



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVACIÓN DE
APOPTOSIS DEPENDIENTE DE P53 DURANTE LA FASE
TEMPRANA DEL CICLO DE REPLICACIÓN DE
ADENOVIRUS**

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

**FRANCISCO MIGUEL LÓPEZ
CARDOSO**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. RAMÓN GONZALEZ GARCIA-CONDE**



CUERNAVACA, MORELOS 2008



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVACIÓN DE APOPTOSIS DEPENDIENTE DE p53 DURANTE LA FASE TEMPRANA DEL CICLO DE REPLICACIÓN DE ADENOVIRUS.

PROYECTO PRESENTADO POR:

BIOL. FRANCISCO MIGUEL LÓPEZ CARDOSO

TUTOR:

DR. RAMÓN GONZALEZ GARCÍA-CONDE

JURADO:

DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY
DR. SUSANA CASTRO OBREGÓN
DRA. MARTHA VÁZQUEZ LASLOP
DR. PAVEL ISA HASPRA
DR. RAMÓN GONZALEZ GARCÍA-CONDE

DEDICATORIA:

A MI MADRE REBECA.

A LOS POCHOS.

A MI TÍA ELENA (Q.E.P.D.).

AGRADECIMIENTOS:

A Pilar, por su incondicional apoyo y amistad.

Al Abuelo, por saber ser amigo de verdad.

A mis compadres Ivonne-Rafael (y al Momiyi), que siempre me ayudaron, en las buenas y en las malas.

A Víctor y a Mahatma por soportarme, y nunca cerrarme las puertas.

A la moral del “Che”, que enseña algo, a Karina (con Sofía), a Fabiola y a Silvia.

A la banda de Cuautla: Andrés Malpica, y en especial a mi carnal Leopoldo Aragón (MPC).

A Adriana Scott, por su inspiración y ayuda.

A Maggie por enseñarme que los colores son bonitos.

A la banda del laboratorio que me permitió trabajar con ellos: al “Osito”, al lavadero que compartí con Mayra, Elizabeth y Rita. A la calidad humana de Norma Ramírez.

A Zoraya por darme su amistad y grandes valores humanos.

Muy especialmente a Ana-lore, por enseñarme mucho, apoyarme y brindarme su rosa amistad.

A la banda ibtlante: Cristina, Oscar, Magda, Monse y Amiel.

A Karla por siempre tenerme en cuenta como amigo.

A la amistad internacional de Mery Piña.

Al Dr. Roberto Stock, por apoyarme y darme sus puntos de vista.

Y por último, pero no menos importante, a mi patrón y amigo Ramón Gonzalez, que me enseñó mucho, confió en mí y me ayudó a seguir adelante. A su familia, Nievska Field y Matías por su amistad, apoyo y siempre recibirme en su casa.

La realización de esta tesis fue financiada por:

- Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, No. 177094).
- Beca CONACyT-SEP (SEP-2004-C01-47487).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Generalidades	9
1.2. Clasificación	10
1.3. Estructura	10
1.4. Genoma	11
1.5. Ciclo de replicación	13
1.5.1. Entrada	13
1.5.2. Fase temprana	14
1.5.3. Fase tardía	15
1.6. Regulación de actividades celulares por Ad	16
1.6.1. Organización del núcleo durante el ciclo de replicación de Ad	16
1.6.2. Procesamiento postranscripcional de genes en la fase tardía	17
1.6.3. Regulación de la traducción selectiva por la E1B 55 kDa	18
1.6.4. Regulación de la respuesta celular en la infección por Ad	19
1.7. Apoptosis	20
1.7.1. Caspasas	21
1.7.2. Ruta extrínseca	22
1.7.3. Ruta intrínseca	23
1.7.4. Regulación de caspasas	24
1.7.5. Familia BCL-2	25
1.7.5.1. Proteínas anti-apoptóticas (subfamilia BCL-2)	25
1.7.5.2. Proteínas pro-apoptóticas (subfamilia Bax)	26
1.7.5.3. Proteínas pro-apoptóticas solo-BH3 (subfamilia solo-BH3)	28
1.8. Regulación de las proteínas p53, p21 y Puma en una célula	29
1.8.1. Regulación de la proteína p53	29
1.8.2. Regulación de la proteína p21	32
1.8.3. Regulación de Puma y p53 en citoplasma	32
1.9. Regulación de apoptosis dependiente de p53 por Ad	33
1.9.1. E4 Orf6	34
1.9.2. E1B 55 kDa	35
1.9.3. E1B 19 kDa	36
1.9.4. Regulación de apoptosis dependiente de p53 en citoplasma	37
1.9.5. Regulación de apoptosis dependiente de p53 en núcleo	38
1.10. Mutantes de Ad para el estudio de la proteína multifuncional E1B 55 kDa	39
1.11. Justificación	40

2.	<u>HIPÓTESIS</u>	<u>41</u>
3.	<u>OBJETIVO</u>	<u>41</u>
	3.1. <u>Objetivos particulares</u>	<u>42</u>
4.	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	<u>42</u>
	4.1. <u>Células y virus</u>	<u>42</u>
	4.2. <u>Citometría de flujo</u>	<u>43</u>
	4.3. <u>Medición de la actividad de caspasas activas</u>	<u>44</u>
	4.4. <u>Medición de la actividad de los genes <i>p53</i>, <i>p21</i>, <i>bax</i>, y <i>puma</i></u>	<u>45</u>
	4.4.1. <u>Extracción de RNA</u>	<u>45</u>
	4.4.2. <u>RT-PCR en tiempo real</u>	<u>46</u>
	4.4.3. <u>Procesamiento de datos obtenidos por RT-PCR en tiempo real</u>	<u>50</u>
	4.4.4. <u>Análisis de proteínas por inmunodetección</u>	<u>53</u>
5.	<u>RESULTADOS</u>	<u>53</u>
	5.1. <u>Análisis de la incidencia de apoptosis en la etapa temprana del ciclo de replicación de Ad5</u>	<u>53</u>
	5.2. <u>Medición de eventos tempranos de apoptosis</u>	<u>56</u>
	5.2.1. <u>Medición de caspasas activas</u>	<u>56</u>
	5.2.1.1. <u>Efecto citopático en HFFs tratadas con Camp y con FasL</u>	<u>56</u>
	5.2.1.2. <u>Activación específica de C-8 y C-9 durante el tratamiento de HFFs con Camp y FasL</u>	<u>57</u>
	5.2.1.3. <u>Activación específica de C-8 y de C-9 por la infección con Ad5 silvestre y mutantes</u>	<u>58</u>
	5.3. <u>Cuantificación de los niveles de expresión de los genes <i>p53</i>, <i>p21</i> y <i>puma</i> por RT-PCR en tiempo real</u>	<u>60</u>
	5.3.1. <u>Validación de condiciones y primers en el ensayo de RT-PCR</u>	<u>62</u>
	5.3.2. <u>Nivel de expresión del gen de <i>p53</i></u>	<u>66</u>
	5.3.3. <u>Nivel de expresión del gen <i>p21</i></u>	<u>67</u>
	5.3.4. <u>Nivel de expresión del gen <i>puma</i></u>	<u>68</u>
	5.4. <u>Medición del nivel de las proteínas <i>p53</i>, <i>p21</i>, <i>bax</i> y <i>puma</i> en la célula infectada</u>	<u>69</u>
6.	<u>DISCUSIÓN</u>	<u>70</u>
7.	<u>PERSPECTIVAS</u>	<u>73</u>
8.	<u>REFERENCIAS</u>	<u>75</u>

ABREVIATURAS

ABC-A1. ATP-Binding-Cassette transporter A1.
Ad. Adenovirus.
ADP. Adenovirus Death Protein.
An. Anexina.
APAF-1. Apoptotic Protease Activating Factor 1.
ARF. Alternative Reading Frame.
ATM. Ataxia-Telangiectasia Mutated.
ATR. ATM Rad3-related protein.
BCL-2. B-Cell Lymphoma-2.
BIR. Baculovirus IAP Repeats.
BH. BCL-2 Homology.
CAR. Coxsackie-Adenovirus Receptor.
CARD. Caspase Recruit Domain.
CDK. Ciclin Dependent Kinases.
CK. Casein Kinase.
DBP. DNA Binding Protein.
DD. Death Domain.
DED. Death Effector Domain.
DISC. Death Inducing Signaling Complex.
DNA-PK. DNA Protein Kinase.
E1B-AP5. E1B - Associated Protein 5.
GST. Glutation-S-Transferase.
HDM-2. Human Double Minute - 2.
HFF. Human Foreskin Fibroblast.
hnRNPs. Heterogeneous nuclear RibonucleoProteins.
hpi. horas post infección.
hpt. horas post tratamiento.
IAP. Inhibitor of Apoptotic Proteins.
IG. Interchromatin Granules.
ITR. Inverted Terminal Repeats.
LUX. Light Upon eXtension.
MHC. Major Histocompatibility Complex
ML. Major Late.
moi. multiplicity of infection.
MOMP. Mitochondrial Outer Membrane Permeability
MRN. MRE11-RAD50-NBS1.
NBD. Nucleotide-Binding Domain
NES. Nuclear Export Signal.
NHEJ. NonHomologous End Joining.
NLS. Nuclear Localization Signal.
NPC. Nuclear Pore Complex.
o/n. over night.
PARP. Poly ADP-Ribose Polymerase.
PCNA. Proliferating Cell Nuclear Antigen.
PI. Propidium Iodide.
PKR. Protein Kinase RNA activated.
pfu. plaque forming units.

PML. Promyelocytic Leukemia Protein.
Pol. Polimerasa.
PS. PhosphatidylSerine.
RB. RetinoBlastoma protein.
RLU. Relative Light Units.
RT. Room Temperature.
snRNPs. small nuclear RiboNucleoProteins.
SUMO-1. Small Ubiquitin related Modifier protein 1.
TM. TransMembranel.
TNF. Tumor Necrosis Factor.
TP. Terminal Protein.
TRAIL. TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand.
VA. Virus Associated.
wt. wild type.
ZRPs. Zonas Replicativas Periféricas.

RESUMEN

Durante la fase temprana del ciclo de replicación de adenovirus (Ad5), las proteínas virales E1A inducen la estabilización del supresor tumoral celular p53, lo que resulta en la activación de apoptosis. La proteína viral E1B 55 kDa (E1B) se une a p53 e inhibe su actividad transcripcional. Además, E1B también se une a la proteína viral E4 Orf6, y ambas, como complejo (E1B-E4) inducen la degradación proteosomal de p53. Actualmente se conocen algunos de los mecanismos de la regulación de las actividades de p53 durante la transformación por Ad5. Sin embargo, el papel de p53 durante una infección productiva de Ad es controversial, debido principalmente a que en la mayoría de los estudios llevados a cabo se han usado líneas celulares transformadas, en lugar de células humanas normales que expresen una p53 funcional. En este contexto, aún se desconoce el mecanismo por el cual se inhibe la apoptosis dependiente de p53, así como el papel de p53 en la regulación de los iniciadores de apoptosis, en células humanas normales infectadas con Ad5. En este trabajo, nosotros utilizamos células humanas normales (Human Foreskin Fibroblasts, HFFs) infectadas con Ad5 silvestre y mutantes que codifican una proteína E1B alterada. Para analizar eventos tempranos de activación de apoptosis en HFFs infectadas con Ad5 y mutantes, medimos la activación de las caspasas 8 y 9, así como la activación de los genes de transcripción dependiente de p53: *p21*, *bax* y *puma*. Nuestros resultados sugieren que las actividades características de apoptosis tardía son inhibidas eficientemente, aún cuando se activa caspasa 9 y no se induce la degradación de p53. Nuestros experimentos también indicaron que la E1B es necesaria para la inhibición eficiente de la actividad transcripcional de p53 en células infectadas con Ad5 silvestre y los mutantes. Estas observaciones concuerdan con resultados previos, y en conjunto sugieren que la regulación de la actividad de p53 no depende de la degradación de p53, inducida por el complejo E1B-E4, sino de su relocalización a zonas específicas del núcleo, en donde colocaliza con la E1B.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

En 1953 Rowe y colaboradores observaron efectos citopáticos en cultivos de células humanas primarias que provenían de tejido extraído de adenoides. Los agentes causantes de estas citopatías se aislaron en 1954 y en 1956 fueron llamados adenovirus (Ad). La observación de la oncogenicidad de los adenovirus (Ad serotipo 12), reconocida en 1963 por Trentin y colaboradores (Yabe *et al.*, 1963) en roedores neonatos, demostró por primera vez una relación en la formación de tumores y la infección por un virus humano. La infección de Ad en humanos causa enfermedades en las vías gástricas, respiratorias y urinarias, así como también en el ojo, dependiendo del serotipo (Tabla 1).

VÍAS RESPIRATORIAS	TRACTO INTESTINAL	TRACTO URINARIO	QUERATOCONJUNTIVITIS
Síntomas de resfriado (goteo nasal)	Diarrea acuosa	Micción frecuente	Ojos rojos
Dolor de garganta	Fiebre	Dolor	Fotofobia
Fiebre	Sensibilidad abdominal	Sangre en la orina	Dolor
Tos severa	Vómitos		Lagrimo
Inflamación de ganglios linfáticos	Dolor de cabeza		
Dolor de cabeza			
Otitis			

Tabla 1. Síntomas de las principales enfermedades causadas por Ad en humanos. Se muestra la sintomatología en cada caso.

Además de su relevancia clínica, la investigación realizada con adenovirus ha permitido descubrir y entender procesos celulares, como el procesamiento de RNA eucariótico por medio de splicing y el control de la progresión del ciclo celular, entre otros.

1.2. Clasificación

Los adenovirus constituyen la familia *Adenoviridae*, que consta de dos géneros: *Mastadenoviridae* que infecta mamíferos, y *Aviadenoviridae* que infecta aves. Existen alrededor de 50 serotipos de adenovirus que infectan humanos y pueden causar enfermedades respiratorias, queratoconjuntivitis o gastroenteritis, dependiendo del serotipo. Estos serotipos se han dividido con base en su resistencia a hemaglutinación por anticuerpos dirigidos contra otros serotipos de Ad. Esta inhibición específica resulta de la unión de anticuerpos a epítomos del hexón y la fibra, proteínas de la cápside viral. Los adenovirus se dividen además en 6 subgrupos (A–F), basados también en su habilidad para aglutinar eritrocitos (serotipos) (Tabla 2).

1.3. Estructura

La cápside de los adenovirus es de aproximadamente 90 nm de diámetro; es icosaédrica, sin envoltura y está constituida por 11 proteínas. La cápside se constituye por la capa externa y la nucleocápside, en la parte interna. La capa externa de la cápside está formada por 240 hexones y en cada uno de sus 12 ejes, pentones. Estas estructuras, llamadas capsómeros conforman la capa externa de la cápside (Shen y Shen, 1996). Los hexones son trímeros de la proteína II, mientras que el pentón se conforma de una base y una fibra. La base está compuesta por un pentámero de la proteína III, y de esta base se proyecta un trímero de la proteína IV, la fibra. Por otra parte, las proteínas IIIa, VI, VIII y IX, cimentan la estructura de la capa externa. La nucleocápside contiene al genoma viral y consta de 4 proteínas estructurales: V, VII, m y la proteína terminal (TP, Terminal Protein). La proteína TP está unida covalentemente a los extremos 5' de las hebras del genoma viral, y funciona como *primer* en la replicación de DNA y participa en la unión del genoma viral a la matriz nuclear.

SUBGRUPOS	HEMAGLUTINACIÓN	SEROTIPOS	PRESENCIA DE TUMORES EN ANIMALES	TRANSFORMACIÓN DE CELULAS EN CULTIVO
A	Poca o nula aglutinación	12, 18, 31	Alta	+
B	Aglutinación completa de eritrocitos de mono	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	Moderada	+
C	Aglutinación parcial de eritrocitos de rata	1, 2, 5, 6	Baja o nula	+
D	Aglutinación completa de eritrocitos de rata	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22 – 30, 32, 33, 36 – 39, 42 – 47	Baja o nula (tumores mamarios)	+
E		4	Baja o nula	+
F		40, 41	Desconocida	

Tabla 2. Clasificación de Ad. Se muestran los subgrupos, serotipos y capacidad oncogénica (Shen y Shenk, 1996). En este trabajo se utilizó Ad serotipo 5 (Ad5), que pertenece al serotipo C.

1.4. Genoma

El genoma de los adenovirus está compuesto por una molécula de doble cadena de DNA lineal, cuya longitud varía entre 34,000 y 44,000 pares de bases (pb) entre los diferentes serotipos. La proteína terminal (TP) participa en la replicación del DNA viral formando un enlace covalente con el DNA y adicionando una citosina a la serina 562 que aporta un residuo 3'OH que funciona como *primer* para la síntesis de DNA viral. Su localización en el extremo 5' de cada cadena de DNA protege a las hebras de ataques exonucleolíticos y del reconocimiento por la maquinaria de reparación de DNA, eventos que podrían impedir el acceso de la DNA polimerasa a los orígenes de replicación presentes en cada hebra. La proteína TP dirige además a los genomas virales a la matriz nuclear para optimizar la transcripción del genoma viral (Fig. 1). El genoma está flanqueado por secuencias repetidas terminales invertidas ITR (Inverted Terminal Repeats) que tienen una longitud de 102 pb (en los serotipos Ad 2 y 5, que son los prototipos del subgrupo C), en cada extremo. Dentro de estas secuencias, se encuentran los orígenes de replicación, que están constituidos por una secuencia conservada y secuencias adyacentes auxiliares. La secuencia conservada es reconocida por las

proteínas virales pre-TP (pre-Terminal Protein) y la polimerasa para el inicio de la síntesis de DNA viral, mientras que las secuencias auxiliares son reconocidas por factores de transcripción celulares (Flint, 1999).

Entre el origen de replicación y la unidad de transcripción de E1A existe una serie de secuencias ricas en A y T que comprenden la señal de encapsidación del genoma. El genoma está organizado de tal manera que la transcripción de los genes virales puede ser regulada en una secuencia temporal, coordinada a lo largo del ciclo de replicación en unidades transcripcionales. La mayoría de los genes de adenovirus son transcritos por la RNA polimerasa II y son policistrónicos, con secuencias codificantes expresadas a través de un procesamiento alternativo de transcritos primarios o “splicing”, y están localizadas en las dos hebras del genoma. La activación de la transcripción de los genes de adenovirus depende de la unión de activadores celulares a los promotores correspondientes. Además, para la mayoría de las unidades, con la excepción del gen E1A, se requiere de proteínas virales que actúan como activadores para optimizar su transcripción. Los transcritos son procesados generando múltiples mRNA por medio de splicing alternativo (en el caso de E1A y de E1B) o tanto por splicing como por poliadenilación alternativa en uno o más sitios (como sucede en E2 y ML). El genoma de Ad contiene además tres unidades de transcripción de RNA polimerasa III, cuyos productos son especies pequeñas de RNA llamadas VA (Virus Associated- RNA) I y II. El VA-RNA 1 se acumula en grandes cantidades (1×10^9 copias por célula) en la fase tardía de la infección y es un potente inhibidor de PKR (Protein Kinase RNA activated). VA-RNA II, por su parte, no se presenta en algunos serotipos de Ad, no es tan abundante como VA-RNA 1 y se conoce poco sobre su función, aunque se presume que puede tener una actividad inhibitoria sobre RNA helicasas (Liao *et al.*, 1998).

En la unidad ML (Major Late), los 3 exones del extremo 5' no traducido de los mRNA tardíos de ML, designados I1, I2 y I3, son procesados por splicing y forman la secuencia líder tripartita (201 nucleótidos) que es común en todos los RNA mensajeros tardíos. Estos, constituyen las 5 familias de mRNA tardíos, L1, L2, L3, L4 y L5 (Fig. 1). Cada familia comparte sitios comunes de poliadenilación en el extremo 3' y codifican para las proteínas estructurales del virión (Flint, 1999).

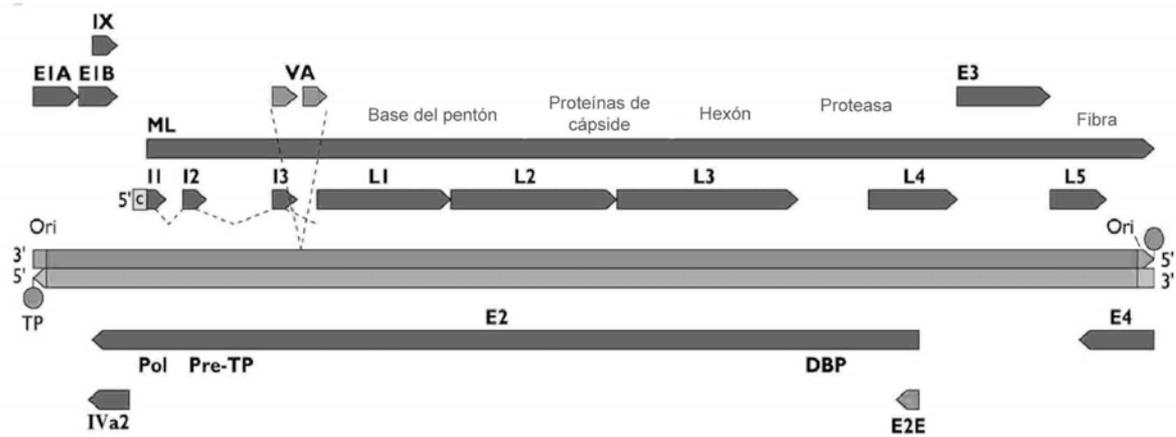


Figura 1. Diagrama de la organización del genoma de Ad. Se muestran los orígenes de replicación (ori) en los extremos; la proteína Terminal (TP) enlazada covalentemente al 5' de cada hebra; las 8 unidades de transcripción dependientes de la RNA polimerasa II (E1A, E1B, IX, ML, E3, E4, E2 y IVa2) y las 3 unidades de transcripción de la RNA polimerasa III (VAI, VAII y E2E). Las flechas indican la dirección de la transcripción (Flint, 1999).

1.5. Ciclo de Replicación

1.5.1. Entrada

El ciclo de replicación inicia cuando el virus se une a la membrana de una célula permisiva, donde la fibra del pentón interactúa con un receptor llamado CAR (Coxsackie-Adenovirus Receptor). Además de ser un receptor para la entrada viral, CAR es una molécula de adhesión celular, localizada en las uniones estrechas de células epiteliales y endoteliales. Este receptor forma parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Immunoglobulin Super Family, IgSF), y es miembro de la subfamilia de CTX (Cortical Thymocyte Xenopus) (Chretien *et al.*, 1998). La estructura de CAR se compone de dos dominios Ig extracelulares, un dominio transmembranal, y un dominio intracelular. La proteína viral fibra se une a CAR, anclando la cápside a la membrana celular, por lo que permite que exista interacción de la base del pentón con las integrinas $\alpha n\beta 3$ y $\alpha n\beta 5$, principalmente (Hong *et al.*, 1997). El virus entra a la célula por endocitosis mediada por clatrina. La actividad de la dinamina es importante para una eficiente formación del endosoma, y para la internalización de la cápside (Wang *et al.*, 1998). La acidificación inicial del endosoma debida a la entrada de H^+ , permite un desensamblaje parcial de la cápside, principalmente por la activación de la proteasa viral. La proteína de cimentación IV es degradada, y esto parece iniciar el desmantelamiento de las proteínas fibra y base del pentón de la cápside viral. Durante

este desensamblaje, las proteínas virales hexón y la base del pentón sufren cambios conformacionales que les permiten interactuar con los lípidos del endosoma. Ambas modificaciones parecen contribuir a la liberación posterior de la cápside viral parcialmente desensamblada al citoplasma. Una vez en el citoplasma, las proteínas IIIa, VIII y IX son desensambladas, y la cápside es dirigida por el citoplasma al núcleo a través de microtúbulos. En este desplazamiento de Ad, la proteína dineína, y el complejo dinactina tienen un papel importante (Kelkar *et al.*, 2004).

1.5.2. Fase temprana

Para la liberación del genoma viral dentro del núcleo, es necesaria la interacción de la proteína VII con la proteína CAN/nup214 del complejo del poro nuclear (NPC, Nuclear Pore Complex). Una vez que la cápside viral se encuentra unida al NPC, es posible la unión del hexón con la histona H1, y se inicia el desensamblaje final de la cápside (Trotman *et al.*, 2001). Las proteínas hexón y XI no entran al núcleo, pero la proteína VII y el genoma viral (con la proteína TP) son importados al núcleo. Una vez en el núcleo, la RNA polimerasa II transcribe el gen E1A, que es eficientemente transcrito sólo por proteínas celulares. Una vez transcritos, los mRNA de E1A son procesados por splicing alternativo y son exportados al citoplasma, donde son traducidos y las proteínas resultantes son importadas al núcleo. Existen dos productos principales del gen E1A denominados: E1A 12S (243 residuos) y 13S (289 residuos), en base en su coeficiente de sedimentación. Éstas son idénticas, excepto por un segmento de 46 residuos extra en la E1A 13S. La proteína celular RB forma parte de una familia de proteínas, llamadas proteínas "pocket", que actúan en la regulación de la proliferación celular (Classon y Dyson, 2001). La proteína viral E1A (el primer activador transcripcional de Ad), interacciona con diferentes miembros de la familia RB, lo que provoca la activación de los factores de transcripción E2F que estimulan la transcripción de los genes virales tempranos por la RNA polimerasa II, e inducen a las células quiescentes a entrar en fase S del ciclo celular, evento necesario para un ciclo replicativo exitoso. Esta activación por E1A también activa la apoptosis a través de p53, que se discutirá más adelante.

El gen de E1B codifica para 2 proteínas (55 kDa y 19 kDa) que cooperan con E1A para inducir la proliferación celular al bloquear la apoptosis inducida directa o indirectamente por E1A, al inducir la degradación de p53. El gen E2 codifica para 3 proteínas (pre-TP, Pol y DBP), que se encargan de la replicación del DNA viral. E3,

por su parte, codifica para proteínas que modulan la respuesta del hospedero a la infección por adenovirus: bloquea la exposición de antígenos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, Major Histocompatibility Complex) 1 e inhibe la citólisis inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF, Tumor Necrosis Factor). Los genes E4 codifican para proteínas con funciones diversas, que van desde regulación de la transcripción, hasta transporte de mRNA y replicación del DNA (Flint, 1999).

1.5.2. Fase tardía

La transición a la fase tardía está marcada por el inicio de la síntesis de DNA viral, el cual como se mencionó antes, se duplica por las proteínas virales pre-TP, Pol (Polimerasa viral) y DBP (DNA Binding Protein). Una vez que la concentración de las proteínas Pol, pre-TP y DBP se ha acumulado en la célula infectada, se puede iniciar la replicación de DNA viral. Las moléculas de DNA viral recién replicadas pueden servir como templados para la síntesis de DNA *de novo*, o para la transcripción de genes tardíos (Flint, 1999). La alta concentración de templados de DNA induce la transcripción de los genes intermedios pIX y IVa2 (este último es el segundo activador transcripcional de Ad). La proteína IVa2, junto con una proteína no identificada (específica de células infectadas) estimula entre 20 - 30 veces la transcripción de los genes tardíos de ML (Tribouley *et al.*, 1994). A diferencia de lo que sucede en la fase temprana, en la fase tardía la transcripción de los genes celulares no es regulada. En esta fase se induce un mecanismo postranscripcional que es responsable de la expresión selectiva de los mRNAs virales tardíos. La formación del complejo entre las proteínas tempranas E1B 55 kDa (E1B) y E4 Orf6 (E4), llamado E1B-E4 participa en la exportación selectiva de los mRNA virales, e inhibe la exportación de mensajeros celulares (Gonzalez y Flint, 2002; Sandri-Goldin, 2004). Para la traducción eficiente de estos mensajeros en el citoplasma, se requiere de los RNA producidos por VA y de la proteína viral L4 100 kDa. Este proceso favorece la síntesis de proteínas virales tardías, cuya concentración aumenta a lo largo de la fase tardía. La liberación de la progenie viral es a través de un ciclo lítico, debido a los efectos citopáticos causados por la infección, por mecanismos que no se conocen con detalle. Pero se ha sugerido que las proteínas virales E4 Orf4 y E3 11.6 kDa pueden inducir muerte celular, durante la fase tardía del ciclo de replicación de Ad (Tollefson *et al.*, 1996).

1.6. Regulación de las actividades celulares por Ad

Durante el ciclo replicativo de Ad se sintetizan diferentes proteínas virales que regulan las respuestas celulares a la infección, con el propósito de asegurar una eficiente replicación viral. Durante la fase temprana, Ad inhibe la maquinaria de reparación de DNA y apoptosis; mientras que durante la fase tardía, induce una eficiente producción de proteínas virales tardías regulando la exportación selectiva de los mRNAs virales tardíos. En ambas fases del ciclo de replicación, las proteínas virales E1B 55 kDa y E4 Orf6 tienen un papel importante. A continuación se mencionan las principales características de la regulación de la célula por parte de Ad, pero la regulación de apoptosis dependiente de p53 se describirá en la sección 1.9.

1.6.1. Organización del núcleo durante el ciclo de replicación de Ad

En la célula infectada, algunas de las proteínas de Ad llevan a cabo una reorganización del núcleo, que es necesaria para un ciclo replicativo eficiente. Las primeras observaciones de una expresión eficiente de mRNAs virales indicaron que en la célula infectada con Ad, los mRNAs virales y no los celulares, se encuentran en zonas nucleares específicas desde donde se lleva a cabo su exportación a citoplasma (Denome *et al.*, 1989). Una vez que los genomas virales se encuentran en el núcleo, se forman estructuras compuestas por proteínas virales y celulares que se asocian a la matriz nuclear. Éstas se localizan cercanas a estructuras celulares llamadas PODs (PML Oncogenic Domains) que contienen a la proteína PML (Promyelocytic Leukemia Protein), un supresor tumoral al que se le han asociado múltiples funciones como regulador del ciclo celular y la apoptosis. Las estructuras que contienen al genoma y proteínas virales y celulares, son llamadas Zonas Replicativas Periféricas (ZRP), y son los sitios en donde se lleva a cabo la replicación, la transcripción y al menos parte del procesamiento postranscripcional de los mRNAs virales. La proteína viral E4 Orf3 se localiza en los PODs, e inicia el reclutamiento de factores de transcripción y splicing (como Sp-100 y NDP35) de los PODS a las ZRP (Doucas *et al.*, 1996), en las que se localiza la proteína viral DBP (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1992) y en donde se acumula el DNA viral replicado *de novo* (Bridge *et al.*, 1996). Durante la fase tardía, se observan

otras zonas virales nucleares alrededor de las ZRPs, en donde son reclutadas proteínas snRNPs (small nuclear Ribonucleoproteins) y proteínas encargadas de splicing (Aspegren *et al.*, 1998), y desde donde se lleva a cabo la exportación de los mRNAs virales tardíos.

Otra función de la relocalización de componentes nucleares es la regulación de las MRN y p53 (secciones 1.6.4 y 1.8.1 respectivamente), proteínas celulares centrales en reparación de DNA (MRN), proliferación celular y apoptosis (p53).

1.6.2. Procesamiento postranscripcional de genes en la fase tardía

Las proteínas virales E1B 55 kDa (E1B) y E4 Orf6 (E4) son sintetizadas durante la fase temprana del ciclo de replicación de Ad, y en esta fase inhiben la actividad proapoptótica de la proteína celular p53, que se discutirá en la sección 1.9. Por otra parte, la E1B y la E4 tienen también un papel importante en la fase tardía, en el procesamiento postranscripcional de los mRNAs virales tardíos. Estas proteínas inducen la acumulación de los mRNAs virales en el citoplasma de células infectadas con Ad, y son necesarias para una expresión eficiente de los genes virales tardíos. La primera evidencia del papel de la E1B en la exportación selectiva de mRNAs virales tardíos, fue que la ausencia de la proteína E1B resulta en una acumulación de los mRNAs virales tardíos en las ZRPs, y no se lleva a cabo su exportación a citoplasma, lo que resulta en la degradación del RNA en el núcleo (Leppard y Shenk, 1989; Leppard, 1993). Durante la fase temprana, la E1B se encuentra asociada a la E4 Orf3 en los PODs pero posteriormente, durante la fase tardía, la E1B se une a E4 Orf6 y es relocalizada a la periferia de las ZRPs (Ornelles y Shenk, 1991). El complejo E1B-E4 fue originalmente identificado por coimmunoprecipitación a partir de extractos de células infectadas (Sarnow *et al.*, 1984). Al igual que sus componentes, la localización de este complejo es principalmente nuclear y su concentración aumenta durante la fase tardía del ciclo de replicación (Rubenwolf *et al.*, 1997). Tanto la localización de la E1B en estas zonas, como la regulación de la exportación selectiva de los mRNAs virales es dependiente del complejo E1B-E4 (Dobner y Kzhyshkowska, 2001). Mutantes que codifican para una E1B incapaz de unirse a la E4 no presentan esta localización, y también presentan una exportación ineficiente de los mRNA virales tardíos (Gonzalez y Flint, 2002), implicando directamente a la asociación de la E1B con la E4 alrededor de las ZRPs en

la regulación de la exportación de los mRNA virales. Por lo tanto, la proteína E1B participa en el procesamiento y exportación de mRNA virales, además de la inhibición de la exportación de los mRNA celulares (Gonzalez y Flint, 2003). Los mutantes de Ad que no codifican para E4 presentan un fenotipo similar al observado en los mutantes carentes de la E1B. Sin embargo, estos mutantes presentan alteraciones en la acumulación del RNA viral en el núcleo que no puede ser atribuido solamente a la falta del complejo E1B-E4. Esto es debido a que tanto la E4 Orf6 como la E4 Orf3, incrementan la estabilidad y la acumulación nuclear de los mRNAs de ML que tienen la secuencia de líder tripartita (sección 1.4) (Sandler y Ketner, 1989; Ohman *et al.*, 1993). Ambas E4 regulan la expresión de genes virales a través de splicing, al inducir la acumulación de mRNAs virales que ya han sufrido splicing, a zonas desde donde se exportan los mRNAs a citoplasma. Estas observaciones indican que las proteínas E4 Orf6 y E4 Orf3 son requeridas para la estabilización nuclear a través de splicing, de los mRNAs de ML (Nordqvist *et al.*, 1994; Shen y Shenk, 1996).

1.6.3. Regulación de la traducción selectiva por la E1B 55 kDa

Además de sus actividades anti-apoptóticas y la exportación de mRNAs virales tardíos, se ha sugerido que la E1B 55 kDa (E1B) podría estar involucrada en la regulación de la traducción de proteínas virales tardías. La ausencia de una proteína E1B funcional resulta también en una mayor inhibición de la síntesis de proteínas virales tardías, mayor a la que puede ser atribuida a una falla en la exportación selectiva de los mRNAs. Estas alteraciones en la síntesis de proteínas durante la fase tardía pueden ser efectos secundarios debidos a la baja concentración de proteínas virales intermedias, como IVa2 (Hayes *et al.*, 1990). Por otra parte, experimentos realizados con mutantes nulos de la E1B mostraron diferencias entre el nivel de inhibición de síntesis de proteínas virales y la reducción en la concentración de mRNAs citoplasmáticos, sugiriendo que la E1B ejerce un papel directo sobre la traducción (Harada y Berk, 1999). Esta actividad pone de manifiesto la multifuncionalidad e importancia de esta proteína viral durante el ciclo replicativo. Sin embargo, el mecanismo molecular y los componentes celulares que intervienen en la regulación de la traducción por parte de la E1B son poco conocidos.

1.6.4. Regulación de la respuesta celular en la infección por Ad

En la célula infectada por Ad, la síntesis de la proteína viral E1A y la entrada del genoma viral al núcleo son interpretadas como insultos por la maquinaria celular. Entre las respuestas celulares a la infección por Ad se encuentran: la apoptosis y la activación de la maquinaria de reparación de DNA. Ambos eventos comprometen el éxito del ciclo replicativo, por lo que Ad codifica proteínas que contrarrestan estas respuestas celulares. Entre las proteínas que regulan la respuestas anti-viral, la proteína p53 (apoptosis) y el complejo MRN (reparación de DNA) tienen un papel fundamental. MRN es un complejo compuesto por las proteínas celulares MRE11-RAD50-NBS1. Este complejo participa en la reparación de DNA; su degradación impide que el genoma viral sea reconocido por la maquinaria de reparación de DNA celular como DNA roto, y evita la concatenación del genoma viral (Weitzman y Ornelles, 2005). Este complejo se asocia y une los extremos de moléculas de DNA rotas, a través de un proceso llamado NHEJ (Non Homologous End Joining) (Petrini y Stracker, 2003), donde participan otras proteínas de reparación de DNA. Entre éstas se encuentran las cinasas ATM y ATR, que activan la respuesta global de daño a DNA (Carson *et al.*, 2003). El complejo conformado por las proteínas virales E1B 55 kDa y E4 Orf6 (E1B-E4), además de participar en la exportación selectiva de mRNAs celulares, también induce la degradación de p53 y de MRN. El complejo E1B-E4 se asocia a un complejo Cullin 5, de aproximadamente 800 kDa (formado por las proteínas celulares Cullin 5, RBX2, y las elonginas B y C) (Querido *et al.*, 2001). El complejo Cullin 5 se compone de E3 ubiquitin ligasas, que incluye el complejo heterodimérico compuesto por las elonginas B y C. La elongina C (112 residuos) es similar en secuencia a la subunidad Skp1, del complejo ubiquitin ligasa Skp1-Cullin1-F, mientras que la elongina B (118 residuos) tiene un dominio “ubiquitin-like” en su región N-terminal. En el complejo Cullin 5, el complejo elonginas E/C funciona como un adaptador, que reconoce la porción “BC-box” del sustrato, y la une a la subunidad compuesta por la Cullin 5 y RBX2. De esta forma a través de los dominios “RING finger” de la proteína RBX2, se recluta y activa el complejo enzimático para la ubiquitinación de los sustratos (Mahrouf *et al.*, 2008). En el complejo Cullin 5 de una célula infectada, la E1B es la subunidad de reconocimiento del sustrato, mientras que la E4 se une a las elonginas E/C. Se conocen dos sustratos para este complejo: p53 (Querido *et al.*, 2001) y el complejo celular MRN (Stracker *et al.*, 2002). Una vez ubiquitinados estos sustratos, son exportados del núcleo al citoplasma a estructuras llamadas agrosomas, donde se lleva a cabo la degradación

proteosomal (Stracker, *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2005). La inhibición de apoptosis dependiente de p53 no sólo depende de las proteínas E1B 55 kDa y E4, la proteína viral E1B 19 kDa también está involucrada en esta regulación. Los detalles de la regulación de p53 por estas proteínas virales se discutirán en la sección 1.9 y a continuación se detalla el proceso de apoptosis y la regulación de p53 en una célula no infectada.

1.7. Apoptosis

El proceso de apoptosis inicia como respuesta a estímulos intra- (daño a DNA, hipoxia) o extra-celulares (radiación, unión de factores de muerte a la membrana), y se caracteriza por: la fragmentación del DNA celular en fragmentos (múltiplos de 200 pb), la condensación del citoplasma, la formación de vesículas llamadas cuerpos apoptóticos y un cambio en la asimetría de la membrana celular. Estas alteraciones tienen por objetivo señalar a la célula apoptótica para su destrucción, sin producir procesos inflamatorios en el organismo. La principal característica del cambio en la asimetría de la membrana celular es la translocación del fosfolípido fosfatidilserina (PS), del espacio citoplasmático al extracelular, como señal para el reconocimiento por parte de macrófagos (Hamon *et al.*, 2000). Este evento se lleva a cabo por la activación del complejo translocasa ABC-A1 (ATP-Binding-Cassette transporter A1), que es activado por proteasas específicas, llamadas caspasas. Durante la apoptosis, las caspasas, cisteín-proteasas homólogas a la proteína Ced-3 de *Caenorhabditis elegans*, tienen un papel central (Leist y Jaattela, 2001). Existen dos rutas principales de activación de apoptosis, que finalizan con la activación de las caspasas: la ruta extrínseca y la ruta intrínseca.

1.7.1. Caspasas

El término caspasas deriva de cysteine-dependent aspartate-specific proteases, por sus siglas en inglés. Su actividad catalítica depende de un residuo de cisteína, que se encuentra dentro de su sitio activo, en un pentapéptido altamente conservado (QACRG). Las caspasas reconocen y hacen un corte proteolítico a su sustrato después de un residuo de aspártico. Actualmente se conocen 14 miembros diferentes de la familia de caspasas en mamíferos, y se han denominado de acuerdo al orden de su descubrimiento. En la célula, las caspasas son sintetizadas como zimógenos, las llamadas procaspasas, que están conformadas por un prodominio y dos subunidades (denominadas pequeña y

grande) en su extremo N terminal. Durante la activación, las subunidades pequeña y grande de las procaspasas son separadas por proteólisis. Entonces, un tetrámero compuesto por dos subunidades pequeñas y dos subunidades grandes forman una caspasa activa. Las caspasas son divididas en dos grupos: el de las caspasas iniciadoras, incluyendo las procaspasas 2, 8, 9 y 10; y el grupo de las caspasas efectoras, que incluye a las procaspasas 3, 6 y 7. Mientras las caspasas efectoras poseen prodominios cortos, las caspasas iniciadoras poseen prodominios grandes. En los prodominios grandes de las caspasas iniciadoras se encuentran los dominios efectores de muerte (DED, Death Effector Domain), como en el caso de la procaspasa 8 y los dominios de reclutamiento de caspasas (CARD, Caspase Recruitment Domain), como en la procaspasa 9. A través de sus prodominios, las caspasas iniciadoras son reclutadas y activadas en respuesta a la activación de receptores de muerte en la superficie celular (ruta extrínseca), o activadas por estímulos pro-apoptóticos originados en el interior de la célula (ruta intrínseca). Una vez que las caspasas iniciadoras han sido activadas, pueden procesar por proteólisis a las caspasas efectoras y activarlas (Gewies, 2003). Las caspasas efectoras activas reconocen varias proteínas celulares como sustratos (entre ellas: actina, DNA-PK, RB, laminina, DNAsas y procaspasas), por lo que su activación resulta en una amplificación de la señal de muerte y eventualmente en la ejecución de la muerte celular.

1.7.2. Ruta extrínseca

Esta ruta de activación de apoptosis inicia en el espacio extracelular de la membrana celular, con la unión de ligandos específicos a los llamados "receptores de muerte", miembros de la superfamilia del gen TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor), que incluye a: Fas/APO-1, TNF-R1 y los receptores TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), entre otros. Todos los miembros de esta familia tienen dominios extra-celulares ricos en cisteínas que permiten el reconocimiento específico de sus ligandos, lo que resulta en la trimerización y la activación de estos receptores. El siguiente paso de señalización es a través del dominio citoplasmático del receptor, donde se encuentra una secuencia conservada denominada "dominio de muerte" (DD, Death Domain). Al DD de los receptores activados, se unen otras proteínas adaptadoras como FADD o TRADD, a través de su propio DD, por lo que son reclutados y forman el llamado complejo señalizador inductor de muerte, DISC (Death Inducing Signaling Complex). Además del dominio DD, las proteínas adaptadoras como FADD contienen

también los dominios DEDs (Death Effector Domains), que se unen a un dominio homotípico en la procaspasa 8 o 10. La alta concentración de procaspasa 8 unida al complejo DISC, resulta en su activación autocatalítica y la liberación subsecuente de la caspasa 8 activa (C-8). La C-8 puede entonces reconocer y activar a las caspasas efectoras. En algunos tipos celulares, como hepatocitos, la señal originada por receptores de muerte activados no es suficientemente fuerte para llevar a cabo la muerte celular. Por consiguiente, se requiere que la señal de muerte sea amplificada a través de la ruta intrínseca, que depende de mitocondria. La proteína Bid, miembro de la familia de proteínas BCL-2 (sección 1.7.5.3.), es el nexo entre la ruta extrínseca y la ruta intrínseca. En citosol, Bid es reclutada y activada por proteólisis por la C-8. La Bid activada es una forma truncada (tBid), que es miristilada para su translocación a mitocondria. Una vez en la membrana externa de mitocondria, interactúa con las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak e induce la liberación de citocromo *c* al citosol, lo que provoca la activación de la caspasa 9 (C-9) (Fig. 2). Los detalles de la liberación de citocromo *c* y las proteínas Bax y Bak se discutirán en la sección 1.7.5.2.

1.7.3. Ruta intrínseca

La mayoría de las señales pro-apoptóticas originadas dentro de la célula provienen del núcleo, como consecuencia de daño a DNA inducido por radiaciones, drogas o infección viral. La mayoría de las respuestas al daño a DNA resultan en la estabilización de la concentración de p53, como en la infección por Ad. Como se mencionó antes, p53 induce la activación de genes pro-apoptóticos, entre ellos, los de *bax* y *bak* (miembros de la familia de BCL-2) que tienen un papel fundamental en la regulación de apoptosis por esta ruta. La activación de las proteínas Bax y Bak, por otros miembros de la familia de BCL-2, es uno de los principales puntos de regulación en la ruta apoptótica intrínseca. Los detalles de esta regulación se discuten en la sección 1.7.5. Una vez activadas Bax y Bak, se translocan a la membrana externa de mitocondria, se oligomerizan e inducen la permeabilización de la membrana externa de mitocondria (MOMP, Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization), con la subsecuente salida de citocromo *c* al citosol. En citoplasma, el citocromo *c* se une a una proteína celular llamada APAF -1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1), en un proceso que requiere de ATP. La proteína APAF -1 se compone de tres dominios: CARD (Caspase Recruit Domain), que media la interacción homotípica con el dominio CARD de la C-9; NBD

(Nucleotide-Binding Domain), que permite la oligomerización requerida para procesar a la C-9; repeticiones WD40, responsables de unir a citocromo *c* (Zou *et al.*, 1997). APAF-1 puede entonces multimerizarse y formar un complejo heptamérico de aproximadamente 1 MDa, llamado apoptosoma (Fig. 2). En el apoptosoma se reclutan moléculas de procaspasa 9, donde se lleva a cabo su activación a través de proteólisis. Una vez activada la C-9, puede activar a la caspasa efectora 3, y ejecutar la muerte celular (Fig. 2) (Gewies, 2003).

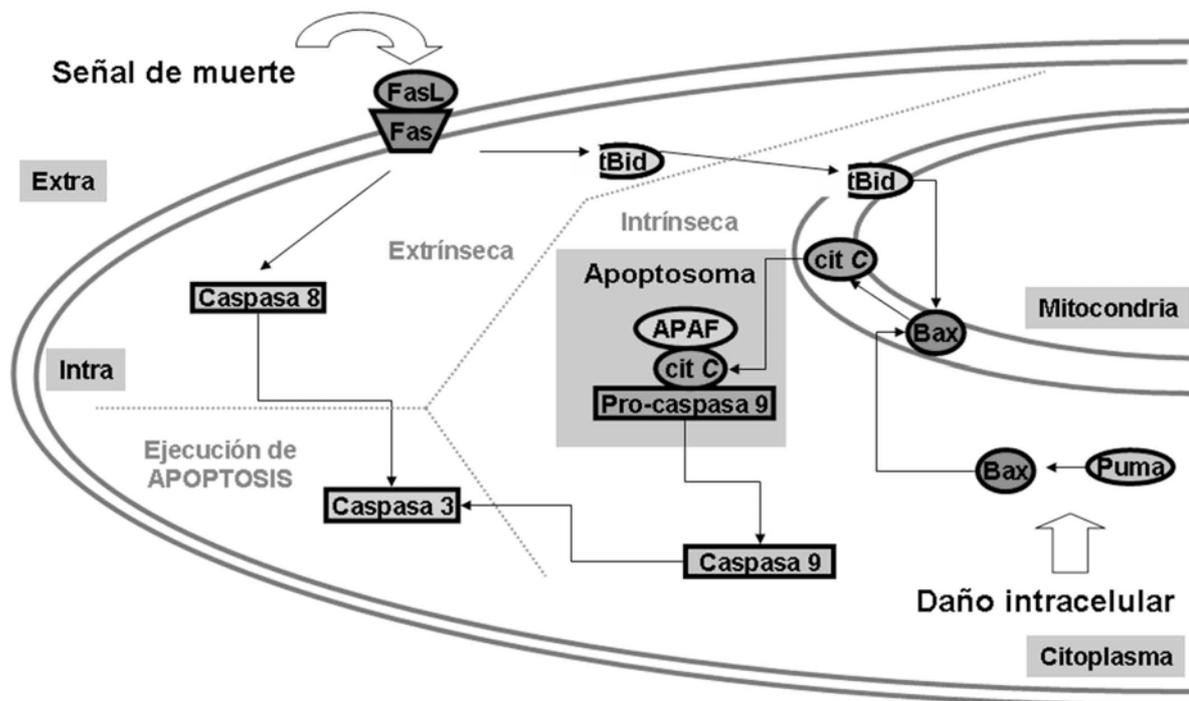


Figura 2. Diagrama de las principales rutas apoptóticas. La ruta extrínseca se inicia con la unión de un ligando a un receptor de muerte, como Fas. El receptor de Fas recluta y activa a la procaspasa 8. Por otra parte, la ruta intrínseca se inicia con daño intracelular (ruptura de DNA), que induce la activación de proteínas apoptóticas que inducen permeabilidad en la membrana externa de mitocondria, induciendo la liberación del citocromo *c* y la activación de la procaspasa 9. Ambas rutas convergen en la activación de caspasas efectoras, como la caspasa 3 y se inicia el desmantelamiento celular. El apoptosoma está formado por las proteínas: APAF, citocromo *c* y la pro-caspasa 9.

1.7.4. Regulación de caspasas

Además de la salida de citocromo *c* de mitocondria, otros factores anti y pro-apoptóticos son liberados por MOMP, como las IAPs (Inhibitor of Apoptotic Proteins) y

SMAC/DIABLO. Las IAPs son una familia de proteínas anti-apoptóticas, cuyos dominios característicos fueron descubiertos en baculovirus. Hasta el momento se conocen ocho IAPs en humanos, entre las que se encuentran: NAIP, c-IAP1, c-IAP2, XIAP y Survivina. Las IAPs ejercen su actividad anti-apoptótica al unirse e inhibir a caspasas, a través de dominios de 70 aminoácidos llamados BIR (Baculovirus IAP Repeats) que están presentes en todas las IAPs descritas (Crook *et al.*, 1993). Se ha sugerido que las XIAP, c-IAP1 y la c-IAP2 inhiben directamente a las caspasas C-3 y C-9 (Salvessen y Ducket, 2002). En cambio, la proteína SMAC/DIABLO, una vez liberada a citoplasma, es capaz de contrarrestar el efecto inhibitorio de las IAPs sobre las caspasas. SMAC/DIABLO se puede unir a las IAPs, como por ejemplo a la XIAP, y de esta manera desplaza a las caspasas de XIAP, y permite su activación de las caspasas (Du *et al.*, 2000). A la fecha, se desconoce si Ad codifica para proteínas con dominios BIR, que podría ser otro nivel de regulación de apoptosis.

1.7.5. Familia BCL-2

El gen *bcl-2* (B-Cell Lymphoma-2) fue descubierto en linfomas foliculares de células B, donde se observó una transcripción excesiva de este gen por el promotor del gen de la cadena pesada de inmunoglobulina, en el cromosoma 14, a consecuencia de una translocación (Tsujimoto *et al.*, 1985). De manera interesante, la sobreexpresión de este gen no provoca proliferación celular, como otros oncogenes, sino resistencia a la muerte celular. Existen alrededor de 20 proteínas de la familia de BCL-2 en células de mamífero (Youle y Strasser, 2008). Estas proteínas presentan homología en estructura y en secuencia a la BCL-2. Además, estas proteínas pueden ser definidas por la presencia o ausencia de secuencias conservadas conocidas como BH (BCL-2 Homology domains, BH1-BH4) y por la presencia de un dominio transmembranal hidrofóbico (TM, TransMembrane domain), de aproximadamente 16 a 19 residuos. Las funciones de estas proteínas son la inhibición o activación de la apoptosis. Para su estudio, las proteínas de esta familia se han dividido estructural y funcionalmente en tres subfamilias: subfamilia BCL-2 (anti-apoptóticas), subfamilia Bax (pro-apoptóticas), y en la subfamilia solo-BH3 (pro-apoptóticas) (Fig. 3).

1.7.5.1. Proteínas anti-apoptóticas (subfamilia BCL-2)

Como su nombre lo indica, estas proteínas inhiben apoptosis en la célula; en particular la originada por factores citotóxicos como deprivación de citocinas, radiaciones γ y UV. Los miembros de esta subfamilia son las proteínas: BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, MCL-1, BCL-B y A1. Todas estas proteínas tienen los cuatro dominios BH (BH1-BH4) (Fig. 3). Estas proteínas ejercen su función anti-apoptótica al unirse a los dominios BH3 de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak, formando heterodímeros que impiden la oligomerización de estas proteínas, e inhiben MOMP. Por otra parte, las proteínas de esta clase también pueden unirse a los miembros de la subfamilia solo-BH3, inhibiendo su actividad y su unión con Bax y Bak. Este tipo de regulación depende de la afinidad de las proteínas de esta subfamilia (BCL-2) por las proteínas solo-BH3, y por la localización subcelular. Por ejemplo, la localización de estas proteínas no es igual: mientras que la BCL-2 se localiza como una proteína integral de membrana en mitocondria (Janiak *et al.*, 1994), la proteína BCL-W y gran parte de la BCL-X_L se encuentran en citoplasma (Tsimbouri *et al.*, 2002), por lo que regulan proteínas diferentes.

1.7.5.2 Proteínas pro-apoptóticas (subfamilia Bax)

Esta subfamilia incluye a las proteínas Bax, Bak y a la poco estudiada Bok. Estas son las proteínas efectoras de la ruta intrínseca, al inducir directamente MOMP. La activación de estas proteínas es regulada directa o indirectamente por los demás miembros de la familia de las BCL-2. En la secuencia de estas proteínas también se encuentran los cuatro dominios BH y un dominio TM (Fig. 3). En una célula sana, las proteínas Bax y Bak se encuentran inactivas. Bax se encuentra inactiva en su forma citosólica, con su dominio TM oculto en un “pocket” hidrofóbico, compuesto por los dominios BH1, BH2 y BH3 (Lalier *et al.*, 2007). En cambio, Bak se encuentra inactiva en la membrana mitocondrial, unida a la proteína de la subfamilia solo-BH3 MCL-1, la cual tiene que ser degradada (vía proteosoma) para que se dé la activación de Bak. Una vez activas (probablemente a través de cambios conformacionales, como la exposición del dominio TM de Bax), ambas proteínas forman oligómeros en la membrana externa mitocondrial, e inducen MOMP y la salida de citocromo *c* al espacio citoplasmático. Por otra parte, evidencias recientes indican que la principal regulación de Bax ocurre principalmente a nivel postraduccional, por parte de las proteínas solo-BH3 (Youle y Strasser, 2008). Además el hecho de que el gen *bax* se expresa constitutivamente,

sugiere que la regulación postraduccional de Bax por parte de las proteínas proapoptóticas de la subfamilia solo-BH3, es su principal mecanismo de regulación (véase siguiente sección). El mecanismo molecular por el cual se induce la permeabilización de la membrana mitocondrial no ha sido caracterizado, pero el modelo más aceptado es la formación de poros en la membrana externa, constituidos por las proteínas Bax y Bak (Chipuk *et al.*, 2006). Por otra parte, el mecanismo de activación de Bax y Bak es regulado positivamente por los miembros de la subfamilia solo-BH3, que se discutirán a continuación.

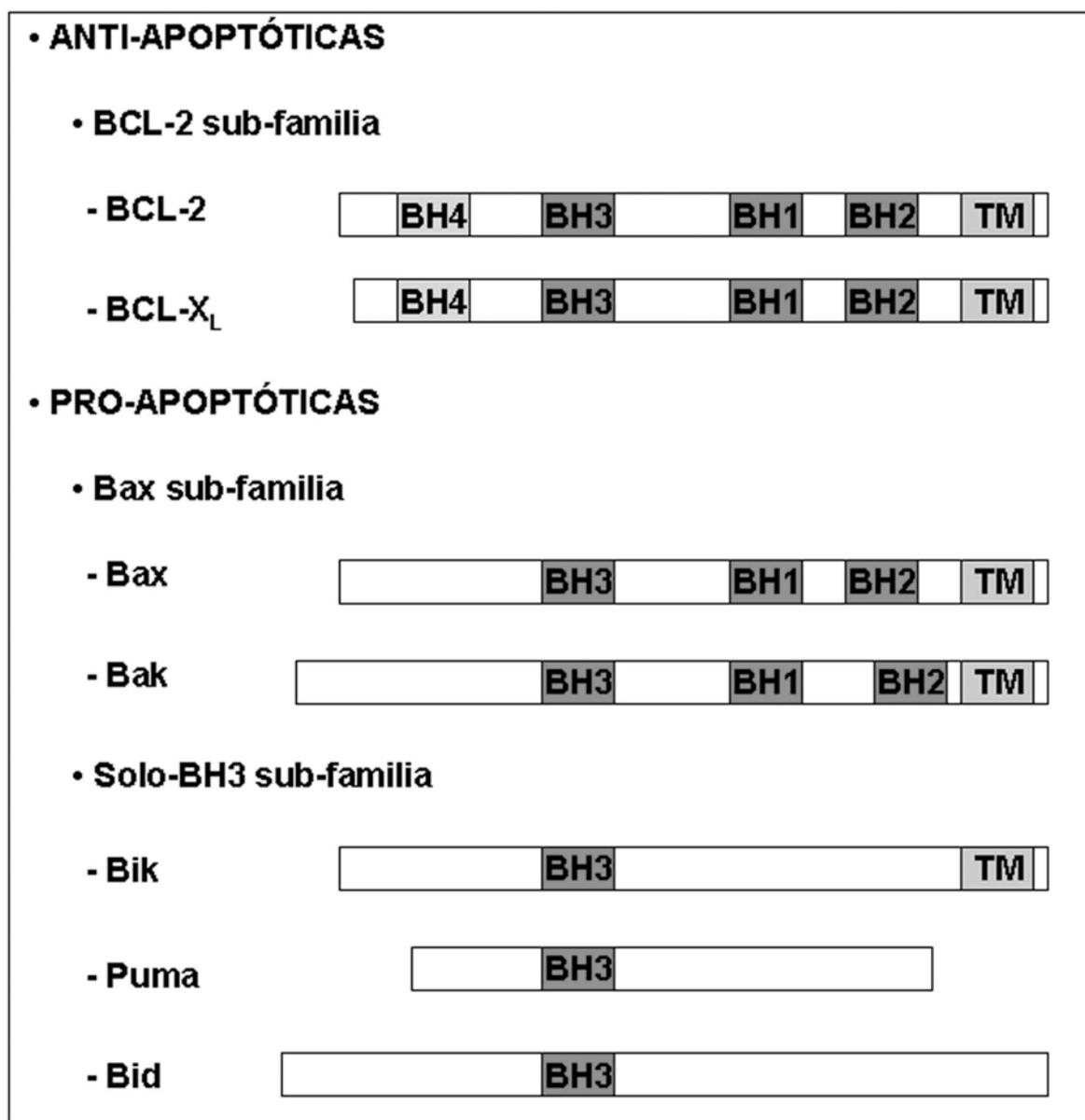


Figura 3. Diagrama de las tres subfamilias de la familia BCL-2. Se muestran proteínas representativas de cada subfamilia, así como la localización de los dominios BH1-BH4 y del dominio transmembranal (TM). Los miembros de la subfamilia Bax son pro-apoptóticas y son las proteínas efectoras de apoptosis, al inducir directamente MOMP. La subfamilia de solo-BH3 induce la activación de los miembros de la subfamilia de Bax. En cambio, las proteínas anti-apoptóticas de la subfamilia de BCL-2 pueden inhibir la actividad de las dos subfamilias antes mencionadas (véase texto).

1.7.5.3 Proteínas pro-apoptóticas solo-BH3 (subfamilia solo-BH3)

Los miembros pro-apoptóticos de esta subfamilia sólo comparten el dominio BH3 con los demás miembros de la familia, por lo que se ha especulado que pueden ser resultado de evolución convergente. Estas proteínas regulan la activación de Bax y Bak, y son incapaces de inducir apoptosis en ausencia de ellas. El dominio BH3 es una secuencia de aminoácidos LXXXGD, en la cual X representa cualquier aminoácido; esta secuencia se encuentra conservada en todos los miembros de la familia de BCL-2. Entre los miembros de esta subfamilia se encuentran: Puma y Noxa, que responden a daño a DNA y son activadas por p53 (Cregan *et al.*, 2004); Hrk y Bim, que son activados por privación de factores de crecimiento; Bmf, que es activado por “anoikis” (desprendimiento de la célula de la matriz extracelular); y por último Bad, Bim, Bik y Bid (esta última está involucrada en la amplificación de la señal apoptótica en la ruta extrínseca) que son activadas por privación de citocinas (Fig. 3). Las funciones de estas proteínas son redundantes, su expresión y actividad dependen del tipo celular y origen del estímulo apoptótico. Por ejemplo, las proteínas Bim y Puma se unen a todos los miembros de la clase de proteínas anti-apoptóticas, mientras otros, como Bad y Noxa se unen a ciertos miembros anti-apoptóticos (Keeble y Gilmore, 2007). La actividad pro-apoptótica de las proteínas solo-BH3 depende de su intervención en la formación de heterodímeros entre las proteínas pro- (Bax, Bak) y anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-XL).

Existen dos modelos de activación de apoptosis dependiente de p53 por las proteínas solo-BH3, en citoplasma. En el primero, se ha propuesto que proteínas como tBid y Bim, se unen a través de sus dominios BH3 (de tipo “Bid-like”) directamente a Bax y a Bak, e inducen su oligomerización en la membrana de la mitocondria, en un mecanismo parecido a “hit and run”, que es un cambio conformacional de Bax inducido por la unión tBid, y una vez hecho este cambio, tBid se disocia (Perez y White, 2000). En el segundo modelo, las proteínas como Bad y Bik no se pueden unir directamente a Bax o a Bak, pero interactúan preferencialmente con las proteínas anti-apoptóticas BCL-2 y BCL-X_L, lo que provoca la formación de heterodímeros pro-apoptóticos, al impedir la unión de estos últimos con Bax y Bak. Por otra parte, también las proteínas Bad o Bik

podrían desplazar a proteínas como Bid y Bim de su unión al dominio BH3 de BCL-2 o de BCL-X_L. Al liberarse Bid y Bim se permite la oligomerización de Bax y Bak, y la liberación posterior del citocromo *c*. Estos dos modelos no son mutuamente excluyentes y su sinergia puede contribuir a la señalización apoptótica. Recientemente se ha sugerido que la interacción de Bax con proteínas anti-apoptóticas (BCL-2/BCL-X_L) resulta en un cambio conformacional de Bax, lo que podría aumentar la afinidad de las proteínas solo-BH3 por Bax, y disociar al heterodímero anti-apoptótico Bax-BCL-X_L/BCL-2 (Youle y Strasser, 2008). El sequestro de Bax por las solo-BH3 de Bax puede inducir la exposición del dominio TM de Bax, y ésta puede ser relocalizada a la membrana externa mitocondrial. Sin embargo, la falta de evidencia directa de la interacción de proteínas solo-BH3, como Bik, con Bax y/o Bak, sugiere que el principal mecanismo de regulación de apoptosis por parte de las solo-BH3 es a través de su unión con las proteínas anti-apoptóticas de la subfamilia de BCL-2. El mecanismo molecular exacto de la activación de Bax/Bak por las proteínas solo-BH3 es todavía desconocido.

1.8. Regulación de las proteínas p53 p21 y Puma en una célula

1.8.1. Regulación de la proteína p53

La fosfoproteína celular p53 es un regulador del avance del ciclo celular que responde a señales de estrés en la célula (hipoxia, radiaciones, daño a DNA), y su gen se encuentra mutado en cerca del 60% de los cánceres humanos. p53 es una proteína multifuncional y sus funciones son reguladas principalmente por dos mecanismos: i) Las modificaciones postraduccionales que regulan su unión a DNA y su actividad como factor transcripcional de genes involucrados en la reparación de DNA, la detención del ciclo celular, la apoptosis y la inhibición de la angiogénesis (Vogelstein *et al.*, 2000); y ii) La localización de la proteína p53 es importante para su regulación. Por ejemplo, a través de secuencias para su exportación e importación nuclear, siendo transportada a través de microtúbulos hacia la maquinaria de importación nuclear en el citoplasma (Vousden y Woude, 2000; Giannakakou *et al.*, 2000). En el primer mecanismo, la proteína p53 puede ser modificada en al menos 17 sitios diferentes. Entre estas modificaciones, la mejor estudiada es la fosforilación en respuesta a radiaciones ionizantes o por luz UV; la mayoría de ellas ocurren en el extremo N terminal (serina 115, Appella y Anderson, 2000). Otras modificaciones importantes son la acetilación

inducida por daño químico al DNA y por hipoxia (Ito *et al.*, 2002), y la modificación por su unión a SUMO-1 (small ubiquitin-like modifier protein-1 (Gostissa *et al.*, 1999). En el segundo mecanismo, es importante la localización de p53 a zonas nucleares específicas donde se modula su actividad (Gostissa *et al.*, 2003). Por ejemplo, la p53 se une a la PML (isoforma IV) y es reclutada a los llamados PODs, donde se estimula su actividad transcripcional (Fogal *et al.*, 2000).

Aunque en algunos modelos, el daño a DNA por medio de fármacos, incrementa el nivel de transcripción de p53 (Pei *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2000), el principal mecanismo de regulación de la actividad de p53 ocurre a nivel post-traducciona (Harris y Levine, 2005). El principal regulador postraducciona de p53 es la proteína celular HDM-2 (Human Double Minute-2). Esta proteína actúa como una ubiquitin ligasa para p53 y lo marca, a través de ubiquitinación, para su degradación proteosoma. Esta regulación negativa por HDM-2 es la causa de los niveles bajos de p53 encontrados en células sanas. Además, p53 induce la activación de la transcripción del gen de *hdm-2*, por lo que la estabilización de p53 induce un circuito de regulación negativa sobre su propia concentración. Por otra parte, la actividad inhibitoria de HDM-2 sobre p53 es regulada negativamente por las fosforilaciones en HDM-2 por parte de las cinasas ATM y CDK-2, así como su secuestro por parte de la proteína ARF (Alternative Reading Frame). El gen *arf* se encuentra en el *locus* de los genes *cdkn2a*, pero se expresa en un marco abierto de lectura distinto, por lo que codifica a una proteína que se une a HDM-2 e induce su poliubiquitinación por lo que posteriormente es degradada por proteosoma. La proteína ARF es regulada positivamente por el factor transcripcional E2F. En una célula sana (en fase G0 o G1), los factores transcripcionales de la familia de E2F están unidos a la proteína RB (sección 1.5.2), por lo que se inhibe su unión a promotores específicos, entre ellos el del gen *arf*. Por lo tanto, la activación o inhibición de HDM-2 tiene una relación directa con la concentración de p53.

La activación de la transcripción de diferentes genes blanco de la proteína p53 depende de su unión a DNA como un tetrámero. Entre estos genes se encuentran genes reguladores del ciclo celular como *p21*, que participan en detener el avance del ciclo celular en la fase G1 o antes de la mitosis, en la fase G2. Otro conjunto de genes que son activados por p53 son genes pro-apoptóticos, como *bax* y *puma*, que participan en la eliminación de células con daños irreparables, a través de apoptosis. Una célula con concentraciones altas de p53 puede detener el avance del ciclo celular o entrar en apoptosis. La decisión entre estos dos eventos celulares depende de diferentes factores:

el tipo celular, la presencia de oncogenes, la intensidad de estrés, el nivel de expresión del gen *p53*, y de la interacción de la proteína *p53* con proteínas específicas (Vousden y Lu, 2002).

Hasta hace poco, la actividad pro-apoptótica de *p53* se atribuía únicamente a su papel como factor transcripcional, pero en estudios recientes se ha observado que la concentración citoplasmática de *p53* tiene un papel importante en la inducción de la apoptosis en células sanas (Chipuk *et al.*, 2004). En estos estudios, se ha propuesto que la localización de *p53* en la mitocondria puede inducir la apoptosis a través de MOMP, por la interacción de *p53* con las proteínas de la familia de BCL-2. Las interacciones de *p53* con las proteínas de la familia de BCL-2 se describen en la sección 1.8.3. La exportación de *p53* del núcleo puede ser inducida por la ubiquitinación en su extremo carboxilo terminal, pero esta modificación también puede señalar a *p53* para su degradación por el proteosoma. Entonces, la cantidad de HDM-2 disponible parece ser determinante en el grado de ubiquitinación de *p53*: la mono-ubiquitinación de *p53* por niveles bajos de HDM-2 permite la exportación nuclear de *p53*; en cambio, niveles altos de HDM-2 resultan en la poli-ubiquitinación y degradación de *p53* por el proteosoma (Li *et al.*, 2003). Además, la actividad pro-apoptótica de *p53* se ha relacionado con la capacidad de las diferentes isoformas de *p53* para unirse a HDM-2 y ser exportadas a citoplasma. La variante de *p53* con una Arg72 en lugar de Pro72 es más eficiente en su acumulación en citoplasma, y en la inducción de apoptosis (Dumont *et al.*, 2003). Además, recientemente se ha observado que la acumulación de *p53* en el citoplasma también puede ser inducida por el factor transcripcional FOXO3a. De manera interesante, FOXO3a inhibe la actividad transcripcional de *p53*, pero al mismo tiempo induce la apoptosis dependiente de *p53* (You *et al.*, 2006). Estas observaciones indican que la actividad transcripcional de *p53* puede ser independiente de la inducción de la apoptosis en el citoplasma. Los diferentes niveles de regulación de *p53* ponen en evidencia que su regulación es compleja, y el tipo celular y el origen del estímulo apoptótico pueden ser fundamentales para determinar su actividad.

1.8.2. Regulación de la proteína p21

El primer blanco transcripcional de *p53* identificado fue el gen *p21* (WAF/CIP1) (el-Deiry *et al.*, 1993). La proteína *p21* forma parte de una familia de proteínas

estructuralmente relacionadas, que incluye a las proteínas p27 y p57, las cuales comparten la capacidad de inhibir un amplio espectro de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs, Ciclin Dependent Kinases) (Coqueret, 2003). La p21 actúa como un inhibidor de CDKs, e induce la detención del ciclo celular en respuesta a daño a DNA, y además es un inductor de diferenciación y senescencia replicativa celular. Estos efectos anti-proliferativos de p21 están relacionados con su unión a PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), con quien forma un complejo que inhibe la síntesis de DNA requerida para la entrada a la fase S del ciclo celular. Al igual que muchas otras proteínas reguladoras del ciclo celular, la vida media de la p21 es relativamente corta (menos de una hora), y es degradada por el proteosoma (Bendjennat *et al.*, 2003). En una célula sana con niveles basales de p53, los niveles de transcripción de p21 son bajos.

1.8.3. Regulación de Puma y p53 en citoplasma

Como se mencionó antes (sección 1.8.1) parte de la actividad pro-apoptótica de p53 se realiza en el citoplasma. Actualmente se desconoce el mecanismo molecular exacto de la inducción de apoptosis en el citoplasma por p53, pero diferentes evidencias sugieren que las proteínas pro-apoptóticas de la subfamilia solo-BH3 pueden estar directamente involucradas, como por ejemplo la proteína Puma (Vousden, 2005). Se han propuesto dos modelos de activación de apoptosis dependiente de p53 en citoplasma. En ambos modelos p53 parece tener funciones similares a las proteínas pro-apoptóticas solo-BH3. El primer modelo propone que la p53 induce MOMP al impedir la formación de heterodímeros anti-apoptóticos entre los miembros de la subfamilia BCL-2 con las proteínas Bax y Bak, por un mecanismo similar al de las proteínas solo-BH3 Bad y Bik. Además se ha observado que p53 se puede unir a BCL-2 y a BCL-X_L, lo que apoya ese modelo (Chipuk *et al.*, 2004). El segundo modelo propone que p53 se une a la proteína pro-apoptótica Bak, e induce un cambio conformacional en Bak (“activación”) que permite la oligomerización de Bax y Bak en la membrana externa de mitocondria, por un mecanismo similar al de las proteínas solo-BH3 tBid y Bim (véase sección 1.7.5.3). También se ha observado que p53 no depende de modificaciones postraduccionales para la activación de Bax (Chipuk *et al.*, 2004). La observación de p53 citoplásmica asociada a membrana mitocondrial parece corresponder con este modelo (Vousden, 2005). Estos modelos no son mutuamente excluyentes, y se ha sugerido que la proteína Puma puede

amplificar la inducción de apoptosis dependiente de p53, conectando ambos modelos. Como se mencionó antes, la transcripción del gen *puma* está regulada por los factores E2F y p53, por lo que la regulación transcripcional es la principal regulación de la proteína Puma. La proteína Puma es una proteína pro-apoptótica de la subfamilia de proteínas solo-BH3 y se localiza en el citoplasma, donde se ha observado que su presencia es importante para la inducción eficiente de la apoptosis dependiente de p53 (Jeffers *et al.*, 2003). Por otra parte, en estudios recientes se ha observado que Puma por sí sola no es suficiente para activar directamente a Bax y no puede inducir MOMP, lo que indica que la actividad pro-apoptótica de Puma depende de p53 (Chipuk *et al.*, 2005). Además mutantes de BCL-X_L que no pueden interactuar con proteínas solo-BH3 (entre ellas Puma) mantienen inactiva a p53 y no inducen apoptosis (Chipuk *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha observado que péptidos con la BH3 de Puma son suficientes para liberar a p53 de BCL-X_L, lo que indica su alta especificidad por p53. Por lo tanto, se ha propuesto que Puma compite y libera a p53 del complejo p53-BCL-X_L, y de esta manera amplifica el estímulo apoptótico al permitir que exista mayor cantidad de p53 disponible para interactuar con Bak, como se propone en el segundo modelo. A pesar de las evidencias arriba mencionadas, el mecanismo molecular exacto de la actividad pro-apoptótica de p53 en citoplasma, no se conoce.

1.9. Regulación de apoptosis dependiente de p53 por Ad

Como se mencionó antes, en una célula infectada por Ad5, la E1A disocia al complejo RB-E2F. La proteína E2F puede entonces inducir la progresión del ciclo celular a fase S, al inducir la síntesis de la proteína ARF que al unirse a HDM-2, inhibe la degradación proteosomal de p53 (Debbas y White, 1993) (Fig. 4). Esto resulta en un estímulo pro-apoptótico, y Ad codifica para tres proteínas virales con una función anti-apoptótica: E1B 19 kDa, E1B 55 kDa y E4 Orf6. Estas proteínas virales contrarrestan las actividades pro-apoptóticas de p53 tanto en el núcleo como en el citoplasma.

1.9.1. E4 Orf6

La proteína viral E4 Orf6 (E4) consta de 296 residuos y en su secuencia se encuentra una señal de exportación nuclear (NES, Nuclear Export Signal) rica en leucinas entre los residuos 83 - 93 y una secuencia de cisteínas e histidinas (HCHC) conservada E4

(Brown *et al.*, 2001). Se ha sugerido que la HCHC es un dominio de unión a zinc. Sustituciones en esta región resultan en alteraciones en la unión de la E4 con la E1B 55 kDa (E1B) y en la inhibición de la degradación de p53 por parte del complejo E1B-E4. Por lo tanto, se ha propuesto que la secuencia HCHC es importante para las funciones de esta proteína (Boyer y Ketner, 2000).

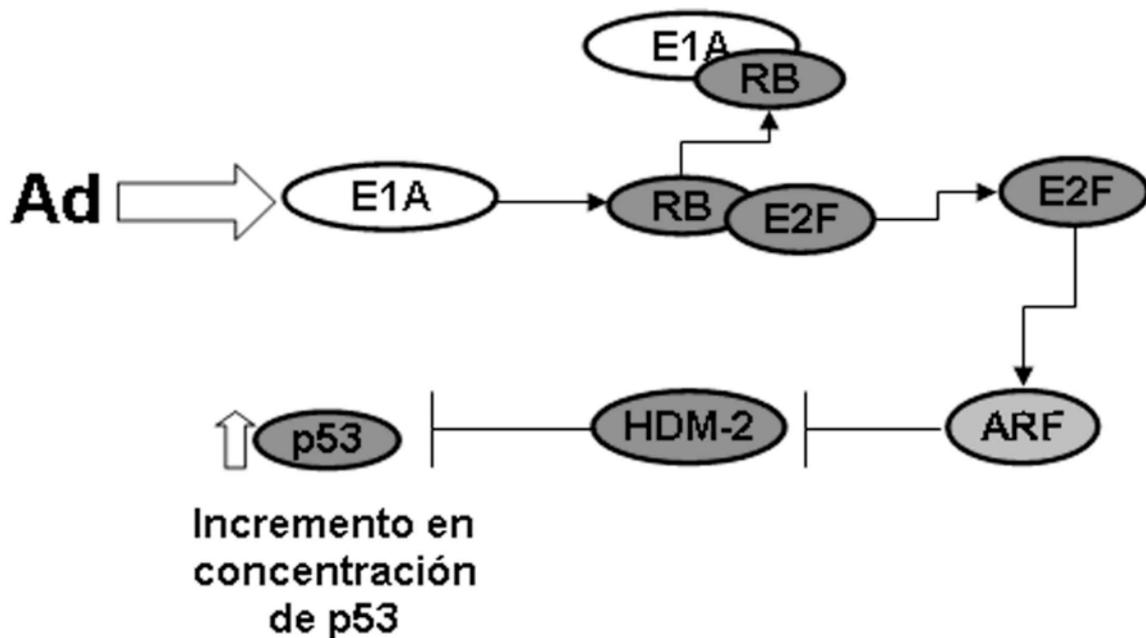


Figura 4. Diagrama de la regulación de la concentración de p53 durante la infección por Ad. La proteína viral E1A activa al factor transcripcional E2F, al secuestrar a la proteína RB. E2F puede entonces inducir la transcripción del gen *arf*. El producto de este gen, la proteína ARF se une e inhibe a HDM-2, el principal regulador de p53. Las flechas delgadas indican inducción, mientras que las líneas truncas indican inhibición.

En el extremo carboxilo terminal de la E4 se encuentra una α -hélice anfipática, conformada por los residuos 239 – 255 (Fig. 5). Las deleciones (241 - 250) y sustituciones (Arg239, Arg241, Leu245) en esta región impiden la localización nuclear de E1B por parte de la E4, en células HeLa, lo que indica que la α hélice de E4 es importante para la localización nuclear de la E1B, en zonas nucleares donde ambas proteínas colocalizan (Orlando y Ornelles, 1999). Por otra parte, se observó que la E1B puede transportarse eficientemente entre el núcleo y el citoplasma, aún en la ausencia de E4 (Kratzer *et al.*, 2000), lo que sugiere que la E4 altera la distribución intranuclear de la E1B en vez de inducir su entrada al núcleo. El complejo E1B-E4 se transporta continuamente entre el núcleo y el citoplasma y, como se mencionó antes, participa en

la degradación de p53, y en la exportación selectiva de mRNA virales. Al mismo tiempo abate la exportación de los mRNA celulares (Dobner y Kzhyshkowska, 2001).



Figura 5. Diagrama de la proteína E4 Orf6. Los diferentes dominios se muestran en bloques, indicando su posición y función.

1.9.2. E1B 55 kDa

La E1B 55 kDa (E1B) es una proteína de 496 residuos. Esta fosfoproteína contiene tres sitios de fosforilación, dos de ellos con secuencias blanco para Caseína Kinasa II (CK2, Casein Kinase 2), Ser490 y Ser491, y otro para CK1, en la Thr495. La lisina 104 es un blanco para la sumoilación de E1B (SUMO-1, Small Ubiquitin Related Modifier protein 1) y la sustitución por una arginina en este sitio afecta la distribución intranuclear de la proteína. Las fosforilaciones en la E1B son necesarias para su actividad transformante, la inhibición de apoptosis y la inhibición de la transcripción dependiente de p53. Esta última se lleva a cabo cuando la E1B se une a p53, unión que no impide que p53 se una a DNA, pero al encontrarse unida la E1B a p53, p53 pasa de ser un activador a un represor transcripcional de secuencias blanco específicas (Teodoro y Branton, 1997). La proteína E1B contiene una secuencia de unión a DNA, característica de dedos de Zn, entre los residuos 350 y 376, pero no se sabe si la proteína se une a zinc. También se encuentra una secuencia de unión a RNA (que no es secuencia específica), llamada RNP debido a su homología con secuencias presentes en las ribonucleoproteínas celulares (RiboNucleo Proteins, RNPs) entre los residuos 250 - 308. Estas regiones presentan unión a ácidos nucleicos en una E1B fusionada a GST (Glutation-S-Transferasa) sintetizada en *Escherichia coli* (Horridge y Leppard, 1998). Las sustituciones dentro de la región RNP en la E1B eliminan la unión de este complejo con RNA (Horridge y Leppard, 1998), y originan proteínas no funcionales, lo que sugiere que constituyen un dominio importante para el plegamiento correcto de la proteína (Gonzalez y Flint, 2002). Por otra parte, la E1B también cuenta en su secuencia con: una señal de localización nuclear (NLS, Nuclear Localization Signal, residuos 360

– 496); una señal de exportación nuclear (NES, residuos 83 - 93), rica en leucinas que es necesaria y suficiente para la exportación de la proteína del núcleo en ausencia de otras proteínas virales (Fig. 6) (Kratzer *et al.*, 2000, Dosch *et al.*, 2001).

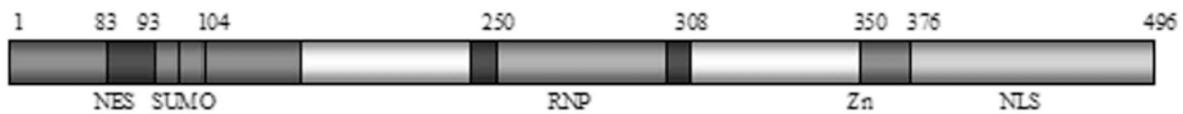


Figura 6. Diagrama de la proteína E1B 55kDa. Los diferentes dominios se muestran en bloques, indicando su posición y función.

1.9.3. E1B 19 kDa

La proteína viral E1B 19 kDa es codificada por la misma región en el genoma viral que la proteína E1B 55 kDa, pero tienen características diferentes. E1B 19 kDa es un homólogo viral de la BCL-2 con actividad anti-apoptótica. Originalmente, las observaciones de que mutantes en el gen de E1B 19 kDa causan degradación de DNA cromosomal (White *et al.*, 1984) y que la BCL-2 puede complementar la ausencia de la E1B 19 kDa durante la infección por Ad (Chiou *et al.*, 1994), indicaron que esta proteína tiene un papel importante en la inhibición de apoptosis y que además es un homólogo viral de BCL-2. La homología entre la secuencia de la E1B 19 kDa y la BCL-2 es limitada, pero existen residuos conservados entre la E1B 19 kDa de Ad y la región BH3 de la BCL-2 (Tarodi *et al.*, 1993). Además de bloquear la apoptosis inducida por la infección de Ad, la E1B 19 kDa también bloquea la apoptosis inducida por una amplia variedad de estímulos (expresión ectópica de p53, daño a DNA) lo que indica que la E1B 19 kDa regula un paso en el que convergen diferentes rutas apoptóticas (White, 2001). La E1B 19 kDa inhibe apoptosis al impedir la oligomerización de Bax y de Bak, de una forma similar a BCL-2 o a BCL-X_L (sección 1.7.5.1). Las observaciones de White y colaboradores indican que en la infección con Ad5 se induce la activación de Bax y Bak, y que estas proteínas son reguladas negativamente por E1B 19 kDa (Cuconati *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, evidencias recientes indican que durante la infección por Ad5, las proteínas pro-apoptóticas solo-BH3 también se encuentran involucradas en la regulación de Bax y de Bak, especialmente Bik y Bim (Subramanian *et al.*, 2007). Actualmente se desconoce si la

E1B 19 kDa regula a las proteínas BH3-only en la inhibición de apoptosis durante el ciclo replicativo de Ad.

1.9.4. Regulación de apoptosis dependiente de p53 en citoplasma

La regulación de las proteínas Bax y Bak por homólogos virales de las proteínas anti-apoptóticas de la familia de BCL-2, es una estrategia anti-apoptótica utilizada por varios virus (Cuconati y White, 2000). Como se mencionó antes, la E1B 19 kDa suprime la apoptosis inducida por varios tipos de estímulos pro-apoptóticos (Subramanian *et al.*, 1993), como daño a DNA, y una subpoblación de p53 se relocaliza en mitocondria, donde induce apoptosis a través de MOMP (sección 1.8.1). Durante las fases temprana y tardía del ciclo de replicación de Ad, una fracción de E1B 19 kDa es relocalizada a la mitocondria, donde forma un complejo con p53 en la membrana de mitocondria, y es posible que este complejo impida MOMP (Lomosonova *et al.*, 2005). En células infectadas con Ad se ha observado que existe interacción de p53 con Bak, así como con la proteína viral E1B 19 kDa (Han *et al.*, 1996; Leu *et al.*, 2004; Lomosonova *et al.*, 2005). Por otra parte, la E1B 19 kDa puede unirse a Bak y a Bax, pero no se puede unir a BCL-2, BCL-X_L, Bad, Bid y tBid (Chen *et al.*, 1996), lo que sugiere que el mecanismo de regulación de esta proteína viral se lleva a cabo por la inhibición de la oligomerización de Bax y de Bak. La observación de que la E1B 19 kDa no se encuentra unida a Bak en una célula normal, en ausencia de un estímulo de muerte (Sundarajan y White, 2001), sugiere que se requiere de una activación en Bak/Bax (un mecanismo parecido al “hit-and-run” de tBid, sección 1.7.5.3) (Perez y White, 2000), para que se lleve a cabo la unión de E1B 19 kDa con las proteínas pro-apoptóticas (subfamilia Bax). En conjunto, las observaciones arriba mencionadas sugieren que la regulación por parte de la E1B 19 kDa de los miembros de la subfamilia Bax se lleva a cabo en un paso inmediatamente anterior a MOMP, por lo que es una estrategia anti-apoptótica eficiente.

1.9.5. Regulación de apoptosis dependiente de p53 en núcleo

Como se mencionó antes, la activación de la célula por E1A induce la actividad proapoptótica de p53, que es regulada por proteínas sintetizadas en la fase temprana del ciclo replicativo de Ad. Además de su papel en la regulación en la exportación de mRNAs virales tardíos (sección 1.6.1), las proteínas virales E1B 55 kDa (E1B) y E4 Orf6 (E4) interactúan directamente con p53. La E1B se une al extremo amino de p53, mientras que E4 se asocia con el extremo carboxilo, y ambas uniones inhiben la actividad transcripcional de p53 por separado (Kao *et al.*, 1990). La concentración de p53 es regulada negativamente por el complejo E1B-E4, que induce su degradación proteosomal (sección 1.6.4). Por otra parte, también se ha sugerido que durante la infección, la E4 Orf3 induce la degradación de la p53, al liberar a p53 de su unión con la E1B y hacerla disponible para su degradación por el complejo E1B-E4 (Konig *et al.*, 1999). En la célula infectada por Ad la localización nuclear de p53 parece ser importante para su regulación. Como se mencionó antes, la PML recluta proteínas a ciertas regiones nucleares para su regulación (sección 1.6.1), entre ellas a p53. De hecho, algunas modificaciones postraduccionales de p53 como acetilación, fosforilación y desubiquitinación se llevan a cabo por enzimas que se encuentran en los sitios donde se encuentra PML. Se ha propuesto que la p53 es reclutada a estas estructuras para llevar a cabo modificaciones postraduccionales, en respuesta a diferentes formas de estrés, como la infección viral. La localización de p53 a sitios nucleares específicos es esencial para sus funciones como activador transcripcional o como activador de apoptosis (Gostissa *et al.*, 2003). Una característica importante de células infectadas con Ad es la formación de ZRPs, donde se lleva a cabo la relocalización de varias proteínas celulares. Las proteínas E1A, que inducen la estabilización de p53, se encuentran en las ZRPs virales, mientras que la proteína viral E4 Orf3 se localiza en estructuras que contienen a la PML (Carvalho *et al.*, 1995) (sección 1.6.1). Recientemente, en el laboratorio se observó que la localización intracelular de p53 es alterada durante la infección por Ad. En ausencia de la E1B, p53 se acumula en el núcleo de la célula infectada. En cambio, solamente en presencia de la E1B, p53 se organiza en el núcleo en estructuras reticulares (Cardoso *et al.*, sometido a *Virology*, 2008). Debido a que estas estructuras se presentan antes de la síntesis de DNA viral, parece ser que una función temprana de la E1B es la relocalización de p53 a estas zonas nucleares. Es posible que esta relocalización de p53, dependiente de la E1B, esté involucrada en la regulación de apoptosis dependiente de p53.

1.10. Mutantes de Ad para el estudio de la proteína multifuncional E1B 55 kDa

Para el estudio de la proteína E1B 55 kDa (E1B) se han utilizado mutantes de Ad, que codifican a una E1B alterada. En este estudio se utilizó una serie de mutantes de Ad con alteraciones en el gen que codifica para la E1B, que han sido utilizadas para intentar definir dominios funcionales en la proteína. Entre éstas, Yew y colaboradores (1990) construyeron 13 mutantes con inserciones en diferentes sitios a lo largo del marco abierto de lectura del gen de la E1B, y en este estudio se utilizaron dos de estos mutantes. i) El mutante A143 contiene una inserción de cuatro aminoácidos en el residuo 143 de la secuencia de la E1B. La proteína E1B sintetizada por este mutante no se une a la E4 Orf6 (E4) (Rubenwolf *et al.*, 1997). También se ha observado que la infección con A143 afecta la exportación de mRNA virales y la localización de la proteína E1B en células HeLa (Gonzalez y Flint, 2002). En la ausencia del complejo E1B-E4 no se induce la degradación de p53, ni la exportación selectiva de mRNA virales y como consecuencia, disminuyen la síntesis de proteínas tardías y la eficiencia de replicación del virus. Cabe mencionar que estos fenotipos son más severos en células normales no transformadas, como HFFs (Human Foreskin Fibroblasts, con niveles de p53 silvestre) (Gonzalez *et al.*, 2006). ii) El mutante Hr6 tiene deletado el gen de E1B, y no sintetiza a la proteína E1B (Harrison *et al.*, 1977). La eficiencia de replicación de este mutante es alrededor de 1000 veces más baja que Ad silvestre, y recientemente observamos que en HFFs infectadas con este mutante existe una síntesis de DNA viral deficiente. Además, la p53 no se relocaliza a las estructuras nucleares parecidas a anillos de una célula infectada (sección 1.6.1) (Cardoso *et al.*, sometido a Virology, 2008). Debido a estas alteraciones presentes en los anteriores mutantes, su estudio nos permitió investigar el papel de la E1B y del complejo E1B-E4 en la inhibición de apoptosis dependiente de p53.

1.11. Justificación

Los Ad tienen una enorme utilidad en la investigación biológica, tanto como herramientas para el estudio de oncogenes, como para su uso potencial como agentes oncolíticos. El mutante de Ad dl1520/ONYX-015, que carece del gen de E1B 55 kDa y es incapaz de degradar p53 en células infectadas, ha sido usado en ensayos preclínicos como terapia oncolítica (Bischoff *et al.*, 1996). Inicialmente se propuso que la replicación de dl1520/ONYX-015 era restringida por el status de p53 en células normales, y que tendría una replicación selectiva en células tumorales con deficiencia en p53. Posteriormente, se observó que la exportación alterada de mRNA virales, y no la ausencia de p53, es el factor determinante para un ciclo de replicación exitoso de dl1520/ONYX-015, que solo se lleva a cabo en líneas celulares que complementan la alteración en la exportación de mRNA virales (O'Shea *et al.*, 2004). Aunque el papel de la p53 sobre la transformación celular se conoce bien, los estudios diseñados para investigar a la E1B durante el ciclo replicativo productivo de Ad se han realizado en líneas celulares, que no expresan una p53 funcional. Por lo tanto, los estudios hechos en estas células distan mucho de reflejar la regulación de p53 por Ad en el contexto de una célula con niveles de p53 normales. Nuestros experimentos se realizaron en HFFs, lo que nos permitió analizar los efectos de la infección por Ad en una célula no transformada. Además, el estudio de HFFs infectadas con los mutantes descritos en la sección 1.10, nos permitió investigar si la ausencia de la E1B o del complejo E1B-E4 resulta en la inhibición de la apoptosis dependiente de p53, y por lo tanto esperamos que el nivel de inhibición de apoptosis dependiente de p53 sea diferente en los mutantes, a comparación con Ad silvestre (Tabla 3).

	Silvestre	A143	Hr6
Inducción de p53 por E1A	++++	++++	++++
Inactivación de p53 (E1B 55 k)	-	-	
Inactivación de p53 (E4 orf6)	-	-	-
Degradación de p53 (E1B 55 k-E4 orf6)	--		
Inducción relativa total de p53		++	+++

Tabla. 3. Posible efecto de la E1B 55 kDa sintetizada por los virus silvestre, A143 y Hr6 sobre los niveles de inactivación de p53. Los signos "+" indican un nivel de inducción relativa de p53 por la E1A sintetizada por los 3 virus. Los signos "-" indican un nivel de inactivación relativa de p53 por la unión, por separado, a las proteínas E1B 55 kDa y E4 Orf6. Los signos "--" indican el nivel de inactivación de p53 por su degradación inducida por el complejo E1B 55 kDa-E4 Orf6.

2. HIPÓTESIS

La inhibición de la actividad de p53 por la proteína viral E1B 55 kDa es necesaria para inhibir la apoptosis durante la fase temprana del ciclo de replicación de Ad serotipo 5 (Ad5), en células humanas normales.

3. OBJETIVO

Caracterizar el estado de la activación de la apoptosis dependiente de p53 durante la fase temprana del ciclo de replicación de Ad5, en células no transformadas.

3.1. Objetivos particulares

- Medir la incidencia de apoptosis en células HFFs infectadas con Ad5 silvestre y los mutantes A143 y Hr6.
- Determinar la ruta apoptótica activada durante la fase temprana, mediante la medición de caspasas 8 y 9, en células HFFs infectadas con Ad5 silvestre y los mutantes A143 y Hr6.
- Medir la actividad transcripcional de p53, a través de la activación de la expresión de los genes *p21*, *bax* y *puma*, en células HFFs infectadas con Ad5 silvestre y los mutantes A143 y Hr6.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Células y virus

Las células 293 (derivadas de células embrionarias humanas de riñón, transformadas con la región E1 de Ad) y HeLa (derivadas de cáncer cervicouterino, transformadas por el gen E6 de papilomavirus) se crecieron en cajas de 100 mm en monocapa en medio Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco-Invitrogen[®]) suplementado con 5 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS, Fetal Bovine Serum, Gibco-Invitrogen[®]). Las células HFFs (Human Foreskin Fibroblasts) se mantuvieron en DMEM con 10% FBS en pases no mayores a 13. Todas las células se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂. En este estudio se utilizó al Ad serotipo 5 (Ad5), que es considerado un prototipo del subgrupo C (Tabla 2). La amplificación de Ad5 y de los virus mutantes con alteraciones en la secuencia de la proteína E1B 55 kDa se hizo en cajas de 100 mm infectando a las células con una moi (multiplicity of infection) de 0.1 pfu (plaque forming units)/célula, del virus en cuestión. Se cosechó a 48 horas post-infección (hpi) desprendiendo la monocapa con un gendarme en PBS 1X (NaCl 135 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM); se centrifugó y se resuspendió el pellet en buffer USB IV (Tris HCl pH 7.5 0.025 M, NaCl 0.15 M, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0.55 mM, dextrosa 0.1% w/v). Se recuperó el virus lisando a las células mediante cambios bruscos de temperatura, en hielo seco con etanol al 70% por 10 minutos (min) e inmediatamente en baño a 37°C por 10 min. Se centrifugó a 4500 X g durante 5 min para eliminar los detritos celulares, y se tituló el sobrenadante resultante. Los virus fueron titulados por ensayo en placa en células 293. Este ensayo consiste en la infección de monocapas de células en cajas de 6 pozos con una serie de diluciones del lisado, limitando la propagación de la infección por una capa de agar. Se alimentaron las células al 4° día post infección (pi), y al 7° día pi se hizo una tinción con Rojo Neutro al 1%, contando el número de las placas en cada dilución, y se obtuvo un título del virus a partir de la dilución original, como unidades expresadas en pfu/ml. Para los experimentos con HFFs, que son células que muestran inhibición proliferativa por contacto, se utilizaron células con una subconfluencia aproximada de 80% – 90%, con el propósito de que la mayoría de las células se encuentren en fase S del ciclo celular. Para todos los experimentos se utilizó una moi de 30 pfu/ml. Para el ensayo de viabilidad celular, una muestra de las células infectadas y

cosechadas se tirió con Rojo Neutro (Fischer Scientific™), al 0.1%, y se contabilizó el porcentaje de células vivas en un hemacitómetro Bright Line (Hausser Scientific™).

4.2. Citometría de flujo.

Las células HFFs se crecieron en monocapas y se infectaron en una confluencia de 80% a los tiempos indicados con una moi de 30 pfu/célula. El desprendimiento de las células en monocapa se hizo de la siguiente forma: se lavó 3 veces con PBS 1X, y se incubó por 5 min en PBS 1X con EDTA 5 mM. Las células se cosecharon en PBS 1X con Ca²⁺ 10 mM y se centrifugaron a 300 X g, durante 3 min a 4°C. Se utilizó el Vibrant™ Apoptosis Assay Kit (según las instrucciones del fabricante, Roche) para la cuantificación de células apoptóticas, que se basa en la alta afinidad de la proteína anexina V (An - Alexa Fluor™ 488) por el fosfolípido fosfatidilserina (PS), expuesto en la cara externa de la membrana celular durante apoptosis (sección 1.7). La pastilla de células se resuspendió en 300 ml de 1X An-binding buffer por muestra, y se les agregó 5 ml de An, 1 ml de yoduro de propidio 100 mg/ml (IP), por cada 100 ml de 1X An-binding buffer en la muestra. Las muestras se incubaron por 15 min a temperatura ambiente (TA). Las células apoptóticas que son positivas a An (An+) no son permeables a IP, mientras que las células en necrosis son positivas a IP (IP+). Las células con tinción doble positiva (An+/IP+) se encuentran en necrosis o apoptosis avanzada. Las células sanas no presentaron tinción a ninguno de estos fluoróforos. En paralelo, se determinó el porcentaje de viabilidad de las células, por tinción con rojo neutro. Las muestras se analizaron por citometría de flujo, utilizando el sistema FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems™, BDIS). Se utilizaron filtros de detección para An (fluoresceína) de 488/520 y para PI de 585/642. Los resultados se analizaron con el programa CellQuest™ (BDIS) y Winmdi (Windows multiple document interface for Flow Cytometry; <http://facs.scripps.edu/software.html>).

4.3. Medición de la actividad de caspasas activas

Las células HFFs se crecieron en cajas de 96 pozos y fueron infectadas con Ad5 y mutantes, a 30 pfu/célula. Se cosecharon a los tiempos indicados y se midió la actividad de caspasa 8 ó 9 (C-8, C-9). La medición de la caspasa activa se hizo mediante el reconocimiento de C-8 o C-9 a sustratos luminogénicos específicos (Caspase-Glo™ ,

Promega%). Cada una de las caspasas activas reconoce una secuencia de aminoácidos específica en el sustrato (C-9, Leu-Glu-Thr-Asp; C-8, Leu-Glu-His-Asp). La hidrólisis de cada sustrato por la caspasa correspondiente libera aminoluciferina, un sustrato luminogénico de la luciferasa. La señal luminosa producida es proporcional a la cantidad de caspasa activa en la muestra en el momento de la adición del sustrato. Para usar este sistema de medición, se agregó el inhibidor de proteosoma MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO) a una concentración final de 60 μ M, para disminuir el fondo inespecífico de proteólisis. Se utilizaron inductores específicos de las rutas apoptóticas en células sin infectar, como controles positivos de cada ruta: ruta extrínseca, las células HFFs se incubaron con el anticuerpo CD95/Fas (FasL, 0.5 mg/ml, Biosource') y cicloheximida (CHX, 10 mg/ml, Roche'); ruta intrínseca, las células HFFs fueron incubadas con camptotecina (Camp, 0.15 mM, Roche'). En ambas condiciones se incubaron a los tiempos indicados (hpt, horas post tratamiento) en DMEM sin FBS, a 37°C y 5% CO₂. El buffer y sustrato Caspase-Glo" , una vez reconstituido y a TA, se agregó directamente sobre células HFFs tratadas o infectadas, crecidas en cajas de 96 pozos. La cantidad de Caspase Glo® reconstituido que se agregó a la muestra fue de 1:1, en relación al volumen de DMEM en la muestra. Se agitó la muestra a 300 revoluciones por minuto (rpm) por 30 segundos (seg) y se incubaron por 15 min a TA, para facilitar la lisis celular. Posteriormente, la cantidad de luz se cuantificó en un luminómetro (EL-111, Biotek'), y se tomaron mediciones cada 15 min. En todos los casos los resultados mostrados se obtuvieron de dos experimentos independientes, y se muestran como los promedios obtenidos expresados en Unidades Relativas de Luz (RLU, Relative Light Units).

4.4. Medición de la activación de los genes *p53*, *p21*, *bax* y *puma*

4.4.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó con Trizol® (Invitrogen%), según las instrucciones del fabricante. Las células HFF se cosecharon a los tiempos indicados con un gendarme en 7 ml de PBS 1X frío (ice-cold). Se centrifugaron 5 min a 800 X g a 4°C. Se lisó y homogenizó la pastilla de células con 1 ml de Trizol® por cada 1.7 X 10⁶ HFFs. La muestra se incubó por 5 min a TA y se separaron las fases con 0.2 ml de cloroformo, se

mezcló por inversión y se incubó por 3 min a TA. Se centrifugó 15 min a 12000 X g por 4°C. La fase acuosa del sobrenadante, se separó y se le agregó 0.5 ml de isopropanol para precipitar el RNA. Se incubó 10 min a TA y se centrifugó 10 min a 12000 X g a 4°C. Se retiró el sobrenadante, y la pastilla se lavó en un 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó 5 min a 7500 X g a 4°C. La pastilla resultante que contenía el RNA, se resuspendió en agua desionizada (MQ). En todo momento se utilizó agua MQ tratada con 0.1% de dietilpicrocarbonato (DEPC, Invitrogen[®]), para inhibir ribonucleasas. La cantidad del RNA obtenido se obtuvo midiendo la absorbancia del RNA de la muestra a una longitud de onda de 260 nm (Ab_{260}), según la ecuación 1:

$$C \quad (m \quad g / m \quad l) \quad = \quad A \quad b_{260} \quad / \quad 0 . 0 2 5$$

Ecuación 1

Donde 0.025 es el coeficiente de extinción de RNA de cadena sencilla, basado en la ley de Lambert – Beer.

La calidad del RNA se obtuvo midiendo la Ab_{260} , Ab_{280} , y Ab_{230} , y analizando el cociente Ab_{260} / Ab_{280} , y Ab_{260} / Ab_{230} . Todas las muestras presentaron un cociente Ab_{260} / Ab_{280} mayor a 1.9 que refleja ausencia de contaminación por DNA, mientras que tuvieron un cociente Ab_{260} / Ab_{230} mayor a 2.2 indicando que no existe contaminación por fenolatos u otros compuestos orgánicos.

4.4.2. RT-PCR en tiempo real

Se midió el nivel del mRNA de los genes *p53*, *p21*, *bax* y *puma*. Además, se midieron también los niveles de mRNA de dos genes control: *actina* y *myc*. Se utilizaron *primers* LUX (Light Upon eXtension, Invitrogen[®]). La emisión de fluorescencia de los *primers* LUX se basa en la propiedad que tiene la estructura secundaria de una secuencia (una horquilla) para “quenchar” o disminuir la intensidad de emisión de un fluoróforo, que se encuentra unido a una de sus bases. En uno de los *primers* LUX, la estructura secundaria (horquilla) se forma debido a la complementariedad de 5 - 7 bases ubicadas en sus extremos 5' y 3'. Cuando el *primer* LUX se hibrida con su secuencia blanco, la intensidad del fluoróforo aumenta aproximadamente 10 veces, en comparación con el *primer* con estructura secundaria

(Fig. 7). Los *primers* se diseñaron para reconocer secuencias localizadas dentro del empalme entre dos exones, por lo que reconocen solamente a los mRNA procesados (Tabla 4), que no contienen intrones. El diseño de los *primers* LUX se hizo según las instrucciones del fabricante (Invitrogen[®]), en la página electrónica: <https://orf.invitrogen.com/lux/>. En esta página el diseño de los *primers* LUX, se basa en algoritmos matemáticos para que la complementariedad de las C y G en los extremos 5' y 3' del *primer* sean suficiente para "quenchar" el fluoróforo, pero al mismo tiempo que no se afecte la especificidad del *primer* por su secuencia blanco. El programa de simulación de PCR, AmplifX 1.37 (http://jullien.n.free.fr/breve.php?id_breve=19) fue utilizado para comprobar que los *primers* LUX reconocieran el empalme entre exones y el producto fuera un amplicón único y específico.

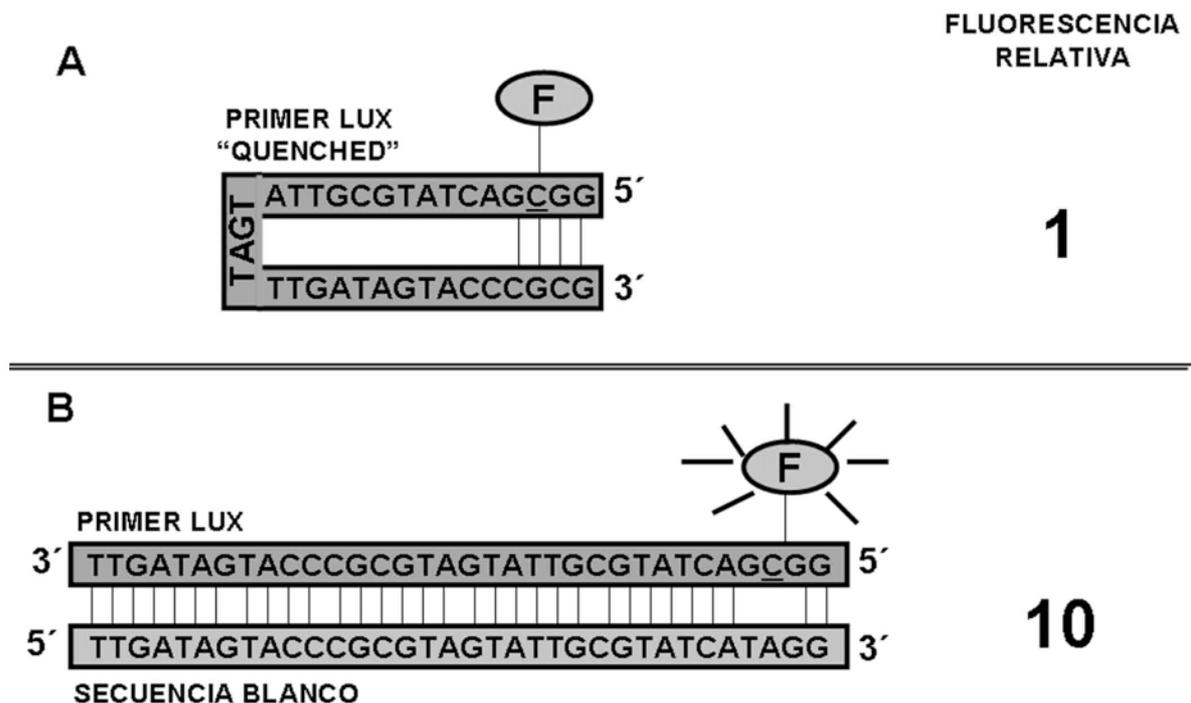


Figura 7. Diagrama de la emisión de fluorescencia de los *primers* LUX. A. El *primer* LUX (3'-5') presenta una estructura secundaria, y tiene una disminución ("Quenched") en la intensidad de emisión del fluoróforo (F) unido a uno de sus extremos. B. En cambio, una vez que el *primer* LUX se hibrida con su secuencia blanco (5'-3') se presenta un aumento en la intensidad de la emisión de su fluoróforo de aproximadamente 10 veces.

En el diseño experimental, se optó por las reacciones de RT-PCR en tiempo real multiplex. En las reacciones multiplex, hay dos sets de *primers* LUX que reconocen distintos mRNA en una misma reacción, pero debido a que están acoplados a diferentes fluoróforos la señal producida puede ser dividida y cuantificada debido a que los

fluoróforos acoplados a los *primers* LUX emiten a diferente longitud de onda. Este sistema tiene la ventaja de que disminuye la variabilidad entre muestras, porque se realizan dos mediciones (de dos genes distintos) en las mismas condiciones de reacción. Cada set de *primers* LUX tiene un primer acoplado a un fluoróforo en uno de sus extremos 5' o 3'. Se utilizaron los siguientes fluoróforos: FAM (éster de carboxyfluoresceína, succinimidil) que emite a una longitud de onda de 520 nm, y JOE (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimethoxifluoresceína) que emite a una longitud de onda de 548 nm. Un tercer fluoróforo, ROX (glicina conjugada al éster de 5-carboxi-X-rodamina, succinimidil) se incluyó en cada muestra con el propósito de normalizar la fluorescencia de los otros dos fluoróforos. ROX tiene una emisión de longitud de onda de 602 nm. La normalización por ROX la realiza el lector automáticamente, tomando la fluorescencia de ROX como nivel basal.

Para la medición del mRNA del gen de *actina* se usó el Human b-Actin-Certified Lux Primer set (Invitrogen[®]), que hibrida entre los exones 2/3 del gen de *actina*, y está acoplado al fluoróforo JOE. Estos *primers* tienen una eficiencia de amplificación mayor de 90%. Una eficiencia de amplificación del 100% significa que en cada ciclo de amplificación, existe el cuadrado del producto que el ciclo anterior. Se utilizó el kit SuperScript[™] III Platinum[™] One step RT-PCR System para llevar a cabo RT-PCR en un solo paso (Invitrogen[™]). Un solo paso significa que la síntesis de cDNA (SuperScript[™] III RT) y la amplificación (Platinum[™] Taq Mix) se realizan en un mismo tubo, disminuyendo las probabilidades de error humano y la variación entre muestras. La síntesis de cDNA (RT) se efectuó a 50°C durante 15 min. La enzima recombinante Platinum[™] Taq DNA Polimerasa contiene un anticuerpo acoplado que impide su actividad a temperatura ambiente, esto provee un "hot start" (una activación de la enzima activada por calor) que se activa a 95°C por 2 min.

Para la amplificación del gen de interés (GIs) se agregaron 20 ng del templado (RNA) de la muestra a la siguiente mezcla de reacción (según las instrucciones del fabricante): 2X Reaction Mix (concentración final de 0.2 mM para cada dNTPs y 3 mM de MgSO₄); enzimas (SuperScript[™] III RT/Platinum[™] Taq Mix); set de *primers* LUX (forward y reverse, concentración final de 200 nM); y ROX (concentración final 50 nM). Adicionalmente se agregó 0.32 U/ml de RNasin[™] Ribonuclease Inhibitor (Promega[™]), para inhibir la degradación por ribonucleasas. En seguida, se realizaron 40 ciclos de amplificación: desnaturalización, 15 seg a 95°C; e hibridación y extensión, 30

seg a 60°C. Se utilizó el ABI 7500" Real Time PCR System (Applied Biosystems') y el software 7500 System Software (Applied Biosystems') para la obtención de datos. Se utilizó el programa Excel (Microsoft') para el análisis de los datos. Se diseñaron los experimentos multiplex con el objetivo de obtener la mayor cantidad de datos (lecturas de emisión de fluorescencia) en cada amplificación de los GIs. Cada muestra se analizó utilizando 8 mezclas diferentes de reacción que comprendía todas las combinaciones posibles entre los *primers* marcados con FAM y los *primers* marcados con JOE (Tabla 5, A). De esta manera, en este diseño experimental se obtuvieron: 4 lecturas independientes de la amplificación de los mRNAs de los genes *p53* y *p21*; y 2 lecturas independientes de los mRNAs de los genes *bax*, *puma*, *myc* y *actina*. Cabe mencionar que cada lectura proviene del promedio de dos duplicados. Sin embargo, debido a la inespecificidad del set de *primers* de *bax* (véase sección 5.3.1), decidimos no tomar en cuenta los datos obtenidos de la amplificación con este set de *primers*, y no utilizamos las combinaciones de *primers* 3 y 6 (Tabla 5, A). Por lo tanto, el procesamiento de los datos obtenidos por el ensayo de RT-PCR se llevó a cabo a partir de solamente 3 lecturas para los genes *p53* y *p21*, y 2 lecturas para los genes de *puma*, *myc* y *actina* (Fig. 5, B).

Gen	Sentido	Secuencia 5' - 3'	Exón	Fluoróforo	Amplicón	Isoformas
<i>p53</i>	forward	CACGGTATTTACCCCTTCAGAT <u>C</u> CGTG	9/8	FAM	92	393 a.a.
	reverse	CAAGGCCTCATTAGCTCTCGGAAC	10			
<i>p21</i>	forward	TCTGCGGCAGGCGCCATGTC	1/2		136	Todas
	reverse	CGACTGCCATTAGCGCATCA <u>C</u> AGTCG	2	FAM		
<i>puma</i>	forward	AGTACGAGCGGCGGAGACAAG	2/3		76	a, b
	reverse	GTACAATCGGAGTCCCATGATGAGATIGTAC	3	JOE		
<i>bax</i>	forward	CCTTTTGCTTCAGGGTTTCATCCA GGAT	2/3		116	Excepto d
	reverse	CACCAAACCTCGCTCAGCTTC <u>T</u> TGGTG	3	JOE		
<i>myc</i>	forward	GGTAGTGAAAACCAGCAGCCT	1/2		68	Todas
	reverse	CGTTAGTCCTGTTGGTGAAG <u>C</u> TAACG	2	JOE		

Tabla 4. Secuencias, sitios de reconocimiento, fluoróforo acoplado, tamaño de amplicón e isoformas reconocidas de los *primers* LUX utilizados en el RT-PCR en tiempo real multiplex. La selección de los *primers* se basó en su capacidad de reconocer a las isoformas que están involucradas en su principal función (véase introducción). La base subrayada en la secuencia de los *primers* indica el *primer* y la base a la cual se encuentra unido el fluoróforo correspondiente.

A

	FAM	JOE
1	<i>p53</i>	<i>actina</i>
2	<i>p21</i>	<i>actina</i>
3	<i>p53</i>	<i>bax</i>
4	<i>p53</i>	<i>puma</i>
5	<i>p53</i>	<i>myc</i>
6	<i>p21</i>	<i>bax</i>
7	<i>p21</i>	<i>puma</i>
8	<i>p21</i>	<i>myc</i>

B

gen	Número de Lecturas
<i>p53</i>	3
<i>p21</i>	3
<i>bax</i>	2
<i>puma</i>	2
<i>myc</i>	2
<i>actina</i>	2

Tabla 5. Combinaciones de *primers* (A), y número de lecturas independientes de los genes *p53*, *p21*, *bax*, *puma* y *myc* (en el subsecuente análisis no se utilizaron las lecturas de las combinaciones 3 y 6) (B). Ambos parámetros se aplicaron para el análisis de todas las muestras.

4.4.3. Procesamiento de datos obtenidos por RT-PCR en tiempo real

Para su análisis, las lecturas de los ciclos de amplificación del RT-PCR en tiempo real se graficaron de la siguiente forma: el número de ciclos (eje "x") vs el cambio de fluorescencia (R_n , eje "y"). El nivel de fluorescencia de los fluoróforos encontrado durante los primeros ciclos (baseline), corresponde con la fase estacionaria. Una vez que el nivel de fluorescencia cruza un umbral, definido como el inicio de la fase exponencial, se determina el Ct (Cycle time) de la muestra, que es el número de ciclo que corresponde con el cruce del umbral. El Ct es el dato de mayor importancia para determinar el nivel de expresión de la muestra (Fig. 8). Cabe mencionar que el umbral de fluorescencia que se utilizó se obtuvo automáticamente por el software utilizado (sección 4.4.2).

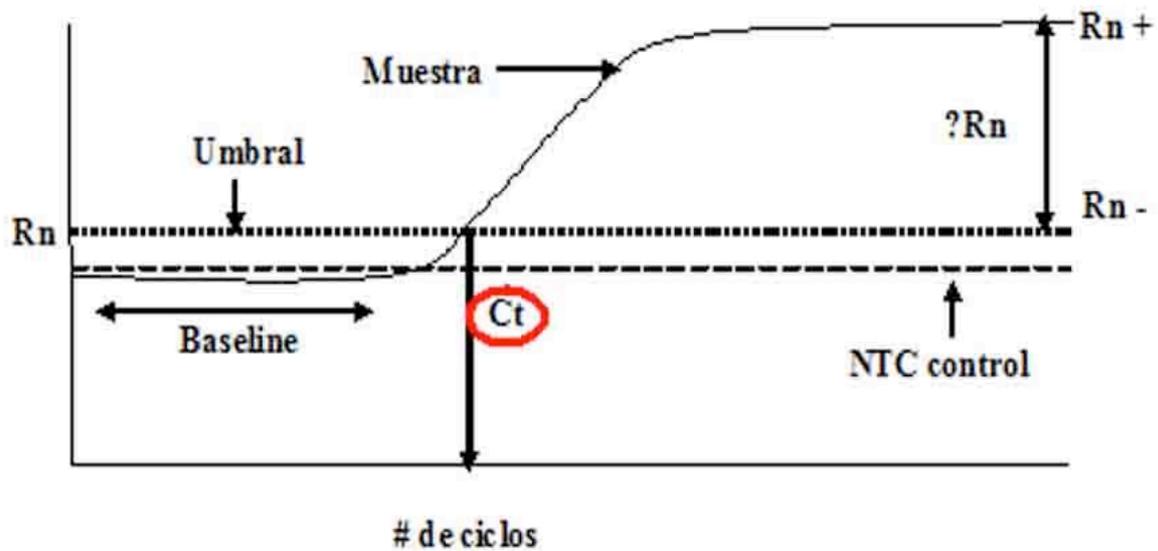


Figura 8. Esquema de una reacción de RT-PCR en tiempo real. En el círculo muestra el punto donde se determina el Ct, el parámetro principal para el análisis en la expresión de los GIs.

Basándose en el Ct, se utilizó el método comparativo o $\Delta\Delta Ct$ para medir los cambios cuantitativos en expresión (fold change) de los genes: *p53*, *p21*, *bax* (que no se utilizó en el análisis final), *puma* y controles (*actina* y *myc*) (Pfaffl, 2001). Los resultados se presentan como cambios de expresión relativos a una muestra que se utiliza como calibrador; en estos experimentos se utilizaron las células no infectadas (control) como calibrador. A partir del Ct obtenido en cada muestra, se obtuvo el promedio de los duplicados (avg) y se calculó la desviación estándar (stdev). Para cada muestra se normalizaron los valores de Ct de los GIs a los valores de Ct del gen de *actina* como referencia (stdev ref), obteniéndose ΔCt , según la ecuación 2.

$$\Delta Ct = \text{avg}Ct_{GOI} - \text{avg}Ct_{ref} \quad \text{Ecuación 2}$$

2

Posteriormente se calculó la desviación estándar de ΔCt (stdev ΔCt), según la ecuación 3.

$$\text{stdev } \Delta Ct = \sqrt{(\text{stdev}_{ref})^2 + (\text{stdev}_{GOI})^2} \quad \text{Ecuación 3}$$

3

Como se mencionó antes, se escogió al Ct de las células no infectadas (control) como calibrador, y se obtuvo el Ct, o valor calibrado, para cada muestra según la ecuación 4.

$$C_t = C_{t_{\text{muestra}}} - C_{t_{\text{calibrador}}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Lastdev Ct es la misma que stdev Ct, por que el calibrador es arbitrariamente tomado como una constante. Se obtuvo el cambio de expresión (Fold change) de cada muestra, en relación al calibrador, de acuerdo a la ecuación 5.

$$\text{Fold change} = 2^{(-C_t)} \quad \text{Ecuación 5}$$

Para el calibrador, el Ct = 0 y por lo tanto el cambio de expresión es igual a $2^{(-C_t)} = 1$. Finalmente se obtuvo el error experimental del cambio de expresión ($SD_{\text{fold change}}$) según la ecuación 6.

$$SD_{\text{fold change}} = (1/n) \cdot (\text{stdev}_{C_t}) \cdot (2^{(-C_t)}) \quad \text{Ecuación 6}$$

Se midió la significancia estadística, a través de la prueba de la media de una distribución normal, con varianza conocida (Rossner, 1982). El valor “p” se obtuvo utilizando la ecuación 7:

$$p = f \left[\frac{(C - m_0)}{(d / \sqrt{n})} \right] \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde C = promedio de la muestra tratada

m₀ = promedio de muestra control (wt)

d = desviación estándar de muestra control

n = número de muestras (mutantes)

f = función de distribución normal

4.4.4. Análisis de proteínas por inmunodetección

Se infectaron células HFFs, a 80-90% de confluencia con los virus Ad5 silvestre, A143, y Hr6. Las células se cosecharon a los tiempos indicados en PBS 1X a 37°C y se obtuvo la pastilla de células centrifugando a 800 X g por 5 min. Las proteínas totales se extrajeron con Tris-HCL pH 8.0 25 mM, NaCl 50 mM, deoxicolato de sodio 0.5% w/v, Nonidet P-40 (NP40) 0.5% w/v y de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM. Se centrifugó 10,000 X g a 4°C por 5 min, para remover detritos celulares. Se hizo análisis de *immunoblotting* a través de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes. Se hizo la inmunodetección (Gonzalez y Flint, 2002) con los siguientes anticuerpos primarios: anti-p21, clona B459 (Biomeda'); anti-bax, Mab 5B7 (Biomeda'); anti-puma/bbc3 (Stratagene'); anti-p53, Pab 240 (Biomeda'); anti-actina, Mab AC-40, (Sigma'). Se utilizó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (producido en cabra, acoplado a peroxidasa) a una dilución de 1:10,000. Se detectó señal luminiscente (ECL Western Blotting Detection, Amersham biosciences'), y se reveló en películas autoradiográficas (Kodak').

5. RESULTADOS

5.1. Análisis de la incidencia de apoptosis en la fase temprana del ciclo de replicación de Ad5

Como se mencionó en la Introducción, en la célula infectada por Ad5, el aumento en la concentración de p53 puede inducir la apoptosis (sección 1.9). Con el objetivo de analizar el papel de la proteína E1B 55 kDa en la inhibición de la apoptosis dependiente de p53, analizamos poblaciones de células infectadas con Ad5 silvestre y mutantes carentes del complejo E1B-E4 (A143 y Hr6) y de la E1B (Hr6). Con este objetivo, utilizamos la citometría de flujo (FACS), que nos permitió medir grandes poblaciones de células infectadas con Ad5 silvestre y los mutantes, basándose en la exposición de fosfatidilserina (PS) en la cara extracelular, una característica de células apoptóticas. Las células en apoptosis temprana se identificaron por medio de la presencia de la proteína anexina (An) (sección 4.2) (llamadas “An+”). Las células en apoptosis tardía o necróticas se identificaron por que pierden la impermeabilidad de la membrana celular y permiten la entrada del yoduro de propidio (IP) (llamadas “IP+”). De esta manera, se pudieron distinguir tres poblaciones de células: células en apoptosis temprana o “An+”; células en apoptosis tardía o “An+/IP+”; y finalmente células necróticas o “IP+”. Las células no infectadas (control) y en ningún proceso de muerte, no son “An+” ni “IP+”. Además de cuantificar las células en apoptosis temprana por la intensidad de señal de la fluoresceína acoplada a anexina (An+); se midió el tamaño de las células analizadas, por que las células apoptóticas presentan un tamaño mayor a una célula sana. Los resultados obtenidos por estos dos criterios fueron similares y el promedio de ambas mediciones, analizadas en la fase temprana del ciclo de replicación (16 hpi) se muestra en la Figura 9. Los análisis mostraron un aumento en la población de células An+ como consecuencia de la infección, tanto con el virus silvestre como con los mutantes A143 y Hr6. En células no infectadas (control) se observó alrededor de un 7% de células An+, que puede deberse a muerte causada por desviaciones experimentales o a muerte espontánea en el cultivo celular, que corresponde con los datos de viabilidad celular (Tabla 6). En las células infectadas con el virus silvestre, se observó alrededor de un 14% de células An+, mientras que en la infección con los mutantes A143 y Hr6, los porcentajes de células An+ fueron de alrededor de 18%. El incremento de las células An+ fue de entre un 100% y 150% en la cantidad de células

An+ a comparación del control, pero este aumento solo representa del 7% al 18% del total de células analizadas. Estos resultados sugieren que a pesar de la acumulación de p53 observada en células HFFs infectadas por mutantes que no presentan el complejo E1B-E4 (A143 y Hr6) (Cardoso *et al.*, sometido a Virology, 2008), el porcentaje de células An+ presente fue de sólo un 20% mayor que en la infección por Ad5 silvestre, sin embargo esto sólo corresponde con un aumento del 4% global (Fig. 9). Estos datos concuerdan con experimentos en los que se midió apoptosis a través de otra metodología, donde se cuantificó activación de caspasa 3 y por la medición de proteólisis de poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) en células HFFs infectadas con Ad5 silvestre y por los mutantes A143 y Hr6 (Cardoso *et al.*, sometido a Virology, 2008). Al igual que en nuestros resultados, en estos experimentos no se observó un aumento significativo en los niveles de células apoptóticas infectadas con el mutante A143 o Hr6, a comparación con silvestre. En conjunto, estos resultados sugieren que esta respuesta celular es eficientemente inhibida aun en ausencia de la proteína E1B 55 kDa.

Virus	Porcentaje de viabilidad celular
Silvestre	91
A143	92
Hr6	89

Tabla 6. Porcentaje de viabilidad celular de células infectadas con Ad5 silvestre, A143 y Hr6, a 16 hpi. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes.

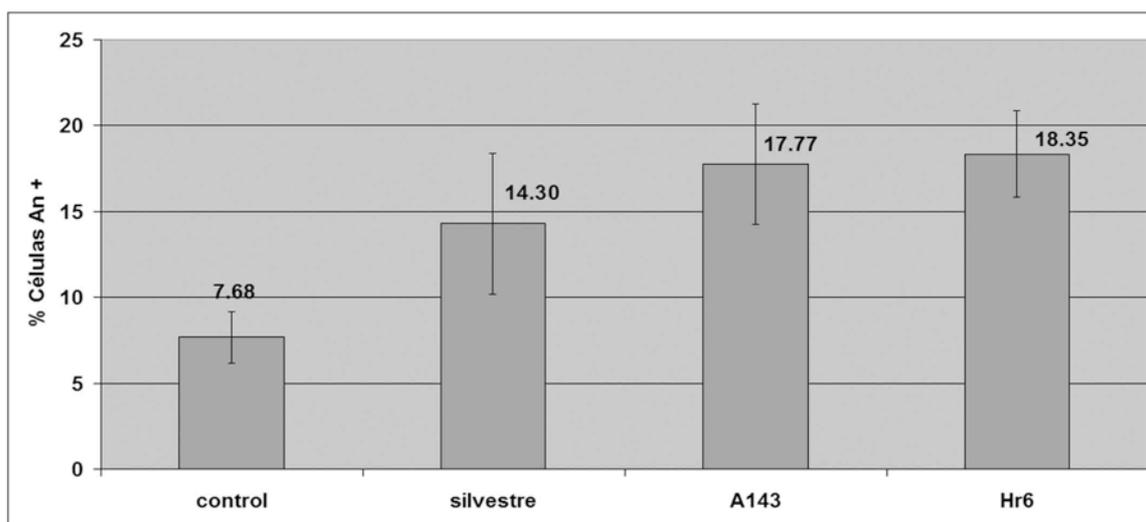


Figura 9. Porcentaje de células apoptóticas (An+) infectadas con Ad5 silvestre, A143 y Hr6 a 16 hpi. Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes, en donde todas las mediciones se hicieron por duplicado (10,000 células por medición), y se analizaron como se describe en el texto. En este y en los subsecuentes experimentos, se utilizó una moi de 30 pfu/ml, en todos los casos. Las líneas sobre los bloques representan la desviación estándar (SD).

5.2. Medición de eventos tempranos de apoptosis

Después de observar que la externalización de la PS, una característica del proceso de apoptosis, es inhibida aun en ausencia de la E1B 55 kDa (sección 5.1), decidimos investigar si la acumulación de p53 resulta en la activación de eventos tempranos de la apoptosis. Uno de los eventos tempranos de la apoptosis dependiente de p53 es MOMP, que induce la salida del citocromo *c* al citoplasma, que a su vez activa a la caspasa 9 (C-9) (sección 1.7.1). Con el objetivo de observar si en las células infectadas, con Ad5 silvestre o con los mutantes carentes del complejo E1B-E4 (A143 y Hr6) o de E1B (Hr6), se induce MOMP, se cuantificó la cantidad de C-9 activa. Por otra parte, también investigamos la posibilidad de que la inducción de MOMP pueda deberse a una inhibición ineficiente de la actividad transcripcional de p53, en ausencia del complejo E1B-E4 y/o de la E1B.

5.2.1. Medición de caspasas activas

Para determinar si es posible medir la activación específica de las C-8 (ruta intrínseca) vs. C-9 (extrínseca) en células HFFs con el sistema de Caspase-Glo® (sección 4.3), se realizó un experimento piloto de medición de caspasas para establecer las condiciones y los controles positivos para utilizar en este ensayo.

5.2.1.1. Efecto citopático en HFFs tratadas con Camp y FasL

Para establecer los controles positivos para cada ruta, como primer paso, se utilizó como parámetro cualitativo de daño celular, el efecto citopático (EC) observado en células HFFs sin infectar, tratadas con camptotecina (Camp, 0.15 mM, como control positivo para ruta intrínseca), o con el anticuerpo para Fas (FasL, 0.5 µg/ml + Cicloheximida, CHX 10 µg/ml, como control positivo para ruta extrínseca), y se analizaron a diferentes horas post infección (hpt). La camptotecina es una droga que se une a la Topoisomerasa I cuando está unida al DNA (a través de un enlace covalente 3'-fosfotirosil con la Tyr 723), que es un intermediario entre la ruptura de una hebra de DNA y su religación. De este modo, la Camptotecina bloquea la religación del DNA, que al encontrarse con la horquilla de replicación resulta en el rompimiento del DNA. Se consideraron células con EC a células HFFs que no presentaban la morfología típica:

redondeadas y/o desprendidas de la monocapa de células. Se contabilizó el porcentaje de células que presentaban EC en relación con el total de células por campo. Se observó inducción de EC en HFFs tratadas con Camp y con FasL, pero el EC se presentó a diferentes hpt para cada agente pro-apoptótico. En el tratamiento con Camp se observó aproximadamente el 25% de las células presentó EC a partir de las 20 hpt (Fig. 10, G), mientras que en el tratamiento con FasL indujo EC en el 25% de las células desde las 16 hpt (Fig. 10, J). Como se esperaba, el porcentaje de células con EC aumentó en tiempos más largos de tratamiento: con Camp, se observó el 50% de células con EC a las 24 hpt (Fig. 10, H); mientras que con FasL, se observó el 50% de las células con EC a las 20 hpt (Fig. 10, K) y 80% a las 24 hpt (Fig. 10, L). Estos resultados nos indicaron que es posible inducir EC en células HFFs tratadas con Camp y con FasL. Por otra parte, estos resultados también sugieren que la inducción de EC por la ruta extrínseca es más rápida, debido a que su activación depende sólo de interacciones proteína-proteína, mientras que la señalización de la ruta intrínseca implica la activación de la transcripción y la traducción de los genes participantes.

5.2.1.2. Activación específica de C-8 y C-9 durante el tratamiento de HFFs con Camp y FasL

Como se mencionó antes, la C-8 y la C-9 son las caspasas iniciadoras de la ruta extrínseca e intrínseca, respectivamente. Una vez que se comprobó la inducción de EC en las HFFs, se midió la activación específica de las C-8 y C-9 durante el tratamiento con Camp y FasL, por medio del reconocimiento específico de las caspasas a un sustrato luminogénico (sección 4.3), que resulta en una señal luminosa proporcional a la cantidad de caspasa activa en la muestra. Para esto, fue necesario medir la activación de C-8 y C-9 en tiempos previos a la aparición de EC. En los experimentos anteriores asumimos que el EC observable por simple inspección de las células, se presenta como consecuencia muy tardía de la apoptosis inducida por cada uno de los dos tratamientos, en donde ya han sido activadas las caspasas efectoras (caspasa 3), y en donde eventualmente y sin importar el origen de la señal pro-apoptótica, se activarían ambas caspasas iniciadoras (C-8 y C-9). Para evitar esto, se analizó la activación de C-8 y C-9 en tiempos previos a la observación de EC, en HFFs tratadas con Camp y FasL.

En base a que se observó EC en tiempos más tempranos en HFFs tratadas con FasL, se midió la activación específica de la C-8 y C-9 en los siguientes tiempos: Camp (12,

16 y 20 hpt), y FasL (6, 8 y 12 hpt). Se observó que el punto más temprano en el que se obtuvo una activación específica de C-8 fue a las 6 hpt, con el tratamiento con FasL, y esta activación disminuyó a las 12 y 16 hpt. En el tratamiento con Camp se observó la activación de la C-8 a partir de las 16 hpt, pero esta activación fue 5 veces menor que la observada con FasL 6 hpt (Fig. 11, A). Por otra parte, en la medición de C-9 se observó que el punto más temprano en el que se presentó activación específica fue a las 16 hpt, con el tratamiento con Camp, y este aumento se conservó hasta las 20 hpt. En cambio, solamente se observó activación de la C-9 por FasL hasta las 12 hpt, pero el nivel fue la mitad del observado con Camp (Fig. 11, B). En ambos casos, el tratamiento de células con Cicloheximida (CHX + control) no indujo activación de C-8 o C-9, a comparación de células sin ningún tipo de droga (control), por lo que se descarta la citotoxicidad del tratamiento con CHX.

Estos resultados nos permitieron determinar los controles de activación específica de C-9 y C-8. Para Camp el tiempo establecido fue el de 16 hpt y para FasL 6 hpt, respectivamente. Estos controles fueron utilizados en el análisis de activación de las caspasas en células infectadas. Cabe mencionar que tanto en el tratamiento con Camp como en el de FasL, se observó que la activación de C-9 y C-8 aumentó conforme avanzó el tiempo de tratamiento, sugiriendo que en tiempos más avanzados las caspasas efectoras también activan a las caspasas iniciadoras, independientemente de la naturaleza de la señal inicial, como se esperaba.

5.2.1.3. Activación específica de C-8 y de C-9 por la infección con Ad5 silvestre y mutantes

Como se describió en la Introducción, durante la infección por Ad5, E1A induce la acumulación de p53, lo cual debería de resultar en un aumento en la actividad de la C-9, debido a la activación de proteínas pro-apoptóticas. Para determinar si en las células infectadas con Ad5 silvestre o con mutantes carentes del complejo E1B-E4 (A143 y Hr6) o de E1B 55 kDa (Hr6) se induce activación de C-9, se infectaron igual número de células con los virus respectivos, y se analizaron a las 16 y 24 hpi. Estos tiempos corresponden con la fase temprana y con el inicio de la fase tardía respectivamente, en el ciclo de replicación de Ad5 en HFFs. También se incluyeron los controles FasL 6 hpt, y Camp 16 hpt, como controles positivos a la ruta extrínseca e intrínseca, respectivamente (véase sección previa).

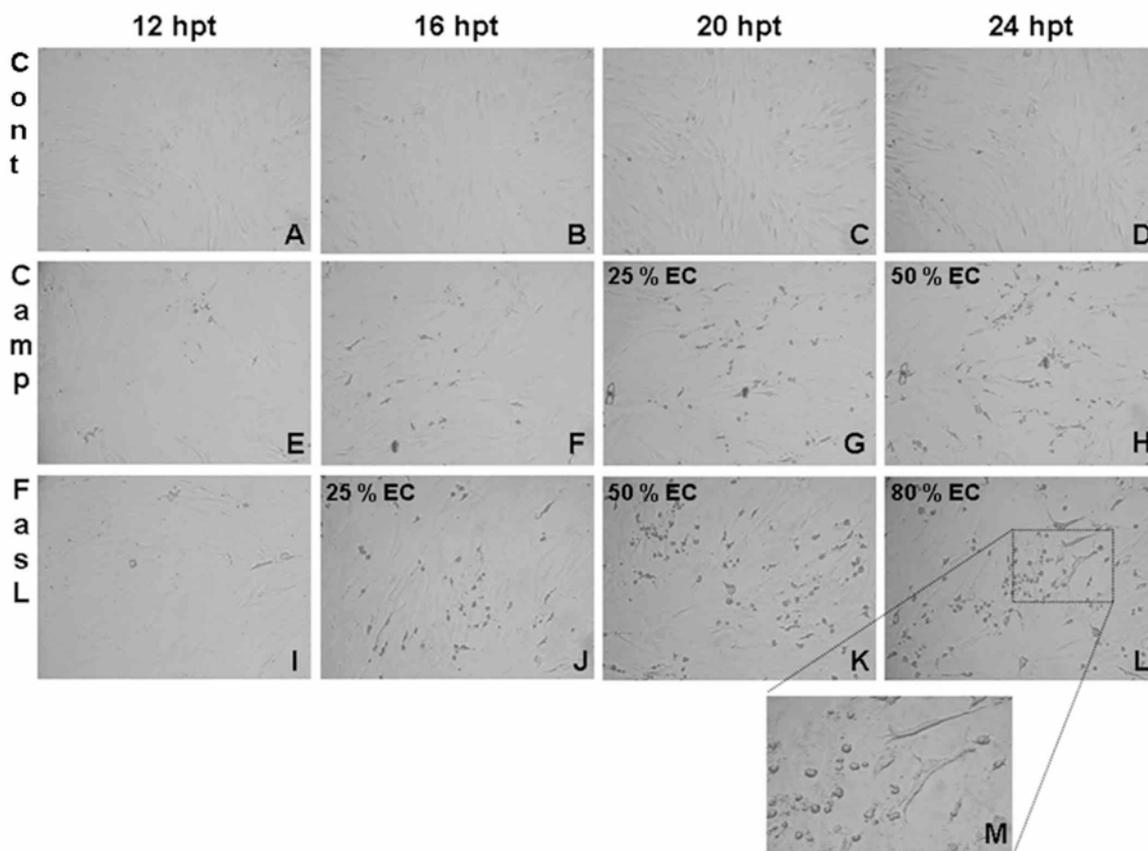


Figura 10. Imágenes representativas de efecto citopático (EC) en HFFs tratadas con FasL y Camp, a los tiempos indicados. A - D. Células sin tratar (Cont, control). E - H, células tratadas con Camp (150 mM). I - J. Células tratadas con FasL (0.5 µg/µL + CHX 10 µg/ml). En el panel M, se muestra una ampliación que muestra células con un visible EC. Se muestra el porcentaje de EC en los paneles donde se presenta más del 25% de células con EC.

Se observó que el nivel de activación de C-8 no es diferente entre células no infectadas (control) e infectadas (Fig. 12, A), mientras que en las células tratadas con Camp 16 hpt, la activación de C-8 fue alrededor de 4 veces mayor a todas las demás muestras. Estos resultados indican que la infección por Ad no induce activación de C-8, como se esperaba (debido a que Ad5 no activa receptores de muerte, como Fas), y además confirman la especificidad del sustrato utilizado en el ensayo. En cambio, se observó un aumento de aproximadamente 2 veces en la activación de C-9 en las células infectadas en comparación con las células control, mientras que en el control positivo Camp 16 hpt se observó un aumento de 3 veces con respecto al control (Fig. 12, B). Cabe destacar que los niveles de aumento de C-9 activa entre las células infectadas con Ad5 silvestre, A143 no varían más del 15 %. Esto último concuerda con nuestras observaciones previas en los que se observó que no hay una diferencia significativa en la inducción de apoptosis entre Ad5 silvestre y los mutantes (Cardoso *et. al.*, sometido a

Virology, 2008). Lamentablemente, debido a que el mutante Hr6 es un mutante nulo a E1B (sección 1.10) y su amplificación es difícil, no fue posible incluir células infectadas con Hr6 en el análisis de activación de C-9.

5.3. Cuantificación de los niveles de expresión de los genes *p53*, *p21* y *puma* por RT-PCR en tiempo real

Como se describió en la Introducción, se ha observado que durante la infección por Ad5, el nivel de la proteína p53 aumenta durante la fase temprana del ciclo de replicación. En ausencia de E1B (Hr6) o del complejo E1B-E4 (Hr6 y A143), la p53 no es degradada pero no se sabe si en HFFs infectadas con estos virus se inhibe la actividad transcripcional de p53. Por lo tanto decidimos determinar si la p53 que se acumula en la infección con los mutantes Hr6 o A143 puede activar la transcripción de algunos genes blanco. Se midió la activación de los genes que dependen de p53 para su transcripción, durante la fase temprana del ciclo de replicación de Ad5, a las 16 hpi y en la transición a la fase tardía, a las 24 hpi.

Como se mencionó antes, los genes de interés (Gs) son algunos de los genes dependientes de p53 que están directamente relacionados con la activación de la apoptosis o la regulación de la progresión del ciclo celular: *p21* (que no participa en la apoptosis), y *puma* (activado tanto por p53 como por E2F). El RNA total se extrajo del mismo número de células no infectadas (control) o infectadas con: Ad5 silvestre, A143 y Hr6, en los tiempos indicados. Se utilizaron los mismos controles positivos para la ruta intrínseca y extrínseca que para la medición de las caspasas.

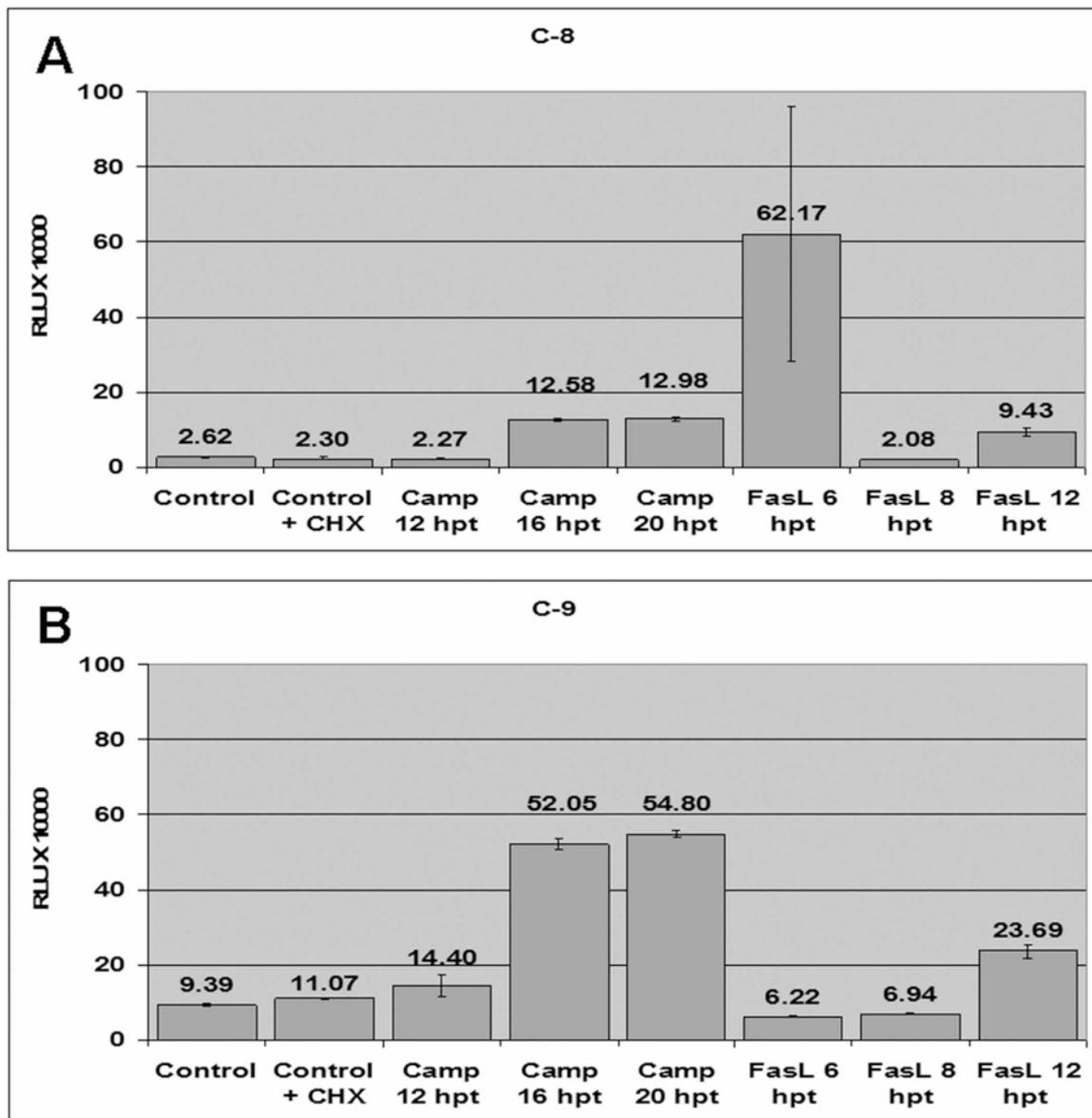


Figura 11. Inducción específica de C-8 y C-9, en HFFs tratadas con FasL y Camp. A. Medición de C-8, donde el tratamiento con FasL a las 6 hpt indujo la mayor señal específica a C-8. B. Medición de C-9, donde el tratamiento con Camp a las 16 hpt es el tiempo más temprano con señal específica de C-9. Estos resultados provienen de dos experimentos independientes, y las líneas muestran la desviación estándar. RLU: Relative Light Units.

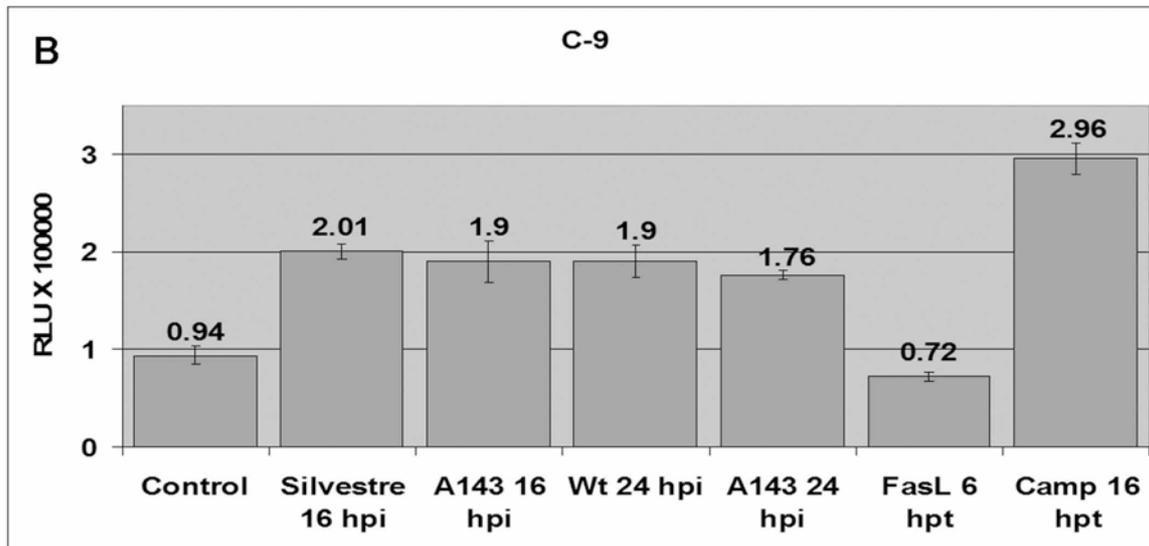
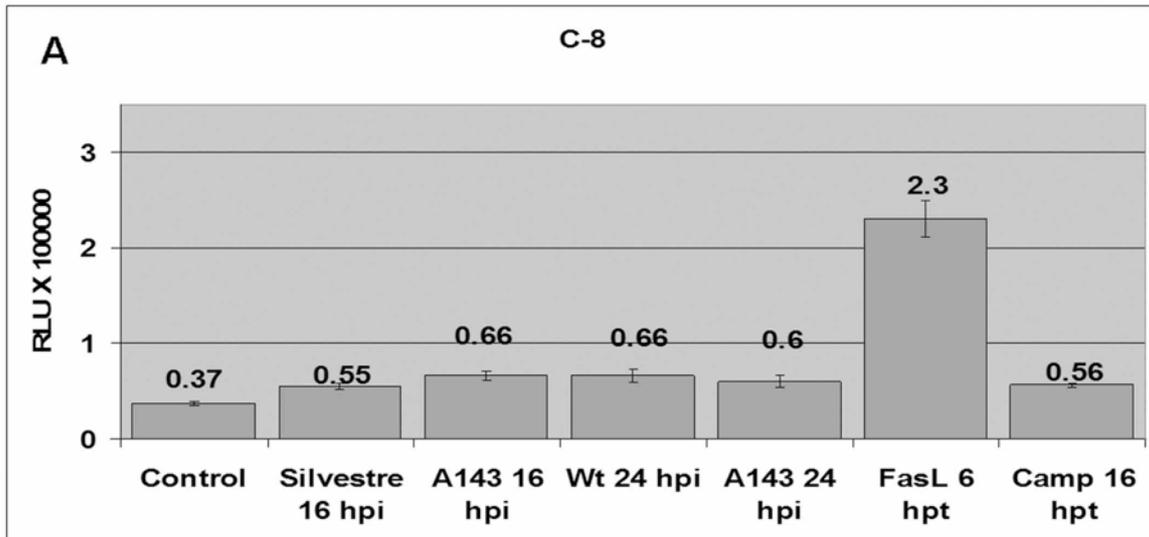


Figura 12. Activación específica de C-8 y C-9 durante la fase temprana del ciclo replicativo de Ad5. A. En la activación de C-8 no se observó diferencia entre células control e infectadas con Ad5 silvestre o el mutante A143, en ambos tiempos. En cambio, se observó un aumento de 4 veces en la activación de C-8 en células tratadas con FasL 6 hpt. B. Las células infectadas con Ad5 silvestre o el mutante A143 presentaron un aumento de 2 veces en el nivel de activación de C-9 a comparación de mock. En células tratadas con Camp 16 hpt, la activación de C-8 fue un 50% mayor que en las células infectadas. Los resultados provienen de dos experimentos independientes. RLU: Relative Light Units.

5.3.1. Validación de condiciones y primers en el ensayo de RT-PCR

Como primer paso en la medición de la expresión de los genes de interés (GIs), se realizó un ensayo piloto para comprobar que las condiciones de reacción del ensayo (mezcla de reacción y condiciones de amplificación, sección 4.9.2) permitieran una eficiente amplificación de los mRNAs de los GIs. Para validar las condiciones de reacción del fabricante y la calidad del RNA obtenido (sección 4.4), se analizó la amplificación del mRNA del gen de *actina*, con sus *primers* respectivos, en un experimento piloto. Se utilizó al gen de *actina* como gen de referencia, debido a que su nivel de expresión no es alterado durante la infección por Ad5 y tiene un mRNA muy estable (gen constitutivo). Debido a que los *primers* de *actina* son comerciales (Invitrogen™) y tiene una eficiencia de amplificación cercana al 90%, el resultado del experimento piloto se pudo analizar utilizando el método de cuantificación absoluta. Este método consiste en analizar las amplificaciones de una serie de diluciones de RNA, de una concentración conocida (conocidos como RNA estándar), para obtener una curva estándar (SC) y obtener la eficiencia de replicación a partir de una pendiente, obtenida a partir de la ecuación de la recta de la SC. Una eficiencia de amplificación del 100% corresponde, en condiciones ideales con una pendiente de la SC de -3.3 (véase sección 4.4). La SC obtenida mostró una pendiente de -3.7 , que corresponde a una eficiencia de amplificación de aproximadamente 90%, como se esperaba (Fig. 13, A).

Por otra parte, se realizó un análisis de la disociación de los productos obtenidos por la amplificación. En este análisis, la presencia de un solo producto durante la amplificación por los *primers* del mRNA del GI, se grafica como un solo pico, que corresponde a un producto que se disocia a una temperatura específica. En el experimento piloto con los *primers* de *actina* se observó la presencia de un solo producto específico que se disocia a una temperatura de aproximadamente 84°C (Fig. 13, B). Los resultados de este ensayo nos permitieron determinar las condiciones para la amplificación de los mRNAs de los GIs, en el RNA extraído de células infectadas con Ad5 silvestre y mutantes.

Por otra parte, el gen *myc* se utilizó como control positivo de un mRNA inestable el cual no es inducido durante el ciclo replicativo de Ad5 (Löhr *et al.*, 2003), y tiene un mRNA con una vida media muy corta (vida media de aproximadamente 1 hr; Brewer y Ross, 1988), y tiene una estabilidad comparable a la de los mRNA de los genes *p53*,

p21, *bax* y *puma*. No se observaron cambios significativos en el nivel de expresión del gen *myc* entre las muestras infectadas con los mutantes A143 y Hr6 a comparación de silvestre, en ninguno de los dos tiempos analizados. Tampoco se observó un cambio significativo de la expresión de estos genes en la inducción por Camp 20 hpt. Solamente en la inducción por Fas 6 hpt se observó un aumento muy significativo de 17 veces en el nivel de expresión de *myc*. Estos resultados confirman que no existe diferencia significativa en la inducción de *myc* entre Ad5 silvestre y los mutantes, y que su inducción es nula después de las 24 hpi (Fig. 14). Los resultados de ambos ensayos nos permitieron determinar las condiciones para la amplificación de los mRNAs de los GIs, para medir el nivel de expresión de estos genes.

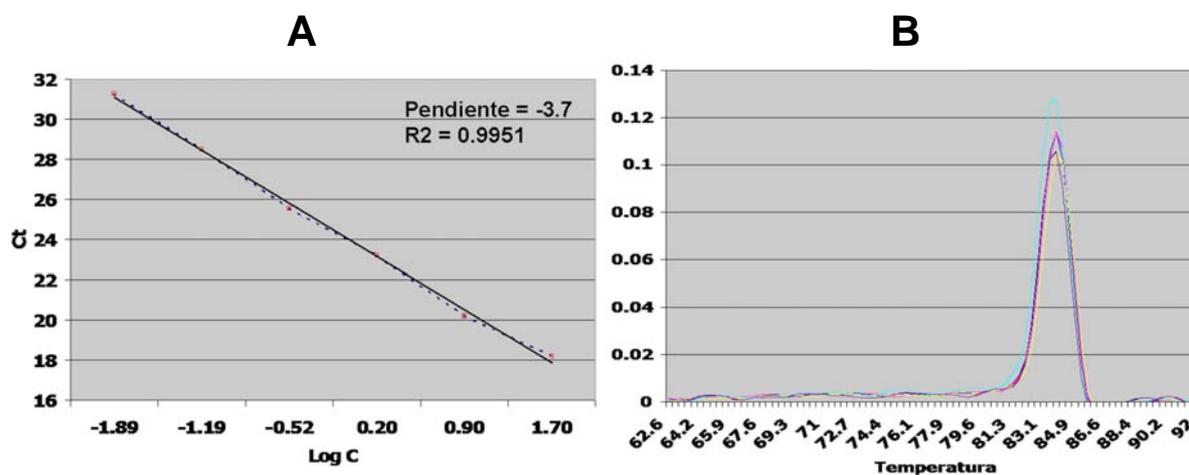


Figura 13. Ensayo piloto de amplificación del mRNA del gen de *actina*. A. Curva estándar (SC) obtenida de la amplificación de una serie de diluciones, a partir de RNA con concentración conocida. Se muestra la pendiente obtenida, -3.7 que corresponde con una eficiencia de amplificación de alrededor del 90%. El valor de R2 describe la correlación entre el Ct y el log del número inicial de copias del mRNA del GI de las muestras que conforman la SC. Entre más cercano a 1 sea el valor de R2, mejor correlación ente el Ct y el número de copias inicial. B. La curva de disociación de la amplificación del mRNA de *actina*. Un solo pico en la gráfica indica la presencia de un solo producto de amplificación, que es específico.

Los experimentos del nivel de expresión de lo GIs se analizaron utilizando el método comparativo (sección 4.4.3), por que el objetivo de este ensayo es comparar los niveles de expresión de los mRNAs de los GIs entre las diferentes muestras. Por esta razón, no fue necesario cuantificar el número de copias del GI iniciales a través del análisis de cuantificación absoluta. Además esto implicaba llevar acabo aproximadamente 360 reacciones extras solo para la obtención de las SC de los set de *primers* de los GIs, por lo que no resultaba viable. El siguiente paso para asegurar una amplificación eficiente de los mRNAs de los GIs fue comprobar si existe una amplificación específica del mRNA de interés con cada uno de los *primers* diseñados (Tabla 3).

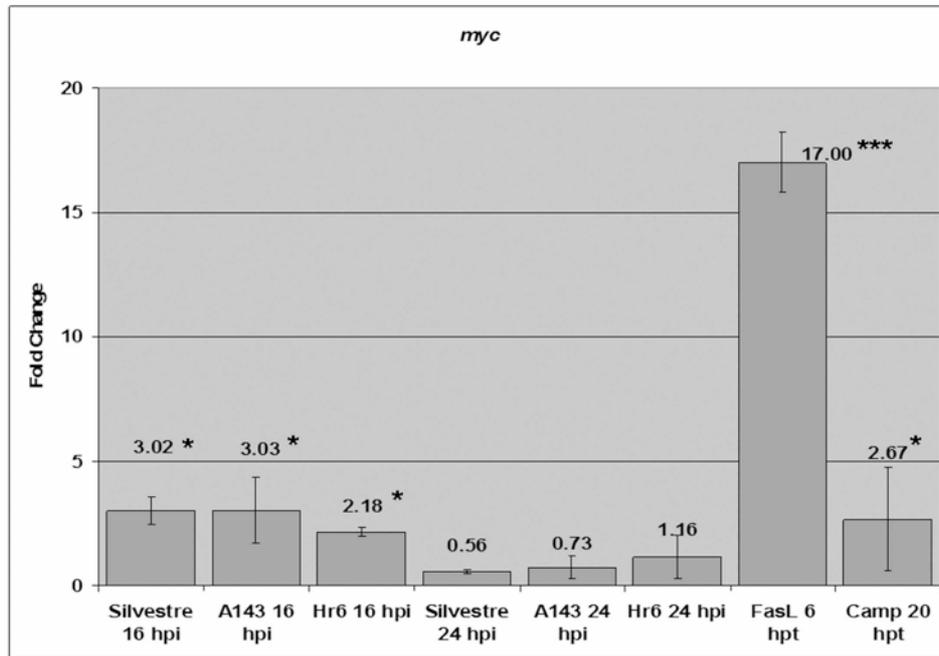


Figura 14. Niveles del mRNA de *myc* por RT-PCR en tiempo real. Se muestra el promedio de 3 datos independientes (sección 4.4.2). A las 16 y 24 hpi no se observa un cambio significativo en la inducción de *myc* entre los mutantes y silvestre (* $p < 0.5$). De igual manera el aumento observado en la muestra tratada con Camp 20 hpt con respecto a las muestras infectadas no es significativo (* $p < 0.5$). En cambio, el aumento de *myc* en el tratamiento con Fas 6 hpt es muy significativo, de alrededor de 17 veces (***) $p < 0.005$). En esta figura y en las siguientes, el valor de “p” se obtuvo a través de la ecuación 7 de la sección 4.4.2, comparando el nivel de expresión del gen en muestras infectadas con mutantes o control, con respecto al nivel de Ad5 silvestre. Las líneas sobre los bloques representan la desviación estándar.

Por lo tanto, se comprobó que existiera un solo producto, específico de la isoforma más estudiada, en las amplificaciones con los diferentes *primers*. Este análisis considera que la eficiencia de amplificación por parte de los *primers* puede ser diferente entre ellos, pero que es la misma entre las diferentes muestras, por lo que permite analizar los resultados de manera comparativa. Lamentablemente, durante los análisis de las curvas de disociación, se observó que el set de *primers* que amplifica al mRNA del gen *bax* no produce un solo producto. Se observaron tres picos en la curva de disociación de los productos de la amplificación del mRNA del gen *bax*, que indica que existen al menos tres productos que se disocian a diferente temperatura, probablemente de diferente tamaño (Fig. 15). Esto nos indicó que la amplificación no fue específica, por lo que la señal fluorescente obtenida durante la amplificación no correlaciona con el nivel del mRNA procesado del gen *bax* de la muestra. Por esta razón decidimos no tomar los resultados de *bax* como válidos. Las curvas de amplificación de los mRNAs de los

genes *p53*, *p21*, *puma* y *myc* no presentaron las alteraciones encontradas en *bax*, por lo que sus datos fueron tomados como válidos.

5.3.2. Nivel de expresión del gen *p53*

La transcripción del gen de *p53* está regulada en un proceso de retroalimentación, en el que la proteína *p53* puede activar la transcripción de su propio gen. Por esta razón, inicialmente se midió si en células infectadas con Ad5 silvestre y mutantes, la transcripción del gen de *p53* es activada. La cuantificación de los mRNA se hizo como se describe en la sección 4.4 y en la Figura 16 se muestran los datos obtenidos. Cabe mencionar que en esta figura y las subsecuentes, el nivel de expresión del mRNA del GI en las muestras control se ajustó a 1. El nivel del transcrito de *p53*, en la infección por silvestre y A143 no fue significativamente diferente entre ellos, en ambos tiempos analizados. En cambio, en la infección con Hr6, se observó un aumento de aproximadamente 2 veces en el nivel de expresión de *p53* en ambos tiempos, a 16 y 24 hpi (Fig. 16). De manera interesante, este nivel de expresión del mRNA de *p53* es similar al obtenido en células tratadas con Fas 6 hpt, pero no con Camp 20 hpt.

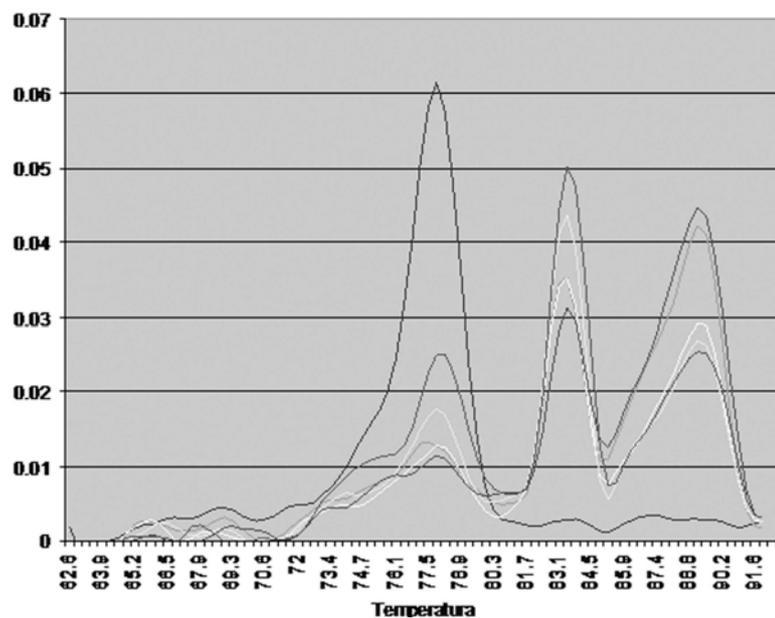


Figura 15. Gráfica de la curva de disociación de los productos obtenidos de la amplificación del mRNA del gen *bax*. Se observan tres picos que corresponden con tres productos inespecíficos de la amplificación. Las diferentes líneas corresponden a diferentes muestras donde se analizó la amplificación del mRNA del gen *bax*.

5.3.3. Nivel de expresión del gen *p21*

Como se mencionó en la Introducción, la transcripción del gen *p21* depende de *p53*. Además, se ha reportado que la *p53* sobreexpresada ectópicamente puede inducir la expresión de *p21* en células infectadas por Ad5 (Koch *et al.*, 2001) y se considera que el nivel de transcripción de *p21* es un reflejo de la actividad de *p53* como factor transcripcional. En nuestros experimentos se observó que el cambio de expresión de *p21* sigue un patrón similar a la inducción observada en el gen de *p53*, siendo las células infectadas con Hr6 las que presentaron un aumento significativo a las 16 hpi en el nivel del mRNA del gen de *p53* de 3 veces, en comparación con Ad5 silvestre y A143, disminuyendo a las 24 hpi a menos de 1.5 veces (Fig. 17). Nuevamente, se observó que el nivel de expresión de *p21* aumentó en Fas 6 hpt aproximadamente 2 veces, similar al de Hr6 16 hpi, pero en Camp 20 hpt el aumento no fue estadísticamente significativo ($p < 0.1$).

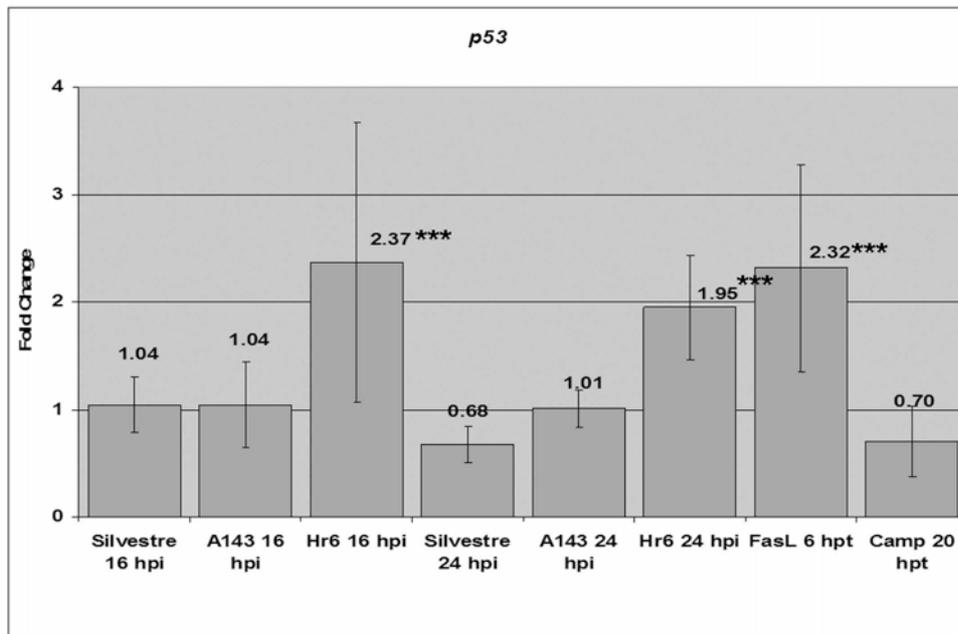


Figura 17. Nivel del mRNA de *p53* por RT-PCR en tiempo real. Se muestra el promedio de 3 datos independientes (sección 4.4.3). En la infección por Hr6, se presenta un aumento significativo de alrededor de 2 veces (***) $p < 0.005$) en el nivel de expresión del gen *p53* a las 16 hpi como a las 24 hpi. El control positivo de la ruta extrínseca Fas 6 hpt también indujo un aumento, de alrededor de 2 veces (***) $p < 0.005$). Las líneas sobre los bloques representan la desviación estándar.

5.3.4. Nivel de expresión del gen *puma*

El gen *puma* es un gen pro-apoptótico que depende de p53 o de E2F para su transcripción (Nakano y Vousden, 2001). En este caso, sorpresivamente no se detectó señal alguna en ninguna de las muestras a las 16 hpi. En cambio, se observó un aumento de aproximadamente 5 veces en células infectadas por Hr6 para las 24 hpi. De manera interesante, en A143 a las 24 hpi, también se observó un aumento de 2 veces en el nivel de expresión de *puma* (Fig. 18). A diferencia de los casos de *p53* y *p21*, ambos controles, tanto Fas 6 hpt como Camp 20 hpt presentaron un incremento similar, de entre 8 y 10 veces. Cabe destacar que el nivel de expresión de *puma* en Hr6 24 hpi fue de nuevo parecido al de Fas 6 hpt.

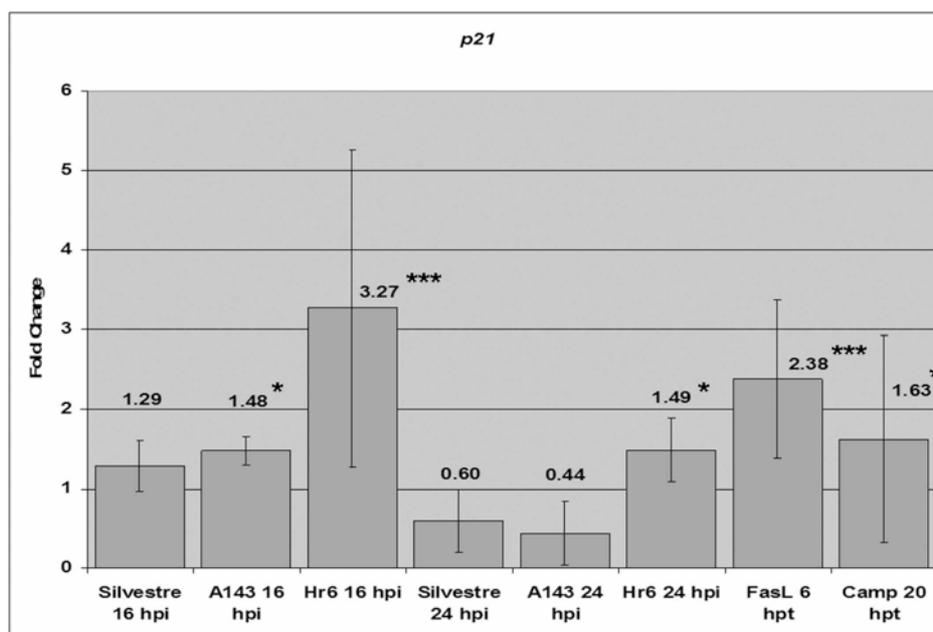


Figura 17. Nivel del mRNA de *p21* por RT-PCR en tiempo real. Se muestra el promedio de 3 datos independientes. En la infección por Hr6, se presenta un aumento significativo de alrededor de 3 veces (***) $p < 0.005$) en el nivel de expresión del gen *p21* a las 16 hpi. Por otra parte, se observó un aumento en A143 16 hpi, Hr6 24 hpi y Camp 20 hpt, pero no fue significativo (* $p < 0.5$), comparado con los niveles de silvestre. El control positivo de la ruta extrínseca Fas 6 hpt también indujo un aumento, de alrededor de 2 veces (***) $p < 0.005$). Las líneas sobre los bloques representan la desviación estándar.

5.4. Medición del nivel de las proteínas p53, p21, bax y puma en la célula infectada

Con el propósito de relacionar el nivel de activación de los genes *p53*, *p21*, *bax* y *puma* por Ad5, con el nivel de proteínas tanto en el núcleo como en el citoplasma, se

midió el nivel de estas proteínas en células infectadas con Ad5 silvestre, A143 y Hr6. Sin embargo, no se lograron resultados claros en estos experimentos (datos no mostrados), por lo que estos experimentos se tendrán que repetir.

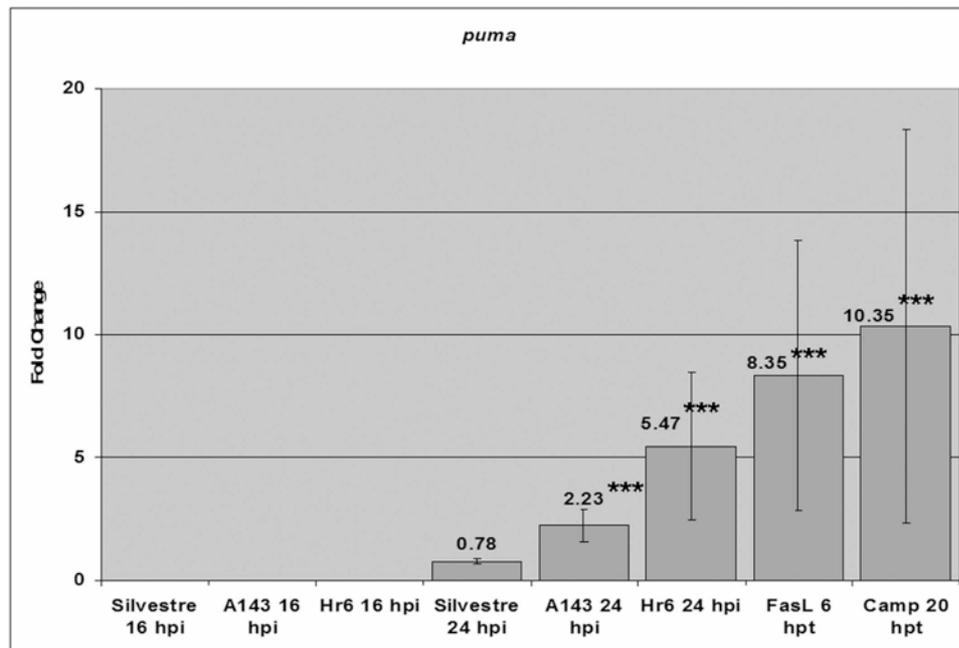


Figura 18. Nivel del mRNA de *puma* por RT-PCR en tiempo real. Se muestra el promedio de 2 datos independientes. En la infección por A143 y Hr6, se presenta un aumento significativo de alrededor de 2 y 5 veces (***) $p < 0.005$ respectivamente. En este caso, el nivel de expresión de Fas 6 hpt fue similar al observado en Camp 20 hpt, 8 y 10 veces mayor (***) $p < 0.005$). Se muestran las líneas de desviación estándar.

6. DISCUSIÓN

Como se mencionó en la Introducción, la síntesis de la proteína viral E1A induce la estabilización de la concentración de p53 en HFFs infectadas con A143 y Hr6, alrededor de 20 hpi (Cardoso *et al.*, sometido a *Virology*, 2008). Para investigar si esta acumulación de p53 induce la apoptosis en las HFFs infectadas con estos mutantes utilizamos FACS (sección 4.2). Durante el análisis por FACS, el porcentaje de células An+ en el control y el ensayo de viabilidad celular (90%, Tabla 6), nos permitió establecer que existe inducción de la exposición de PS en la superficie de las células por la infección, independiente del daño provocado a las células durante ensayo. Los resultados de FACS sugieren que la apoptosis es eficientemente inhibida, de manera independiente de la E1B (Fig. 9). Por otra parte, nuestros resultados de FACS coinciden con otros experimentos en los que se midió apoptosis por el método de proteólisis de PARP, en células HFFs infectadas con Ad5 silvestre o los mutantes A143 y Hr6 (Cardoso *et al.*, sometido a *Virology*, 2008). En conjunto, estos resultados provenientes de dos metodologías distintas y con diferente sensibilidad, sugieren que la apoptosis es eficientemente inhibida aun en ausencia del complejo E1B-E4 o de la proteína E1B. De manera interesante, nosotros no observamos una diferencia significativa en el porcentaje de células An+ entre Ad5 silvestre y los mutantes, ni entre los mutantes. Esto sugiere que la ausencia de la E1B o del complejo E1B-E4 no tiene un efecto aditivo sobre la inducción de apoptosis. Además, estas observaciones sugieren que la ineficiencia de replicación de estos mutantes (sección 1.10) no se debe a una falla en la inhibición de apoptosis dependiente de p53, sino a la deficiencia en la replicación de DNA viral (Gonzalez *et al.*, 2006).

El aumento en células An+ puede ser provocado por la activación de C-9 (sección 1.7.). Nosotros observamos que el aumento de alrededor de dos veces en el nivel de activación de C-9 entre la infección por Ad5 silvestre y A143 (Fig. 12), es similar al aumento de dos veces de células An+ en las mismas condiciones, observado por FACS (Fig. 9). Con nuestros experimentos no es posible saber si el nivel de apoptosis en estos experimentos puede ser comparable, por lo que es necesario hacer experimentos para saber si existe correlación entre el nivel de C-9 activa y el porcentaje de células An+: i) Cuantificar la inducción de células An + por Camp 16 hpt por FACS. Este control positivo nos permitiría observar el porcentaje de células An+ que corresponde a un aumento de tres veces en la activación de C-9 con respecto al control (Fig. 12), y

facilitaría la identificación de las poblaciones An+ en las células infectadas. ii) En el ensayo de medición de activación específica de C-9 es fundamental incluir células infectadas con el mutante Hr6. Esta medición nos permitirá observar directamente si se presenta un efecto aditivo en la activación de C-9 por la ausencia de la E1B y del complejo E1B-E4. Por otra parte, nuestros datos indican que existe activación de C-9 en HFFs infectadas con Ad5 sivestre y A143. El aumento de la C-9 activa podría originarse de dos formas: de manera independiente o dependiente de la formación del apoptosoma. Se ha observado que en líneas celulares puede haber activación de C-9 a partir de la oligomerización de pro-C-9, aún en ausencia del apoptosoma (Chang *et al.*, 2003), pero se desconoce si un mecanismo similar se presenta en HFFs infectadas con Ad5. Por otra parte, es posible que la E1B 19 kDa no sea suficiente para impedir la activación de la C-9, pero que la apoptosis sea inhibida por alguna otra estrategia desconocida (viral o celular). Se sabe que diferentes virus codifican proteínas con funciones parecidas a las IAPs celulares (sección 1.7.4.), por lo que una posibilidad sería que Ad utilice estrategias similares para la inhibición de C-9 río abajo de la formación del apoptosoma, aunque no se ha descrito un gen con estas características en el genoma de Ad. Una de las estrategias virales para inhibir caspasas activas podría ser a través de homólogos virales a las IAPs, o activando IAPs celulares. Se ha observado que la E1A puede inducir a ERK (Extracelular-signal Regulated protein Kinase; Schüman y Dobbelstein, 2006), y ERK puede activar al factor transcripcional NF-kB (Marshall, 1995). Entre los genes activados por la NF-kB se encuentran genes que codifican para diferentes *iaps*, como *xiap*. Por lo tanto, es posible que Ad5 presente otro nivel de regulación de apoptosis hasta el momento desconocido.

En células HFFs infectadas por Ad, la activación de C-9 puede deberse a la transcripción de genes pro-apoptóticos dependientes de p53. Actualmente no se sabe si existe una inhibición eficiente de la actividad transcripcional de p53 en HFFs infectadas con Ad5, o si esta inhibición depende de la E1B o del complejo E1B-E4. Nuestros resultados de RT-PCR indicaron que la E1B es necesaria para la inactivación de la expresión de los genes *p53* y *p21* durante la fase temprana (Figs. 16 y 17). En cambio, no se observó activación del gen *puma* en células infectadas con Hr6 y A143 en la fase temprana, sino hasta la fase tardía. La activación de p53 y E2F por E1A, en la fase temprana del ciclo de replicación de Ad sugiere que es posible que *puma* se active desde

la fase temprana, o incluso que la activación de ambos factores transcripcionales pueda tener un efecto aditivo sobre la activación de *puma*. La activación de *puma* a las 24 hpi sugiere que puede ser una respuesta pro-apoptótica tardía que también es inhibida por la E1B (Fig. 18). Nuestros resultados de RT-PCR en tiempo real provienen de un sólo experimento por condición, que aunque nos permitió hacer varias mediciones de la expresión de un mismo gen (sección 4.4.2.), no nos permite confirmar los resultados obtenidos. Por otra parte, es necesario diseñar un nuevo juego de *primers* para cuantificar la expresión del gen de *bax* en todas las muestras, y repetir la medición de la activación de *puma*, para confirmar si su activación se lleva a cabo solamente en la fase tardía, en ausencia de la E1B. De cualquier forma, nuestros resultados son suficientes para sugerir que existe regulación de la actividad transcripcional de p53, que depende de la E1B en HFFs infectadas con Ad5.

Uno de los objetivos de este proyecto era observar si la actividad citoplasmática de p53 está involucrada en la apoptosis inducida por la infección con Ad5. En este estudio consideramos que la degradación de p53 por el complejo E1B-E4 tiene una relación directa con la actividad citoplasmática de p53, por lo que la presencia de E1B-E4 resultaría en una menor cantidad de p53 citoplasmática y niveles menores de apoptosis. La ausencia de este complejo no indujo apoptosis, pero no se logró cuantificar a la p53 en citoplasma, por lo que nuestros resultados no nos permiten concluir si la activación de C-9 puede deberse directamente a una actividad citoplasmática de p53. Por otra parte, la activación de C-9 en HFFs infectadas por Ad5 (Fig. 12) sugiere que existe actividad pro-apoptótica de p53 en citoplasma, pero para corroborar esto es necesario hacer los experimentos que cuantifiquen la cantidad y actividad no sólo de la p53, sino de las proteínas reguladoras de apoptosis en citoplasma (Puma, Bax, BCL-X_L), como se planteó inicialmente en este proyecto.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la inhibición de apoptosis durante la infección por Ad5 en HFFs no depende de la actividad transcripcional de p53. Esto concuerda con la observación de que en células no infectadas, mutantes de p53 deficientes en su actividad transcripcional no se ven afectados en su potencial apoptótico (Chipuk *et al.*, 2003; Chipuk y Green, 2003). La observación de que los mutantes de la E1B pueden replicarse eficientemente en líneas celulares con p53 silvestre, sugiere que existen diferentes estrategias para la modulación de la actividad de p53 durante la infección viral (Shen *et al.*, 2001). Como se mencionó en la

Introducción, en una célula infectada por Ad5 la regulación de p53 parece lograrse por su relocalización. En el núcleo, la proteína celular PML recluta a p53 en los PODs, en respuesta a varios tipos de estrés (Fogal *et al.*, 2000), y es aquí donde se llevan a cabo algunas modificaciones postraduccionales de p53, como acetilación, fosforilación y desubiquitinación. La relocalización de p53 en el núcleo es esencial para sus funciones como activador transcripcional o inductor de apoptosis (Gostissa *et al.*, 2003). Una característica importante de células infectadas con Ad5 es la formación de las ZRPs, donde se realiza la relocalización de varias proteínas celulares. Recientemente, observamos que la localización intracelular de p53 es alterada durante la infección por Ad5, y en ausencia de la E1B, la p53 se acumula de manera desorganizada en el núcleo de la célula infectada. En cambio, en presencia del complejo E1B-E4, la p53 se encuentra localizada en estructuras globulares nucleares que coinciden con sitios en los que se localiza la PML (Cardoso *et al.*, sometido a *Virology*, 2008; y observaciones no publicadas). Debido a que estas estructuras aparecen antes del inicio de la síntesis de DNA viral, nuestros datos sugieren que la relocalización de la p53 a zonas nucleares de replicación viral es importante para la replicación del genoma viral y que puede ser el principal mecanismo de regulación de las actividades de p53; incluyendo la activación de la apoptosis.

7. PERSPECTIVAS

- Cuantificar el porcentaje de células An+ en HFFs tratadas con Camp 16 hpt, y medir la activación de C-9 en HFFs infectadas con Hr6 a 16 y 24 hpi.
- Corroborar los niveles de expresión de los genes *p53*, *p21*, *puma* y *bax*, con RT-PCR en tiempo real, en las mismas condiciones analizadas en este estudio.
Es necesario corroborar: i) la activación de los genes *p53*, *p21* y *puma* por el tratamiento con Fas 6 hpt; ii) la falta de inducción de *p53* y *p21* por Camp 20 hpt; iii) la falta de activación del gen *puma* a las 16 hpi; iv) en el caso del gen *bax*, diseñar un nuevo conjunto de primers y validarlo antes del análisis en células infectadas.
- Para determinar el papel de la E1B sobre la inducción de la actividad pro-apoptótica de p53 en citoplasma, es necesario cuantificar a las proteínas p53, p21, Puma y Bax en núcleo y en citoplasma. Estos experimentos se intentaron,

pero no se obtuvieron resultados claros (sección 5.4). Por lo tanto se requiere de la cuantificación de las proteínas pro- y anti- apoptóticas p53, p21, Bax y Puma (además de cuantificar también a la proteína anti-apoptótica BCL-X_L), en la infección con Ad5 silvestre, A143, y Hr6, durante la fase temprana y la transición a la fase tardía del ciclo replicativo de Ad5.

- Diseñar experimentos de medición de apoptosis con una doble mutante, nula a E1B 55 kDa y a E1B 19 kDa, como control para medir directamente los niveles de apoptosis dependiente de la E1B 55 kDa.

8. REFERENCIAS

1. Appella, E. y Anderson, C.W. (2000). Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. *Pathol. Biol.* 48: 227 – 245.
2. Aspegren, A., Rabino, C. y Bridge, E. (1998). Organization of splicing factors in adenovirus-infected cells reflects changes in gene expression during the early to late phase transition. *Exp. Cell. Res.* 245: 203 - 213.
3. Bendjennat, M., Boulaire, J., Jascur, T., Brickner, H., Barbier, Sarasin, A., Fotedar, A., y Fotedar, R. (2003). UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21/WAF1 to promote DNA repair. *Cell.* 114: 599 – 610.
4. Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise C., Horn, S., Muna, M., Ng. L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. y McCormick, F. (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53 – deficient human tumor cells. *Science.* 274: 373 – 376.
5. Boyer, J.L. y Ketner, G. (2000). Genetic analysis of a potential zinc-binding domain of the adenovirus E4 34 k protein. *J. Biol. Chem.* 275: 14969 – 14978.
6. Brewer, G. y Ross. J. (1988). Poly (A) shortening and degradation of the 39 AU-rich sequences of human c-myc mRNA in a cell-free system. *Mol.Cell. Biol.* 8: 1697 – 1708.
7. Bridge, E., Riedel K.U., Johansson, B. M. y Pettersson, U. (1996). Spliced exons of adenovirus late RNAs colocalize with snRNP in a specific nuclear domain. *J. Cell. Biol.* 135: 303 - 314.
8. Brown, L.M, Gonzalez, R.A., Novotny, J. y Flint, S.J. (2001). The structure of the adenovirus E4 Orf 6 protein predicted by fold recognition and comparative protein modeling. *Proteins.* 44: 97 – 109.
9. Cardoso, F.M., Kato, S., Huang, W., Flint, S.J. y Gonzalez, R.A. (2008). An early function of the adenoviral E1B 55 kDa is required for the nuclear relocalization of the cellular p53 protein in adenovirus-infected normal human cells. *Sometido a Virology.*
10. Carson, C.T., Schwartz, R.A., Stracker, T.H., Lilley, C.E., Lee, D.V. y Weitzman, M.D. (2003). The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *EMBO J.* 22: 6610 – 6620.
11. Carvalho, T., Seeler, J.S., Ohman, K., Jordan, P., Pettersson U., Akusjarvi, G., Carmo-Fonseca, M. y Dejean A. (1995). Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J. Cell Biol.* 131: 45 – 56.
12. Chang, D.W., Ditsworth, D., Liu, H., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S. y Yang, X. (2003). Oligomerization is a general mechanism for the activation of apoptosis initiator and inflammatory procaspases. *J. Biol. Chem.* 278: 16466 – 16469.
13. Chen, G., Branton, P.E., Yang, E., Korsmeyer, S.J., y Shore, G.C. (1996). Adenovirus E1B 19-kDa death suppressor protein interacts with Bax but not with Bad. *J. Biol. Chem.* 271: 24221 – 24225.
14. Chiou, S.K., Tseng, C.C., Rao, L. y White, E. (1994). Functional complementation of the adenovirus E1B 19K protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J. Virol.* 68: 6553 – 6566.
15. Chipuk, J.E. y Green, D.R. (2003). p53's believe it or not: lessons on transcription-independent death. *J. Clin. Immunol.* 23: 355 – 361.

16. Chipuk, J.E., L., Kuwana, Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M. y Green, D.R. (2004). Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Science*. 303: 1010 - 1014.
17. Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D.D. y Green, D.R. (2005). PUMA Couples the Nuclear and Cytoplasmic Proapoptotic Function of p53. *Science*. 309: 1732 - 1735.
18. Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L. y Green, D.R. (2006). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ*. 13: 1396 – 1402.
19. Chretien, I., Marcuz, A., Courtet, M., Katevuo, K., Vainio, O., Heath, J.K., White, S.J. y Du Pasquier, I. (1998). CTX, a *Xenopus* thymocyte receptor, defines a molecular family conserved throughout vertebrates. *Eur. J. Immunol*. 28: 40094 – 4104.
20. Classon, M. y Dyson, N. (2001). p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp. Cell. Res*. 264: 135-147.
21. Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: A function for each cell compartment? *Trends Cell Biol*. 13: 65 - 70.
22. Cregan, S.P., Arbour, N.A., MacLaurin, J.G., Callaghan, S.M., Fortin, A., Cheung, E.C.C., Guberman, D.S., Park, D.S. y Slack, R.S. (2004). p53 activation domain 1 is essential for PUMA upregulation and p53-mediated neuronal cell death. *J. Neurosci*. 44: 10003 - 10012.
23. Crook, N.E., Clem, R.J. y Miller, L.K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol*. 67: 2168 - 2174.
24. Cuconati, A., Degenhardt, K., Sundararajan, R., Ansel, A. y White, E. (2002). BAK and BAX function to limit adenovirus replication through apoptosis induction. *J. Virol*. 76: 4547 – 4558.
25. Cuconati, A. y White, E. (2002). Viral homologs of BCL-2: role of apoptosis in the regulation of virus infection. *Genes Dev*. 16: 2465 – 2478.
26. Debbas, M. y White, E. (1993). Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev*. 7: 546 - 54.
27. Denome, R.M., Werner, E.A. y Patterson, R.J. (1989). RNA metabolism in nuclei: adenovirus and heat shock alter intranuclear RNA compartmentalization. *Nucl. Acids Res*. 17: 2081 – 2098.
28. Dobner, T. y Kzhyshkowska, J. (2001). Nuclear export of adenovirus RNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 259: 25 - 34.
29. Dosch, T., Horn, F., Schneider, G., Kratzer, F., Dobner, T., Hauber, J. y Stauber, R.H. (2001). The adenovirus type 5 E1B-55kDa oncoprotein actively shuttles in virus-infected cells, whereas transport of E4 orf6 is mediated by a CRM1-independent mechanism. *J. Virol*. 75: 5677 - 5683.
30. Doucas, V., Ishov, A.M., Romo, A., Juguilon, H., Weitzman, M.D., Evans, R.M. y Maul, G.G. (1996). Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev*. 10: 196 – 207.
31. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. y Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 102: 33 - 42.
32. Dumont, P., Leu, J.I., Della Pietra III, A.C., George, D.L. y Murphy, M. (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat. Genet*. 33: 357–365.

33. el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V., Levy, D., Parsons, R., Trent, Allday, M.J J., Lin, D., Mercer, W., Kinzler, K., y Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 75: 817 – 825.
34. Flint, S.J. (1999). Organization of the adenoviral genome. *Adenoviruses: basic biology to gene therapy*. Prem Seth. R.G. Landes Company.
35. Fogal, V., G. M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P.P., Will, H., Schneider, C. y Del Sal, G. (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO. J.* 19: 6185 - 95.
36. Gewies, A. (2003). Introduction to apoptosis. *ApoReview*.
37. Giannakakou, P., Sackett, D.L., Ward, Y., Webster, K.R., Blagosklonny, M.V. y Fojo, T. (2000). p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nat. Cell. Biol.* 2: 709 - 717.
38. Gonzalez, R.A. y Flint, S.J. (2002). Effects of mutations in the adenoviral E1B 55-kilodalton protein coding sequence on viral late mRNA metabolism. *J. Virol.* 76: 4507 - 4519.
39. Gonzalez R. A. y Flint S. J. (2003). Regulation of mRNA production by the adenoviral E1B 55 kDa and E4 orf6 proteins. *Adenoviruses: model and vectors in virus-host interactions*, Capítulo 10. Springer Press.
40. Gonzalez, R.A., Huang, W., Finnen, R., Bragg, C. y Flint, S.J. (2006). The adenoviral E1B 55 kDa protein is required for both regulation of mRNA export and efficient entry into late phase of infection in normal human fibroblasts. *J. Virol.* 964-974.
41. Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M. y Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO. J.* 18: 6462 - 6471.
42. Gostissa, M., H. T., Will, H. y Del Sal, G. (2003). Regulation of p53 functions: let's meet at the nuclear bodies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 351 - 7.
43. Hamon, Y., Broccardo, C., Chambenoit, O., Luciani, M.F., Toti, F., Chaslin, S., Freyssinet, J.M., Devaux, P.F., McNeish, J., Marguet, D. y Chimini, G. (2000). ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat. Cell. Biol.* 2: 399 – 406.
44. Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D. y White, E. (1996). The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes & Dev.* 10: 461–477.
45. Harada, J.N. y Berk, A.J. (1999). p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55 K in adenovirus type 5 replication. *J. Virol.* 73: 5333 – 5344.
46. Harris, S.L. y Levine A.J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene.* 17: 2899 - 908.
47. Harrison, T., Graham, F., y Williams, J. (1977). Host-range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells. *Virology.* 77: 319 - 29.
48. Hayes, B.W., Telling, G.C., Myat, M.M., Williams, J.F. y Flint. S.J. (1990). The adenovirus L4 100-kilodalton protein is necessary for efficient translation of viral late mRNA species. *J. Virol.* 64: 2732 – 2742.
49. Hong, S.S., Karayan, L., Tournier, J., Curiel, D.J. y Boulanger, P.A. (1997). Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I 2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO. J.* 9: 2294 - 2306.
50. Horridge, J.J. y Leppard, K.N. (1998). RNA-binding activity of the E1B 55-kilodalton protein from human adenovirus type 5. *J. Virol.* 9374 – 9379.

51. Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C.H., Kovacs, J.J., Higashimoto, Y., Appella, E. y Yao, T.P. (2002). MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO. J.* 21: 6236 - 6245.
52. Janiak, F., Leber, B. y Andrews, D.W. (1994). Assembly of Bcl-2 into microsomal and outermitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.* 269: 9842.-9849.
53. Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K.H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J.N., McKinnon, P.J., Cleveland, J.L. y Zambetti, G.P. (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell.* 4: 321–328.
54. Kao C.C., Yew P.R. y Berk, A.J. (1990). Domains required for *in vitro* association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55 K proteins. *Virology.* 179: 806 - 814.
55. Keeble, J.A y Gilmore, A.P. (2007). Apoptosis commitment – translating survival signals into decisions on mitochondria. *Cell Res.* 17: 976 – 984.
56. Kelkar, S.A., Pfister, K.K., Crystal, R.G. y Leopold, P.L. (2004). Cytoplasmic dynein mediates adenovirus binding to microtubules. *J. Virol.* 78: 10122 – 10132.
57. Koch, P., Gatfield, J., Löber, C., Hobom, U., Lenz-Stöppler, C., Roth, J., Döbelstein, M. (2001). Efficient replication of adenovirus despite the overexpression of active and nondegradable p53. *Cancer Res.* 61: 5941 – 5947.
58. König, C., Roth, J. y Döbelstein, M. (1999). Adenovirus type 5 E4 orf3 protein relieves p53 inhibition by E1B-55- kilodalton protein. *J. Virol.* 73: 2253 – 2262.
59. Kratzer, F., Rosorius, O. Heger, P., Hirshmann, N., Dobner, T., Hauber, J. y Stauber R.H. (2000). The adenovirus type 5 E1B-55K oncoprotein is highly active shuttle protein and shuttling is independent E4 orf6, p53 y Mdm2. *Oncogene.* 19: 850 - 857.
60. Lalier, L., Cartron, P.F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B. y Vallette, F.M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis.* 12: 887 – 896.
61. Leist, M. y Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 589-98.
62. Leppard, K.N. y Shenk, T. (1989). The adenovirus E1B 55 kDa protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *EMBO. J.* 8: 2329 - 2336.
63. Leppard, K.N. (1993). Selective effects on adenovirus late gene expression of deleting the E1B 55 kDa. *J. Gen. Virol.* 74: 575 - 582.
64. Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E. y George, D.L. (2004) Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol.* 6: 443–450.
65. Li, M., Brooks, C.L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R. y Gu, W. (2003). Mono versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science.* 302: 1972 - 1975.
66. Liao H.J., Kobayashi, R. y Mathews, M.B. (1998). Activities of adenovirus virus-associated RNAs: purification and characterization of RNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 8514 – 8519.
67. Liu, G. y Lozano, G. (2005). p21 stability: Linking chaperones to a cell cycle checkpoint. *Cancer Cell.* 7: 113 – 114.

68. Löhr, K., Hartmann, O., Schäfer, H. y Dobbelstein, M. (2003). Mutual interference of adenovirus infection and myc expression. *J. Virol.* 77: 7936 – 7944.
69. Lomsonova, E., Subramanian, T., y Chinnadurai, G. (2005). Mitochondrial localization of p53 during adenovirus infection and regulation of its activity by E1B-19K. *Oncogene* 24: 6796 – 6808.
70. Lu, Y.P., Lou, Y.R., Li, X.H., Xie, J.G., Brash, D., Huang, M.T. y Conney, A.H. (2000). Stimulatory effect of oral administration of green tea or caffeine on ultraviolet light-induced increases in epidermal wild-type p53, p21 (WAF1/CIP1), and apoptotic sunburn cells in SKH-1 mice. *Cancer Res.* 60: 4785 – 4791.
71. Mahrouf, N., Redwine, W.B., Florens, L., Swanson, S.K., Martin-Brown, S., Bradford, W.D., Staehling-Hampton, K., Washburn, M.P., Conaway, R.C. y Conaway, J.W. (2008). Characterization of cullin-box sequences that direct recruitment of Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules to elongin BC-based ubiquitin ligases. *J. Biol. Chem.* 283: 8005 – 8013.
72. Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 80: 179 – 185.
73. Nakano, K. y Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell.* 7: 683 – 694.
74. Nordqvist, K., Ohman, K. y Akusjärvi, G. (1994). Human adenovirus encodes two proteins which have opposite effects on accumulation of alternatively spliced mRNAs. *Mol. Cell Biol.* 14: 437 – 445.
75. Ohman, K., Nordqvist, K. y Akusjärvi, G. (1993). Two adenovirus proteins with redundant activities in virus growth facilitates tripartite leader mRNA accumulation. *Virology.* 194: 50 – 58.
76. Orlando, J.S. y Ornelles, D.A. (1999). An arginine-faced amphipathic alpha helix is required for adenovirus type 5 e4orf6 protein functions. *J. Virol.* 73: 4600 – 4610.
77. Ornelles, D. y 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.* 65: 424 – 439.
78. O'Shea, C.C., Johnson, L., Bagus, B., Choi, S., Nicholas, C., Shen, A., Boyle, L., Pandey, K., Soria, C., Kunich, J., Shen, Y., Habets, G., Ginzinger, D. y McCormick, F. (2004). Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell.* 6: 611 – 623.
79. Pei, X.H., Nakanishi, Y., Takayama, K., Bai, F. y Hara, N. (1999). Benzo[a]pyrene activates the human p53 gene through induction of nuclear factor kappa B activity. *J. Biol. Chem.* 274: 35240 - 35246.
80. Petrini, J.H. y Stracker, T.H. (2003). The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Tr. Cell Biol.* 13: 458 - 62.
81. Perez, D. y White, E. (2000). TNF- α signals apoptosis through a Bid-dependent conformational change in Bax that is inhibited by E1B 19K. *Mol. Cell.* 6: 53 – 63.
82. Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* 29: 2002 - 2007.
83. Puvion-Dutilleul, F., Roussev, R. y Puvion, E. (1992). Distribution of viral RNA molecules during the adenovirus type 5 infectious cycle in HeLa cells. *J. Struct. Biol.* 108: 209 – 220.

84. Querido, E., Morisson, M.R., Chu-Pham-Dang, H., Thirlwell, S.W., Boivin, D. y Branton, P.E. (2001). Identification of three functions of the adenovirus e4orf6 protein that mediate p53 degradation by the E4orf6-E1B55 K complex. *J. Virol.* 75: 699 – 709.
85. Rossner, B.A. (1982). *Fundamentals of Bioestistics*. Duxbury Press, PWS Publishers.
86. Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H. y Ward, T. G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 84: 570 – 573.
87. Rubenwolf, S., Schutt, H., Nevels, M., Wolf, H. y Dobner, T. (1997). Structural analysis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton-E4 orf6 protein complex. *J. Virol.* 71: 1115 - 1123.
88. Salvessen, G.S. y Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 401 - 10.
89. Sandler, A.B. y Ketner, G. (1989). Adenovirus early region 4 is essential for normal stability of late nuclear RNAs. *J. Virol.* 63: 624 - 630.
90. Sandri-Goldin, R.M. (2004). Viral regulation of mRNA export. *J. Virol.* 78: 4389 - 4396.
91. Sarnow, P., Hearing, P., Anderson, C.W., Halbert, D.N., Shenk, T. y Levine, A.J. (1984). Adenovirus early region 1B 58,000 dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4 25,000-dalton protein in productively infected cells. *J. Virol.* 49: 692 – 700.
92. Schümann, M. y Döbelstein, M. (2006). Adenovirus-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylation during the late phase of infection enhances viral protein levels and virus progeny. *Cancer Res.* 66: 1282 – 1288.
93. Shen, Y. y Shenk, T. (1996). Viruses and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 105 - 111.
94. Shen, Y., Kitzes, G., Nye, J.A., Fattaey, A. y Hermiston, T. (2001). Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55K protein. *J. Virol.* 75: 4297 – 4307.
95. Stracker, T.H., Carson, C.T. y Weitzman, M.D. (2002). Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature.* 418: 348 -352.
96. Subramanian, T., Tarodi, B., Govindarajan, R., Boyd, J.M., Yoshida, K. y Chinnadurai, G. (1993). Mutational analysis of the transforming and apoptosis suppression activities of the adenovirus E1B 175R protein. *Gene.* 124: 173–181.
97. Subramanian, T., Vijayalingam, S., Lomonosova, E., Zhao, L. y Chinnadurai, G. (2007). Evidence for involvement of BH3-Only proapoptotic members in adenovirus-induced apoptosis. *J. Virol.* 81: 10486 – 10495.
98. Sundararajan, R. y White, E. (2001). E1B 19K blocks Bax oligomerization and tumor necrosis factor α -mediated apoptosis. *J. Virol.* 75: 7506 – 7516.
99. Tarodi, B., Subramanian, T. y Chinnadurai, G. (1993). Functional similarity between adenovirus E1B 19K gene and Bcl-2 oncogene: mutant complementation and suppression of cell death induced by DNA damaging agents. *Intl. J. Oncol.* 3: 467 – 472.
100. Teodoro, J.G. y Branton, P.E. (1997). Regulation of apoptosis by viral gene products. *J. Virol.* 71: 1739 – 1746.
101. Tollefson, A.E., Scaria, A., Hermiston, T.W., Ryerse, J.S., Wold, L.J. y Wold, W.S.M. (1996). The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at

- very late stage of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J. Virol.* 70: 2296 - 2306.
102. Tribouley, C., Lutz, P., Staub, A. y Kedinger, C. (1994). The product of the adenovirus intermediate gene IVa2 is a transcriptional activator of the major late promoter. *J. Virol.* 68: 4450 - 4457.
 103. Trotman, L.C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R.P. y Greber, U.F. (2001). Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat. Cell. Biol.* 3: 1092 – 1100.
 104. Tsimbouri, P., Drotar, M.E., Coy, J.L. y Wilson, J.B. (2002). *bcl-xL* and RAG genes are induced and the response to IL-2 enhanced in EmuEBNA-1 transgenic mouse lymphocytes. *Oncogene.* 21: 5182 – 5187.
 105. Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. y Croce, C. M. (1985). Involvement of the *bcl-2* gene in human follicular lymphoma. *Science.* 228: 1440 – 1443.
 106. Vogelstein, B., Lane, D. y Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature.* 408: 307 – 310.
 107. Vousden, K.H. y Woude, G.F. (2000). The ins and outs of p53. *Nat. Cell. Biol.* 2: 178 - 180.
 108. Vousden, K.H. y Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer.* 2: 594 - 604.
 109. Vousden, K.H. (2005). p53 and PUMA: A Deadly Duo. *Science.* 309: 1685 - 1686.
 110. Wang, K., Huang, A., Kapoor-Munshi, A. y Nemerov, G. (1998). Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J. Virol.* 72: 3455 – 3458.
 111. Weitzman, M. D. y Ornelles, D. A. (2005). Inactivating intracellular antiviral responses during adenovirus infection. *Oncogene.* 24: 7686 – 7696.
 112. White, E., Grodzicker, T. y Stillman, B.W. (1984). Mutations in the gene encoding the adenovirus E1B 19K tumor antigen cause degradation of chromosomal DNA. *J. Virol.* 52: 410–419.
 113. White, E. (2001). Regulation of the cell cycle and apoptosis by the oncogenes of adenovirus. *Oncogene.* 20: 7836 – 7846.
 114. Yabe, Y., Samper, L., Taylor, G. y Trentin, J.J. (1963). Cancer induction in hamsters by human type 12 adenovirus. Effect of route of injection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 113: 221 - 224.
 115. Yew, P.R., Kao, C.C. y Berk, A. J. (1990). Dissection of functional domains in the adenovirus 2 Early 1B 55K polypeptide by suppressor-linker insertional mutagenesis. *J. Virol.* 179: 795 - 805.
 116. You, H., Yamamoto, K. y Mak, T.W. (2006). Regulation of transactivation independent proapoptotic activity of p53 by FOXO3a. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 9051 - 9056.
 117. Youle, R. J. y Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev.* 9: 47 – 59.
 118. Zou, H., Yang, R., Hao, J., Wang, J., Sun, C., Fesik, S.W., Wu, J.C., Tomaselli, K.J. y Armstrong, R.C. (2003). Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *J. Biol. Chem.* 278:8091 - 8098.