distribución azarosa de regiones en las que la señal para la proteína era más intensa, a la par con esta distribución también se observó la formación de estructuras en forma de anillos que aumentaron en número al aumentar el tiempo post-infección.

Conforme avanzó el ciclo de replicación, la AP5 se reorganizó en una especie de red, tal como se describió para las células A549. A diferencia de lo descrito para las células A549, en las células HFF observamos que después de las 24 hpi y alrededor de las 36 hpi, la AP5 es reorganizada nuevamente, coexistiendo estructuras en forma de anillo de un tamaño mayor al descrito anteriormente (antes de las 24 hpi), con una distribución difusa de manera homogénea en el núcleo. Aparentemente la cantidad de proteína disminuye a tiempos tardíos del ciclo de replicación, 36 hpi, con respecto a la fase temprana, como se puede observar en la figura 19.

Cabe mencionar que este anticuerpo no nos permitió tener una señal muy bien definida, pero con un análisis detallado pudimos hacer las siguientes observaciones. En las células infectadas con el mutante A143 la proteína AP5 se reorganizó formando aglomeraciones de proteína al azar, en estos se encuentra una mayor cantidad de proteína y por lo tanto, al microscopio se observó una señal más intensa que la observada para la infección con el virus silvestre.

Observamos disminución en la intensidad de señal para AP5 a las 36 hpi Durante la infección con el mutante S380 se observó desde las 8 h.p.i que la proteína AP5 se reorganizó más eficientemente en forma de anillos, que en la infección con el virus silvestre.

La formación de estructuras en forma de anillos grandes, se observó al mismo tiempo que en la infección con wt. Mientras que a las 36 h.p.i, en las células infectadas con el mutante S380 la señal para la proteína presente en el núcleo no disminuyó tan drásticamente, y además se observó lo que parece una nueva reorganización de la AP5 en la que ésta se distribuyó predominante en estructuras en forma de anillos, anillos pequeños, sobre un fondo tenue de AP5 distribuido homogéneamente y de manera difusa en todo el núcleo (ver Figura 19).

En resumen, el incremento en la señal de AP5 y su reorganización en anillos es indispensable durante la fase temprana, esto último apoyándonos en nuestros resultados de los experimentos de IF donde AP5 colocaliza con E1B, DBP y p53 en los centros de replicación. De las interacciones de estas proteínas pareciera que depende la eficiencia del virus durante la fase tardía.

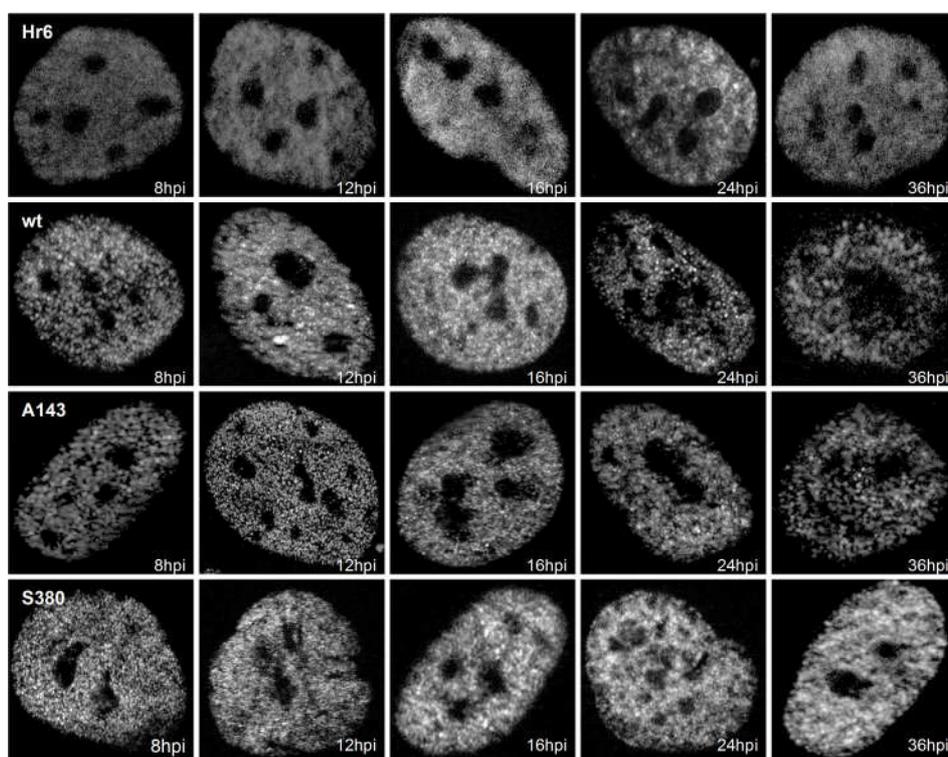


Fig. 19. DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA AP5 EN CÉLULAS HFF INFECTADAS. En esta figura se muestran las imágenes representativas de la reorganización de la AP5 a lo largo del ciclo de replicación del virus wt, y cada uno de los mutantes (Hr6, A143 y S380).

Análisis de la eficiencia de síntesis de ADN viral en células infectadas con Ad5wt y mutantes de E1B. Las muestras se procesaron tal como se describió en la sección de materiales y métodos. La concentración de ADN total de cada una de las muestras, incluyendo el de las células no infectadas, se determinó mediante espectrofotometría. Posteriormente se realizó un primer experimento en el que fueron utilizadas sólo las muestras de ADN extraídas

de las células cosechadas a las 36 hpi, para asegurar de esta manera que nos encontráramos en una ventana de tiempo posterior al inicio de síntesis de ADN, incluso en la infección con los mutantes.

Las diluciones que utilizamos de cada una de las muestras de ADN total, y de los controles, positivo (ADN genómico de Ad5) y negativo (ADN células sin infectar), sirvieron como templado para las reacciones de PCR. Los productos de PCR obtenidos, se analizaron cualitativamente por electroforesis en geles de agarosa al 1%, con lo que inicialmente pudimos establecer la dilución en la que observamos un cambio geométrico (no lineal) en la concentración de ADN.

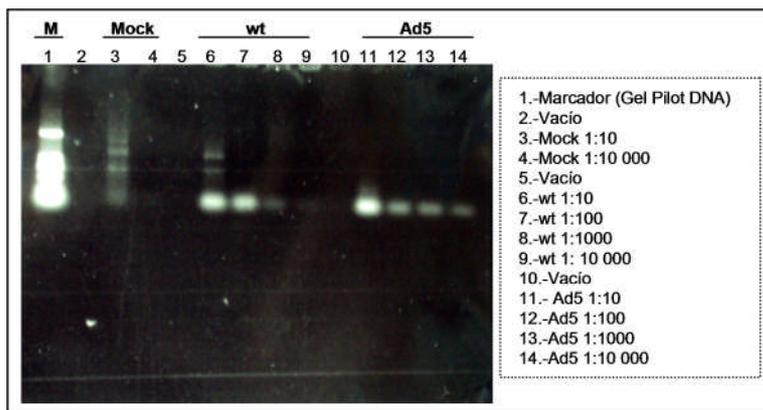


FIGURA 20. PRIMER EXPERIMENTO DE PCR. Gel de agarosa al 1%. Muestra los productos de PCR obtenidos a partir del DNA total de células no infectadas (mock), y células infectadas con el virus wt. En los carriles 11, 12,13 y 14 se muestran los productos de PCR obtenidos a partir de diluciones de DNA genómico de Ad5 (de concentración conocida).

En la figura 20 se muestra el gel en el que se corrieron las muestras de los productos de PCR obtenidos con el templado de ADN de mock, wt y Ad5. En la primera dilución de mock 36 hpi observamos que hay una serie de bandas a lo largo del carril que corresponden a ADN total no amplificado o a amplificaciones inespecíficas, debido a la alta concentración de ADN; estas bandas no se observaron en las siguientes diluciones (1:100, 1:1000, 1:10,000).

Mientras que en la primera dilución de wt se observaron algunas de las bandas que estaban presentes en la primera dilución de mock. Estas bandas no se observaron en la dilución 1:100, pero la señal del amplicón fue tan intensa como la de la dilución anterior. A partir de la dilución 1:1,000 la señal del amplicón disminuyó hasta apenas ser visible en la dilución 1:10,000.

Para los productos de PCR de las diluciones de ADN genómico de Ad5, se observó sólo la banda correspondiente al amplicón. En la dilución 1:10 la banda fue de una intensidad mayor a la observada en la misma dilución de wt, esta intensidad disminuyó conforme aumentó la dilución, tal y como observamos en el ADN total extraído de células infectadas con el virus wt. En ambos casos observamos un efecto de dilución, el cual llegó a un punto en el que el cambio dejó de ser lineal. Esto nos permitió establecer las condiciones para hacer un segundo experimento en el que se mantuvieron las mismas condiciones en los ciclos y temperatura, así como de la mezcla de reacción (buffer, oligos, y dNTPs); pero utilizando como templado las diluciones de DNA total extraídas de células infectadas con cada uno de los mutantes (figura 21).

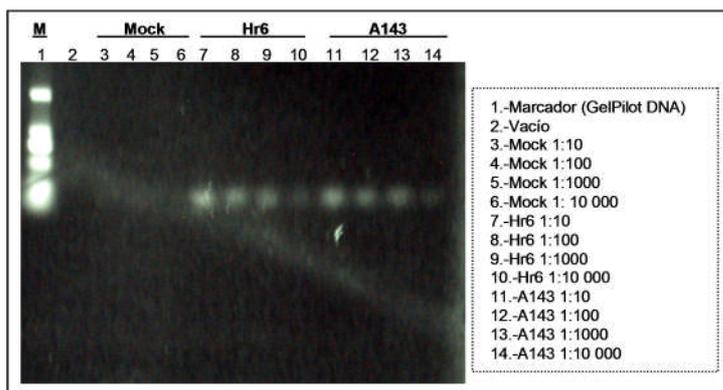


FIGURA 21. SEGUNDO EXPERIMENTO DE PCR. Gel de agarosa al 1%. Muestra los productos de PCR obtenidos a partir del DNA total de células no infectadas (mock), células infectadas con el virus mutante Hr6 y células infectadas con el mutante A143. (GEL 1)

En el primer gel del segundo experimento, en ninguna de las diluciones de mock se observaron las bandas inespecíficas que observamos en el primer experimento. Sin embargo, en los productos de las diluciones de ADN de células infectadas con los mutantes, Hr6 y A143, se observó un comportamiento similar al observado en los productos de PCR de las muestras de wt.

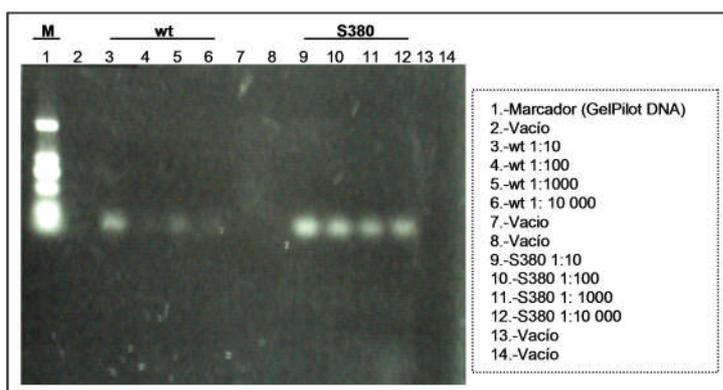


FIGURA 22. SEGUNDO EXPERIMENTO DE PCR. Gel de agarosa al 1%. Muestra los productos de PCR obtenidos a partir del DNA total de células infectadas con wt, y de células infectadas con el mutante S380. (GEL 2)

En el gel número dos del segundo experimento (Figura 22), observamos que a partir de la segunda dilución la concentración de ADN, a juzgar por la intensidad de bandas fue muy similar. En conclusión, del primer y segundo experimentos, los resultados nos permitieron establecer las condiciones que nos permitirían determinar el tiempo post-infección en el que inicia la síntesis de ADN viral.

El protocolo empleado en la purificación del ADN favorece la obtención de ADN viral, por lo que, aunque no es una medida definitiva, la concentración de ADN total nos proporcionó una idea de la cantidad de ADN viral presente en cada una de las muestras. Cualitativamente, en los geles de agarosa al 1%, observamos la misma cinética que en las gráficas que se obtuvieron a partir de los datos de espectrofotometría. Por lo tanto, se confirmó que la cantidad de ADN que se extrajo de las células infectadas con el mutante S380 es mayor que la que se extrajo de las células infectadas con el virus silvestre (Figura 23).

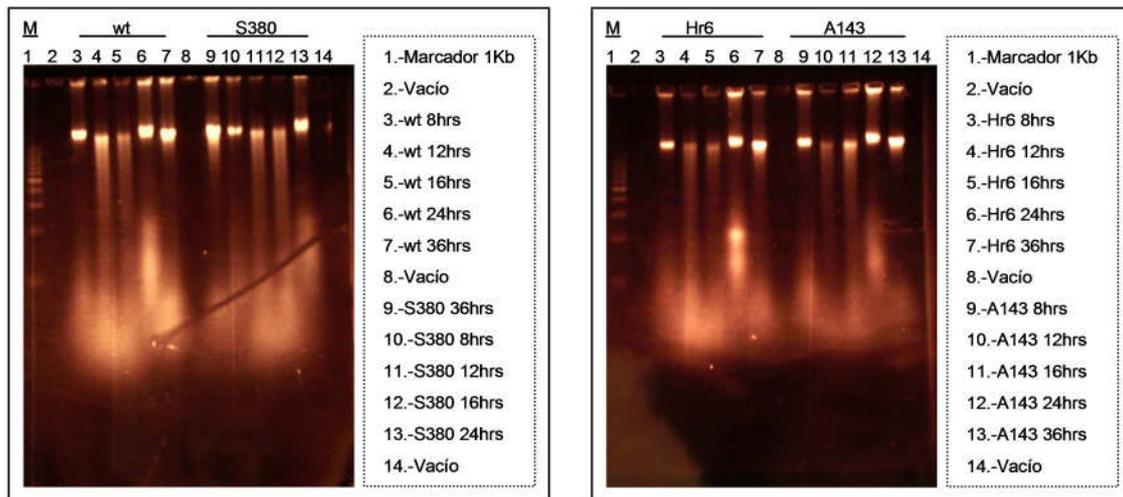


FIGURA 23. ADN TOTAL. Geles de agarosa al 1%. Se cargaron cada una de las muestras de DNA total, de las células infectadas con el virus silvestre y los mutantes (Hr6, A143 y S380). En el gel de la izquierda: las muestras de wt y S380. En el de la derecha: Hr6 y A143.

Como en el segundo experimento de PCR no se observó diferencia entre los productos de PCR con las diluciones del ADN de células infectadas con el mutante S380; para el tercer experimento se hizo una dilución más (1:100,000) por cada tiempo post-infección.

Síntesis de ADN en células HFF infectadas con el virus Ad5wt y mutantes. Nuestros resultados indican que, tanto en wt como en S380, el inicio de síntesis de ADN viral es a las 16hpi. Sin embargo, en contraste con lo que sucede en la cinética de Ad5wt, a las 24 y 36hpi (Figura 24), observamos que en el mutante S380 la diferencia de síntesis es cuando menos dos veces más, con respecto a wt. Estos resultados, en conjunto con los obtenidos de los experimentos de cinética de formación de los centros de replicación viral (E1B y DBP), nos permiten sugerir que en la infección de células HFF con el mutante S380 se da una mayor eficiencia de formación de centros de replicación, lo cual correlaciona con una mayor eficiencia de replicación de ADN viral y a su vez una mayor producción de progenie viral. Con respecto a los otros dos mutantes, en el mutante A143 el inicio de la síntesis de ADN viral se observa hasta las 24 hpi. Esta observación correlaciona con una menor eficiencia de A143, para formar los centros de replicación viral, en comparación con wt, como resultado de la inhibición de formación del complejo E1B-Orf6 (González *et al.*, 2002, González *et al.*, 2006). En células infectadas con el mutante Hr6, observamos que el inicio de la síntesis de ADN viral es muy retardado en comparación con wt o con los mutantes A143 y S380.

Se ha reportado que en el mutante Hr6 la síntesis de ADN viral es impedida significativamente (González *et al.*, 2006); lo cual no es resultado de una entrada retardada a la fase tardía del ciclo de replicación, pues no aumentan las concentraciones relativas de ADN viral acumulado en la infección con el mutante Hr6 (Gonzalez *et al.*, 2006);nuestros resultados concuerdan con lo reportado por González, ya que como podemos observar en la gráfica de la figura 24, a las 36hpi no hay un incremento en las concentraciones relativas de ADN viral en células infectadas con el mutante Hr6. Es necesario realizar nuevamente estos experimentos, optimizando las

condiciones para obtener un punto exacto en el que podamos decir con seguridad que inicia la síntesis de ADN en wt y cada uno de los virus mutantes, o bien confirmar los resultados obtenidos en este trabajo.

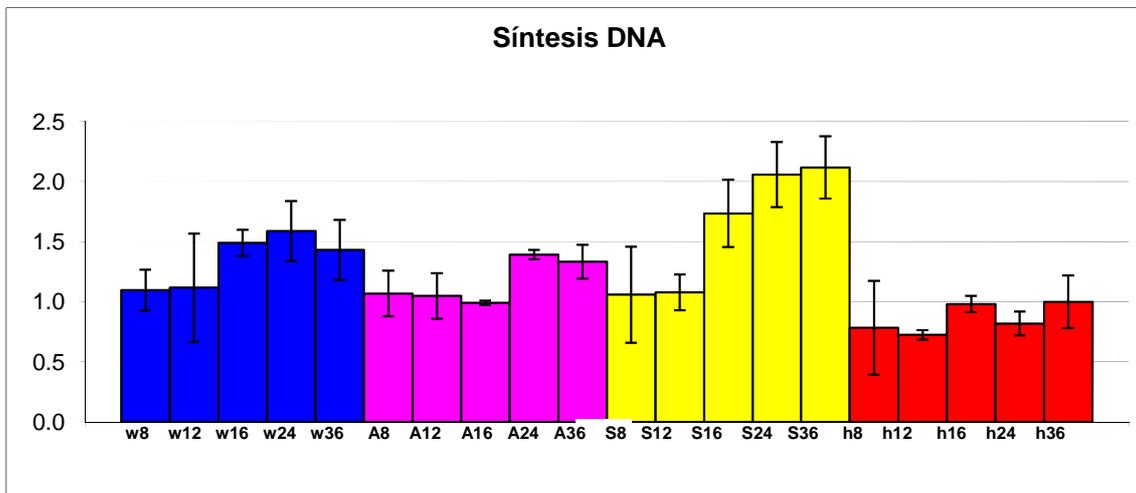


FIGURA 24. Inicio de síntesis de ADN viral en células HFF infectadas con Ad5 wt y mutantes.

SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.

Medición de los niveles de DBP. Sabemos que la proteína DBP juega un papel importante en el ciclo de replicación de adenovirus, está involucrada en la replicación del ADN, control transcripcional y estabilidad de ARNm, y ensamblaje del virus. Es una proteína de 529 aminoácidos con un peso molecular de 59,049 Da que se une a cooperativamente a la cadena sencilla de ADN con gran afinidad. Sin embargo, no sabemos la cinética de acumulación de esta proteína durante el ciclo de replicación de cada uno de los mutantes, en comparación con el virus wt, en células HFF. Por lo tanto, seleccionamos tres tiempos, de los cinco tiempos post-infección, para realizar el análisis de la proteína DBP.

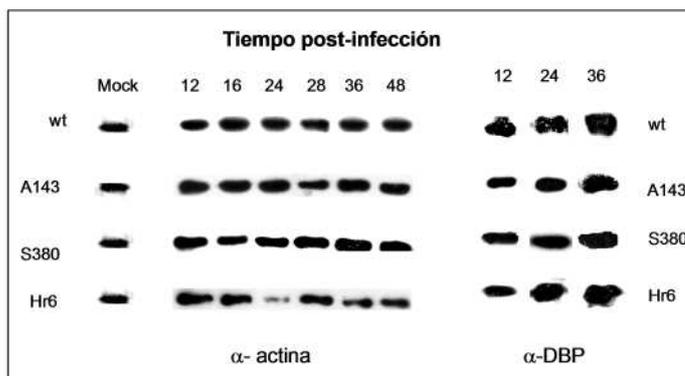


FIGURA 25. WESTERN ANTI-ACTINA Y ANTI-DBP. Se muestran los resultados para cada uno de las muestras de proteína total a las 12, 24 y 36 horas post-infección

La tendencia que se observó en la cinética de acumulación de DBP tanto en el virus wt como los mutantes fue muy similar (Figura 25), y no parece haber diferencias significativas ni en el

tiempo ni el nivel de síntesis total de la proteína. Estos datos sugieren que ninguna de las mutantes tiene un efecto en la síntesis o acumulación de esta proteína temprana.

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

El estudio de las funciones de la E1B durante la fase temprana del ciclo de replicación se propuso debido a que al estudiar mutantes de adenovirus con alteraciones en el gen que codifica para la E1B durante la fase tardía del ciclo de replicación, en células no transformadas, se registraron fenotipos que no se habían descrito en los experimentos realizados con células HeLa (González *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2008; Castillo, Ramírez, González. en preparación). Dichos fenotipos sugieren que la E1B tiene una función durante la fase temprana del ciclo de Ad, la cual no se ha descrito, y en la cual basamos el presente trabajo.

Como resultado de los experimentos de IF para determinar la distribución de la E1B, en células HFF, observamos que la E1B se localiza con mayor eficiencia en los centros de replicación viral, en ausencia de la interacción con la proteína AP5 (mutante S380). Dato relevante de este trabajo ya que estamos reportando un fenotipo que no se había observado para este mutante en células transformadas. Empleando al mutante A143 pudimos determinar que dicha eficiencia para localizarse en los centros de replicación requiere directamente de la interacción con la proteína Orf6. Esta mutación inhibe la interacción entre la E1B y Orf6, lo cual induce un defecto específico en la exportación de los ARNm virales e inhibe la asociación de la proteína E1B con las zonas periféricas de los centros de replicación viral tanto en células HFF, como en células HeLa (González *et al.*, 2002; González *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2008).

Se ha reportado que los centros de replicación viral se pueden identificar fácilmente por IF, utilizando anticuerpos contra la proteína temprana de unión a ADN (DBP). Sin embargo se desconoce el cómo se distribuye la DBP en células HFF a lo largo del ciclo de replicación de Ad5, y si la síntesis de la DBP depende de la presencia de la E1B.

De acuerdo con los resultados de este trabajo, la distribución de DBP en forma de puntos resulta de la acumulación en sitios específicos en los que la proteína se asocia con el ADN viral, y pudiera estar asociada con interacciones proteína-proteína que resultan en un microambiente favorable para el inicio de replicación del ADN viral y formación eficiente de los centros de replicación. Es decir, que la proteína DBP es secuestrada en estas estructuras, y conforme avanza el ciclo de replicación de Ad, durante la fase temprana, el número y tamaño de estas estructuras aumenta.

Lo que nos permitió determinar que la localización de la DBP en los centros de replicación se da con la misma eficiencia aún en ausencia de la E1B. Por lo que concluimos que la E1B no es necesaria para la localización de la DBP en los centros de replicación, lo que sugiere que otras interacciones son las que favorecen dicha redistribución, como en el caso de la ausencia de interacción entre las proteínas E1B y AP5, en el mutante S380.

La redistribución de proteínas celulares por parte de las proteínas virales, durante el ciclo de replicación, tampoco se ha reportado para células HFF. En ausencia de la proteína E1B (Hr6) o en ausencia de la interacción de la E1B con Orf6 (A143) la proteína PML permanece en estructura tipo "tracks", aún durante la fase tardía, lo que podría sugerir un proceso menos eficiente para la formación de los centros de replicación, tal y como lo observamos por IF. Sin embargo, con los resultados de los experimentos realizados con PML, sólo podemos concluir que existen diferencias en cuanto a los patrones de distribución de PML, entre el virus silvestre y los mutantes, los cuales son complejos y difíciles de interpretar.

También observamos, que en las células HFF infectadas, tanto con el virus silvestre como con cada uno de los mutantes, la proteína p53 sufre una redistribución de citoplasma a núcleo, durante la fase temprana del ciclo de replicación. Siendo necesario este evento para que la proteína p53 sea relocalizada en los centros de replicación, donde se ha reportado interacciona con proteínas como AP5, E1B y Orf6. Sugiriendo que la proteína p53 puede tener una participación en la maquinaria de replicación, o bien en la organización de ésta durante la fase temprana del ciclo de replicación.

Por otro lado, también observamos que durante la fase tardía la proteína p53 es excluida hacia citoplasma, en forma de agregados localizados en la periferia del núcleo de las células infectadas. Lo que depende directamente de la interacción de p53 con la E1B, así como de la interacción con el complejo E1B-E4, ya que tanto en el mutante Hr6 (ausencia de la proteína E1B) como en el mutante A143 (no interacción entre las proteínas E1B y Orf6), la proteína p53 continuó acumulándose en el núcleo de la célula infectada. Lo que sugiere que la proteína p53 es estabilizada en el núcleo de manera independiente por las proteínas E1B y Orf6, inhibiendo apoptosis.

Por lo tanto, el que la p53 se relocalice completamente del núcleo a los agregados perinucleares y con mayor eficiencia en las células infectadas por el mutante S380 que en aquellas infectadas por el virus silvestre, coincide con la mayor eficiencia para inhibir apoptosis reportada en 2006 por el grupo de investigación del Dr. Ramón González y tesis de licenciatura de Cardoso y Ramírez (Cardoso 2006; Ramírez 2006); además de correlacionar directamente con la eficiencia de replicación de este mutante reportada en HFF y HeLa.

Otra de las proteínas de interés en este proyecto fue la proteína temprana Orf3. Nuestras observaciones coinciden con lo reportado para HeLa y A549, con respecto a las estructuras descritas para la proteína Orf3 y colocalización de éstas con PML. Además de la formación de agregados de la Orf3, durante la fase tardía, distribuidos en la periferia del núcleo y citoplasma, en los cuales no se observó co-localización con la proteína PML.

Sugiriendo que la redistribución de la proteína PML durante la fase tardía no está relacionada a la interacción con la Orf3, como sucede durante la fase temprana.

Por otro lado, la alteración en los patrones de distribución de la proteína Orf3, en el caso del mutante Hr6, muestra que la proteína E1B puede ser necesaria para la adecuada distribución de la proteína Orf3 a lo largo del ciclo de replicación. Sin embargo, los patrones de relocalización de la proteína Orf3, observados a lo largo del ciclo de replicación, entre mutantes y el virus silvestre, son tan diferentes que es difícil dar una interpretación certera. Será necesario hacer experimentos adicionales para conocer el efecto de las mutaciones en S380, A143 y Hr6, sobre la distribución de la proteína Orf3 a lo largo del ciclo de infección en células HFF. En todo caso, es interesante hacer notar que en la infección con el virus mutante S380 las estructuras en forma de "tracks" permanecen hasta más tarde en la infección.

Los resultados obtenidos en el análisis de la distribución de la proteína AP5, coinciden con los patrones reportados para células A549 infectadas con el virus silvestre. Fue difícil establecer patrones de distribución específicos, como en el caso de las otras proteínas analizadas en este trabajo. Sin embargo, se logró establecer tres distribuciones características (descritas en la sección de resultados), que muestran una reorganización de AP5 exclusivamente nuclear.

Esta reorganización coincide con la co-localización de las proteínas AP5 y p53, en células HFF, lo que apoya la interacción directa que había sido reportada recientemente, en células transformadas.

Por otro lado, la observación de estructuras en forma de anillos de la proteína AP5, que coinciden con los anillos formados por la proteína E1B, en los centros de replicación viral, sugieren que la proteína AP5 es reclutada a los centros de replicación viral, al igual que ha sido reportado para p53.

Sin embargo, al analizar los resultados obtenidos con el mutante S380, la distribución de la proteína AP5 en los centros de replicación viral es completamente independiente de la presencia de la proteína E1B. Además de lo mencionado arriba, nuestros resultados son significativos ya que sugieren que la proteína AP5 podría estar sujeta a degradación por el complejo E1B-E4, y que en ausencia de la interacción entre las proteínas E1B y AP5, la degradación no es inducida (mutante S380).

Todo lo anterior, sugiere que la proteína AP5 tiene un papel determinante en las interacciones que establece la proteína E1B durante el ciclo de replicación de Ad en células no transformadas.

En resumen, como resultado de los experimentos de IF, pudimos determinar la distribución de cada una de las proteínas de interés, en células HFF (Orf3, E1B, AP5, p53, PML, y DBP). En el caso de la proteína DBP los patrones de distribución son muy similares entre silvestre y mutantes, sin embargo no sabemos si la mutación en la secuencia de la proteína la proteína E1B afecta la síntesis de la proteína DBP. Para determinar esto, hicimos un análisis de la cinética de acumulación de la proteína DBP, utilizando Western blot.

A partir de este análisis pudimos determinar que la cinética de acumulación de la proteína DBP, en células HFF, es similar a la observada en HeLa. Los resultados obtenidos de los experimentos en HFF fueron similares a los obtenidos en HeLa, es decir, la cinética de acumulación de la proteína DBP, no difiere entre silvestre y mutantes. Por lo tanto, las mutaciones en la proteína E1B no afectan la síntesis de proteínas virales tempranas, como DBP.

La proteína DBP es la principal componente de los centros de replicación, pero al no haber diferencias en cuanto a síntesis, podemos sugerir que la diferencia en el nivel de síntesis de ADN, que se ha reportado entre el virus silvestre y los mutantes, tanto en células HeLa como en HFF, no se debe a la expresión de genes tempranos como el que codifica para la proteína DBP, sino a la interacción de la proteína E1B con componentes virales y celulares.

Se ha reportado que en células HFF la síntesis de ADN en el virus Hr6 es menos eficiente que en el virus silvestre, lo que nos llevó a preguntarnos si las diferencias en concentración de ADN viral están relacionadas con diferencias en el inicio de síntesis en cada uno de los mutantes. Para poder responder a esta pregunta diseñamos el experimento descrito en la sección de materiales y métodos.

Los resultados obtenidos muestran que en el virus silvestre y los mutantes A143 y S380, la síntesis ocurre entre las 16 y 24 horas post-infección, y además coinciden con lo observado y reportado por González (González *et al.*, 2006), ya que en el mutante Hr6 el inicio de síntesis no se detectó hasta alrededor de las 36 horas post-infección, resultando en una síntesis ineficiente de ADN; que contrasta claramente con una síntesis de ADN viral más eficiente en las células infectadas con el mutante S380 que en las células infectadas con el virus silvestre.

Lo que sugiere que, aunque la proteína E1B es necesaria para el inicio de replicación del genoma, las mutaciones que inhiben la interacción de ésta con las proteínas Orf6 o AP5, no afectan esta actividad al grado de inhibirla. Aunque es necesario confirmar los experimentos de cuantificación de ADN, los datos sugieren que en el mutante S380 a pesar de tener un inicio de

síntesis de ADN similar al del virus silvestre, se observa claramente una mayor acumulación de ADN en el mutante S380.

En conjunto, todos nuestros resultados sugieren que la interacción de la E1B con AP5, aunque tiene un papel importante para la exportación de ARNm virales tardíos puede interferir con la formación eficiente de los centros de replicación, y por lo tanto, con la replicación eficiente del genoma viral. Los resultados sugieren también que las interacciones proteína-proteína en las que participa la E1B, durante la fase temprana del ciclo de replicación, son determinantes para que se establezca una reorganización ordenada de componentes celulares (PML, p53, MRN, además de factores de transcripción y splicing) y virales (Orf6, Orf3, DBP, etc), para la formación de los centros de replicación viral (ver anexo I).

8. PERSPECTIVAS

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos sugerir algunas funciones para la proteína E1B, además de las ya reportadas. Como por ejemplo: i) reorganización eficiente de los componentes nucleares que participan en el ciclo de replicación (mediante la interacción con proteínas virales y celulares); ii) reclutamiento adecuado de los factores necesarios para la formación de los centros de replicación, específicamente favoreciendo el reclutamiento de la proteína DBP; iii) y participación en la formación de agregados citoplásmicos en los que se acumula p53 para su degradación.

Por lo tanto, en trabajo a futuro proponemos el análisis de dichas funciones de reorganización, en células HFF, haciendo uso del conjunto de 13 mutantes conocidos y descritos para la E1B (Yew *et al.*, 1990). Dicho análisis puede ser complementado con experimentos en paralelo, realizados en otros tipos celulares (primarios o de células no transformadas), para descartar la participación de algún componente celular.

Para analizar el reclutamiento adecuado de los factores necesarios para la formación de los centros de replicación proponemos experimentos de inmunoprecipitación, marcaje de proteínas empleando DBP silvestre y mutantes de inserción o delección en DBP.

Mientras que para el análisis de la participación de la E1B en la formación de los agregados citoplásmicos además de la E1B y p53, será necesario considerar interacciones con Orf6, HDM, ubiquitina y AP5.

La distribución de la proteína AP5 en células HFF debe ser caracterizada adecuadamente; repitiendo los experimentos de inmunofluorescencia, empleando el mismo anticuerpo acoplado a diferentes fluoróforos. Será de interés y de suma importancia el determinar la actividad de la

proteína AP5, y de ser posible establecer si es que hay algún tipo de conexión con la maquinaria de exportación (TAP).

9. REFERENCIAS:

Awakumov N, Kajon A, Hoeben R, Mymryk J. 2004. Comprehensive sequence analysis of the E1A proteins of human and simian adenoviruses. *Virology*. 477-92.

Barral P, Rusch A, Turnell A, Gallimore P, Byrd P, Dobner T, Grand R. 2005. The interaction of the hnRNP family member E1B-AP5 with p53. *FEBS Lett*. 2752-8.

Cardoso F, Kato S, Huang W, Flint S, Gonzalez R. 2008. 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*. 339-46.

Chiou S, White E. 1997. p300 binding by E1A co-segregates with p53 induction but is dispensable for apoptosis. *J Virol*. 3515-25.

Debbas M, White E. 1993. Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev*. 546-54.

Dobbelstein M, Roth J, Kimberly W, Levine A, Shenk T. 1997. Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *EMBO J*. 4276-84.

Doucas V, Ishov A, Romo A, Juguilon H, Weitzman M, Evans R, Maul G. 1996. Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev*. 196-207.

Doucas V, Evans R. 1996. The PML nuclear compartment and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 25-9.

Evans D & Hearing P. 2003. Distinct Roles of the Adenovirus E4 ORF3 Protein in Viral DNA Replication and Inhibition of Genome Concatenation. *J. Virol*. 5295-5304.

Evans D & Hearing P. 2005. Relocalization of the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex by the Adenovirus E4 ORF3 Protein Is Required for Viral Replication. *J. Virol*. 6207-6215.

Everett R, Lomonte P, Sternsdorf T, van Driel R, Orr A. 1999. Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition. *J. Cell Sci*. 4581-8.

Everett R. 2001. DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene*. 7266 - 7273.

Everett R, Chelbi-Alix M. 2007. PML and PML nuclear bodies: Implications in antiviral defence. *Biochimie*. 819-30.

Flint S, Gonzalez R. 2003. Regulation of mRNA production by the adenoviral E1B 55-kDa and E4 Orf6 proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*. 287-330.

Fogal V, Sandy P, Zacchi P, Sternsdorf T, Jensen K, Pandolfi P, Will H, Schneider C, Del Sal G, 2000. Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J*. 6185-6195.

Gabler S, Schutt H, Groitl P, Wolf H, Shenk T, & Dobner T. 1998. E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J. Virol*. 7960-7971.

Gonzalez R, Flint S. 2002. Effects of mutations in the adenoviral E1B 55-kilodalton protein coding sequence on viral late mRNA metabolism. *J. Virol*. 4507-19.

Gonzalez R, Huang W, Finnen R, Bragg C, Flint S. 2006. Adenovirus E1B 55-kilodalton protein is required for both regulation of mRNA export and efficient entry into the late phase of infection in normal human fibroblasts. *J. Virol*. 964-974.

Goodrum Felicia D. & Ornelles David A. 1999. Roles for the E4 orf6, orf3, and E1B55-Kilodalton Proteins in Cell Cycle-Independent Adenovirus Replication. *J. Virol*. 7474-7488.

- Halbert D, Cutt J, & Shenk T. 1985.** Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J Virol.* 250-7.
- Harada J, & Berk A. 1999.** p53-Independent and -Dependent Requirements for E1B-55K in Adenovirus Type 5 Replication. *J. Virol.* 5333–5344.
- Harada J, Shevchenko A, Pallas D, Berk A. 2002.** Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J. Virol.* 9194–9206.
- Heise C, Ganly I, Kim Y, Sampson-Johannes A, Brown R, Kirn D. 2000.** Efficacy of a replication-selective adenovirus against ovarian carcinomatosis is dependent on tumor burden, viral replication and p53 status. *Gene Ther.* 1925-9.
- Hofmann T. & Will H. 2003.** Review Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation. *Cell Death Differ.* 1290–1299.
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H. 1997.** Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 25-7.
- Hoppe A, Beech S, Dimmock J, Leppard K. 2006.** Interaction of the adenovirus type 5 E4 Orf3 protein with promyelocytic leukemia protein isoform II is required for ND10 disruption. *J. Virol.* 3042–3049.
- Horridge J, Leppard K. 1998.** RNA binding activity of the E1B 55-kilodalton protein from human adenovirus type 5. *J. Virol.* 9374-9379.
- Ishov A, & Maul G. 1996.** The Periphery of Nuclear Domain 10 (ND10) as Site of DNA Virus Deposition. *Gene.* 1–12.
- Kao C, Yew P, & Berk A. 1990.** Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 e1B-55k proteins. *Virology.* 806-814.
- Kzhyshkowska J, Schütt H, Liss M, Kremmer E, Stauber R, Wolf H, Dobner T. 2001.** Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is methylated in its Arg-Gly-Gly (RGG) box and interacts with human arginine methyltransferase HRMT1L1. *Biochem J.* 305-14.
- Kzhyshkowska J, Rusch A, Wolf H, Dobner T. 2003.** Regulation of transcription by the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is mediated by complex formation with the novel bromodomain-containing protein BRD7. *Biochem J.* 385-93.
- Kim E, Deppert W. 2006.** The versatile interactions of p53 with DNA: when flexibility serves specificity. *Cell Death Differ.* 885-9.
- Ko-Ning C, Roth J, & Dobbstein M. 1999.** Adenovirus Type 5 E4orf3 Protein Relieves p53 Inhibition by E1B-55-Kilodalton Protein. *J. Virol.* 2253–2262.
- Leppard K, Everett R. 1999.** The adenovirus type 5 E1b 55K and E4Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components. *J. Gen. Virol.* 997-1008.
- Leppard K, Emmott E, Cortese M. 2009.** Adenovirus type 5 E4 Orf3 protein targets promyelocytic leukaemia (PML) protein nuclear domains for disruption via a sequence in PML isoform II that is predicted as a protein interaction site by bioinformatic analysis. *J. Gen. Virol.* 95–104.
- Lobel L, Goff S. 1984.** Construction of mutants of Moloney murine leukemia virus by suppressor-linker insertional mutagenesis: positions of viable insertion mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4149-53.
- Lu X. 2005.** p53: a heavily dictated dictator of life and death. *Curr Opin Genet Dev.* 27–33.
- Malette P, Yee S, Branton P. 1983.** Studies on the phosphorylation of the 58000 dalton early region 1B protein of human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1069-78.
- Melnick A, Licht J. 1999.** Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 3167-215.

- Nemerow G, Pache L, Reddy V, Stewart P. 2009.** Minireview: Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology*. 380–388.
- Ornelles D, & Shenk T. 1991.** Location 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. *J. Virol.* 424-439.
- Peter & Hemmerich. 2008.** Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies. *J. Cell Sci.* 121, 2731.
- Querido E, Teodoro J, & Branton P. 1997.** Accumulation of p53 Induced by the Adenovirus E1A Protein Requires Regions Involved in the Stimulation of DNA Synthesis. *J. Virol.* 3526–3533.
- Querido E, Marcellus R, Lai A, Charbonneau R, Teodoro J, Ketner G, & Branton P. 1997.** Regulation of p53 Levels by the E1B 55-Kilodalton Protein and E4orf6 in Adenovirus-Infected Cells. *J. Virol.* 3788–3798.
- Querido E, Blanchette P, Yan Q, Kamura T, Morrison M, Boivin D, Kaelin W, Conaway R, Conaway J, Branton P. 2001.** Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin containing complex. *Gene Dev.* 3104–3117.
- Regad T, & Chelbi-Alix M. 2001.** Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene.* 7274 - 7286.
- Roulston A, Marcellus R, Branton P. 1999.** Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol.* 577-628.
- Rowe W, Huebner R, Gilmore L. 1953.** Isolation of a cytogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degradation in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 570-573.
- Russell W. 2009.** Review Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol.* 1-20.
- Sarnow P, Ho Y, Williams J, & Levine A. 1982.** Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 387-394.
- Schwartz R, Lakdawala S, Eshleman H, Russell M, Carson C, & Weitzman M. 2008.** Distinct Requirements of Adenovirus E1b55K Protein for Degradation of Cellular Substrates. *J. Virol.* 9043–9055.
- Shenk T. 1996.** Adenoviridae: the viruses and their replication. En *Fields Virology*, 3rd edition, 2111-2148. Editado por B.N. Fields, D.M. Knipe y P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.
- Smiley J, Young M, Flint S. 1990.** Intranuclear location of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton protein. *J Virol.* 4558-64.
- Stracker T, Lee D, Carso C, Araujo F, Ornelles D, & Weitzman M. 2005.** Serotype-Specific Reorganization of the Mre11 Complex by Adenoviral E4orf3 Proteins. *J. Virol.* 6664–6673.
- Takahashi Y, Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, & de Thé H. 2004.** PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene.* 2819–2824.
- Teodoro J, Halliday T, Whalen S, Takayasu D, Graham F, Branton P. 1994.** Phosphorylation at the carboxy terminus of the 55-kilodalton adenovirus type 5 E1B protein regulates transforming activity. *J. Virol.* 776-86.
- Teodoro J, Branton P. 1997.** Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J Virol.* 3620-7.
- van Breukelen B, Brenkman A, Holthuizen P, & van der Vliet P. 2003.** Adenovirus Type 5 DNA Binding Protein Stimulates Binding of DNA Polymerase to the Replication Origin. *J. Virol.* 915–922.
- Wold W, Gooding L. 1991.** Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immune surveillance and virus-cell interactions. *Virology.* 1– 8.
- Woods D, Vousden K. 2001.** Regulation of p53 function. *Exp Cell Res.* 56-66.

Yew P., Kao C. & Berk A. 1990. Dissection of Functional Domains in The Adenovirus 2 Early 1B 55K Polypeptide by Suppressor-Linker Insertional Mutagenesis. *J. Virol.* 795-805.

Yew P, & Berk A. 1992. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature.* 82-85

Yew P, Liu X, & Berk A. 1994. Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev.* 8: 190-202.

Zhao H, Granberg F, Pettersson. 2007. How adenovirus strives to control cellular gene expression. *Virology* 363. 357–375.

Zimber A, Nguyen Quang-De', Gespach C. 2004. Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease. *Cell Signal.*1085– 1104.

Proteína	Proteínas con las que interactúa	Patrón de distribución en células HFF	Virus	Patrón de distribución representativo de las etapas		Localización subcelular predominante	
				Temprana	Tardía	Temprana	Tardía
E1B	Orf3, Orf6, DBP, p53, AP5	D, P, A	Silvestre	D y P	D y A	Nuclear	Nuclear
			H8	No se sintetiza	No se sintetiza	Ausente	Nuclear
			A143	D y P	P	Nuclear	Nuclear
			S380	D y P	A	Nuclear	Nuclear
DBP	DBP	D, P, A	Silvestre	D y P	P y A	Nuclear	Nuclear
			H8	D y P	D y A	Nuclear	Nuclear
			A143	D	D y A	Nuclear	Nuclear
			S380	D y P	A	Nuclear	Nuclear
PML	Orf3, p53	S, P*, T	Silvestre	S	S y T	Nuclear	Nuclear
			H8	P*	S y T	Nuclear	Nuclear
			A143	S	P* y T	Nuclear	Nuclear
			S380	S	P*, S y T	Nuclear	Nuclear
p53	E1B, Orf6, AP5, p53	N, C	Silvestre	N	C	Nuclear	Citoplásmica
			H8	N	N	Nuclear	Nuclear
			A143	N	N	Nuclear	Nuclear
			S380	N	C	Nuclear	Citoplásmica
Orf3	E1B, PML	S, T, Ag	Silvestre	S	S	Nuclear	Nuclear
			H8	S y T	S y Ag	Nuclear	Nuclear
			A143	S	T y Ag	Nuclear	Nuclear
			S380	S y T	T y Ag	Nuclear	Nuclear

D= Difusa en núcleo

P= En puntos

A= En estructuras en forma de anillo

S= "Specks"

P* =Puntos

T= "Track s"

N= Distribuida en núcleo

C= Distribuida en citoplasma

S= "Specks"

T= "Track s"

Ag= Estructuras formadas por agregados de proteína

En esta tabla se resumen las características generales de cada una de las proteínas estudiadas en el presente trabajo. Además de indicar el patrón de distribución y localización subcelular representativa, durante las fases temprana y tardía, en la infección de células HFF con los virus wt, H8, A143 y S380

Anexo II.

GLOSARIO Y ABREVIACIONES

Ad5. Adenovirus tipo 5

Ad5wt. Adenovirus Silvestre tipo 5

A143. Mutante de inserción en la secuencia que codifica para la proteína E1B55kDa. Se inhibe la formación del complejo E1B55kDa/E4Orf6.

Hr6. Mutante de delección en la secuencia que codifica para la proteína E1B55kDa. No hay síntesis de E1B55kDa.

S380. Mutante de inserción en la secuencia que codifica para la proteína E1B55kDa. Se inhibe la interacción entre las proteína E1B55kDa y E1BAP5.

DBP. Proteína viral de unión a ADN (DNA Binding Protein)

AP5. Proteína celular de unión a E1B-55kDa (E1B-AP5)

PML. Proteína celular

Orf3. Proteína viral temprana E4Orf3.

Orf6. Proteína viral temprana E4Orf6.

E1B-E4. Complejo formado por las proteínas virales tempranas E1B-55kDa y E4Orf6.