



Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

**Análisis de la Dinámica de Formación de los  
Centros de Replicación de Adenovirus 5 en  
células HFF.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN  
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

**Margarita Valdés Alemán**

Tutor: Dr. Ramón González García Conde



CUERNAVACA, MOR. 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Virología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la asesoría del Dr. Ramón González García-Conde. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca otorgada por CONACyT (No. 509022129) y proyecto CONACyT-SEP (SEP-2004-C01-47487).

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	7
1.1 Generalidades sobre los adenovirus.....	7
1.2 Estructura del Virión. ....	8
1.3 El genoma y su organización.....	9
1.4 Ciclo de Replicación .....	11
1.4.A Fase Temprana: Interacción con la célula huésped y activación transcripcional. .....	11
1.4.B Fase Tardía: Replicación del genoma viral y expresión selectiva de los genes virales tardíos. ....	12
1.5 Genes tempranos.....	15
1.5.A Activación de la célula por E1A.....	15
1.5.B Activación de las unidades transcripcionales tempranas por E1A .....	15
1.6 Inhibición de las defensas celulares.....	16
1.6.A Inhibición de apoptosis .....	16
1.6.B Inhibición de la respuesta a ruptura en DNA de doble cadena. ....	17
1.6.C Inhibición de la respuesta antiviral inducida por interferón. ....	17
1.7 Genes tardíos .....	18
1.7.A Activación de la transcripción de los genes virales tardíos. ....	19
1.7.B Procesamiento post-transcripcional .....	20
1.7.C Expresión selectiva de mRNA virales tardíos .....	21
2. ANTECEDENTES.....	24
2.1 Proteínas con funciones asociadas a la expresión génica se encuentran organizadas en dominios nucleares.....	24

2.1.A Nucleolo .....	25
2.1.B Cuerpos de Cajal.....	26
2.1.C Speckles o Gránulos de Intercromatina.....	26
2.1.D Cuerpos de PML (ND10).....	27
2.2 Reorganización del núcleo y formación de los CR. ....	29
2.2.A Reorganización de Cuerpos de PML (ND10). ....	29
2.2.B Reorganización de Cuerpos de Cajal y Gránulos de Intercromatina. ....	29
2.3 Organización de los Centros de replicación.....	31
2.4 Procesamiento post-transcripcional y exportación de mRNAs virales tardíos, actividades potencialmente asociadas a los CR. ....	34
2.5 Actividades de E1B asociadas a los CR.....	35
3. HIPOTESIS .....	39
4. OBJETIVO .....	39
5. ESTRATEGIA METODOLÓGICA .....	39
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
6.1 Células y virus.....	40
6.2 Ensayos de Inmunofluorescencia. ....	41
6.3 Diseño de oligos y sondas para FISH.....	42
6.3.B Late 2 (L2).....	43
6.3.C Proteína de choque térmico 70 (Hsp70).....	44
6.4 Síntesis de sondas para FISH.....	45
6.4.A Clonación de productos de RT-PCR. ....	45
6.4.B Transcripción de sondas para FISH. ....	46

6.5 Ensayos de FISH. ....	47
6.6 Obtención y análisis de fracciones subcelulares. ....	48
7. RESULTADOS.....	50
7.1 Distribución de mRNAs virales tardíos de Ad5 en células HFF. ....	50
7.1.A. Estandarización de condiciones para FISH en HFF. ....	51
7.1.B. Análisis de la distribución del mRNA viral L2 procesado. ....	53
7.2 Obtención de Centros de replicación. ....	58
7.2.A Purificación de CR por métodos de separación por tamaño y densidad. ....	59
7.2.B. Separación de CR por técnicas de Inmunoprecipitación. ....	62
7.3. Componentes de nucléolo son reorganizados durante la infección con Ad5. ....	65
8. DISCUSIÓN .....	68
9. CONCLUSIONES.....	77
10. REFERENCIAS .....	77
11. MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	82
11.1 Generación de sondas para FISH .....	82
11.1.A Generación de cDNA por RT-PCR.....	82
11.1 .C Orientación de los insertos en las construcciones para FISH. ....	85
11.1.D Transcripción <i>in vitro</i> . ....	87
12. TABLAS.....	89

## ABREVIATURAS

Ad	Adenovirus
APL	Acute Promyelocytic Leukemia
CAR	Coxsackie-Adenovirus Receptor
CB	Coiled Body
CBP	Cap Bindig Protein
CDK1	Cyclin-Dependent Kinase 1
cit	citoplasma
CR	Centros de Replicación
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBP	DNA Binding Protein
DFC	Dense Fibrillar Center
DMEM	Dulbbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucliec Acid
dsDNA	double stranded DNA
DTT	dithiothreitol
E1B	E1B-55 kDa
ELL	Eleven-nineteen Lysin-rich Leukemia
FCS	Fetal Calf Serum
GC	Granule Center
HFF	Human Foreskin Fibroblast
hpi	horas post-infección
IG	Interchromatin Granules
IgG	Inmunoglobulina G
mAb	monoclonal antibody
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
ML	Major Late
MLL	Mixed Lineage Leukemia
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	messenger RNA
mRNP	messenger ribonucleoprotein
NB	Nuclear Bodies
ND10	Nuclear Domain 10
NHEJ	non-homologus end joining
nlo	nucleolo
NOR	Nucleolar Organizer Region
np	nucleoplasma
Orf3	E4 orf3

Orf6	E4 orf6
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFU	Plaque Forming Unit
PKR	Protein Kinase RNA-activated
PML	Promyelocytic Leukemia Protein
PMSF	Phenylmethanesulphonyl Fluoride
poliA	poli-Adenina
RNA	Ribonucleic Acid
RNApol	RNA polimerasa
rRNA	ribosomal RNA
SG	Stress Granules
snoRNA	small nucleolar RNA
snRNA	small nuclear RNA
ssDNA	single stranded DNA
TBP	TATA Binding Protein
TIA1	T-cell Intracellular Antigen-1
UTR	Untranslated region
TP	Terminal Protein
VA	Virus-Associated
WB	Western Blot
ZPR	Zona Periférica de Replicación

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades sobre los adenovirus.

Los adenovirus forman parte de la familia *Adenoviridae*, la cual se divide principalmente en dos géneros, *Aviadenovirus* y *Mastadenovirus*. El primero está conformado por virus que infectan aves y el segundo por virus que pueden infectar a diferentes mamíferos, entre ellos el humano, el simio y el ratón. Se conocen cincuenta y dos serotipos diferentes de adenovirus de humano. Estos serotipos se identificaron y clasificaron por su resistencia a la neutralización por sueros dirigidos contra diferentes serotipos. Además, estos se clasifican en seis subgrupos (A-F) por su habilidad para aglutinar eritrocitos y por el porcentaje de GC en su genoma [1-2].

Los adenovirus fueron aislados por primera vez en 1953 en tejido de adenoides obtenidos de pacientes con infecciones respiratorias agudas. A pesar de que se identificaron asociados a enfermedades respiratorias, se descubrió que sólo del 5%-10% de estas enfermedades eran causadas por los adenovirus [3]. Los adenovirus además asociados a otras enfermedades como la conjuntivitis y gastroenteritis infantil [4-5].

Estudios con adenovirus de humano, mostraron que estos son capaces de inducir la formación de tumores en hámster. Estos fueron los primeros datos de un virus humano capaz de promover la oncogénesis, sin embargo, no se ha demostrado que la infección por adenovirus esté asociada a cáncer en humanos [6-7]. A raíz de este descubrimiento, los adenovirus comenzaron a utilizarse como herramienta para el estudio de la oncogénesis, por lo cual se han generado mutantes del virus que han permitido descifrar algunas de las funciones de sus genes. Además, los adenovirus se utilizan como modelo para el estudio de procesos celulares como la transcripción, replicación de DNA y traducción. Un evento que se observó por primera vez, en estudios con adenovirus, fue el procesamiento por splicing de RNAs mensajeros (mRNAs) [8].

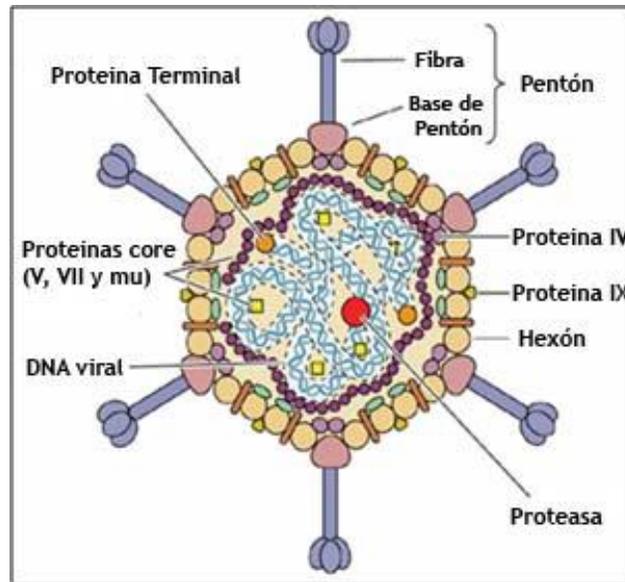
## 1.2 Estructura del Virión.

Los adenovirus son partículas cuyo diámetro varía entre 70-100 nm. No poseen envoltura lipídica y su cápside tiene una estructura icosaédrica. Dentro de la cápside, en el core del virión, se encuentra el genoma (de doble cadena de DNA) asociado a proteínas.

La cápside está compuesta mayoritariamente por los capsómeros pentón y hexón. El capsómero del pentón se encuentra en cada vértice del icosaedro y está conformado por la base del pentón y una proteína fibra que se proyecta desde la superficie en cada vértice. La base del capsómero del pentón está formada por cinco proteínas III y la proteína fibra está compuesta por tres proteínas IV. El capsómero del hexón lo conforman tres polipéptidos II.

El core lo conforman el genoma viral y cuatro proteínas diferentes. La proteína terminal (TP) que se encuentra unida covalentemente a ambos extremos 5' del genoma de DNA por un enlace fosfodiéster entre el grupo  $\beta$ -hidroxilo de la serina 562 y el hidroxilo 5' de la deoxicitosina terminal. Los otros tres polipéptidos, V, VII y  $\mu$ , son proteínas ricas en argininas que interactúan con el DNA. La proteína VII es la más abundante del core y sobre la cual se enrolla y empaqueta el DNA viral.

Los polipéptidos VII y IX estabilizan interacciones entre los capsómeros de hexón, lo que permite la formación de diferentes arreglos no equivalentes en la superficie de la cápside (revisado en [9]).



**Figura 1. Estructura del virión** (modificada de Flint et al., 2002).

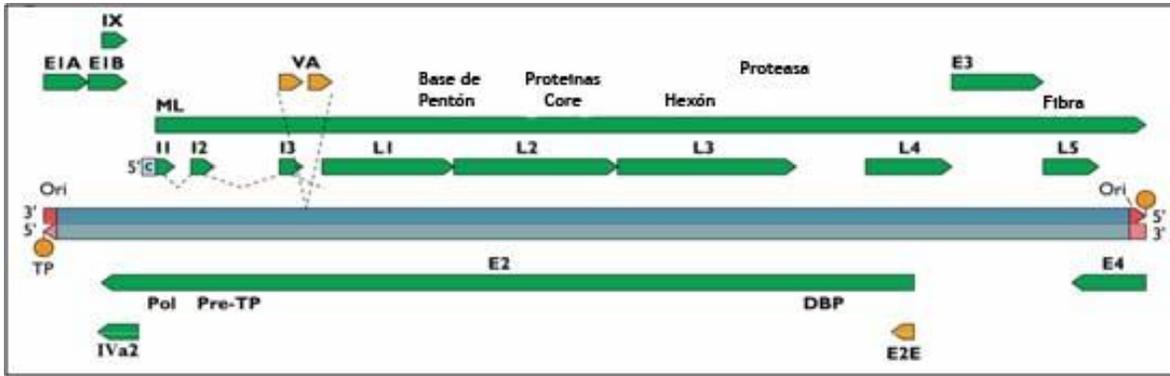
### 1.3 El genoma y su organización

El genoma de adenovirus es de DNA de doble cadena (dsDNA) lineal y mide alrededor de 36 kpb. Tiene dos orígenes de replicación idénticos, uno en cada extremo, que están flanqueados por secuencias terminales repetidas invertidas. Las dos cadenas del genoma se transcriben y existe una sobreposición entre las regiones codificantes. El genoma se encuentra organizado en unidades transcripcionales que son transcritas por la RNA polimerasa (RNAPol) II. Cinco unidades de transcripción tempranas (E1A, E1B, E2, E3 y E4), dos unidades de transcripción tempranas retrasadas (IX y IVa2) y una unidad transcripcional tardía que se divide en cinco familias de mRNAs (L1 a L5), las cuales se generan por splicing alternativo y selección diferencial del sitio de poliadenilación (poliA), que se encuentran bajo el control del promotor Major Late (ML). Además, se encuentran codificados dos genes que son transcritos por la RNAPol III que dan lugar a dos RNA pequeños llamados "asociados a virus" (Virus Asociated) (VA RNA-1 y VA RNA-2).

Todas las unidades transcritas por la RNAPol II dan lugar a más de un mRNA por splicing alternativo, sintetizándose más de cuarenta transcritos diferentes. Como consecuencia,

las proteínas codificadas en una misma unidad transcripcional pueden compartir secuencias y participar en algunas funciones comunes. Por ejemplo: la unidad E1A codifica para dos proteínas que activan la transcripción e inducen la entrada a la fase S del ciclo celular de la célula hospedera; E1B codifica para dos proteínas que bloquean la activación de apoptosis de la célula; E2 codifica tres proteínas que funcionan en la replicación del genoma viral; E3 codifica para proteínas que regulan la respuesta del hospedero a infecciones; la familia de mRNAs tardíos codifica para las proteínas estructurales y proteínas encargadas del ensamblaje de la cápside. La unidad E4 es la única que codifica para proteínas con funciones diversas, ya que sus productos regulan la transcripción de genes virales, el transporte de mRNAs, la replicación del genoma viral y la apoptosis de la célula hospedera (Revisado en [10]).

La organización en unidades transcripcionales le permite controlar con un sólo elemento transcripcional la expresión de múltiples genes que son requeridos para una misma función, como la replicación de DNA. La posición de las unidades dentro del genoma, podría conferirles regulación temporal sobre su expresión, lo que explicaría que en la fase temprana las primeras unidades en transcribirse son las de los extremos (E1 y E4). Por otra parte, se ha visto que dentro del core, la molécula de DNA se encuentra organizada en ocho dominios superenrollados y cada unidad forma un dominio de forma independiente de las otras (Revisado en [10-11]).



**Figura 2. Esquema de la organización del genoma de adenovirus en unidades transcripcionales.** Por convención, el genoma se esquematiza con el gen E1A de lado izquierdo y la cadena que se lee de izquierda a derecha codifica para las unidades E1A, E1B, IX, ML, VA RNA y E3, la cadena que se lee de derecha a izquierda codifica para las unidades E4, E2 y IVa2 (modificada de Flint et al., 2002).

#### 1.4 Ciclo de Replicación

El ciclo de replicación de los adenovirus ha sido estudiado principalmente con los serotipos 2 y 5 del subgrupo C (Ad2 y Ad5), por lo que estos dos serotipos son considerados los prototipos de los adenovirus.

Por convención, el ciclo replicativo de virus con genomas de DNA se divide principalmente en dos fases, una temprana y una tardía, separadas por el inicio de replicación del genoma viral.

##### 1.4.A Fase Temprana: Interacción con la célula huésped y activación transcripcional.

En el ciclo de replicación de los adenovirus, la fase inmediata temprana inicia con la interacción del virus con la célula hospedera permisiva. Esta interacción se da entre la proteína de cápside fibra y el receptor CAR (Coxsackie-Adenovirus Receptor), en la superficie de la célula. Una segunda interacción entre la base de pentón con las integrinas  $\alpha_v\beta_3$   $\gamma\alpha_v\beta_5$  promueve la endocitosis del virión mediada por clatrina y la liberación de las proteínas fibra. El pH bajo del endosoma, activa a una proteasa viral que se encuentra asociada al virión y resulta en el corte del polipéptido VI que interconecta al core y a la cápside. Antes de la fusión del endosoma con el lisosoma, el virión es liberado a

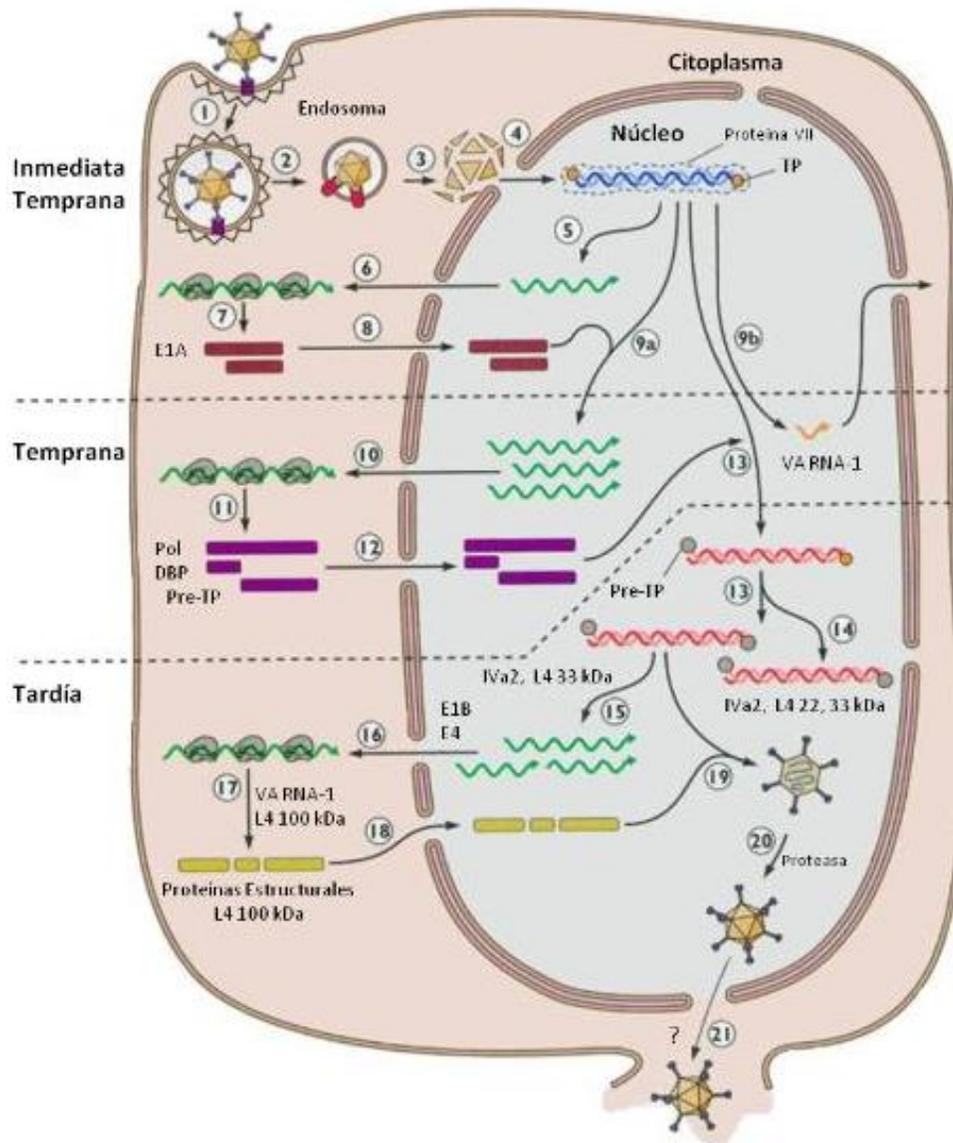
citoplasma por un proceso mediado por la base de pentón. En el citoplasma, el virión es transportado al núcleo asociado a microtúbulos. En el trayecto ocurren otros pasos de desensamblaje y se liberan los polipéptidos IIIa, III (capsómero de pentón) y VIII. Para la translocación al interior del núcleo, el core del virión interactúa con proteínas de los filamentos del complejo del poro nuclear (CAN/Nup214) y el DNA viral, aún asociado a la proteína del core VII es internalizado por asociación con H1 e importinas  $\alpha$  y  $\gamma$ , y se asocia a la matriz nuclear por medio de TP.

Una vez que el genoma viral entra al núcleo, la primera unidad en ser transcrita es E1A. La expresión de sus productos (12S y 13S) resulta en la activación transcripcional de las demás unidades tempranas y en la activación directa e indirecta de genes celulares responsables de inducir la entrada a la fase S del ciclo celular, para crear un ambiente favorable para la replicación viral [12]. La activación de los genes virales tempranos resulta en la acumulación de los productos de la unidad transcripcional E2 (la proteína de unión a DNA, DBP; el precursor de la proteína terminal, Pre-TP; y la DNA polimerasa viral, Pol) que se encargan de la replicación del genoma viral. Los mensajeros virales tempranos son transcritos en el núcleo, y exportados al citoplasma en donde son traducidos. Las proteínas tempranas recién sintetizadas son importadas al núcleo en donde interactúan con factores de transcripción celulares (Oct 1, NF I y II), induciendo la síntesis del DNA viral. La proteína terminal (TP) unida a los extremos 5' funciona como cebador para el inicio de la síntesis, que ocurre mediante el mecanismo de desplazamiento de cadena.

1.4.B Fase Tardía: Replicación del genoma viral y expresión selectiva de los genes virales tardíos.

La fase tardía comienza con el inicio de la síntesis del DNA viral. Las moléculas de DNA recién sintetizadas pueden ser utilizadas como moldes para continuar la replicación o para la transcripción de los genes virales tardíos, codificados en la unidad transcripcional tardía ML. Los transcritos tardíos son procesados por splicing alternativo y por selección diferencial de sitio de poliA, dando lugar a cinco familias de mensajeros (L1-L5). Durante la

infección, no se inhibe la síntesis de mensajeros celulares, sin embargo, los mensajeros virales tardíos son exportados selectivamente a citoplasma en donde también son selectivamente traducidos. Estos eventos de selección de mRNAs virales sobre los mRNAs celulares, promueven la síntesis eficiente de las proteínas virales estructurales. Después de ser sintetizadas, las proteínas estructurales entran al núcleo en donde se da el ensamblaje de los viriones inmaduros; para ello se requiere de una secuencia de encapsidación cercana al extremo izquierdo del genoma viral. Los viriones maduros se forman cuando los precursores de las proteínas de la cápside son procesados por la proteasa viral L3 (p23). Finalmente la progenie viral es liberada por lisis celular. Como se explicará más adelante, la replicación del genoma viral, así como la síntesis de los mRNAs virales tardíos y parte de su procesamiento se lleva a cabo en estructuras nucleares inducidas por la infección, llamadas Centros de Replicación (CR).



**Figura 3. Representación del ciclo de replicación de Ad2 y Ad5** (modificada de Flint et al., 2009). En la fase inmediata temprana, el genoma viral entra al núcleo y se transcribe E1A, la cual activa la transcripción de las demás unidades tempranas. Durante la fase temprana, se sintetizan las proteínas virales que se requieren para la replicación del genoma viral. Una vez que se acumulan, inicia la replicación del genoma y la fase tardía. Comienza la expresión de los genes virales tardíos que codifican para las proteínas estructurales. Los genomas recién sintetizados son encapsidados, dando lugar a la progenie viral que se liberará de la célula.

## 1.5 Genes tempranos

Las proteínas tempranas de adenovirus establecen tres eventos principales en la fase temprana que se requieren para una replicación exitosa del virus: 1) Se induce a la célula hospedera a entrar a la fase S del ciclo celular para establecer un ambiente adecuado que permita la replicación del genoma viral; 2) Se inhiben las defensas celulares (apoptosis, respuesta antiviral por interferón y respuesta a ruptura de dsDNA) que se establecen como resultado de la infección viral para protección de la célula; 3) Se sintetizan las proteínas virales necesarias para la replicación del genoma viral. Estos tres eventos dependen de la activación transcripcional de las unidades de transcripción tempranas al inicio del ciclo de replicación, que a su vez depende de las proteínas codificadas en la unidad transcripcional E1A [1].

### 1.5.A Activación de la célula por E1A

Como se describió arriba, en la fase inmediata temprana de la infección, la unidad E1A es la primera en transcribirse, por tener un promotor constitutivamente activo. Sus principales productos son E1A 12S y E1A 13S que resultan de un procesamiento por splicing diferencial. Las E1A sólo difieren en 46 aminoácidos que se encuentran en la región media de la 13S. Tienen cinco regiones conservadas: el N-terminal, CR1, CR2, CR3 (sólo la tiene la 13S) y CR4. Sufren varios procesos de fosforilación por las cinasas celulares CDK1, 2 y 4, MAPK y la caseína cinasa II. Funcionan como *trans*-activadores y activan la transcripción de las unidades transcripcionales del virus. Las E1A no tienen dominios de unión a DNA, pero activan la transcripción uniéndose a proteínas reguladoras y factores de transcripción celulares [12].

### 1.5.B Activación de las unidades transcripcionales tempranas por E1A

Una vez iniciada la fase temprana, la E1A activa la transcripción de las otras unidades tempranas. El dominio de activación se encuentra en la región CR3 de E1A 13S que se une a la subunidad MED23 del complejo mediador, favoreciendo el ensamblaje del complejo

de inicio de transcripción. Este dominio es responsable de estimular la actividad de los promotores tempranos E1B, E2E (promotor temprano de E2), E3, y E4. Además la E1A activa la transcripción de genes con promotor TATA uniéndose directamente a TBP y activando su función o uniendo a sus represores como Dr1.

E1A también regula la transcripción por medio de factores que se unen fuera del sitio promotor basal. Un ejemplo de esto es la regulación de sitios de unión del activador transcripcional celular E2F, el cual se descubrió en adenovirus y regula el promotor de la unidad transcripcional E2. La proteína de retinoblastoma (pRB) une a E2F evitando la activación de genes regulados por E2F. E1A 12S y 13S se unen a pRB desplazando a E2F. Por lo tanto E1A libera la represión de E2F activando la transcripción de los genes de E2 necesarios para la replicación viral y de los genes celulares que se requieren para la progresión del ciclo celular hacia la fase S, como DNA pol  $\alpha$ , ciclina A y E, cdc2 y *c-myc* [12].

## 1.6 Inhibición de las defensas celulares

### 1.6.A Inhibición de apoptosis

La activación transcripcional y progresión del ciclo celular por E1A activa la apoptosis de forma dependiente e independiente de p53. La forma dependiente de p53 sucede por la inducción de la expresión del supresor tumoral p19<sup>ARF</sup> por E1A. Éste se une e inhibe a MDM2, proteína requerida para la ubiquitinación y posterior degradación de p53, resultando en un aumento de la concentración de p53. La forma independiente de p53 se da por la inducción de otras proteínas del virus, E4 orf4 y E3, cuyos genes son también activados por E1A [13].

Durante la infección, las proteínas virales E1B-55K (E1B), E1B-19K y E4 orf6 (Orf6) son las principales responsables de la inhibición de la apoptosis. La E1B-19K es un homólogo de BCL-2 y se asocia a las proteínas proapoptóticas BAK y BAX inhibiendo su oligomerización y la formación de poros en la membrana mitocondrial [14-15]. Las proteínas E1B y Orf6

forman un complejo que se asocia a p53 [16]. El complejo E1B/Orf6 se asocia además a un complejo de E3 ubiquitina ligasa (Cullin 5, Elongina B y C, Rbx 1), que ubiquitina a p53 y ésta es degradada por proteosoma [17-20]. Además la E1B por sí sola también puede unir a p53 en el extremo N-terminal; esta interacción cambia la afinidad de p53 por sus sitios de unión en el DNA y el complejo actúa como un represor de los genes activados por p53 [21-22]. La Orf6 se asocia también a p53, pero en el extremo C-terminal, bloqueando su actividad [23].

#### 1.6.B Inhibición de la respuesta a ruptura en DNA de doble cadena.

Ensayos con mutantes de adenovirus nulas para E4, mostraron que durante la infección se activa la respuesta a daño en dsDNA al observar la formación de concatámeros con múltiples copias del DNA viral, ligados por el mecanismo celular de unión de extremos no homólogos (NHEJ). Esta respuesta es inhibida por las proteínas tempranas de adenovirus E4 orf3 (Orf3), Orf6 y E1B. En mutantes que no expresan E4 se activan las cinasas de respuesta a daño en DNA, ATM y ATR. Estas cinasas activan a otras proteínas celulares de respuesta a daño en DNA como el complejo MRN (compuesto por Mre11, Rad50 y Nbs1). Adicionalmente, el complejo E1B/Orf6 se encarga también de la ubiquitinación de componentes del complejo MRN, Rad50 y Mre11, por la Cullin5-E3 ubiquitina ligasa descrita anteriormente [24-26].

#### 1.6.C Inhibición de la respuesta antiviral inducida por interferón.

Desde la fase temprana de la infección, Orf3 se acumula en dominios nucleares conocidos como ND10 (Nuclear Domain 10) e induce su reorganización, los cuales pasan de estructuras con forma punteada a una distribución con apariencia filamentosa tipo hebra (tracks). PML es una proteína celular de respuesta a interferón (INF) que se localiza y acumula en estos dominios y funciona como proteína de andamiaje para la localización de otros componentes de los ND10. La redistribución de los ND10 inducida en la infección se da por la interacción de la Orf3 con la isoforma II de PML y resulta en la reorganización de

otros componentes de los ND10 como Daxx, lo que produce una inhibición de la respuesta antiviral inducida por INF. Además, en tiempos tardíos, Daxx es degradada vía proteasoma de forma dependiente de E1B y cullin 5, pero independiente de Orf6 (a diferencia de p53 y Mre11).

La reorganización de los ND10 inicia también la formación de estructuras nucleares en las que se replica y transcribe el genoma viral, llamados Centros de Replicación (CR) viral, como se describirá más adelante.

### 1.7 Genes tardíos

Las proteínas tardías del virus, se requieren para la formación de progenie viral. La unidad tardía, codifica las proteínas estructurales del virus y proteínas que regulan la propia expresión de los genes tardíos. La formación eficiente de nuevos viriones, depende de la eficiencia de replicación del genoma viral y de síntesis de proteínas estructurales. A su vez, la expresión de los genes virales tardíos, requiere la maquinaria celular para su transcripción, procesamiento, exportación y traducción. A pesar de que la síntesis de mensajeros celulares no es inhibida durante la infección con adenovirus, en tiempos tardíos del ciclo de replicación, la mayor parte de las proteínas sintetizadas son virales. Esto es resultado de diferentes mecanismos que se establecen durante la fase tardía que permiten una síntesis muy eficiente de los genes virales tardíos y su selección preferencial sobre los celulares. Este proceso de expresión selectiva inicia con señales que amplifican la activación transcripcional del promotor de ML; seguido de alteraciones en la maquinaria celular de procesamiento post-transcripcional que favorecen el procesamiento adecuado de las diferentes familias de genes tardíos; y finalmente dos mecanismos que resultan en la expresión selectiva de los mensajeros virales tardíos: 1) la selección preferencial de los mRNA virales tardíos para su exportación hacia el citoplasma, y 2) su selección preferencial por la maquinaria de síntesis de proteínas. El establecimiento de cada uno de estos mecanismos involucra la interacción de proteínas virales con la maquinaria celular, comprometiendo su actividad con la síntesis de los genes virales tardíos, lo que resulta en

una producción muy eficiente de progenie viral. Tanto la replicación del genoma viral, como la síntesis de mRNAs virales tardíos y al menos el inicio del procesamiento post-transcripcional, se llevan a cabo en estructuras nucleares inducidas por la infección, llamadas Centros de Replicación (CR).

#### 1.7.A Activación de la transcripción de los genes virales tardíos.

Las cinco familias de mensajeros que codifican los genes virales tardíos (L1-L5), están organizados en una sola unidad transcripcional bajo la regulación del promotor ML. Este promotor es activado en niveles bajos por E1A desde la fase temprana del ciclo de replicación viral. Sin embargo, la transcripción es muy baja y abortiva, sólo se sintetizan algunos de los genes más cercanos al promotor (codificados en la familia de mensajeros L1). No es hasta que inicia la síntesis del DNA viral que su actividad aumenta alrededor de cien veces. El retraso en el aumento de la actividad de este promotor se debe a sus mecanismos de regulación positiva, por elementos en *cis* y en *trans*, que aseguran su actividad máxima hasta la fase tardía.

La activación en *cis* de ML, depende del inicio de la replicación del DNA viral. Se piensa que este mecanismo de activación requiere del acceso al sitio de unión en el genoma viral, el cual se expone sólo en los genomas recién sintetizados. Además de E1A, la proteína temprana IVa2 y las proteínas tardías L4-22KDa y L4-33KDa son necesarias para activar por completo la síntesis de la unidad tardía, generando en total 20 mensajeros diferentes por splicing alternativo. Inicialmente, IVa2 y L4-22/33KDa se activan en cascada, de manera dependiente de la síntesis del genoma viral, y finalmente forman un loop regulatorio positivo asegurando la activación de otros promotores en copias de genomas que están siendo sintetizados. IVa2 funciona como factor de activación transcripcional uniéndose a secuencias regulatorias río abajo de ML, aumentando su actividad. Sin embargo, la unidad transcripcional tardía mide 28 Kb de largo y para poder generar los hnRNAs de las familias más distantes al promotor (L3, L4 y L5) se requiere un aumento en la procesividad de la transcripción. Este aumento depende de las proteínas tardías L4 22/33-kDa, las cuales

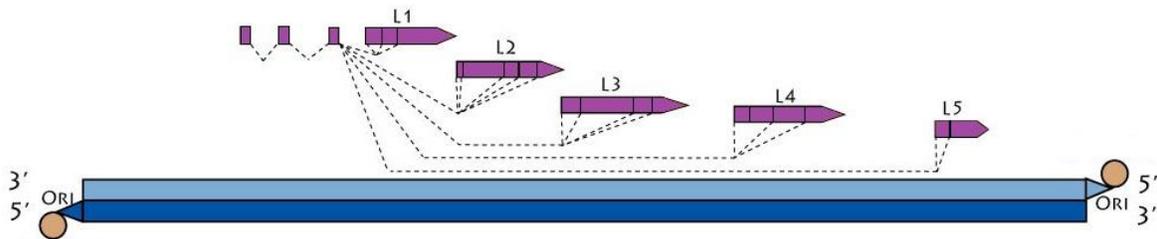
tienen un papel en el procesamiento post-transcripcional de los hnRNAs tardíos. A su vez, L4-22/33KDa están bajo la regulación de un promotor dentro de la unidad tardía, e independiente de ML, cuya activación depende de las proteínas E1A, E4 orf3 y IVa2. A esta última, se le conoce como una proteína temprana retrasada porque se transcribe después de los demás genes tempranos, en la transición a la fase tardía, debido a que está sujeta a una represión transcripcional que depende también de la replicación del genoma viral. En conjunto, todos estos mecanismos de regulación funcionan como un temporizador que activa la síntesis de genes tardíos hasta que inicia la replicación del DNA y aumenta el número de copias del genoma viral.

#### 1.7.B Procesamiento post-transcripcional

Todas las unidades de transcripción virales que son transcritas por la RNAPol II, excepto la IX y la IVa2, dan lugar a más de un producto por procesamiento de splicing alternativo. En la fase tardía se inducen cambios en la maquinaria de procesamiento post-transcripcional que favorecen la escisión de intrones cada vez más grandes, tanto en genes tempranos como en genes tardíos. Este cambio es especialmente importante para favorecer la procesividad durante la transcripción de los genes tardíos, codificados en la unidad ML (ver **Figura 4**).

Todos los mensajeros tardíos comparten un segmento de tres exones en el extremo 5' denominado líder tripartita. La síntesis de los mRNAs de cada familia depende de la procesividad de la transcripción, del intrón aceptor 3' que se une al líder tripartita durante el procesamiento post-transcripcional, así como de la selección del sitio de poli-A. Para la síntesis de las familias más alejadas al promotor, se requiere escindir fragmentos cada vez más grandes (ver **Figura 4**). Durante la fase tardía, la interacción de la proteína viral E4 orf4 con la fosfatasa celular PP2A induce la fosfatación de las proteínas SR (que son proteínas ricas en serinas y argininas, involucradas en el procesamiento por splicing) lo que resulta en un cambio en las SR disponibles, alterando los patrones de procesamiento de los hnRNA. Además, la síntesis de las proteínas tardías L4-22/33K promueve el procesamiento

por splicing en sitios específicos. Finalmente, como se describirá más adelante, durante la infección hay una reorganización de la maquinaria de procesamiento celular hacia los sitios en donde se lleva a cabo la transcripción de los mRNAs tardíos.



**Figura 4. Procesamiento post-transcripcional de ML.** Esquema de los productos de mRNA virales tardíos, resultantes del procesamiento por splicing alternativo. Los primeros tres exones corresponden al líder tripartita. (Imagen modificada de Swiss Institute of Bioinformatics. 2008).

### 1.7.C Expresión selectiva de mRNA virales tardíos

A pesar de tener estrategias para sintetizar una gran cantidad de mRNAs virales durante la fase tardía, los adenovirus tendrían que competir con los mRNAs celulares por el uso de la maquinaria de procesamiento, exportación y traducción, disminuyendo la eficiencia de formación de progenie viral. Sin embargo, el virus desarrolló dos mecanismos de selección para favorecer la síntesis de sus proteínas sobre la de las celulares: la exportación selectiva y la traducción selectiva de los mRNA virales tardíos. Como se discutió anteriormente, las proteínas E1B, Orf3 y Orf6, contrarrestan las defensas celulares permitiendo establecer las condiciones óptimas para la expresión de los genes tardíos; sin embargo, estas proteínas también son responsables de la expresión selectiva de los genes tardíos.

#### 1.7.C.1 Exportación selectiva

El mecanismo molecular responsable de la selección de los mRNA virales tardíos para ser exportados y del bloqueo de los mRNAs celulares en el núcleo aún no se conoce. Se sabe que depende de la E1B y del complejo que forma con la Orf6. Hasta ahora, se han

propuesto principalmente, dos mecanismos diferentes pero no necesariamente excluyentes, que se basan en las actividades conocidas para este complejo.

l) Tanto la E1B como la Orf6 contienen secuencias de exportación e importación nucleares (NES y NLS) por lo que son proteínas con localización nucleo-citoplasmica. La ausencia de cualquiera de las dos proteínas o mutaciones en cada una, resultan en defectos en la exportación selectiva [27]. La interacción de E1B/Orf6 es necesaria para la relocalización de E1B hacia los Centros de Replicación (CR), los cuales son fábricas virales que se forman durante la fase tardía en el núcleo; en estos sitios se localiza y replica el genoma viral, y se transcriben y procesan los mRNAs tardíos. En mutantes de adenovirus en las que se interrumpe la interacción E1B/Orf6, no se observa la relocalización hacia CR y estos virus tienen defectos en la exportación selectiva de mRNA [28-29]. Se sabe además que la E1B interacciona con una proteína celular llamada E1B-AP5 (AP5) [30]. Ésta es una ribonucleoproteína que se asocia con la maquinaria de exportación vía Tap (componente central en la exportación de mRNA en metazoarios, ver más adelante sección 2.4 ). Por lo anterior se ha propuesto que el complejo E1B/Orf6, localizado en los CR, funciona como un transportador núcleo-citoplásmico de los mRNA virales tardíos, a la vez que es responsable de inhibir la exportación de mRNA celulares [31]. Aunque se sabe que durante la infección, la secuencia del líder tripartita puede aumentar la eficiencia de exportación a citoplasma de un mRNA hasta cinco veces, esta no es responsable de la exportación selectiva mediada por E1B. Las proteínas tempranas retardadas, pIX y IVa2 no tienen la secuencia del líder tripartita y se exportan selectivamente durante la fase tardía. Además, se ha probado que cualquier secuencia insertada dentro de la unidad ML, es transcrita, procesada y exportada selectivamente durante la fase tardía. Lo único que parece ser necesario para que un mRNA celular se exporte selectivamente durante la fase tardía, es que sea transcrito durante esta fase. Esto implica que las unidades de transcripción activadas en estos tiempos, ocupan microambientes nucleares distintos, especializados en facilitar el transporte de mRNAs maduros a citoplasma. Recientemente, se encontró que la vía de exportación de genes virales tempranos, es dependiente de

CRM1 y la exportación selectiva de los mRNAs virales tardíos es dependiente de Tap. Se propone que la asociación de los mRNAs a microdominios (CR), que a su vez se forman durante la fase tardía, enriquecidos con componentes de la maquinaria de procesamiento favorece su exportación por acoplamiento entre maquinaria de procesamiento y exportación [32].

II) Por otro lado, se propone que las actividades del complejo E1B/Orf6 en la degradación de componentes celulares, junto con el complejo E3 ubiquitina ligasa, son las responsables de la exportación selectiva de mRNA. Este modelo se ha propuesto en base a experimentos en los que la ausencia de cullin5 (parte del complejo ubiquitina ligasa) resulta en una deficiencia en la exportación selectiva de mRNA tardíos. El modelo propone que el complejo E1B/Orf6/E3 ubiquitina ligasa marca para su degradación a proteínas involucradas en el procesamiento postranscripcional y/o la exportación de mRNA y que esta degradación resulta en el bloqueo de la exportación de mRNAs celulares pero no de los virales. Sin embargo, hasta ahora los sustratos que se han identificado como blanco del complejo E1B/Orf6/E3 ubiquitina ligasa son: p53, la subunidad Mre11 del complejo MRN, la DNA ligasa IV, integrina  $\alpha 3$  y la helicasa Bloom. Por otra parte, en la reciente identificación de la vía de Tap como responsable de la exportación para los mRNA tardíos, no se observó degradación de ninguno de los componentes principales de esta vía de exportación de mRNA (Yatherajam G et al. 2011). Consecuentemente, hasta ahora no hay evidencia que haya mostrado degradación de proteínas que participen en la exportación de mensajeros.

#### 1.7.C.2 Traducción selectiva de mRNA virales tardíos

La traducción eficiente de las proteínas virales, depende de una selección preferencial de los mensajeros virales sobre los mensajeros celulares para utilizar la maquinaria de traducción celular. Esta selección depende de dos mecanismos: 1) La fosfatización de la subunidad eIF4E del complejo RNA helicasa-Cap dependiente, eIF4F y la fosforilación del

factor eIF2 $\alpha$  por PKR. Ambos eventos resultan en una inhibición de la traducción dependiente de Cap de los mensajeros celulares. Sin embargo, aunque los mensajeros tardíos de adenovirus también tienen Cap, poseen una secuencia tripartita de 201 nucleótidos que promueve la traducción por el mecanismo de *ribosome shunting* que permite al ribosoma pasar por alto la región 5' no traducida y llegar al codón de inicio [33]. Este mecanismo es favorecido por la proteína viral L4-100 kDa [34]. 2) Otro mecanismo que favorece la traducción de los mensajeros virales es la síntesis de RNA-VA I. Estos RNAs pequeños parecen inhibir la activación de PKR en sitios donde se encuentran los mensajeros virales acumulados. Se ha propuesto que un gradiente de dsRNA que se forma alrededor de los mRNAs virales, inhibe a PKR ([35]y revisado en [1]).

Algunas evidencias sugieren que además de su papel en la exportación selectiva de mRNA, la E1B podría estar involucrada en la traducción selectiva: 1) Células infectadas con un mutante nulo para E1B, además de mostrar una exportación selectiva deficiente, muestra un defecto mucho mayor en la producción de las proteínas tardías, que no correlaciona con el efecto de la disminución de los mRNAs virales tardíos en citoplasma. 2) Se ha visto que en la infección con mutantes nulas de E1B el factor eIF4E permanece fosforilado, por lo que se propone un papel directo de E1B en la traducción. 3) Análisis proteómicos han mostrado la asociación de la E1B con la maquinaria de traducción.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Proteínas con funciones asociadas a la expresión génica se encuentran organizadas en dominios nucleares.

El núcleo, como bien se sabe, es el organelo celular en el cual se encuentra almacenada la maquinaria celular involucrada en la expresión génica. Como se describió anteriormente, después de los procesos de entrada y desencapsidación, el genoma de los adenovirus es

transportado hacia este organelo, en donde puede acceder la maquinaria que requiere para su replicación y síntesis de mensajeros virales. Un concepto menos difundido, es la compartimentalización u organización nuclear; éste se refiere a la organización de la maquinaria nuclear en regiones especializadas conocidas como organelos nucleares. Estos se forman y mantienen en ausencia de membranas. Esta organización permite la separación de proteínas por funciones, facilitando su regulación y reclutamiento a los sitios donde se requieren. Algunos de los dominios mejor conocidos y más estudiados son: el nucleolo, los Cuerpos de Cajal (CB), los gránulos de intercromatina (IG) o “speckels” y los Cuerpos de PML (o ND10, Nuclear Domain 10). Entre organelos, existe un flujo dinámico de componentes, al igual que existe un flujo entre organelos y el nucleoplasma [36-38]. Durante la infección con Ad, la desregulación de estos organelos para el reclutamiento de sus componentes hacia los sitios de replicación virales son procesos poco entendidos hasta ahora. A continuación, se hace una breve descripción de los organelos, sus funciones mejor conocidas, así como los eventos de reorganización conocidos, durante la infección con Ad.

#### 2.1.A Nucleolo

Es el dominio más notable en el núcleo, mide entre 0.5-5  $\mu\text{m}$  de diámetro y se pueden encontrar de 1-4 nucleolos en células de mamífero (ver **Figura 5**). Se divide en tres regiones morfológicamente y funcionalmente distintas: 1) Los centros fibrilares (FC), donde se encuentran los *loci* de los distintos cromosomas que contienen los genes que codifican a los rRNA, arreglados en tándem, llamados regiones organizadoras nucleares (NOR). 2) El componente fibrilar denso (DFC), región en donde se encuentran los genes de los rRNA que se transcriben activamente y los rRNA recién transcritos. 3) El componente granular (GC), región en la que se llevan a cabo los eventos de procesamiento tardío de la biogénesis de los rRNAs. Estudios con células HeLa utilizando espectroscopía de masas, han permitido conocer el contenido proteómico del nucléolo, el cual asciende a aproximadamente cuatrocientas proteínas diferentes, de las cuales el 30% son proteínas

no caracterizadas. El resto de las proteínas se puede asociar a las funciones que se sabe que son reguladas en el nucleolo, como la biogénesis de ribosomas, metabolismo de mRNAs, regulación del ciclo celular, plegamiento de proteínas y procesamiento de micro RNAs [38]. Además de estas funciones, se propone que el nucleolo puede funcionar como sitio de almacenamiento o reservorio de proteínas celulares, en donde son retenidas como una forma de regular su función, evitando así que interactúen con sus blancos. Un ejemplo, es la proteína MDM2 que se asocia con el supresor tumoral ARF, una proteína de nucleolo, evitando así la degradación de p53 vía MDM2 (revisado en [38-39]).

### 2.1.B Cuerpos de Cajal

Se describieron por primera vez en 1903 por Ramon y Cajal, y posteriormente se les llamó “Coiled Bodies” (CB). Miden entre 0.5-2  $\mu\text{m}$  de diámetro y en un núcleo puede haber de 0-10 dependiendo del estado de proliferación (ver **Figura 5**), las células primarias o derivadas de tejidos pueden tener muy pocos o pueden no tener ninguno. Son estructuras muy dinámicas que suelen dividirse. Frecuentemente se encuentran cerca del nucleolo y se ha visto una asociación preferencial con los *loci* de genes de histona y los clusters de los genes U1, U2, U4, U11 y U12. Los CB se caracterizan por tener una gran concentración de la proteína p80 (coilina) y están asociados a la biogénesis de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs) y del tráfico de snRNPs y de ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares (snoRNPs) hacia speckles y nucleolo respectivamente. Contienen los snRNPs del spliceosoma (U1, U2, U3, U4/U6 y U5), el snRNP U7 encargado del procesamiento 3' de la histona H1 y a las snoRNPs U3 y U8 encargadas del procesamiento de pre-rRNAs [36].

### 2.1.C Speckles o Gránulos de Intercromatina

Fueron descubiertos por primera vez en 1961 por Swanson Beck quien observó, por inmunotinciones y microscopía óptica, dominios (1-1.5 $\mu\text{m}$  de diámetro) con una distribución punteada en el núcleo, a los que llamó speckles. Tiempo después se

esclareció, que eran las mismas estructuras observadas dos años antes por Hewson Swiff por ensayos de microscopía electrónica, nombradas gránulos de intercromatina (IGs). Lo que Swiff observó a escala de microscopía electrónica, fue la asociación de clusters de gránulos (de ~20-25nm) conectados por fibras cortas, además, descubrió que contenían RNA. Los IGs se caracterizan por el enriquecimiento en el factor SC-35, que es una proteína rica en serina-arginina (SR). Ensayos de proteómica, han encontrado ~146 proteínas distintas asociadas a procesamiento de pre-RNAs, exportación de mRNAs, transcripción, procesamiento y adición de poliA, subunidades de RNA pol II y proteínas de asociación a RNA. Se ha visto que el dominio SR, presente en proteínas de procesamiento post-transcripcional, es suficiente para la localización de proteínas hacia los IGs. No obstante, se sabe que ni el procesamiento de pre-mRNAs, ni la transcripción se llevan a cabo en estos dominios. Los IGs son los sitios en donde se da el ensamblaje, la modificación y el almacenamiento de los factores de splicing. Sin embargo, sí se ha observado que hay un flujo muy dinámico, tanto de sus componentes proteicos como de RNA, hacia los sitios donde hay transcripción activa (fibras de pericromatina). Además, cambios en su composición y distribución nuclear, responden a cambios en la transcripción y en el estado de fosforilación de sus componentes. Se cree que su papel principal es acoplar eficientemente la transcripción y el procesamiento post-transcripcional (revisado en [40-42]).

#### 2.1.D Cuerpos de PML (ND10)

Los cuerpos de PML, también llamados ND10 o PODs (PML Oncogenic Domains), son pequeños dominios esféricos (~0.1- 1µm de diámetro) que se definen por la presencia de la proteína PML (Promyelocytic leukemia protein) (ver **Figura 5**). Se observan alrededor de 5-15 dominios por núcleo y se encuentran asociados a la matriz nuclear. Tienden a estar cerca de otros dominios como CB y speckles, sin colocalizar con ellos. Hasta ahora se conocen alrededor de 100 proteínas que se asocian a estos dominios; algunas de las más estudiadas son Sp100, SUMO1, HAUSP, Daxx, el complejo MRN, p53, pRb, CBP y eIF4E. A

diferencia de otros dominios, como los mencionados anteriormente, los ND10 están involucrados en varios procesos diferentes como regulación transcripcional, replicación de DNA, apoptosis, senescencia, reparación de DNA y mecanismos de resistencia contra infecciones virales [43]. Algunos de los componentes de los ND10 son enzimas encargadas de modificaciones post-traduccionales tales como: acetilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación. Se piensa que la regulación de mecanismos tan diferentes, asociada a estos dominios, se facilita por el reclutamiento de enzimas y sus blancos en estos sitios. A su vez, PML, el componente mayoritario de los ND10, es modificado post-traduccionamente por sumoilación, forma interacciones proteína-proteína entre ella misma y otras proteínas sumoiladas. Se propone que por la asociación de PML consigo misma, forma la estructura esférica de estos dominios y funciona como la proteína de anclaje reclutando componentes hacia el interior de los ND10.

Para al menos tres familias de virus con genoma de DNA (poliomavirus, como SV-40; herpes virus, como HSV-1 y los adenovirus, Ad5), el DNA viral se asocia a la periferia de los ND10 en la fase temprana de la infección (revisado en [36, 43-44]).



**Figura 5. Distribución de organelos subnucleares en el núcleo.** Imágenes de inmunofluorescencia, mostrando núcleos de células marcadas con anticuerpos que reconocen proteínas específicas de diferentes dominios nucleares: nucléolo en rojo a la izquierda, cuerpos de PML o ND10 en verde en el centro y CB en rojo a la derecha [39].

## 2.2 Reorganización del núcleo y formación de los CR.

En la infección con Ad, la reorganización nuclear comienza desde la fase temprana del ciclo de replicación del virus. Inicialmente, ocurre la interacción de proteínas virales con componentes de los ND10. Posteriormente, durante la transición a la fase tardía, inicia la formación de los CR virales adyacente a estos organelos nucleares. Conforme el ciclo de infección avanza, gran parte de la maquinaria celular, organizada en los dominios nucleares, es relocalizada hacia los CR.

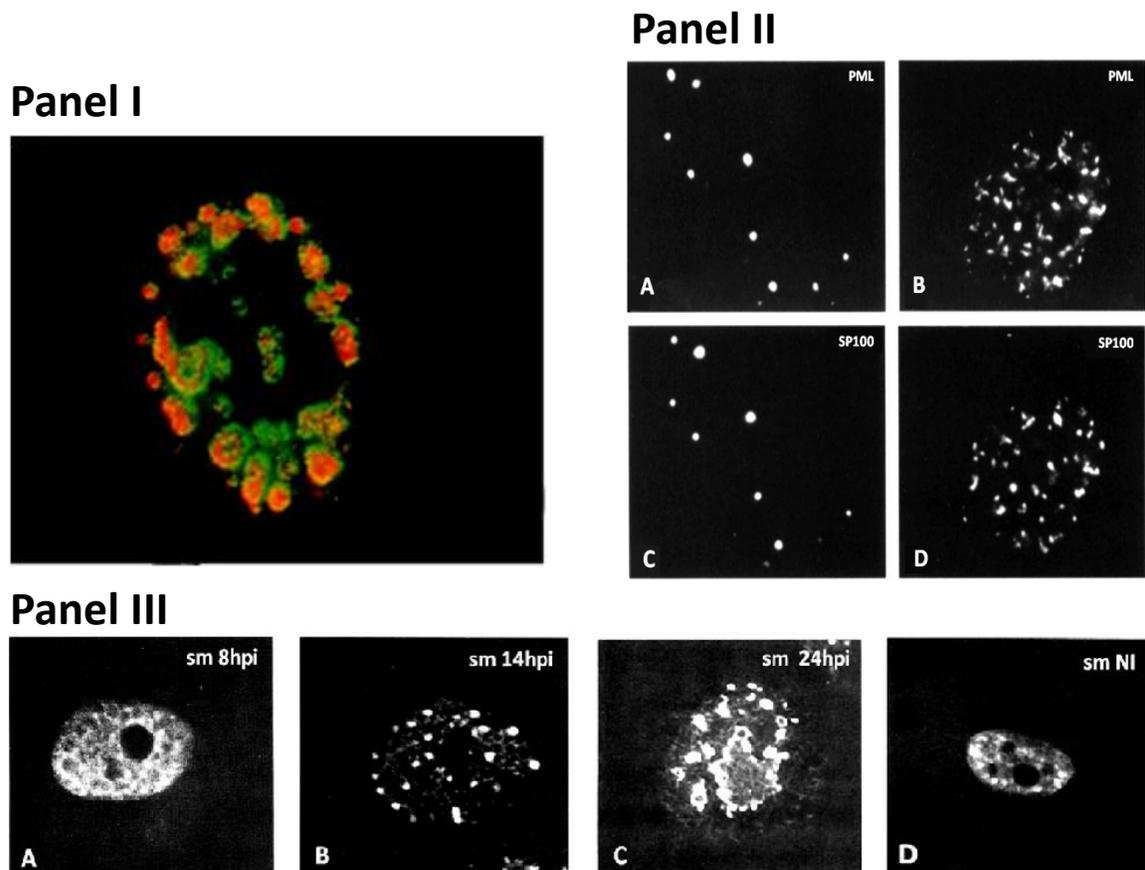
### 2.2.A Reorganización de Cuerpos de PML (ND10).

Posterior a la entrada del genoma viral al núcleo, éste se localiza en la periferia de los ND10. Al igual, durante la fase temprana del ciclo de replicación, las proteínas virales tempranas E1A y Orf3 son reclutadas hacia estos sitios. La interacción de Orf3 con PML induce la reorganización de los ND10, de estructuras esféricas regulares, a estructuras con una morfología alargada (tipo hebras) llamadas “tracks” (**Figura 4**, panel II A y B) [44]. Posteriormente, E1B y Orf6 son reclutadas a sitios adyacentes a los “tracks” de PML, colocalizando en puntos. Estos, son los sitios que darán lugar a estructuras electrodensas denominadas Centros de Replicación (CR) (**Figura 6**, panel I). Se propone que la asociación de la proteína viral E1B con Orf3, la recluta hacia los tracks de PML y la interacción posterior de Orf6 con la E1B, desplaza a Orf3. Estas interacciones resultan en la relocalización de componentes de los ND10 hacia los CR, que se formarán en la transición a la fase tardía. Aunque no todos los componentes de los ND10 son relocalizadas hacia los CR (PML y SP100, componentes mayoritarios de ND10, se mantienen en “tracks”), sí se reclutan moléculas involucradas en la regulación transcripcional, la reparación de DNA y la apoptosis, entre otras.

### 2.2.B Reorganización de Cuerpos de Cajal y Gránulos de Intercromatina.

Los Cuerpos de Cajal (CB) y los clusters de gránulos de intercromatina (IGs), también sufren una reorganización durante la infección. Como se describió anteriormente, estos

organelos subnucleares contienen la maquinaria de procesamiento postranscripcional (snRNPs) [45]. La reorganización ocurre desde tiempos tempranos, y es más notoria en la fase tardía durante la expresión de los genes virales tardíos (**Figura 6**, panel III). Análisis por microscopía de inmunofluorescencia muestran la acumulación de la maquinaria de procesamiento de mRNAs (snRNPs), en los sitios donde hay transcripción de genes virales [46]. Conforme avanza la fase tardía de la infección los cuerpos de Cajal se desintegran en micro *foci*, marcados con p80 (coilina) [47]. Sin embargo, la mayoría de los snRNPs de los CB, se acumulan en los clusters de IGs, los cuales se agrandan y reorganizan formando una especie de coraza alrededor de los CR (**Figura 6**, panel III C; y**Figura 7**) [45, 48].



**Figura 6. Formación de CR y reorganización de estructuras nucleares.** Panel I) Centros de replicación viral. Inmunofluorescencia de células HeLa infectadas con Ad a 20 horas post-infección (hpi). En rojo se muestra la proteína DBP y en verde, marcado con dUTP, los sitios de síntesis de RNA viral. Imagen modificada de Pombo, et al., 1994. Panel II) Reorganización de los cuerpos de PML o ND10. En A y C, se muestran micrografías de inmunofluorescencia de células no infectadas para las proteínas PML y Sp100, ambas

componentes abundantes de los ND10. En B y D se muestra la reorganización de las proteínas PML y Sp100 a las 8 hpi. Imágenes modificadas de Carvalho, et al., 1995. Panel III) Reorganización de clusters de gránulos de intercromatina y Cuerpos de Cajal. Inmunofluorescencia para snRNPs. D, se muestra la organización de las snRNPs en clusters de gránulos de intercromatina y Cuerpos de Cajal en células no infectadas. A-C, se muestra la reorganización de estas estructuras a diferentes tiempos post-infección. Imágenes modificadas de Bridge, et al., 1993.

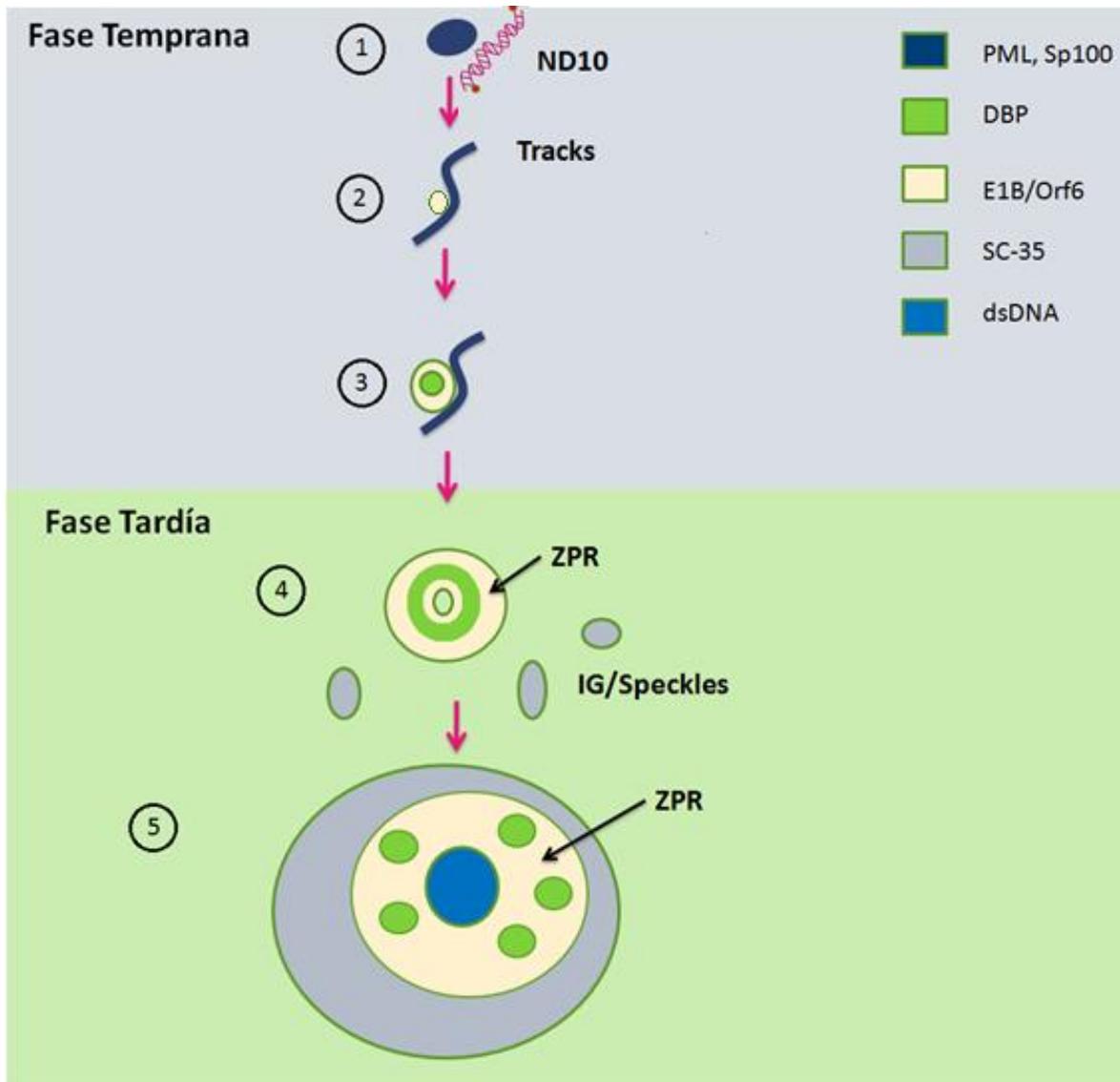
### 2.3 Organización de los Centros de replicación.

Los CR son estructuras formadas durante la infección con Ad5 que resultan de la reorganización y el reclutamiento de proteínas virales y celulares. Estos son los sitios donde se lleva a cabo la replicación del genoma viral, la transcripción de los mRNA virales tardíos, y el inicio de su procesamiento postranscripcional. Para los procesos que se llevan a cabo en los CR se requiere de la maquinaria celular, que como se describió anteriormente, se localiza en dominios nucleares que son reorganizados durante la infección.

Análisis por microscopía de fluorescencia han mostrado que los CR, se caracterizan por la presencia de la proteína viral de unión a ssDNA (DBP). Esta proteína participa durante la replicación del genoma viral; su afinidad por las cadenas sencillas de DNA es tan alta que su interacción resulta en la apertura de la doble hélice [49-50]. Al inicio de la formación de los CR, se observa la acumulación de DBP y E1B, en estructuras con forma punteada, adyacentes a los “tracks” de PML (**Figura 7; 3**). El tamaño de estas estructuras aumenta por la acumulación de DBP, E1B y otros componentes de los ND10 como p53, Daxx, ATR, ATM y MRN. Conforme avanza la infección, DBP y E1B adquieren una distribución de puntos a estructuras con forma de anillos (**Figura 6**, panel I; y **Figura 7**, 4).

Los análisis hechos por microscopía electrónica han permitido observar la organización de los CR con mayor detalle. En el centro de estos sitios, se observa una estructura densa en donde se acumula el dsDNA viral que no está siendo transcrito. Alrededor de esta estructura se encuentra una red fibro-granular, llamada zona periférica de replicación

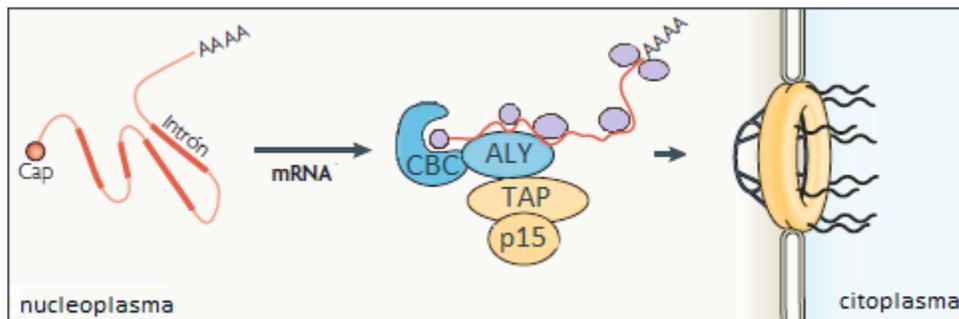
(ZPR), en la que se encuentran embebidos sitios de acumulación de ssDNA. Se le denomina ZPR, por ser el sitio en dónde se lleva a cabo la transcripción y la replicación. Además, los sitios de acumulación de DBP y E1B, corresponden a la ZPR [44, 49]. Sin embargo, se ha mostrado que la transcripción y la replicación del genoma, ocurren en regiones distintas pero adyacentes dentro de la ZPR de los CR. Alrededor de esta zona se acumulan los clusters de IGs, donde se localiza la maquinaria de splicing (snRNPs, proteínas SR, complejos de unión entre exones, entre otros) y se encuentran los mRNA poliadenilados. Por lo anterior, se sugiere que los clusters de IG reclutados, son los sitios donde ocurre al menos el inicio del procesamiento postranscripcional de los mRNA virales tardíos (**Figura 7, 5**) [48, 51-52].



**Figura 7. Esquema representando la reorganización de estructuras nucleares y formación de los CR.** 1) Inicialmente, el genoma viral se localiza adyacente a los ND10. 2) Desde la fase temprana de la replicación viral, la proteína Orf3 induce la reorganización de los ND10 (hacia estructuras llamadas tracks), mediante su interacción con PML. 3) E1B es reclutada hacia los tracks, por su interacción con Orf3. Inicia la nucleación de los CR como estructuras punteadas donde DBP y componentes de los ND10 son reclutados. 4) Aumenta el número de componentes reclutados hacia los CR. Estos aumentan en tamaño y se forman los anillos característicos de DBP y E1B. Inicia la reorganización de CB e IGs. 5) Los CR aumentan en tamaño y componentes de CB e IGs se relocalizan hacia la periferia de estas estructuras.

## 2.4 Procesamiento post-transcripcional y exportación de mRNAs virales tardíos, actividades potencialmente asociadas a los CR.

Se sabe que en la célula no infectada, la maquinaria de procesamiento (splicing) de pre-mRNA y la maquinaria de exportación de mRNA, se asocian físicamente al mRNA durante el procesamiento por splicing (ver **Figura 8**). Por lo tanto, la selección para exportación de los mRNAs celulares, se da durante el evento de síntesis y procesamiento, resultando en la formación de mRNPs (el mRNA asociado a la maquinaria postranscripcional), que son seleccionados por la maquinaria de exportación. Esta selección depende directamente de la asociación del factor de exportación, Aly, con la proteína de la maquinaria de splicing UAP56. Posteriormente, Aly forma un complejo con las proteínas Tap y p15. El complejo Aly/Tap/p15 se asocia directamente al complejo del poro nuclear y media la exportación de los mRNP maduros completamente procesados (revisado en [53]).



**Figura 8.** Esquema representando el acoplamiento de la maquinaria de exportación con la del procesamiento postranscripcional. Del lado izquierdo se muestra el hnRNA, en medio, se muestra el mensajero maduro y procesado asociado aún a la maquinaria de procesamiento (mRNP), representada con círculos morados. Los óvalos azules representan a las proteínas adaptadoras (CBC y ALY) y los óvalos amarillos representan a los receptores para exportación (TAP y p15). Del lado derecho se representa el Complejo de poro nuclear, insertado en la membrana nuclear. (Imagen tomada y modificada de Hurt y Köhler, 2007)

Como se describió anteriormente, todos los mensajeros virales tardíos son procesados por splicing. Además, la exportación selectiva depende del complejo E1B/Orf6, pero no requiere de alguna secuencia consenso. El único factor asociado a la selectividad en la

exportación durante la fase tardía, es que la transcripción se lleve a cabo durante esta fase (ver sección 1.7.C.1 ). Esto implica que las unidades de transcripción activadas en estos tiempos, ocupan microambientes nucleares distintos, especializados en facilitar el transporte de mRNAs maduros a citoplasma. Recientemente, se encontró que la exportación selectiva durante la fase tardía se lleva a cabo por la vía de Tap, que es el exportador general de mRNAs celulares. La E1B se asocia a una proteína celular de la familia de las hnRNP, llamada E1B-AP5 (AP5), que a su vez interacciona con Tap. La interacción de la E1B con AP5 parece favorecer la exportación de los mRNA virales tardíos [30]. Se sabe también, que los mensajeros virales tardíos son transcritos en los CR y que el inicio del procesamiento postranscripcional ocurre en estos sitios. La reorganización de la maquinaria de splicing hacia los CR en la fase tardía, refleja el requerimiento de las moléculas encargadas de procesar una gran cantidad de mensajeros virales tardíos. La ausencia de la maquinaria de procesamiento en los sitios de transcripción celulares, debida a su relocalización hacia los CR, resultaría en la selección de los mRNAs virales para su exportación y no la de los mRNA celulares. Por lo tanto, la exportación selectiva de los mensajeros virales tardíos, es favorecida por la relocalización de la maquinaria celular de procesamiento postranscripcional hacia los CR.

## 2.5 Actividades de E1B asociadas a los CR.

La E1B es una proteína multifuncional, que como se describió anteriormente, es responsable de inhibir la respuesta celular a la infección y de favorecer la replicación y expresión del genoma viral. La importancia de sus actividades durante la infección la han convertido en un blanco predilecto en el diseño de adenovirus recombinantes dirigidos a terapia oncolítica. Sin embargo, las bases moleculares de la selectividad de estos virus en la infección de células sanas versus transformadas no se han esclarecido. Aunque la proteína E1B está implicada en funciones muy diferentes, recientemente se está

esclareciendo que un factor en común parece ser su regulación en los CR, sitios donde se localiza durante la fase tardía.

E1B participa en la inhibición de defensas celulares junto con productos codificados en E4, utilizando principalmente dos estrategias: la relocalización y la degradación de componentes celulares (ver sección 1.6. Desde la fase temprana, Orf3, E1B y Orf6, subsecuentemente son reclutados hacia los ND10, resultando en la reorganización de este dominio y en la relocalización de sus componentes, los cuales están implicados en la respuesta viral de interferón (Daxx) y en la reparación a daño en dsDNA (complejo MRN, ATR). Además, E1B y Orf6 unen individualmente a p53, inhibiendo sus funciones pro-apoptóticas. En complejo (E1B-Orf6), se asocian al complejo celular E3 ubiquitin ligasa, seleccionando sustratos para poliubiquitinación, una señal para su degradación vía proteosoma. Esta actividad de E1B se asocia a la degradación de componentes celulares específicos, como p53 y el complejo MRN, la cual se determinó utilizando células transformadas [54]. Se propuso que esta actividad ocurre en cuerpos citoplásmicos perinucleares llamados agresomas [55]. Estos sólo han sido observados por algunos grupos en células transformadas y no se han encontrado en células primarias. Además, en células no transformadas, no se observa la degradación de p53 y los componentes de MRN ([56] y experimentos no publicados). De forma contraria, p53 aumenta durante la fase tardía pero no resulta en activación de apoptosis [56]. Experimentos de nuestro laboratorio, con células no transformadas (HFF), muestran que p53 y MRN son relocalizadas hacia CR, de forma dependiente de E1B. Estos resultados reflejan el papel de E1B en la inhibición de las defensas celulares, por redistribución de componentes hacia los CR. Las diferencias que se observan entre células transformadas y no transformadas pueden ser un reflejo de la desregulación en el ciclo celular y mecanismos apoptóticos que presentan las células transformadas. Estudiar a los Ad en el contexto de células no transformadas, nos permite observar los mecanismos que el virus desarrolla durante la infección, para contrarrestar los mecanismos celulares (no alterados) con los que se va enfrentando a lo largo del ciclo de replicación viral.

Además de inhibir las defensas celulares, E1B se requiere para la transición eficiente hacia la fase tardía, la replicación eficiente del genoma viral y la exportación selectiva de los mensajeros virales tardíos [27]. En ensayos con mutantes nulas de E1B, tanto en células transformadas como en células primarias, se observan defectos en la replicación del DNA viral y en la exportación selectiva de los mRNAs virales tardíos [31, 57]. Mutantes que impiden la interacción E1B-orf6, han mostrado que ésta es necesaria para la localización de E1B hacia los CR y también para el establecimiento de la exportación selectiva de los mRNAs virales tardíos. Por lo tanto, inicialmente se propuso que el complejo E1B-orf6 actuaba como el transportador de mRNA hacia citoplasma en la fase tardía, favoreciendo la exportación de los virales y no de los celulares (revisado en [58]). Posteriormente, se observó que utilizando células transformadas con mutaciones dominantes negativas para una subunidad del complejo E3 ubiquitin ligasa (cullin 5), Ad tiene defectos en la exportación selectiva. Por lo anterior, se propuso otro modelo en el que el complejo E1B-orf6-E3ubiquitin ligasa participa en la degradación de componentes celulares involucrados en la exportación de mRNAs, suprimiendo la exportación de los mensajeros celulares y favoreciendo la exportación de los mensajeros virales [19]. Recientemente se demostró que la vía de exportación de los mensajeros virales, durante la fase tardía, se lleva a cabo por la vía de Tap, pero no se encontró degradación en los componentes de ésta vía durante la infección[59]. El determinante primario de la exportación selectiva, mediada por E1B, parece ser que la transcripción ocurra durante la fase tardía (ver sección 1.7.C.1). Esto implica que las unidades de transcripción activadas en estos tiempos, ocupan microambientes nucleares distintos, especializados en facilitar el transporte de mRNAs maduros a citoplasma. El alto número de mRNAs virales, que se sintetizan y procesan en los CR durante la fase tardía, requiere del reclutamiento de gran parte de la maquinaria de procesamiento de mRNAs (ver sección 2.4 . Ensayos de microscopía fluorescente y electrónica, muestran que durante la fase tardía, los speckles y Cuerpos de Cajal son redistribuidos, y varios de sus componentes, involucrados en el procesamiento por splicing, son reclutados hacia la periferia de los CR (**Figura 6**, panel III). Por otro lado,

ensayos con fracciones nucleares mostraron la dinámica de acumulación y flujo de los mRNAs tardíos, en ausencia de E1B funcional, observaron que los mRNAs virales tardíos se acumulan en un paso anterior a matriz nuclear [29]. Esto sugiere que la función de E1B se requiere en un paso anterior a la exportación. Resultados no publicados de nuestro laboratorio en células primarias y transformadas, muestran que la E1B es necesaria para la formación eficiente de los CR. Por lo anterior, proponemos que la E1B tiene un papel en el reclutamiento de componentes hacia los CR, en donde se seleccionan los mRNAs virales para su exportación, al favorecer su procesamiento postranscripcional y el acoplamiento con la maquinaria de exportación [32].

Queda claro que la E1B, participa en la regulación de diversas proteínas reclutándolas hacia los CR y tiene un papel en la formación eficiente de estos sitios, por lo tanto, un efecto en los procesos que ahí se regulan, tales como la replicación eficiente del DNA y la exportación selectiva de los mRNAs tardíos. La actividad multifuncional de la E1B, está ligada a su asociación con una gran cantidad de proteínas [60]. Sin embargo, aún no se entiende por completo cómo se regulan estas interacciones, y por lo tanto, cómo se regulan sus actividades a lo largo del ciclo de replicación viral. La E1B tiene sitios para fosforilación (por CDK1 y CDK2) y sitios para sumoilación. Se ha reportado que la sumoilación de E1B favorece su asociación a CR [61]. E1B, a su vez, puede sumoilar a p53 y potencialmente a Mre11 ([62] y comunicación personal con T. Dobner). En ausencia de sumoilación, E1B se asocia a la E3 ubiquitin ligasa (cullin5). Lo anterior refleja, cómo las actividades de E1B pueden definirse por sus modificaciones post-traduccionales.

Es evidente que el ensamblaje organizado de los CR y la reorganización de componentes del núcleo podrían ser determinantes para la inhibición de defensas celulares y la replicación eficiente del virus. Consecuentemente, el estudio de la dinámica de formación de los CR y los componentes moleculares asociados a estas estructuras, permitirá entender el nexo entre su formación y las funciones asociadas a E1B.

### 3. HIPOTESIS

La proteína E1B 55 kDa es necesaria para el reclutamiento de componentes de los CR que resulta en la expresión eficiente de los genes virales tardíos.

### 4. OBJETIVO

Analizar la dinámica de formación de los CR en células HFF infectadas con Ad5.

Objetivos particulares

- Analizar la distribución intracelular de mRNAs virales tardíos de Ad5 (L2), por FISH.
  - 1) Diseñar sondas específicas para los mRNAs de L2 de adenovirus y los de  $\beta$ -actina, en su forma procesada y no procesada, y para el mRNA de Hsp70.
  - 2) Montar condiciones para ensayo de hibridación *in situ* fluorescente (FISH).
- Analizar la distribución de componentes proteicos de los CR a diferentes tiempos a lo largo del ciclo de replicación viral por inmunofluorescencia (IF).
- Aislamiento de los CR por medio de fraccionamiento celular.
- Análisis proteico de los CR, por Western Blot (WB).

### 5. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

Para obtener información sobre la dinámica de formación de los CR y su composición, se utilizaron dos enfoques experimentales, uno visual y el otro bioquímico. Todo el análisis se realizó en células no transformadas, HFF (Human Foreskin Fibroblast), que son fibroblastos derivados de prepucio humano, infectadas con Ad5 (WT) y con una mutante nula para E1B (Hr6).

1) Enfoque Visual. Células HFF infectadas con Ad5 WT y la mutante nula para la proteína E1B, Hr6, a distintos tiempos a lo largo del ciclo de replicación, se analizaron por IF para

determinar la distribución de moléculas virales y celulares que funcionan como marcadores de los diferentes tipos de moléculas que son reclutadas a los CR para la replicación del genoma viral y para el procesamiento postranscripcional de los mRNA virales tardíos. Las proteínas virales DBP y E1B se usaron como marcadores de CR y la proteína celular SC-35 de gránulos de intercromatina. Además los ensayos de IF se combinaron con ensayos de FISH para analizar la distribución de mRNAs virales tardíos (L2) y mRNA celulares, procesados y no procesados.

2) Enfoque Bioquímico. Por medio de fraccionamiento subcelular y gradientes de velocidad, se aislaron fracciones enriquecidas con los CR, a partir de células HFF infectadas en las mismas condiciones que los ensayos de IF. Las fracciones enriquecidas con los CR se analizaron por WB con los mismos marcadores usados para los ensayos de IF.

Para observar la progresión en la formación de los CR, los tiempos post-infección utilizados fueron las: 24, 28 y 36 horas post-infección (hpi). Estos tiempos permiten analizar la organización y composición de los CR desde el inicio de la fase tardía y en la progresión hacia una etapa tardía avanzada de la infección, correspondiendo las 24 hpi al inicio de la replicación del DNA viral en células HFF.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Células y virus.

*Cultivo de Células.* Todos los ensayos se realizaron con fibroblastos derivados de prepucio humano (HFF, Human Foreskin Fibroblasts) de pase 13 o 14 y se usaron a una confluencia de entre 80%-90%. Las células HFF se crecieron como monocapa en medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) adicionado con 10% (v/v) suero bovino fetal (FCS). Las células 293, células embrionarias de riñón humano transformadas con la región E1 de Ad, se utilizaron para la amplificación del mutante de Ad, Hr6. Se mantuvieron en cultivo

como una monocapa y se cultivaron con medio DMEM adicionado con 5% (v/v) de suero bovino y 5% (v/v) de FCS. Todas las células se crecieron con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

*Infección de HFF.* Las células HFF se infectaron con Ad5 WT, o con el mutante Hr6 (Harrison et al. 1977). Los ensayos con HFF infectadas se realizaron a las 24, 28 y 36 hpi. Las infecciones con Ad5 WT, se realizaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 30 unidades formadoras de placas (PFU) por célula. Las infecciones con el mutante Hr6 se hicieron a una MOI de 30 PFU/célula. El virus se adsorbió durante 1 hr, a 37 °C, durante la cual, las cajas con los cultivos se agitan suavemente cada 10-15 min para asegurar una distribución homogénea del inóculo, se retiró el inóculo y se adicionó DMEM/10% FCS; las células se mantuvieron a 37 °C el tiempo post-infección requerido.

## 6.2 Ensayos de Inmunofluorescencia.

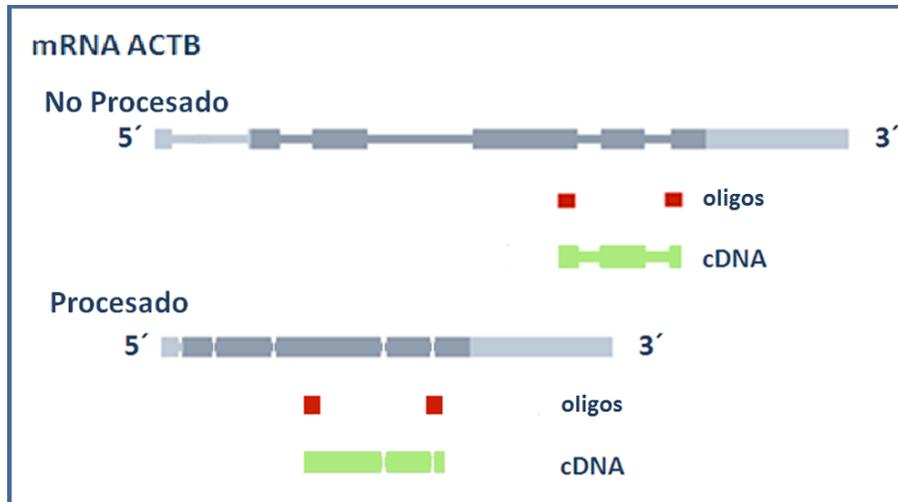
*Inmunofluorescencia con cultivos celulares.* Las células HFF se crecieron en cajas de doce pozos sobre cubreobjetos (previamente esterilizados por autoclave y lavados con ácido acético glacial (100%) y metanol (100%). Se retiró el medio de los pozos y las células se lavaron 1X con 2 ml/pozo de PBS 1X durante 5 min en agitación suave. Las células se fijaron con 500 µl de formaldehído 3.7% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. El formaldehído se lavó 3X con PBS 1X (igual que el lavado anterior). Las células se permeabilizaron con 500 µl de PBS/Tritón X-100 0.5% durante 5 min a temperatura ambiente con agitación suave. El detergente se lavó 3X con PBS 1X y se adicionaron 50 µl con los anticuerpos primarios a la dilución que se indica en cada caso. El anticuerpo primario se incubó durante 4 hrs a 4 °C y después se lavó 3X con PBS 1X. El anticuerpo secundario se incubó durante 2 hrs a 4 °C y después se lavó 2X con PBS 1X. En los casos donde se incluyó DAPI (10 µg/ml, se utilizó a una dilución 1:10,000) y se lavó 2X con PBS 1X. Para analizar las muestras, los cubreobjetos se montaron sobre PBS/10% glicerol en portaobjetos y se sellaron con barniz. Las muestras se mantuvieron a -20 °C hasta ser analizadas utilizando un microscopio de fluorescencia (Axiovert 200M, Carl Zeiss Inc.), con un objetivo 63X y el sistema ApoTome (Carl Zeiss Inc.).

### 6.3 Diseño de oligos y sondas para FISH.

*Diseño de oligos para FISH.* Los primers con uniones intrón-exón o exón-exón, se diseñaron en base a las secuencias de cada gen, variando las longitudes para obtener una  $T_m$  y especificidad óptima. Para el análisis y evaluación de los oligos se utilizó el programa Primer-Blast de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Como parámetro, se solicitaron pares de oligos que dieran un producto entre 400-500pb aprox., para tener una eficiencia óptima en el ensayo de hibridación *in situ*. A partir de la lista de pares de oligos arrojados por el programa, se escogieron los que no dieran productos secundarios inespecíficos o que estos fueran menos favorecidos que el específico. Para el diseño de cada par de oligos se usaron las secuencias indicadas en la **Tabla I**. Las secuencias, de cada par de oligos y sus especificaciones se describen en la **Tabla II**

#### 6.3.A $\beta$ -actina (ACTB)

El gen de beta actina (ACTB) de *Homo sapiens*, de 1,852 pb, contiene cinco intrones y seis exones. La sonda generada, correspondiente al mRNA no procesado, abarca la totalidad del intrón 4, el exón 5 y el intrón 5 y mide 498 pb, que debe de hibridar exclusivamente con el transcrito en el que los intrones correspondientes no han sido procesados. Para el mRNA procesado, se generó una sonda de 510pb que abarca gran parte del exón 4, todo el exón 5 y la unión entre el exón 5 y el exón 6, esta sonda sólo debe hibridar específicamente con los mRNAs en los que los intrones han sido removidos.

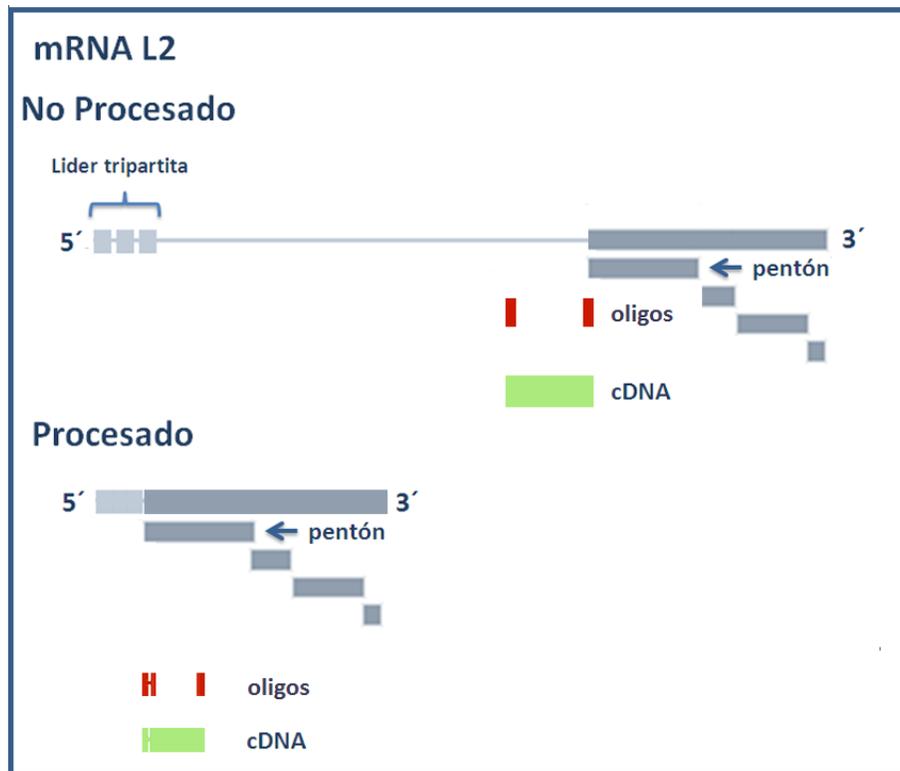


**Esquema del diseño de oligos y productos de cDNA para los mensajeros de Beta actina.** En azul está representada la secuencia del mRNA en su forma procesada o no procesada. En azul claro se representan las regiones no traducidas (UTRs). En rojo, la región donde hibridan los oligos diseñados. En verde, el cDNA producto de una RT-PCR usando los oligos diseñados, que corresponde a la región utilizada para la transcripción *in vitro* y síntesis de la sonda respectiva.

### 6.3.B Late 2 (L2)

El mensajero tardío L2 de Adenovirus, es sintetizado a partir de la unidad transcripcional tardía ML. L2 comparte tres exones no codificantes en el extremo 5' de ML con el resto de los mensajeros tardíos, denominados líder tripartita (I1, I2 y I3). L2 abarca una región de 11,961 pb y da lugar a más de un mRNA por splicing alternativo. Las sondas de L2 se diseñaron para reconocer el mRNA que codifica para la proteína estructural pentón. Los oligos se diseñaron usando las anotaciones en la secuencia del genoma de Adenovirus 2 y se corroboraron haciendo alineamientos con la secuencia de Adenovirus 5. En caso de diferencias, las secuencias de los oligos se corrigieron en base a la secuencia de Ad5. La sonda generada para L2 no procesado, mide 399pb y abarca la región 3' del intrón y la unión intrón-exón de la secuencia codificante de pentón. Esta sonda puede hibridar con los mensajeros de L2 en los que el intrón (región L1) no ha sido removido. Para L2 procesado, se generó una sonda de 470pb que hibrida desde la unión exón-exón que se forma entre el último líder tripartita (I3) y la región codificante de pentón, hasta más de la

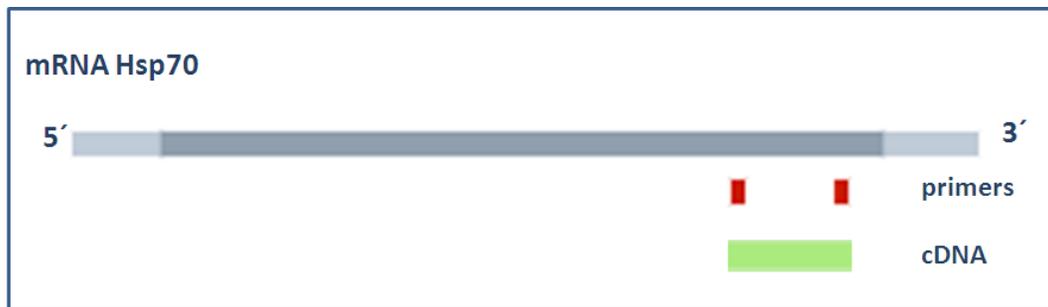
mitad de la región codificante para pentón. Esta sonda hibrida con los mRNAs procesados de pentón.



**Esquema del diseño de oligos y productos de cDNA para los mensajeros de pentón en L2.** En azul está representada la secuencia del mRNA en su forma procesada o no procesada. En azul claro se representan las regiones no traducidas (UTRs). En rojo, la región donde hibridan los oligos diseñados. En verde, el cDNA producto de una RT-PCR usando los oligos diseñados, que corresponde a la región utilizada para la transcripción *in vitro* y síntesis de la sonda respectiva.

### 6.3.C Proteína de choque térmico 70 (Hsp70)

En *Homo sapiens*, el gen de la proteína de choque térmico 1A de 70kDa (HSPA1A) está constituido por 2,445 pb y no contiene intrones. Se generó una sonda de 442pb que hibrida en la región 3' del mensajero.



**Esquema del diseño de primers y productos de cDNA para el mRNA de Hsp70.** En azul está representada la secuencia del mRNA. En azul claro se representan las regiones no traducidas (UTRs). En rojo, la región donde hibridan los oligos diseñados. En verde, el cDNA producto de una RT-PCR usando los oligos diseñados, que corresponde a la región utilizada para la transcripción *in vitro* y síntesis de la sonda respectiva.

#### 6.4 Síntesis de sondas para FISH.

*RT-PCR.* Para la retrotranscripción, se llevó a cabo un ciclo de 30 min a 55°C en el termociclador o en termoblock. Para la amplificación del producto obtenido, por PCR, se utilizó el siguiente protocolo en un termociclador: inicialmente un ciclo de desnaturalización de 2 min a 94 °C; 40 ciclos de 15 seg a 94 °C para desnaturalizar, 30 seg a 65 °C (o 30 seg a 70 °C) para alinear y 30 seg a 68 °C (o 30 seg a 72 °C) para la extensión; finalmente se dio un ciclo de extensión de 5 min a 68 °C (o 72 °C). Las condiciones de RT-PCR, para cada par de oligos, se muestran en el Anexo III.

##### 6.4.A Clonación de productos de RT-PCR.

*Ligación.* La reacción de ligación se preparó de acuerdo a las instrucciones del kit de pGEM-T easy y se dejó 1 hr a temperatura ambiente y O/N a 4 °C. La proporción molar inserto:plásmido que se usó fue 1:3.

*Transformación.* La reacción de ligación se incubó 10 min en hielo con las células competentes (alícuota de 200 µl). Se dio un choque térmico durante 1.5min a 42 °C. Se agregó 1 ml de LB a temperatura ambiente y se incubó durante 1 hr a 37 °C y 250 rpm. Finalmente, las células transformadas se platearon en cajas LB/ampicilina y LB (control).

#### 6.4.B Transcripción de sondas para FISH.

*Linearización de plásmidos.* Previo a la reacción de transcripción *in vitro*, los plásmidos se linearizaron usando de 1-2 ng de plásmido para cada reacción de digestión. Para las reacciones de transcripción con la polimerasa T7, los plásmidos se digirieron con la enzima de restricción Sall. Para las reacciones de transcripción con la polimerasa SP6, los plásmidos fueron digeridos con la enzima NcoI, a excepción del plásmido 8.3 (L2 no procesado), para el que se utilizó SacII. Después de terminar la digestión, se precipitó el DNA linear añadiendo 1/20 de 0.5M EDTA, 1/10 de 3M acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó durante al menos 15 min a -20 ° C y se centrifugó 15 min a 14 rpm. El pellet se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O MQ. Posteriormente se trató con proteinasa K, para degradar RNAsas. Se usó de 100-200 µg/ml de proteinasa K y 0.5% SDS, la digestión se dejó durante 30 min a 50 °C. Posteriormente se hizo una extracción fenol-cloroformo para quitar proteinasa K. Se precipitó con 1/10 de acetato de sodio 3M y se volvió a resuspender en 50 µl de H<sub>2</sub>O MQ/DEPC.

*Transcripción in vitro.* Para generar las sondas de RNA para FISH, se usaron plásmidos pGEM-T easy, con los insertos de cDNA, como templados para la transcripción *in vitro*. En el plásmido, la secuencia de la sonda se encuentra flanqueada por los promotores SP6 y T7, dependiendo de la orientación de la secuencia, se utilizó una de las polimerasas correspondientes para sintetizar la sonda (anti-sentido) o el control (sentido). Para la reacción de transcripción *in vitro*, se linearizaron los plásmidos en un sitio que está situado río abajo del final de la secuencia a transcribir, para evitar que la extensión de secuencias que no corresponden a la sonda. Las sondas para FISH se marcaron con uridina acoplada a Digoxigenina (DIG) o a bromo-uridina (BrU). La relación de marcaje (nucleótido marcado: nucleótido no marcado) en ambos casos fue 1:2. Se usó el sistema de transcripción MEGA Script de Ambion. Por cada reacción de transcripción se usaron 4 µl de mezcla de nucleótidos (40mM), 1 µl del buffer 10X, 1 µl del templado linearizado (0.02-0.04 ng/µl), 1 µl de enzima (SP6 50mM o T7 75mM) y , RNAsin (1 u/µl) y c.b.p. 10 µl de H<sub>2</sub>O/ DEPC. La

mezcla de nucleótidos se preparó de la siguiente manera: 10mM final de ATP, CTP y GTP, 6.5mM de UTP y 3.5mM de UTP marcado. Las reacciones se incubaron a 37 °C de 7-10 hrs, tiempos a los que se alcanzó el mayor rendimiento. Después se adicionó 1 µl de Turbo DNasa (Ambion) y se incubó durante 15 min a 37 °C. El producto se precipitó agregando 30 µl de LiCl y 30 µl de H<sub>2</sub>O/DEPC y se incubó O/N a -20 °C. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 14 krp 4 °C. El pellet se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se resuspendió en 10 µl de H<sub>2</sub>O/DEPC con RNAsin (Promega). Los productos se verificaron por gel de agarosa y se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro (Nano Drop, ND-1000).

### 6.5 Ensayos de FISH.

*Hibridación In situ (FISH).* Las células se fijaron con PBS/4% formaldehído fresco (enfriado a -20 °C) durante 20 min a T.A. Se lavó 3X durante 5 min sin movimiento, con PBS + 50 mM NH<sub>4</sub>Cl. Se permeabilizó con PBS + 50 mM NH<sub>4</sub>Cl / 0.5% tritón X-100 durante 15 min a temperatura ambiente, sin agitación. Se hicieron 2X lavados de 5 min sin movimiento, con PBS + 50 mM NH<sub>4</sub>Cl para quitar el detergente. Para los ensayos con sondas marcadas con digoxigenina, antes de la hibridación, se trató con PBS + 50 mM NH<sub>4</sub>Cl/1.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min a temperatura ambiente y después se lavó 2X con PBS + 50 mM NH<sub>4</sub>Cl. La hibridación se incubó O/N con 10 ng de sonda/pozo, en buffer de hibridación 50% formamida a 58 °C. Después se hicieron tres lavados de 20 min, sin movimiento, con buffer de hibridación/50% formamida a 75 °C y posteriormente dos lavados de 10 min con Buffer SSC (0.015M citrato de sodio/ 0.15M NaCl) a la misma temperatura. Antes de incubar con los anticuerpos se bloqueó con Buffer de bloqueo (1% BSA/ 0.2% leche/ 0.3% tritón X-100/ PBS 1X) durante 1 hr. La incubación de los anticuerpos se realizó durante 2 hrs a temperatura ambiente u O/N a 4 °C. El anti-digoxigenina (Roche) se utilizó a una dilución 1:1000 y el anti-BrU, 1:100. Después, se lavó 3X con PBS + 50mM NH<sub>4</sub>Cl. El anticuerpo secundario se incubó de 2-4 hrs a temperatura ambiente y se lavó 3X con Buffer TNT (tris 0.1M pH 7.5/ NaCl 0.15M/ 0.05% tween 20) durante 5 min con agitación. Se incubó con el fluoróforo (TSA Plus TMR, Fluorescein System, Perkin Elmer) 1:100

(amplification diluent) durante 8 min a temperatura ambiente y posteriormente se lavó 3X con Buffer TNT durante 5 min c/u.

## 6.6 Obtención y análisis de fracciones subcelulares.

*Obtención de nucléolos.* Modificación del protocolo adaptado de Muramatsu M, et al., por el laboratorio de Lamond A. para la obtención de fracciones citoplásmicas, nucleoplásmicas y de nucléolos [63].

Se cultivaron células HFF hasta llegar a ~90% de confluencia,  $1.5 \times 10^7$  células por condición. Para cosecharlas, se lavó 2X con 5 ml/caja de PBS 1X a 37 °C y se desprendieron de la superficie usando 1 ml de tripsina (tripsina-EDTA 10X de GIBCO; tripsina 50 µg/ml, EDTA 20 µg/ml y NaCl 85 µg/ml) ~2 min a 37 °C. Para inactivar la tripsina, se adicionaron 7 ml/caja de DMEM/10% FCS y se juntaron todas las células en un tubo. Las células se lavaron 3X con 8 ml de PBS a 4 °C y se centrifugaron durante 5 min a 200 g y a 4 °C. El pellet con las células se resuspendió en 500 µl de Buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 20 µg/ml PMSF, 10 µg/ml Aprotinina) frío y se incubó en hielo durante 5 min. Las células se lisaron utilizando un homogenizador (previamente enfriado en hielo) de vidrio y teflón. Durante la lisis, las muestras se monitorearon en el microscopio hasta que más del 90% de células estuvieran lisadas. A partir de este paso, todas las soluciones y muestras se mantuvieron frías. El homogenizado de células se centrifugó a 200 g durante 5 min a 4 °C; el sobrenadante corresponde a la fracción citoplásmica y el pellet contiene los núcleos y detritos celulares. Para obtener una fracción de núcleos limpia (eliminando los detritos celulares), el pellet se resuspendió en 500 µl de solución S1 (0.25 M sacarosa y 10 mM MgCl<sub>2</sub>) y se depositó sobre 500 µl de solución S2 (0.35 M sacarosa y 0.5 mM MgCl), asegurándose de mantener las dos fases separadas. Posteriormente, se centrifugó a 1,400 g durante 5 min a 4 °C. El pellet corresponde a la fracción de núcleos limpios. Los núcleos se resuspendieron en 500 µl de solución S2 y se lisaron con un sonicador sumergido durante 10-20 min. La lisis se monitoreó hasta que todos los núcleos estuvieran lisados. La suspensión de núcleos sonicados se depositó

sobre 500 µl de solución S3 (0.88 M sacarosa y 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>), asegurándose de mantener las dos fases separadas. Se centrifugó durante 10 min a 3,000 g y 4 °C. El pellet resultante, corresponde a la fracción de nucléolos y el sobrenadante a la fracción de nucleoplasma. Los nucléolos se resuspendieron en 100 µl de solución S2. Todas las fracciones se almacenaron a -70 °C hasta utilizarse.

*Análisis bioquímico de fracciones subcelulares.* Las fracciones correspondientes a citoplasma, nucleoplasma y nucléolo se analizaron por SDS-PAGE y por Western Blot (WB). Todos los geles de poliacrilamida se realizaron al 10% de acrilamida. Se tiñeron con Coomassie o con plata (de acuerdo a lo indicado). Para los ensayos de Western Blot, los geles de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nylon por el método de transferencia semi-seco. Se utilizó el sistema de tres buffers de transferencia: Ánodo I (0,3 M Tris-base, 10% metanol a pH 10.4), Ánodo II (0.025 M Tris-base, 10% metanol a pH 10.4) y Cátodo (0.25 M Tris-base, 0.04 M glicina, 10% metanol a pH 9.4). Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con buffer de bloqueo (PBS 1X / 3% leche en polvo / 0.5% Tween 20). Los anticuerpos primarios y secundarios se incubaron ~4 hrs (dependiendo del anticuerpo) y 2 hrs, respectivamente. Después de cada incubación, los anticuerpos se lavaron 3X durante 10 min con 50 ml buffer de lavado (PBS 1X / 0.3% leche en polvo / 0.05% Tween 20). Las membranas se revelaron por el método de quimioluminiscencia; se incubaron con ECL Plus (Perkin Elmer) o ECL Advanced (Invitrogen), dependiendo de la sensibilidad requerida, y se reveló usando películas radiográficas (Kodak).

*Inmunoprecipitación de fracciones subcelulares.* Antes de la inmunoprecipitación se hizo un entrecruzamiento de la muestra con formaldehído como se indica a continuación. Se usaron 25 µl de muestra (nucleoplasma o nucléolo) y se llevaron a un volumen de 100 µl con RIPA (150mM NaCl/ 0.1% SDS/ 0.1% tritón-X100/ 1mM EDTA/ 20mM NaPO<sub>4</sub> pH 7.2)/1% formaldehído. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente agitando las muestras por inversión cada 10 min. El formaldehído se diluyó aumentando el volumen a

500 µl con RIPA. Se adicionó el anticuerpo (anti-DBP 1:100 o anti-nucleolina 1:500). Se adicionaron 50 µl de suspensión 50% agarosa A. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente con agitación leve. Para inmunoprecipitar se centrifugó a 6 krpm a temperatura ambiente durante 5 min. Se separó el sobrenadante y el pellet se lavó 3x con 500 µl de RIPA centrifugando a 6 krpm durante 10 min. El pellet lavado se resuspendió en 30 µl de Buffer Laemmli 2X/10% β-mercaptoetanol.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Distribución de mRNAs virales tardíos de Ad5 en células HFF.

Como se describió en la introducción y en los antecedentes, los mRNA virales tardíos se sintetizan e inician su procesamiento postranscripcional asociados a los CR. La exportación selectiva de estos mRNAs es dependiente de E1B, que se localiza en los CR cuando la síntesis de los transcritos ocurre durante la fase tardía. Se propone que la asociación de los mRNAs a microdominios, que a su vez se forman durante la fase tardía, enriquecidos con componentes de la maquinaria de procesamiento favorece su exportación por acoplamiento entre maquinaria de procesamiento y exportación.

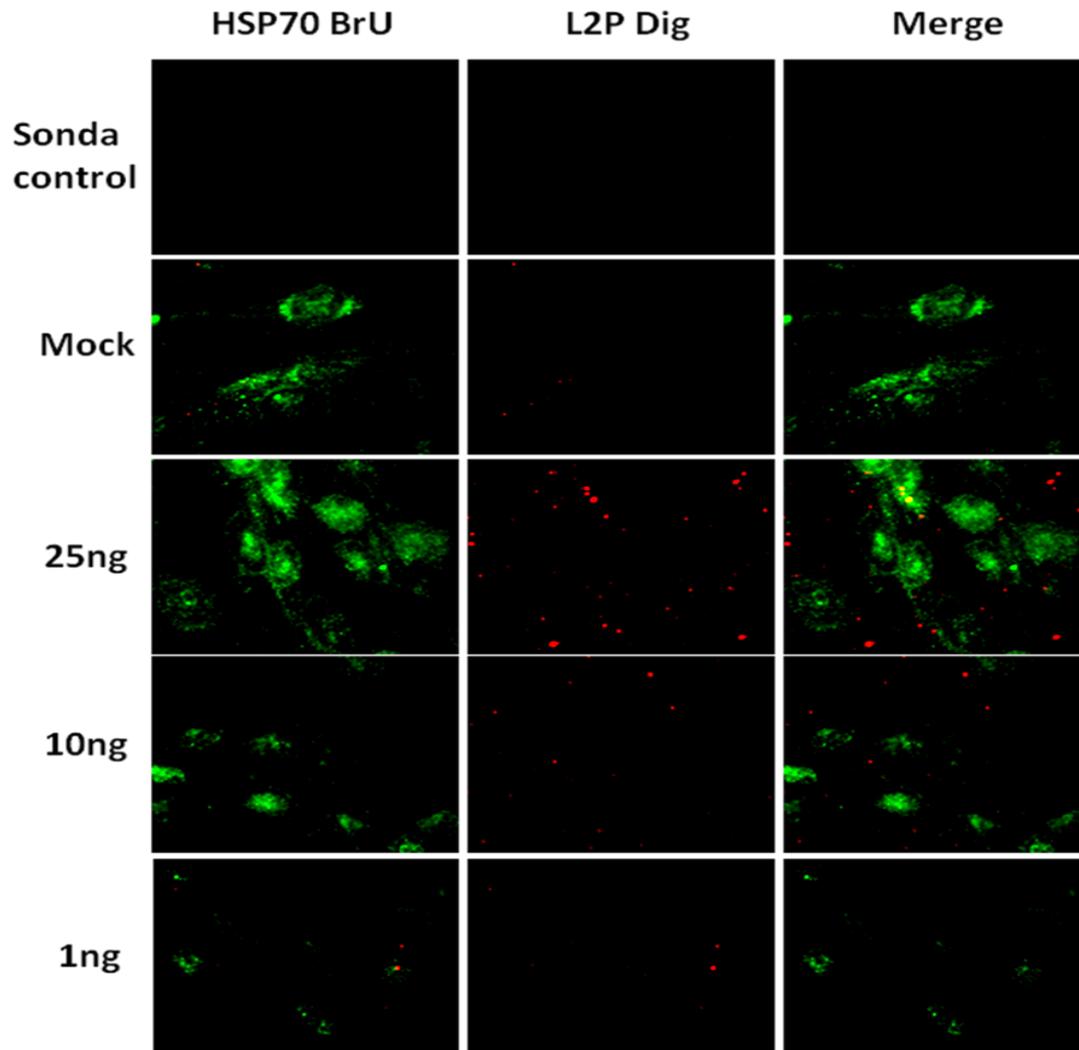
Para estudiar la localización de los mRNAs virales tardíos y analizar si existe un nexo entre su procesamiento postranscripcional y la formación de CR, decidimos hacer un análisis de la distribución intracelular de los transcritos de mRNA de L2, procesados y no procesados por hibridación *in situ* y análisis por microscopía de epifluorescencia, en células HFF infectadas con Ad5 a diferentes tiempos post-infección, como se describe en materiales y métodos.

Para el ensayo de hibridación *in situ*, se diseñaron sondas que reconocieran específicamente la forma procesada o la no procesada del transcrito viral L2. Como

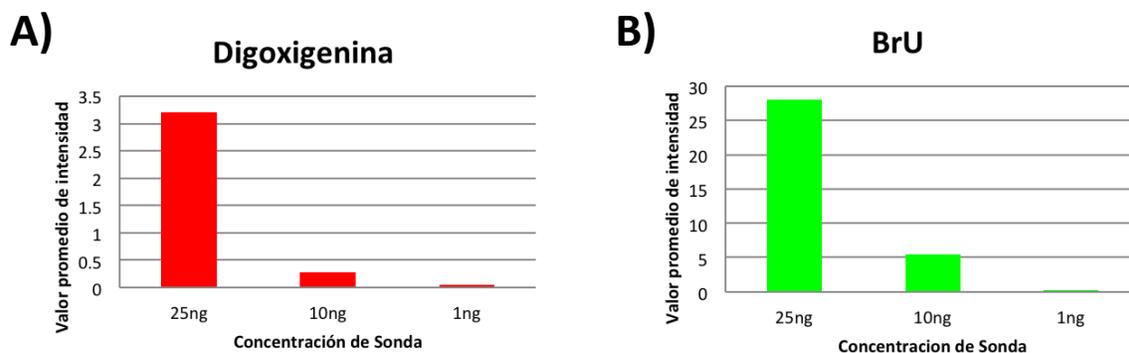
control de la distribución de un transcrito celular, se diseñaron sondas para los mRNAs, procesados y no procesados de  $\beta$ -actina. Como control de un transcrito sin procesamiento, se diseñó una sonda contra el mRNA celular de Hsp70, el cual no posee intrones (ver materiales y métodos y material suplementario).

#### 7.1.A. Estandarización de condiciones para FISH en HFF.

Para estandarizar las condiciones de los ensayos de FISH, se probaron diferentes concentraciones de cada sonda (1ng, 10ng y 25ng) y diferentes temperaturas de lavados: lavados astringentes a 75°C (**Figura 9**) y lavados muy poco astringentes a 37°C (datos no mostrados). A partir de las señales obtenidas en las imágenes procesadas, se asignaron valores de intensidad de señal, usando el programa Image J. Con estos datos se hicieron gráficas de intensidad de señal VS concentración de sonda (**Figura 10Figura 1**). El aumento de intensidad de señal fue congruente con el aumento en la concentración de sonda, sin embargo, también se aumentó la señal de fondo (**Figura 9, Figura 11Figura 11**ver controles). Para obtener señal detectable de la sonda y menor fondo, se decidió usar una concentración de 10ng de sonda y lavar a 75°C para el resto de los experimentos.



**Figura 9. Búsqueda de condiciones para ensayos de hibridación *in situ*.** Se muestran células HFF infectadas con Ad5 WT a 28hpi, procesadas para detección por FISH, usando diferentes concentraciones de sonda 1ng, 10ng y 25ng. Las células no infectadas (mock) fueron tratadas con 25ng de sonda. La sonda control se probó en células con 28hpi (se utilizaron 25ng por pozo). Los lavados de las sondas se realizaron a 75°C. En verde se muestra la sonda para HSP 70 marcada con BrU y en rojo, la sonda para el gen de Ad5 L2 (digoxigenina) en su forma no procesada (L2P).



**Figura 10. Histogramas de concentración VS intensidad de señal para sondas.** A partir de las imágenes anteriores de FISH, se relacionó la intensidad de fluorescencia con la concentración de sonda. En el panel A se muestran los datos para la sonda de L2 procesada marcada con digoxigenina y en el panel B, se muestran los datos para la sonda de HSP70 marcada con BrU. Las gráficas se hicieron a partir de los valores de intensidad de señal para cada imagen, usando el programa Image J.

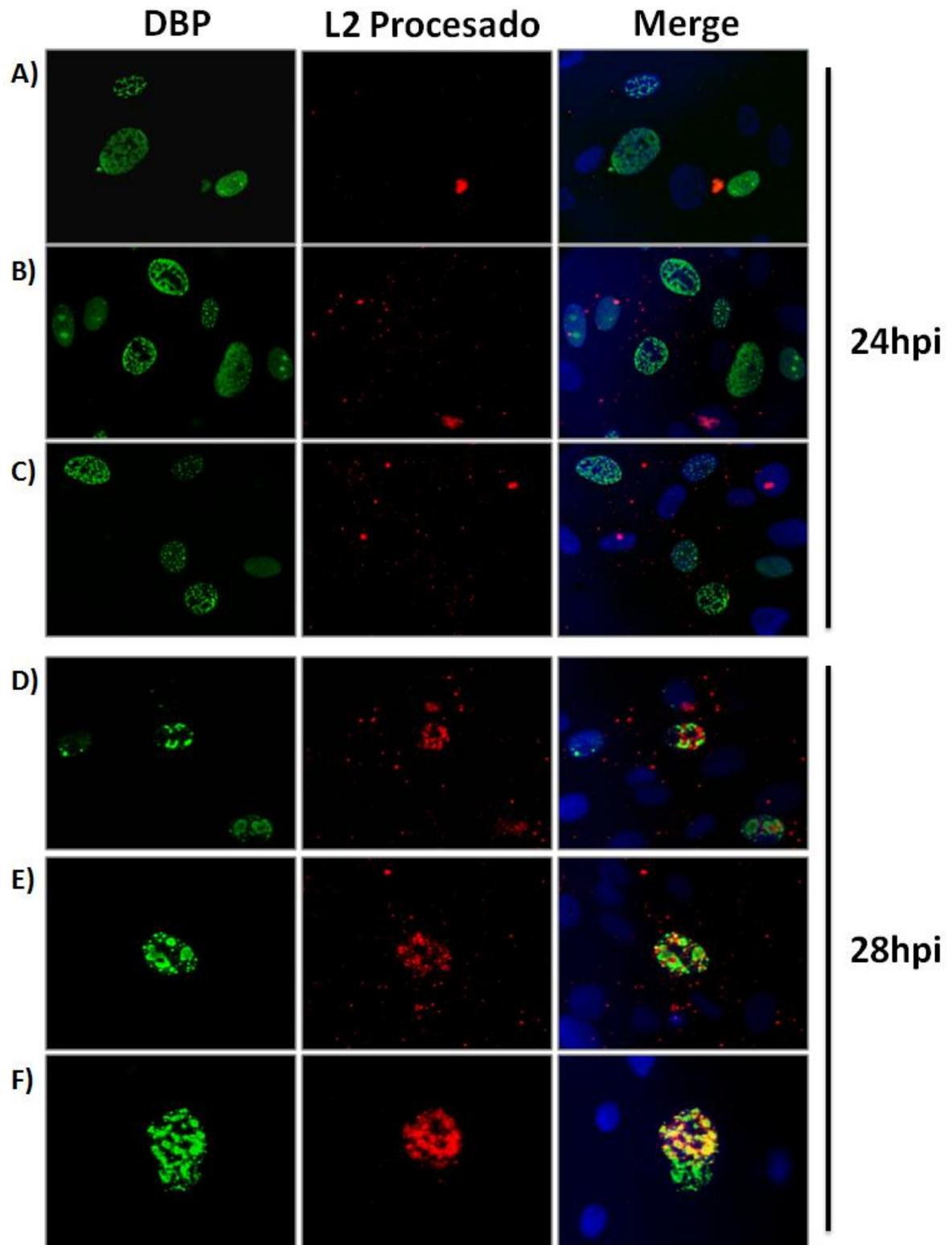
#### 7.1.B. Análisis de la distribución del mRNA viral L2 procesado.

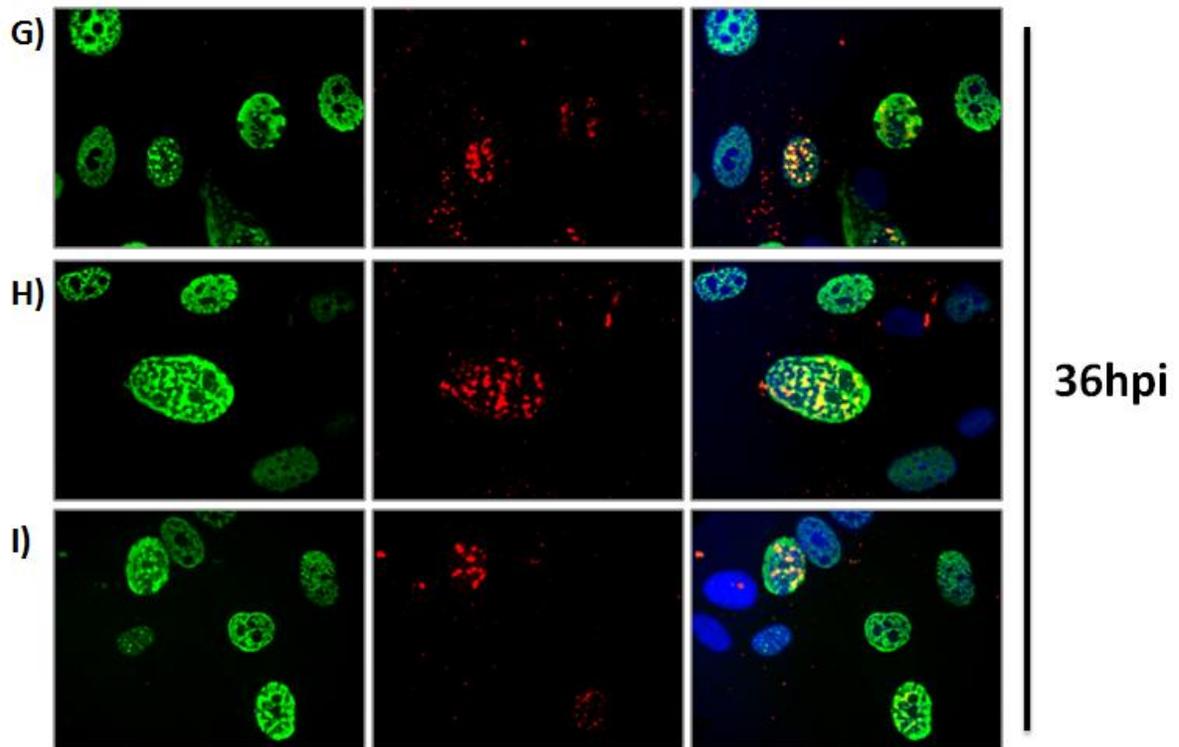
Una vez establecidas las condiciones para la hibridación de las sondas, se analizó la distribución del mRNA viral L2 en diferentes tiempos durante la fase tardía del ciclo de hibridación como se describe arriba y en materiales y métodos. La sonda para L2 fue marcada con digoxigenina y como referencia de los Centros de Replicación viral se utilizó un anticuerpo contra la proteína DBP.

Como se muestra en la **Figura 11** **Figura 18**, en el inicio de la fase tardía (24hpi), se observan células en las que la distribución de DBP pasa de ser difusa en núcleo a puntos que formarán los anillos característicos de los CR. En este tiempo se observan algunos puntos marcados con digoxigenina, principalmente fuera de núcleo, pero la señal y distribución es muy parecida a la observada en el control con células infectadas (ver controles, **Figura 12**). Las células con 28hpi (que corresponde ya a la fase tardía establecida) tienen una distribución de DBP principalmente en anillos y se observa un aumento en la señal para la L2 procesada en núcleo, adyacente a los CR. En el panel D, se muestra una célula con una distribución más tardía de la proteína, que colocaliza con la señal para la sonda de L2 procesado. En la fase tardía avanzada del ciclo de replicación viral (36hpi), la distribución de DBP se observa como una especie de red anular

intranuclear, cuya localización hacia la periferia del núcleo se hace más notable. En este tiempo, la señal observada para L2 procesada aumenta tanto en densidad como en intensidad y también se observa cierta colocalización con la señal para DBP.

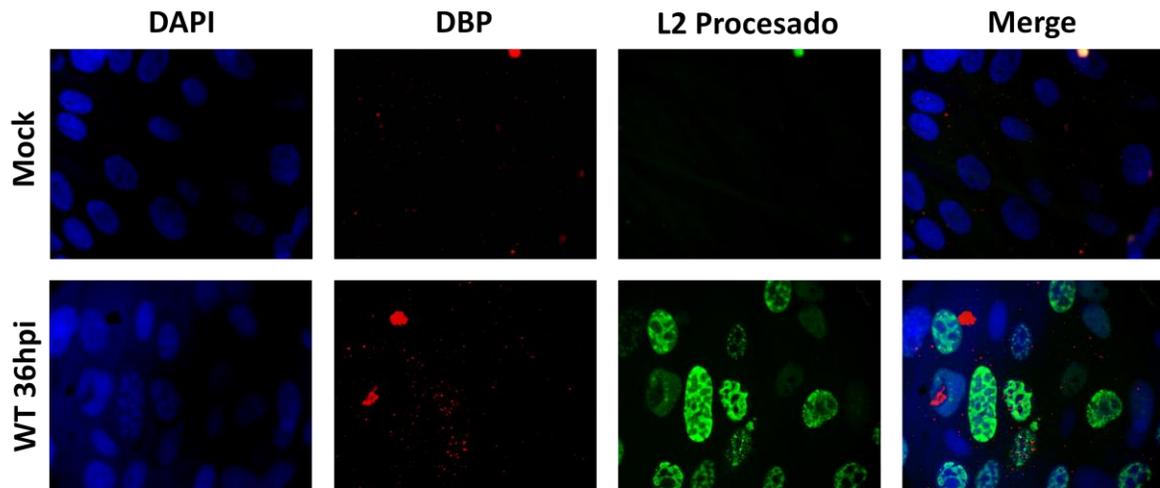
La **Figura 13**, resume las diferentes distribuciones observadas para DBP y la sonda de L2 procesada. Del panel A-C se muestra la distribución de DBP que corresponde principalmente a tiempos donde inicia la transición hacia la fase tardía (24hpi). Cuando DBP se encuentra difuso en núcleo (panel A), no se observa señal para L2 procesado en núcleo. Conforme la distribución de DBP pasa hacia estructuras puntuales, comienza a detectarse una señal puntual de L2 procesada (panel B), en sitios cercanos a los puntos de DBP. En células donde se observan patrones para DBP correspondientes con el comienzo de la formación de Centros de Replicación (panel C-F), la señal para L2 aumenta y se observa adyacente a estos sitios. En los paneles G-I, se muestran distribuciones tardías para DBP en donde hay una intensidad de señal muy alta de L2 procesado y colocalización.





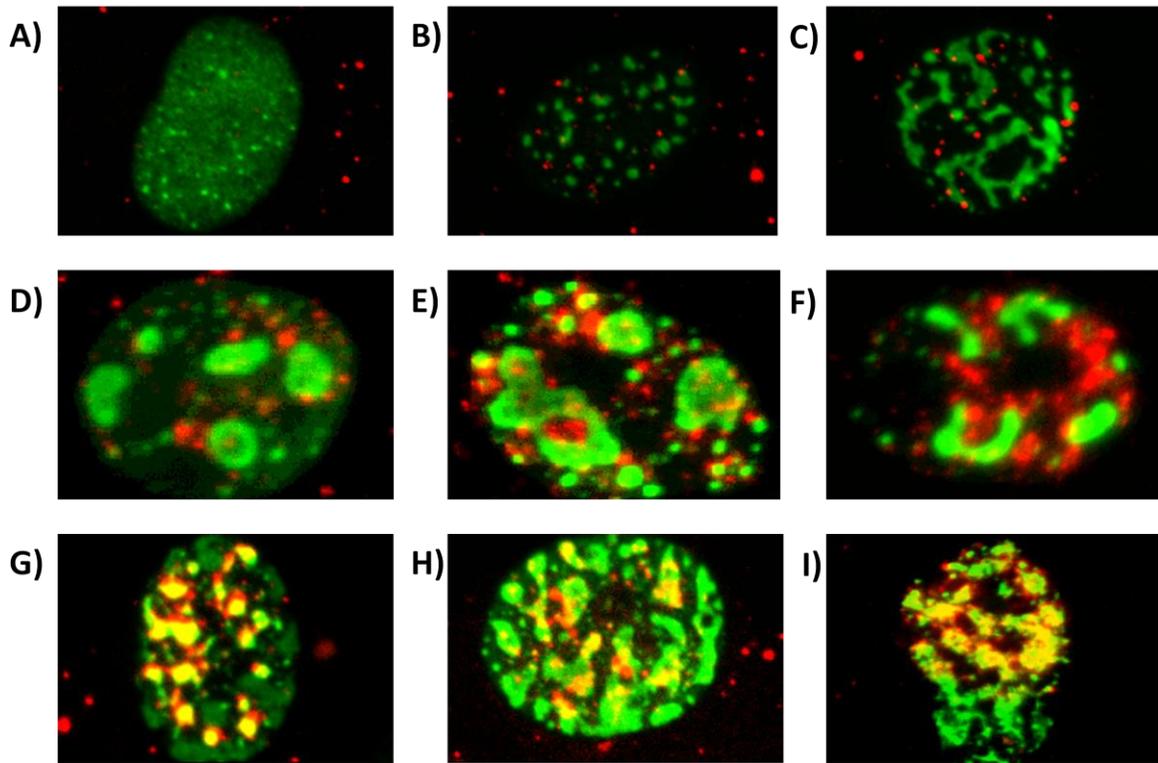
**Figura 11.** Distribución de DBP y el mRNA procesado L2 al inicio de la fase tardía de replicación de Ad5. Se muestran imágenes de epifluorescencia de células HFF infectadas con Ad5 WT a las 24hpi, 28hpi y 36hpi. Las imágenes de 24hpi y 36hpi fueron tomadas con un objetivo 100X y las imágenes a 28hpi, con un objetivo 63X.

## Controles



**Figura 12. Controles para la sonda de L2 procesada.** Se muestran imágenes de epifluorescencia de células HFF no infectadas (mock) y células infectadas con Ad5 WT a las 36hpi. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 100X.

En resumen, la señal para la sonda que detecta mensajeros procesados de L2, aparece cercano a los sitios de nucleación de DBP (sitios de síntesis de DNA viral). Conforme avanza la infección y la distribución de DBP forma anillos, la señal para L2 procesado aumenta y se localiza siempre alrededor de los sitios marcados con DBP. La detección por epifluorescencia no nos permite concluir que hay colocalización, se requiere un análisis por microscopía confocal que permita quitar la señal que se encuentra fuera del plano focal. Aún así, el método de detección utilizado para la sonda de L2 procesado (digoxigenina), requiere de la precipitación de un sustrato fluorescente que puede difundir. Por lo tanto, la señal observada como colocalización puede no ser real.



**Figura 13. Patrones de distribución de DBP y L2 procesado.** Se muestra un acercamiento a los núcleos de células HFF infectadas con Ad5 WT. En verde se observan diferentes patrones de distribución de DBP durante la infección y en rojo la señal para el mRNA procesado de L2. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 63X (panel D-F y panel I) y con un objetivo 100X (panel A-C y paneles G y H). Los paneles A-C corresponden a 24hpi, paneles D-F a 28hpi y paneles G-I a 36hpi.

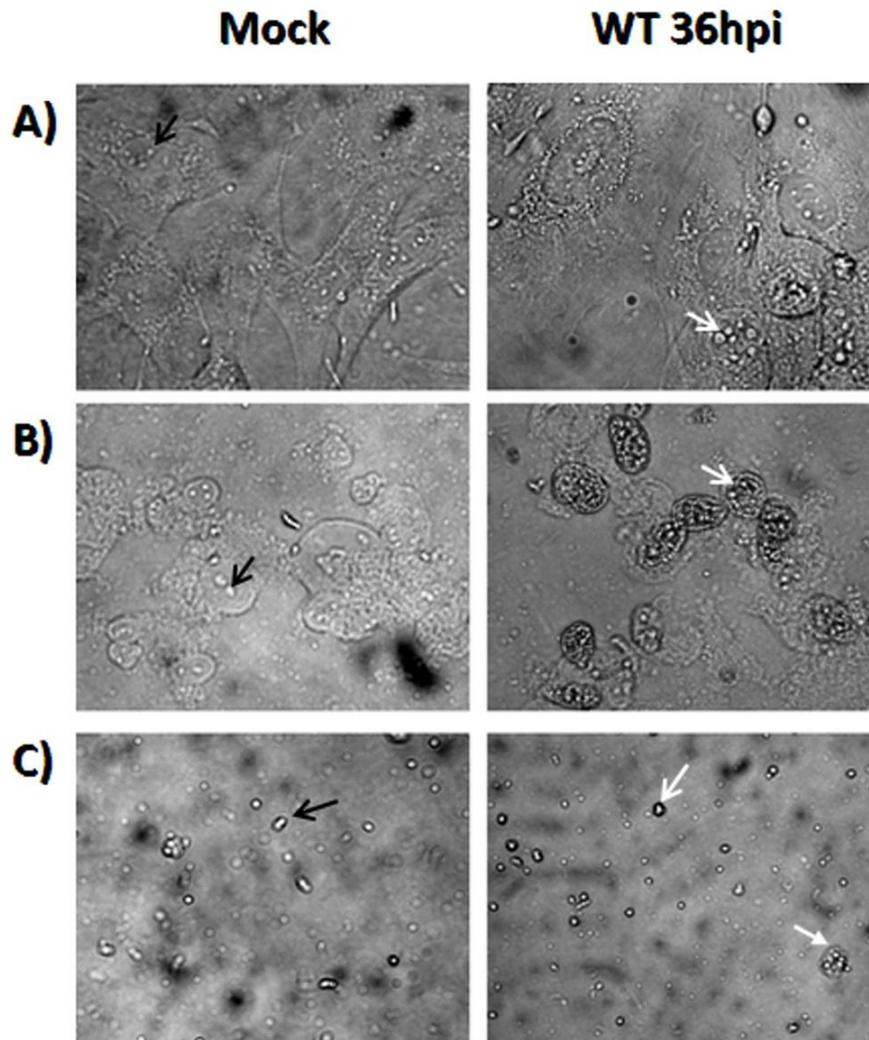
## 7.2 Obtención de Centros de replicación.

Como se describió en antecedentes, durante la fase tardía de la infección viral hay una gran reorganización de componentes nucleares, y muchos son reclutados hacia los CR. La información que hasta ahora se tiene, sobre los componentes relocalizados hacia CR, ha sido obtenida por diversos ensayos utilizando microscopía electrónica, de fluorescencia y de luz. Sin embargo, claramente no se conoce su composición en la totalidad; entender qué moléculas son reclutadas en los CR podría darnos un indicio de qué actividades se regulan en estos sitios durante la infección. Por lo tanto, decidimos encontrar un método que permita aislarlos, para su análisis bioquímico por diversas técnicas (WB, RT-PCR, RIP-ChIP, proteómica, etc.).

### 7.2.A Purificación de CR por métodos de separación por tamaño y densidad.

Inicialmente, se buscó un método por el cual se pudiesen aislar los CR. Como se describió anteriormente, son los sitios donde se replica el genoma viral y donde se transcriben y procesan los mRNAs virales tardíos, por ello son estructuras que están compuestas de ácidos nucleicos, tanto DNA y RNA viral y proteínas, y miden entre 2-5 $\mu$ m. Comparándolos con los nucléolos, ambas estructuras comparten similitudes en composición, tamaño y densidad. Por lo tanto, se decidió utilizar un protocolo para la obtención de nucléolos, el cual es una adaptación del laboratorio de Lamond A., del protocolo original de Muramatsu M., [63]. Este protocolo consiste en la separación de fracciones celulares por gradientes de velocidad y colchones de sacarosa (que separan por tamaño y densidad), resultando en fracciones enriquecidas con nucleolos.

Estandarizamos el método para nuestras condiciones celulares, volúmenes y equipo disponible, como se especifica en la sección de materiales y métodos. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se muestran imágenes de las muestras obtenidas durante el fraccionamiento, con células HFF mock y células infectadas con Ad5 WT a 36hpi. Las flechas indican, en el caso de las células no infectadas, a los nucléolos y se observa como en la muestra se enriquecen en la fracción final. En las células infectadas, se observa una estructura similar que podrían ser los CR y que de la misma forma se enriquece en la fracción final. Sin embargo, no se debe descartar que también puedan ser nucléolos con una morfología y cantidad alterados.

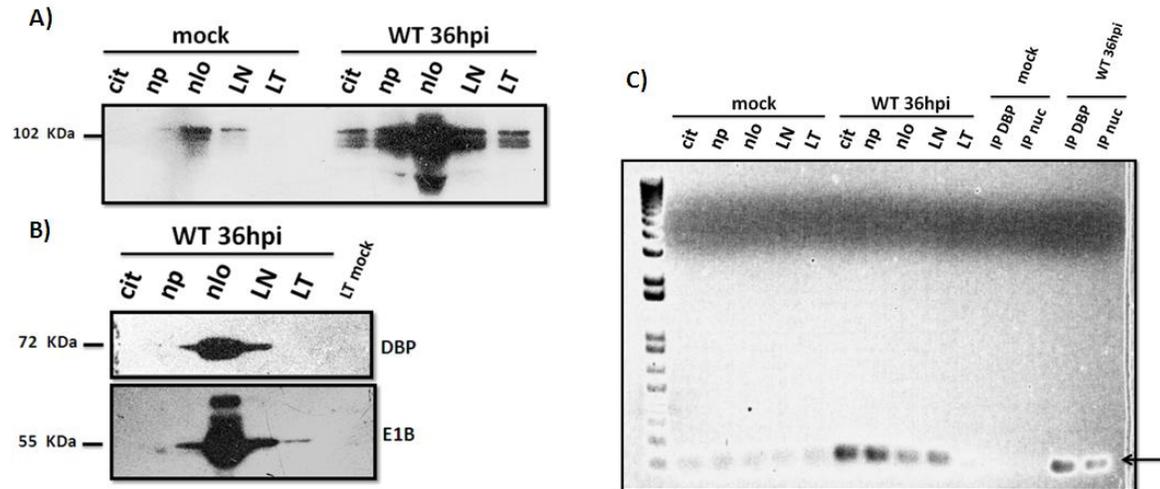


**Figura 14. Imágenes del procedimiento para obtención de nucléolos.** Imágenes de células HFF, sus núcleos y nucleolos, tomadas con un objetivo 20X por contraste de fases. A) Se muestran las células HFF no infectadas e infectadas con Ad5 36hpi en cultivo. B) Núcleos obtenidos después de lisar las células en suspensión. C) Nucléolos obtenidos después de sonicar los núcleos en suspensión. Las flechas negras indican los nucléolos y las blancas los posibles CR (o nucléolos) en células infectadas.

Para corroborar que logramos estandarizar el protocolo, y que las estructuras observadas por microscopía son nucléolos, las fracciones se analizaron por WB para buscar la presencia de nucleolina, una proteína abundante en el nucléolo (**Figura 15a**). Observamos que tanto en células no infectadas como en células infectadas, nucleolina es concentrada en la fracción correspondiente a nucléolo. Además en la infección se observa la aparición

de un producto de proteólisis de nucleolina y se observa un aumento en la señal de nucleolina en citoplasma.

Para comprobar que el método utilizado nos permite aislar CR, se buscaron marcadores de estos sitios en las fracciones aisladas (correspondientes a nucléolos en las células no infectadas). Como se mencionó en la introducción (y se muestra en el panel I de la **Figura 6**), DBP es el principal marcador de CR. Esta proteína se une a cadena sencilla de DNA y se requiere para la replicación del genoma viral, por lo tanto es muy abundante en estos sitios. También se describió cómo la proteína temprana E1B es reclutada hacia los CR y está involucrada en la exportación selectiva de los mensajeros virales tardíos. Por lo tanto, se hicieron ensayos de WB para analizar la presencia de las proteínas DBP y E1B. Se observó un enriquecimiento tanto de E1B como DBP en las fracciones donde se esperan encontrar los CR (**Figura 15a y b, nlo**). Finalmente, los CR son los sitios en donde se replica el genoma viral; para saber si las fracciones contenían DNA viral, realizamos un PCR utilizando oligos que hibridan en la región del líder tripartita (**Figura 15c**). Observamos DNA viral tanto en la fracción correspondiente a CR, como en citoplasma y nucleoplasma. Para saber si el DNA se encuentra asociado directa o indirectamente a DBP se hicieron inmunoprecipitaciones (IP) con anticuerpos contra DBP y nucleolina a partir de las fracciones correspondientes a CR (nlo, WT 36hpi). Tanto DBP como nucleolina parecen estar asociadas, de manera directa o indirecta, al DNA viral. Además, resultados preliminares del laboratorio indican que por medio de RT-PCR es posible detectar mensajeros virales tardíos.



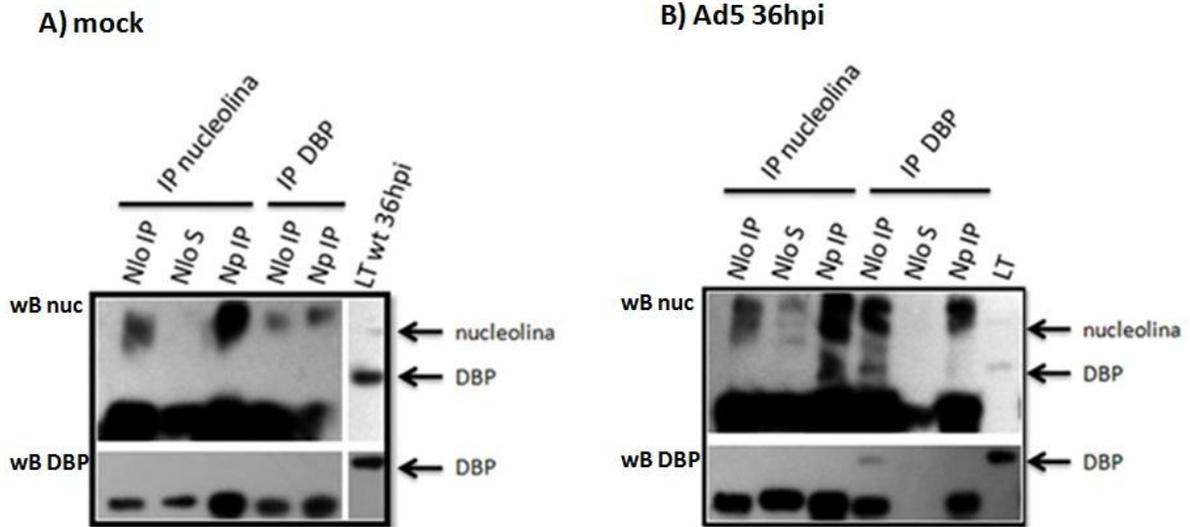
**Figura 15.** Marcadores de CR se obtienen en la fracción de nucléolo de HFF infectadas con Ad5 WT a 36hpi. Se muestran WB para nucleolina (A), DBP y E1B (B) a partir de fraccionamiento de citoplasma (cit), nucleoplasma (np), nucléolos (nlo). Como control, se usaron lisados de núcleo (LN) y lisados totales (LT) de HFF en las condiciones marcadas. El peso molecular de nucleolina es de 102kDa, de DBP 72 kDa y E1B 55kDa. Cada proteína se analizó con membranas independientes. En el Panel C, se observan los productos de PCR de la amplificación de una región de ML (indicada con la flecha) de ~100pb, a partir de muestras del fraccionamiento y de inmunoprecipitaciones (IP) a partir de las fracciones nucleolares con anti-DBP (IP DBP) o anti-nucleolina (IP nuc).

En conjunto, los resultados anteriores muestran que los CR pueden ser obtenidos por procedimientos para obtener nucléolos, los cuáles se basan en la purificación por tamaño y densidad. Sin embargo, también existe la posibilidad que tanto nucléolos como CR estén siendo co-aislados en estas fracciones. Para saber si la presencia de nucleolina, se debe a un efecto de co-aislamiento con los nucléolos, se buscó la presencia de DNA ribosomal amplificando la región 18S (no se muestra), sin embargo, no se logró observar producto de amplificación en ninguna muestra.

#### 7.2.B. Separación de CR por técnicas de Inmunoprecipitación.

Al seguir detectando nucleolina en la fracción de nucléolo de células infectadas, podemos deducir que estamos o co-aislando CR y nucléolos, o que nucleolina podría estar presente en los CR como una proteína requerida para la replicación de Ad. Para saber si estábamos co-aislando CR y nucléolos en las fracciones provenientes de células infectadas, se

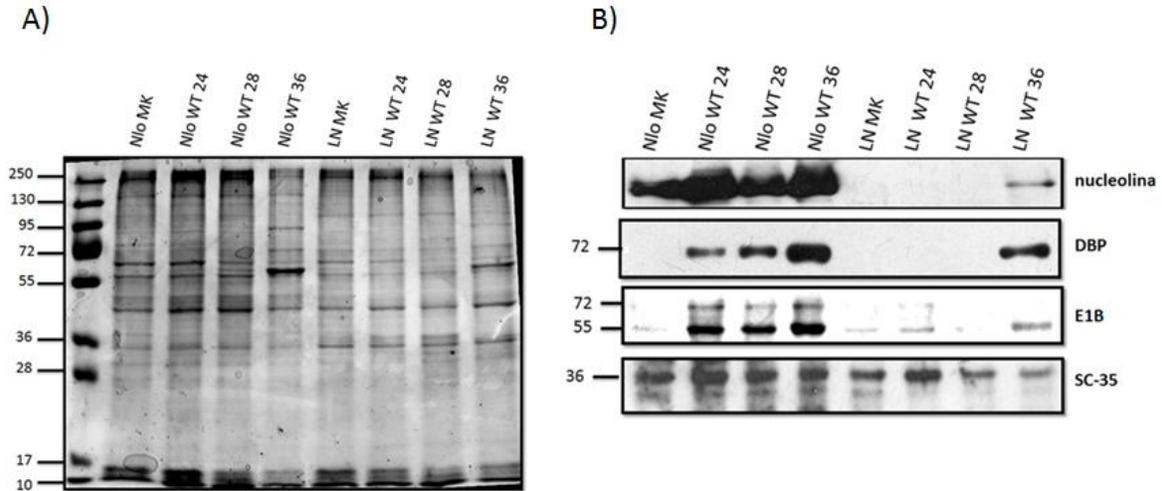
realizaron inmunoprecipitaciones (IP) a partir de las fracciones de nucléolo. Si nucleolina se encuentra completamente en nucléolo, esperaríamos poder separar a los CR de los nucléolos realizando una IP con anti-DBP, en las que esperaríamos que precipiten únicamente CR. De la misma manera, al hacer una IP con anti-nucleolina esperaríamos aislar sólo nucléolos. Para asegurar que tanto los CR como los nucléolos precipitaran como complejos, se realizó previamente una fijación moderada de la muestra (con 0.1% formaldehído durante 30min). El procedimiento de IP se realizó como está descrito en la sección de materiales y métodos. En la **Figura 16**, se muestran los WB para DBP con las fracciones resultantes de la IP (Nlo IP). Como control, también se muestra el sobrenadante que resulta de la IP (Nlo S) que corresponde a lo que no se unió al anticuerpo utilizado para IP. El control para la señal de DBP (72kDa) se observa claramente en los lisados totales (LT) de células infectadas con Ad5 WT a las 36hpi. Las bandas inferiores corresponden a la cadena pesada del anticuerpo usado en la IP. La misma membrana usada para los WB contra DBP, se incubó con el anti-nucleolina, comparando la señal obtenida para DBP y nucleolina en cada condición. Aunque se obtuvo mucho fondo, la señal para nucleolina se observa como una sola mancha, en lugar de los dobletes que se mostraron en los WB anteriores. No obstante, observamos que al IP a partir de los extractos enriquecidos CR, con anti-DBP, estamos también precipitando a nucleolina asociada directa o indirectamente a estas estructuras. Sin embargo, cuando hacemos la misma IP con anti-nucleolina, no se observa DBP asociado a esta proteína. Estos resultados, pueden deberse a que durante la infección con Ad5, nucleolina está siendo reclutada hacia los CR. En este caso, se esperaría encontrar a nucleolina en CR, parte de la nucleolina aún en nucléolo, y parte soluble en nucleoplasma, tal como se observa en el WB. En este caso, la nucleolina que se detectada en las IP con anti-DBP sería por su asociación con CR.



**Figura 16. Inmunoprecipitación de DBP y nucleolina a partir de fracciones enriquecidas con CR.** Se muestran WB para nucleolina y DBP a partir de IP de fracciones enriquecidas con nucléolos (mock) y CR (Ad5 36hpi). El peso molecular de nucleolina es de 102 kDa y de DBP, 72 kDa. Se utilizó la misma membrana para analizar la presencia de ambas proteínas, revelando primero contra la proteína DBP y luego nucleolina. Nlo IP, inmunoprecipitaciones de las fracciones enriquecidas con nucléolos/CR. Nlo S, sobrenadante de la IP. LT, lisado total. Np IP, inmunoprecipitación de nucleoplasmas.

Sabemos que los CR van madurando, como observamos en los experimentos con FISH e IF con DBP, y su tamaño va aumentando posiblemente por el reclutamiento de componentes durante la fase tardía de la infección. Para corroborarlo, decidimos hacer un análisis bioquímico de los CR aislados por fraccionamiento a diferentes tiempos tardíos durante la infección (**Figura 17**). En el análisis de proteínas por PAGE-SDS teñidas con coomasie (panel A), observamos que hay diferencias en los patrones de proteínas entre las fracciones aisladas (Nlo) y los lisados totales de núcleo (LN), congruente con lo que esperamos al enriquecer componentes específicos del nucléolo o CR. Además, el patrón de proteínas de las fracciones, infectadas (WT) y no infectadas (MK), no solo es diferente sino que las diferencias en el patrón van siendo más notorias a tiempos más tardíos. Estas fracciones también se analizaron por WB, para analizar la presencia de los marcadores de CR, DBP y E1B, en nuestras fracciones durante la fase tardía (panel B). Se observó una acumulación progresiva de DBP como se esperaba; E1B también se acumula en el tiempo tardío más avanzado, aunque esto es menos evidente (**Figura 17**, panel B). El WB para nucleolina no es muy claro, sin embargo, con los diferentes ensayos parece haber un aumento de nucleolina en células infectadas. Sabiendo que hay reclutamiento de maquinaria de procesamiento hacia los CR durante la fase tardía se buscó la presencia de la proteína SC-35, que es una proteína SR que participa durante el splicing para

haber una acumulación inicial en las fracciones a las 24hpi, que vuelve a disminuir a las 36hpi. Sin embargo no queda claro por qué obtenemos señal para esta proteína en nucléolos (Nlo MK).

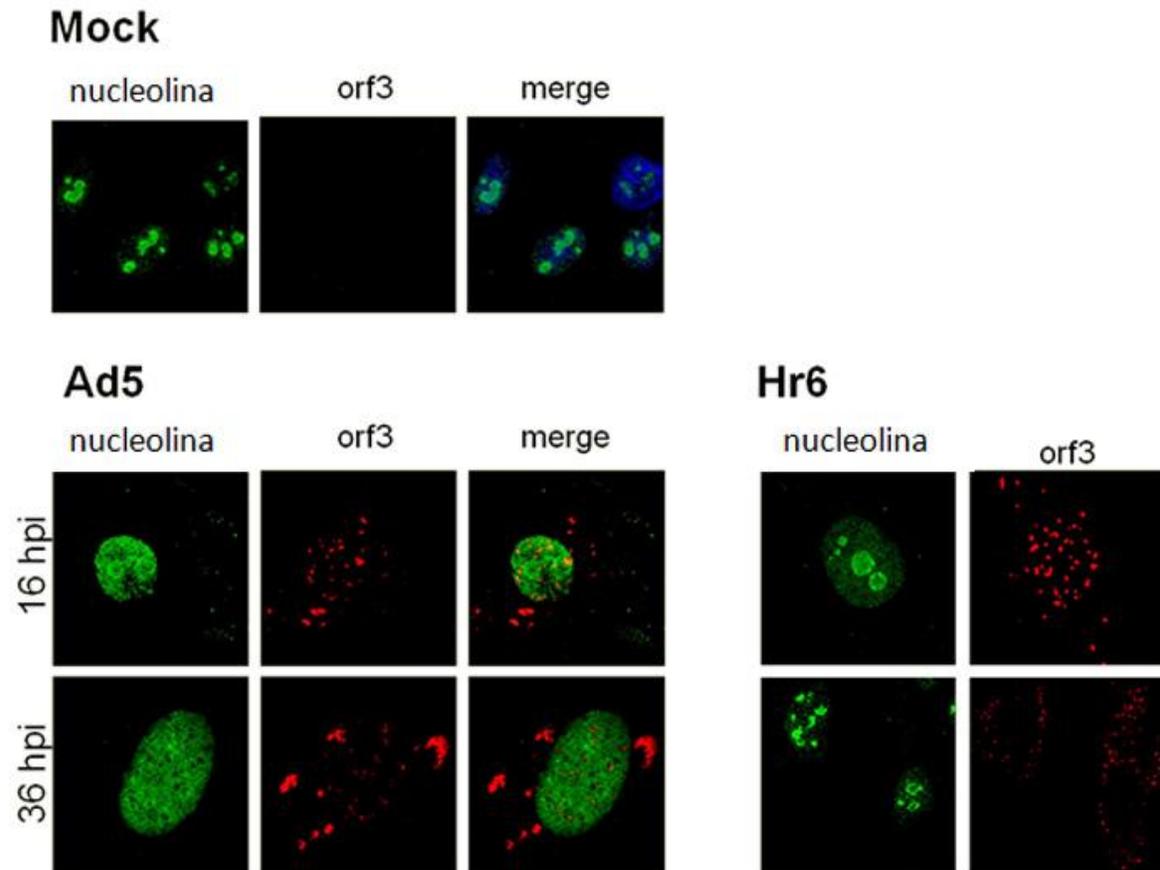


**Figura 17. Detección por WB, de DBP y nucleolina.** A) Se muestra un gel de poliacrilamida teñido con coomasie en el que se cargaron las fracciones obtenidas de células infectadas (Nlo WT) a diferentes tiempos tardíos (24, 28 y 36hpi) con Ad5. B) Se muestra un WB, en el que se cargaron las mismas muestras que en el panel A, para nucleolina (102 kDa), DBP (72 kDa), E1B (55 kDa) y SC-35 (35 kDa). Como control positivo se usaron lisados de núcleo (LN) de HFF en las condiciones marcadas. Los extractos de proteína no se ajustaron a concentración total de proteína, sino a número de células correspondiente. Hay una diferencia de 8X más células en los carriles de Nlo que en los LN.

### 7.3. Componentes de nucléolo son reorganizados durante la infección con Ad5.

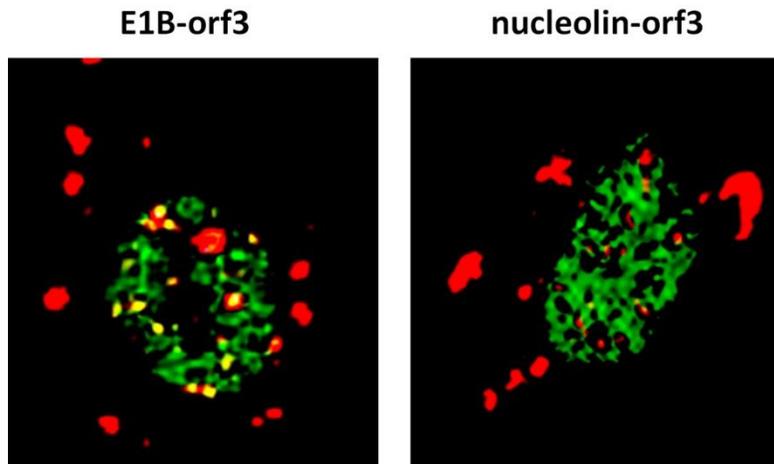
Como se describió en la introducción, la infección por Ad induce cambios en la organización ultraestructural del núcleo, la cual aumenta durante la formación de los CR virales, reclutando componentes e induciendo la redistribución de componentes de ND10, gránulos de Intercromatina (speckles) y Cuerpos de Cajal. En los ensayos de obtención de CR, se observó la presencia de nucleolina en CR y además inmunoprecipita junto con DBP. Previamente, se ha reportado que la transfección de la proteína estructural pV, de adenovirus, induce la relocalización hacia citoplasma de las proteínas nucleolares B23 y nucleolina [65]. Sin embargo, no es claro si la composición del nucléolo es afectada en el contexto de la infección y durante la formación de CR.

Por lo anterior, se quiso analizar la localización subcelular de la nucleolina durante la infección con Ad5 ensayos de inmunofluorescencia a tiempos tempranos y tardíos (16 y 36hpi, respectivamente) del ciclo de replicación viral. Como control de infección, se utilizaron anticuerpos contra la proteína viral orf6. En la **Figura 18**, se muestra la localización de nucleolina en los nucleolos de las células no infectadas (mock), como era de esperarse. Sin embargo, observamos como desde tiempos tempranos en el ciclo de replicación viral, nucleolina es redistribuida hacia nucleoplasma y no hacia citoplasma, como se había descrito anteriormente en un contexto fuera de la infección. Observamos también, que a tiempos tardíos de la infección, nucleolina se observa más difusa en el núcleo, pero además se acumula en sitios con forma anular donde se observa mayor intensidad de señal. Además, encontramos que este efecto de redistribución, es menos eficiente en ausencia de la proteína temprana E1B-55K durante la infección (mutante Hr6).



**Figura 18.** Relocalización de nucleolina hacia nucleoplasma inducida por la infección con Ad5. Se muestra la distribución intracelular de nucleolina y Orf3 analizada por inmunofluorescencia en células HFF en las condiciones indicadas. Se utilizaron simultáneamente los anticuerpos monoclonales anti-nucleolina y 6A11, marcados con Alexa-488 y Alexa-568 respectivamente. Los núcleos están marcados con DAPI.

Para saber si nucleolina es redistribuida hacia CR, se pretendía hacer un ensayo de colocalización con marcadores de CR (E1B o DBP), sin embargo, debido a que todos los anticuerpos utilizados para estas proteínas provienen de ratón no pueden utilizarse juntos en el mismo ensayo. Por tanto, las imágenes obtenidas para nucleolina por IF se analizaron y compararon con la distribución de E1B (**Figura 19**).



**Figura 19.** La distribución de nucleolina en nucleoplasma es similar a la distribución de E1B-55k asociada a CR. Acercamiento a núcleos de células HFF infectadas con Ad5wt a 36hpi. En verde se muestra la distribución de nucleolina o E1B (como se indica) y en rojo la distribución de Orf3. A las imágenes se les modificaron los niveles de intensidad en Photoshop, de manera a ver sólo los sitios con la señal más intensa.

Observamos que los sitios en donde hay una mayor intensidad en la señal de nucleolina coinciden con la distribución de los sitios de mayor intensidad para E1B, sin embargo, los sitios donde se observa la mayor intensidad de nucleolina, no colocalizan con la proteína viral Orf3.

En conjunto, estos experimentos, junto con los experimentos de IP, sugieren que durante la infección, nucleolina se relocaliza hacia nucleoplasma y una fracción se detecta específicamente en los CR. El enriquecimiento de nucleolina, observado en las fracciones enriquecidas con CR, podría resultar como consecuencia de esta relocalización lo que sugiere un probable papel de nucleolina en la replicación de Ad

## 8. DISCUSIÓN

La mayoría de los virus con genoma de DNA, como los Ad, llevan a cabo su ciclo de replicación en el núcleo de la célula. Como se describió en los antecedentes, el núcleo es un organelo altamente dinámico que está organizado en regiones especializadas, no

delimitadas por membranas, llamadas suborganelos nucleares (ver sección 2.1 . Algunos de los más estudiados son el nucléolo, los Cuerpos de Cajal, los speckles y los ND10. En estos, se encuentra organizada la maquinaria celular involucrada en la expresión génica (speckles, Cuerpos de Cajal y nucleolo), así como maquinaria celular involucrada en respuesta antiviral, apoptosis y reparación de DNA (núcleolo y ND10). Durante la infección con Ad, se induce una reorganización nuclear tanto de componentes celulares como virales, que resulta en la formación de sitios específicos conocidos como “fábricas” virales o CR, en donde se producen los mensajeros virales que codifican para las proteínas estructurales, se sintetizan las copias del genoma, y se ensamblan para formar nuevos viriones.

La E1B de Ad es una proteína multifuncional implicada en diversas actividades como producir la inhibición de la respuesta celular a la infección, favorece la replicación y expresión del genoma viral, y participa en la formación adecuada de los CR. Aunque sus funciones parecen muy diferentes, recientemente se está esclareciendo que podrían regularse en los CR (ver sección 2.5 . La multifuncionalidad de la E1B, se debe a su asociación con una gran cantidad de proteínas a lo largo del ciclo de replicación viral como: PML, Daxx, p53, Mre11, AP5, Hdm2 y Ubc9 (comunicación con T. Dobner). Sin embargo, la manera en que se regulan estas interacciones, y por lo tanto, cómo se regulan sus actividades a lo largo del ciclo de replicación viral aún no se ha establecido. La E1B puede ser fosforilada y sumoilada, por tanto, entender cómo sus modificaciones post-traduccionales pueden definir sus actividades es de gran interés para esclarecer su regulación durante el ciclo de replicación viral. E1B, participa en el reclutamiento de diversas proteínas hacia los CR y tiene un papel en la formación eficiente de estos sitios, y por lo tanto, un efecto en los procesos que ahí se regulan, tales como la replicación eficiente del DNA y la exportación selectiva de los mRNAs tardíos (ver sección 2.5 ). Queda claro la importancia del ensamblaje organizado de los CR y que por lo tanto, la reorganización de componentes del núcleo podrían ser determinantes para la inhibición de defensas celulares y la replicación eficiente del virus. Consecuentemente, el estudio de

la dinámica de formación de los CR y los componentes moleculares asociados a estas estructuras, permitirá entender el nexo entre su formación y las funciones asociadas a E1B.

Como se describió en antecedentes, el requerimiento principal para el exporte selectivo de los mRNAs virales tardíos, es que su activación transcripcional se dé en la fase tardía (ver sección 1.7.C.1 . La organización de los genes de Ad en unidades transcripcionales le permite regular múltiples genes con un mismo elemento transcripcional y ha evolucionado a tener una red compleja de regulaciones temporales para la expresión de sus genes (ver sección 1.7.A . Durante la fase temprana, la activación transcripcional mediada por E1A permite la expresión de los genes codificados en la unidad E2, necesarios para la replicación del genoma viral. Esto permite el inicio de la replicación del DNA viral, marcando la transición a la fase tardía. La replicación como tal del DNA viral activa en *cis* al promotor ML, bajo el cual están regulados las cinco familias de mRNA virales tardíos. Su expresión sigue una cinética compleja, por el aumento en sus requerimientos de procesividad transcripcional y de procesamiento postranscripcional (ver sección 1.7.B ). La familia L1 tiene una expresión basal desde la fase temprana, pero no es hasta que la proteína temprana retardada IVa2 se expresa e inicia la replicación del DNA viral, que se activa un promotor interno de L4. Este promotor, regula la expresión de dos productos que activan finalmente al promotor ML en su totalidad, resultando en la expresión de las cinco familias de mensajeros tardíos (L1-L5). De esta forma, los mensajeros de L2 no se expresan hasta que la fase tardía está completamente establecida.

Los resultados del análisis de la distribución del mRNA de L2 procesado, por hibridación *in situ* a diferentes tiempos post-infección, mostraron que este mRNA tiene una distribución dinámica y que los cambios en su distribución intra-nuclear se relacionan con el progreso de la infección y la dinámica de formación de los CR, utilizando a la proteína DBP como marcador (**Figura 11** y **Figura 13**). Los ensayos de microscopía de fluorescencia con células infectadas, que no están sincronizadas, permiten analizar diferentes poblaciones celulares

en una misma muestra, por lo que se logró observar la localización de DBP y del mRNA de L2 en diferentes estadios del ciclo replicativo del virus. A las 24 hpi, tiempo en el que inicia la replicación del DNA viral, DBP se observó en al menos tres distribuciones diferentes dentro del núcleo: i) una distribución difusa y homogénea; ii) numerosos puntos; y iii) estructuras semi-anulares, en aparente transición entre puntos y anillos. A las 28 hpi, la distribución de DBP aparece todavía en estructuras semi-anulares, pero para esta etapa se encuentra mayoritariamente en anillos, aunque aún se observan algunos puntos. Finalmente, a las 36 hpi, DBP se observa ocupando la mayor parte del núcleo, con una señal más intensa y formando una especie de red anular, que parecería ser resultado del crecimiento y fusión entre anillos formados en la etapa anterior (**Figura 13**, comparar D-F con G-I). Estos resultados, concuerdan con la distribución de DBP en células transformadas, en las que desde la fase temprana la proteína se acumula en el núcleo mostrando una distribución difusa; posteriormente, en la fase tardía, se acumula en puntos nucleares, y finalmente, estos puntos se agrandan formando los anillos característicos de los CR. La distribución difusa de DBP en el núcleo no se ha asociado aún a ningún evento de replicación del genoma viral, y se sabe que no es hasta que inicia su acumulación en puntos, que el DNA viral comienza a sintetizarse en la periferia de estos sitios [49]. Concordando con la dinámica de distribución de DBP, la señal para la sonda del mRNA de L2 procesado, se observó en el núcleo sólo en células en las que DBP está distribuida en puntos nucleares; es decir, en sitios en los que la replicación del genoma viral debe haber iniciado. El análisis de la distribución de L2 procesado muestra inicialmente la aparición de pequeños *foci* (puntos) adyacentes a los puntos de DBP, y conforme avanza el crecimiento de los CR, los *foci* de L2 aumentan tanto en número como en tamaño, pero se mantienen adyacentes o en la periferia de los sitios en los que se localiza DBP. En los tiempos tardíos más avanzados, en los que DBP se observa como anillos o como una red anular, los *foci* de L2 parecen rodear los sitios de acumulación de DBP y los CR se observan con mayor frecuencia cercanos a la periferia nuclear. Los resultados con L2 concuerdan con lo esperado, debido al tiempo en el que ocurre la

activación del promotor ML, que como se describió arriba, requiere del inicio de la replicación del genoma viral. Estos resultados muestran que el análisis de la distribución de los mRNA, por FISH, combinado con el de la distribución de proteínas virales o celulares, por inmunofluorescencia, permiten estudiar con detalle la dinámica de distribución de las diferentes especies de mRNA virales, asociados a los CR, a lo largo de la fase tardía del ciclo de replicación. Utilizando esta estrategia, se continuará el análisis de la distribución de los mRNAs virales, para comparar la organización de las formas procesadas (mRNA) y no procesadas (pre-mRNA), en células infectadas con Ad WT y mutantes con alteraciones en la proteína E1B. Estos experimentos nos permitirán aprender sobre el papel de E1B en la organización de los CR y el impacto de esta organización en la exportación selectiva de los mRNA virales tardíos.

Como se discutió anteriormente, estudiar la composición de los CR, nos permitiría entender qué actividades se están regulando en estos sitios, qué papel tiene E1B en el reclutamiento de componentes hacia estos, así como que tipo de modificaciones post-traduccionales tiene E1B cuando se asocia a ellos, entre otras cosas. Hasta ahora, no se ha hecho ningún análisis que permita analizar su composición por ensayos bioquímicos. La información que conocemos de los CR, hasta ahora, se ha obtenido a partir de experimentos de microscopía. A pesar de ser muy útil, este tipo de ensayos nos limita a tener que saber qué proteínas buscar y el número de proteínas que se pueden analizar por ensayo. Partiendo de la información que conocemos sobre las actividades y moléculas asociadas a los CR, así como del tamaño de estos, sabemos que son estructuras similares en densidad y tamaño al nucléolo celular. Ya se ha reportado previamente un procedimiento para aislar nucléolos, basado en su tamaño y densidades. Por lo tanto, decidimos que utilizando una estrategia similar, podríamos obtener fracciones bioquímicamente definidas, enriquecidas con los CR, debe ser posible. Por ello, montamos condiciones para aislar CR por este método, en la escala y las condiciones celulares de nuestro laboratorio.

Los resultados del análisis de fracciones sub-celulares correspondientes a los CR por microscopía de contraste de fases, mostraron el enriquecimiento de estructuras con los tamaños esperados para nucléolos en células no infectadas, como nucléolos y CR en células infectadas. Las estructuras obtenidas a partir de células no infectadas correspondieron, en tamaño y forma, a los nucléolos [66], a diferencia de las fracciones obtenidas de células infectadas, en donde encontramos consistentemente un mayor número de estructuras similares en tamaño, pero claramente diferentes en morfología (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Previamente, se ha reportado que a tiempos tardíos del ciclo de replicación de Ad, el nucléolo es desplazado hacia la periferia nuclear junto con la cromatina [67-68], pero no se ha reportado un cambio en su morfología. No sabemos si las estructuras observadas en células infectadas corresponden a CR, o a nucléolos con una morfología alterada. Sin embargo, se esperaría ver un aumento en el número de estructuras dentro del núcleo durante la infección, debido a la aparición de los CR. Será interesante estudiar estas estructuras aisladas, por microscopía confocal y electrónica, para hacer un análisis detallado de su organización.

Los resultados del análisis de las fracciones sub-celulares por SDS-PAGE, mostraron diferencias en el patrón de bandas entre las fracciones aisladas y el enriquecimiento de bandas específicas. Esto es lo que se esperaría al favorecer el enriquecimiento de sólo ciertos componentes nucleares durante el fraccionamiento. Además, se observó claramente un cambio en el patrón de proteínas en las fracciones nucleares correspondientes a tiempos tardíos avanzados de la infección (ver **Figura 17**; panel A, carriles nlo y LN WT 36). Como se describió en la introducción, en la fase tardía se establecen dos mecanismos que favorecen la expresión casi exclusiva de los genes virales; por una parte, las proteínas E1B y Orf6 bloquean la exportación de la mayoría de los mRNA celulares y permiten la salida eficiente de los mRNA virales a citoplasma; por otra, los mRNA virales son también traducidos de forma selectiva, ya que se inhibe la traducción de mRNA dependiente de Cap y los mRNA virales son traducidos por un mecanismo de “shunting”. Consecuentemente, el cambio en el patrón de bandas

observado puede relacionarse al establecimiento de la expresión selectiva de los genes virales tardíos.

Los resultados del análisis de las fracciones sub-celulares por WB, mostraron el enriquecimiento de nucleolina (utilizado en estos ensayos como marcador de nucléolo) en la fracción nucleolar. Estos datos indican que el procedimiento que adaptamos para aislar una fracción enriquecida con estructuras de dimensiones y composición similares a nucléolo funciona (ver **Figura 15**; panel A, mock). El mismo análisis, a partir de células infectadas a tiempos tardíos avanzados, mostró un aumento general de nucleolina en todas las fracciones; sin embargo, el enriquecimiento de nucleolina en la fracción correspondiente a nucléolo se mantuvo, indicando un aumento de los niveles de nucleolina total durante la infección con Ad., tal vez porque la proteína es estabilizada o porque aumenta su expresión (ver más adelante resultados de inmunofluorescencia con nucleolina). Por otro lado, el enriquecimiento de las proteínas E1B y DBP (las cuales funcionan como los principales marcadores de los centros de replicación), mostró que el mismo procedimiento utilizado para obtener nucléolos, nos permite también obtener los CR a partir de células infectadas con Ad5 (ver **Figura 15**, panel B). Adicionalmente, los resultados del análisis de las fracciones enriquecidas con CR, por PCR, confirmaron la presencia de DNA viral, apoyando la conclusión que obtuvimos fracciones enriquecidas con estos dominios virales. Además, los ensayos de PCR, a partir de inmunoprecipitaciones de DBP, mostraron que la DBP está asociada a DNA, lo que sugiere que las estructuras aisladas probablemente se mantienen como complejos en el procedimiento. Sin embargo, el hecho de que el DNA viral también inmunoprecipite con la nucleolina, demuestra su asociación con componentes de CR, durante la infección.

De manera interesante, se observó también un enriquecimiento de una banda de E1B que migra por arriba de los 55kDa, esta se localiza alrededor de los 75kDa y se ha descrito que corresponde a la forma sumoilada de E1B (ver **Figura 15** y **Figura 16**; panel B, E1B). Esta modificación aumenta la frecuencia con la que E1B se asocia a ND10 y a los CR, y está

ligada a la actividad transformante de E1B [69]. Continuar el análisis de estas fracciones, puede dar información sobre la regulación post-traducciona de E1B y las funciones asociadas a los CR.

Los resultados del análisis por WB de IP con anti-nucleolina y anti-DBP a partir de las fracciones enriquecidas con nucléolos y CR, sugieren la asociación de nucleolina con DBP (ver **Figura 16**, DBP). Al IP con anti-DBP se logró detectar nucleolina, sin embargo al IP con anti-nucleolina no se detectó DBP. Esto podría explicarse si sólo una fracción de nucleolina se asocia a DBP, de esta forma al IP con anti-nucleolina, se estaría bajando nucleolina no asociada a DBP y tal vez asociada, pero no se lograría detectar. Esto podría corroborarse utilizando anticuerpos contra diferentes epítopes de nucleolina. Los resultados del análisis de distribución de nucleolina por IF's muestran una redistribución de nucleolina, dependiente de E1B (ver **Figura 18**, Hr6), de nucléolo hacia una distribución más nucleoplásmica. Sin embargo, los sitios de mayor intensidad de nucleolina tienen una distribución de red anular, muy similar a la conocida para DBP y E1B en CR (ver **Figura 19**). Esto sugiere que nucleolina podría estar siendo reclutada hacia los CR durante la infección, y concuerda con los ensayos de IP, mostrando que una fracción de nucleolina está difusa en nucleoplasma, pero otra, se encuentra asociada a CR y por lo tanto se detecta al IP con anti-DBP. Ensayos de colocalización por IF, entre DBP y nucleolina son necesarios para confirmar su relocalización a CR.

Nucleolina es una proteína de nucléolo, encargada de la transcripción y procesamiento de rRNAs para la biogénesis de ribosomas. En nuestros análisis de WB con células no infectadas, el anticuerpo contra nucleolina detectó un doblete en la fracción enriquecida con nucléolos. Sin embargo, en células infectadas a tiempos tardíos, además de aumentar la señal, se observa la aparición de un triplete y lo que parecería ser un producto de proteólisis. Anteriormente se ha reportado un producto de proteólisis en células infectadas con Ad5, sin embargo, no muestran imágenes, ni reportan el peso molecular de este producto [65]. Es interesante recalcar que el producto de proteólisis sólo se observa

en la fracción correspondiente a CR y nucléolo. Nucleolína es regulada por fosforilación y glicosilación, además, es una proteína de respuesta a estrés genotóxico. Bajo estrés, nucleolina se asocia con p53, resultando en su movilización hacia nucleoplasma. Esta asociación es dependiente de la activación de Hsp70 y la proteína de replicación A (RPA), que se activa por daño a DNA de cadena sencilla [70-72]. La aparición de un triplete, podría deberse a diferentes estados modificados de la proteína. No podemos concluir cuál es el mecanismo por el cual nucleolina se relocaliza. Sin embargo, sabemos que es dependiente de E1B, al igual que la redistribución de p53 hacia CR, sugiriendo un posible mecanismo en el que el complejo p53-nucleolina sea relocalizado en conjunto a estos sitios de forma dependiente de E1B. En contraste con nuestros resultados, se ha reportado que la proteína estructural pV induce la relocalización de nucleolina hacia el citoplasma [65]. Sin embargo, estos experimentos se hicieron con transfecciones, en un contexto fuera de la infección y nuestros experimentos no nos permiten concluir las diferencias en relocalización a nucleoplasma, y no citoplasma. También se ha reportado la inhibición del procesamiento de rRNAs desde la fase temprana del ciclo replicativo de Ad5. Esto muestra que en la infección se altera tanto la composición como en las funciones asociadas a este organelo nuclear. Estos resultados en conjunto, apoyan nuevamente el papel de E1B en la redistribución de componentes hacia los CR.

En este trabajo, se estableció por primera vez, un método que permite aislar fracciones enriquecidas con los CR. El establecimiento de esta metodología permite analizar la composición de los CR (por ensayos proteómicos y genómicos) y establecer un ensayo bioquímico para medir directamente el papel de las modificaciones postraduccionales de E1B, sobre sus actividades, y su efecto sobre el reclutamiento de cada una de las moléculas que participan en CR. Por otro lado, se montaron condiciones para el análisis visual, por hibridación *in situ* en células HFF de mRNAs virales, lo que nos permitirá posteriormente hacer un análisis de la distribución mRNAs virales procesados y no procesados, en diferentes tiempos del ciclo replicativo y con diferentes mutantes de E1B. Continuar con el uso de estas herramientas en conjunto, permitirá dar una gran cantidad

de información sobre la relación entre la formación de CR y sus componentes, el procesamiento de mRNAs virales y el estado de E1B durante la infección.

## 9. CONCLUSIONES

- Se montaron las condiciones para los experimentos de hibridación *in situ* en células HFF.
  - En estos ensayos, se observó la distribución del mensajero de L2 procesado junto a los CR, marcados con DBP.
  - En tiempos tempranos, L2 P, se observa como *foci* adyacentes a los sitios donde comienza la nucleación de DBP.
  - Conforme avanza la formación de los CR, L2 P se distribuye alrededor de DBP.
  - A tiempos tardíos, la distribución de L2P y DBP se observa con mayor frecuencia hacia periferia nuclear.
- Por microscopía de luz, en células infectadas con Ad5 WT, se observó un cambio morfológico intra-nuclear: y la presencia de estructuras, comparables con nucleolos en tamaño, pero con morfología distinta y en mayor número por célula.
- Se estandarizó la obtención de fracciones enriquecidas con marcadores de CR en células HFF, por medio de fraccionamiento celular y centrifugación con colchones de sacarosa.
- Se observó por IF y WB, un aumento de nucleolina en células infectadas con Ad5 WT.
- Por inmunoprecipitación, se observó una asociación de nucleolina con DBP.
- En la infección con Ad5, se observó por IF la redistribución de nucleolina de nucléolo hacia nucleoplasma y posiblemente hacia CR.
- La redistribución de nucleolina es dependiente de la presencia de E1B.

## 10. REFERENCIAS

1. Berk, A.J., *Adenoviridae: The viruses and their replication*, in *Virology*. 2006. p. 2355-2394.
2. Rosen, L., *A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses*. *Am J Hyg*, 1960. **71**: p. 120-8.
3. Enders, J.F., et al., *Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses*. *Science*, 1956. **124**(3212): p. 119-20.
4. Mautner, V., V. Steinhorsdottir, and A. Bailey, *Enteric adenoviruses*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1995. **199 ( Pt 3)**: p. 229-82.

5. Aoki, K., et al., *Clinical features of adenoviral conjunctivitis at the early stage of infection*. Jpn J Ophthalmol, 2011. **55**(1): p. 11-5.
6. Endter, C. and T. Dobner, *Cell transformation by human adenoviruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 2004. **273**: p. 163-214.
7. Nevels, M. and T. Dobner, *Determination of the transforming activities of adenovirus oncogenes*. Methods Mol Med, 2007. **131**: p. 187-95.
8. Nevins, J.R., *Processing of late adenovirus nuclear RNA to mRNA. Kinetics of formation of intermediates and demonstration that all events are nuclear*. J Mol Biol, 1979. **130**(4): p. 493-506.
9. Russell, W.C., *Adenoviruses: update on structure and function*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 1): p. 1-20.
10. Shenk, T.E., *Adenoviridae: The Viruses and Their Replication*, in *Virology*, N. Fields B., Editor. 2001. p. 2265-2291.
11. Jane Flint, P.D., *Organization of the Adenoviral Genome*, in *Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy*. 1999, R.G. Landes Company. p. 17-30.
12. Jones, N.C., *Transformation by the human adenoviruses*. Semin Cancer Biol, 1990. **1**(6): p. 425-35.
13. Debbas, M. and E. White, *Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B*. Genes Dev, 1993. **7**(4): p. 546-54.
14. Cuconati, A., et al., *Bak and Bax function to limit adenovirus replication through apoptosis induction*. J Virol, 2002. **76**(9): p. 4547-58.
15. White, E., *Regulation of the cell cycle and apoptosis by the oncogenes of adenovirus*. Oncogene, 2001. **20**(54): p. 7836-46.
16. Nevels, M., et al., *The adenovirus E4orf6 protein can promote E1A/E1B-induced focus formation by interfering with p53 tumor suppressor function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(4): p. 1206-11.
17. Harada, J.N., et al., *Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery*. J Virol, 2002. **76**(18): p. 9194-206.
18. Querido, E., et al., *Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex*. Genes Dev, 2001. **15**(23): p. 3104-17.
19. Woo, J.L. and A.J. Berk, *Adenovirus ubiquitin-protein ligase stimulates viral late mRNA nuclear export*. J Virol, 2007. **81**(2): p. 575-87.
20. Sarnow, P., et al., *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, 1984. **49**(3): p. 692-700.
21. Martin, M.E. and A.J. Berk, *Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3146-54.
22. Yew, P.R., X. Liu, and A.J. Berk, *Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53*. Genes Dev, 1994. **8**(2): p. 190-202.
23. Dobner, T., et al., *Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor*. Science, 1996. **272**(5267): p. 1470-3.
24. Mathew, S.S. and E. Bridge, *The cellular Mre11 protein interferes with adenovirus E4 mutant DNA replication*. Virology, 2007. **365**(2): p. 346-55.
25. Schwartz, R.A., et al., *Distinct requirements of adenovirus E1b55K protein for degradation of cellular substrates*. J Virol, 2008. **82**(18): p. 9043-55.

26. Berk, A.J., *Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus*. *Oncogene*, 2005. **24**(52): p. 7673-85.
27. Gonzalez, R., et al., *Adenovirus E1B 55-kilodalton protein is required for both regulation of mRNA export and efficient entry into the late phase of infection in normal human fibroblasts*. *J Virol*, 2006. **80**(2): p. 964-74.
28. Pilder, S., J. Logan, and T. Shenk, *Deletion of the gene encoding the adenovirus 5 early region 1b 21,000-molecular-weight polypeptide leads to degradation of viral and host cell DNA*. *J Virol*, 1984. **52**(2): p. 664-71.
29. Leppard, K.N. and T. Shenk, *The adenovirus E1B 55 kd protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism*. *EMBO J*, 1989. **8**(8): p. 2329-36.
30. Gabler, S., et al., *E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs*. *J Virol*, 1998. **72**(10): p. 7960-71.
31. Gonzalez, R.A. and S.J. Flint, *Effects of mutations in the adenoviral E1B 55-kilodalton protein coding sequence on viral late mRNA metabolism*. *J Virol*, 2002. **76**(9): p. 4507-19.
32. Blobel, G., *Gene gating: a hypothesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(24): p. 8527-9.
33. Yueh, A. and R.J. Schneider, *Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA*. *Genes Dev*, 2000. **14**(4): p. 414-21.
34. Xi, Q., R. Cuesta, and R.J. Schneider, *Tethering of eIF4G to adenoviral mRNAs by viral 100k protein drives ribosome shunting*. *Genes Dev*, 2004. **18**(16): p. 1997-2009.
35. Rahman, A., et al., *Effect of single-base substitutions in the central domain of virus-associated RNA I on its function*. *J Virol*, 1995. **69**(7): p. 4299-307.
36. Spector, D.L., *Nuclear domains*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 16): p. 2891-3.
37. O'Brien, T.P., et al., *Genome function and nuclear architecture: from gene expression to nanoscience*. *Genome Res*, 2003. **13**(6A): p. 1029-41.
38. Leung, A.K., et al., *Bioinformatic analysis of the nucleolus*. *Biochem J*, 2003. **376**(Pt 3): p. 553-69.
39. Wendy Bickmore, P.D., Francois-Michel Boisvert, M.Sc., Stephanie, Cliff, B.Sc., Jonathan Chubb, Ph.D., Graham, Dellaire, Ph.D., Nick Gilbert, Ph.D., Jeremy Sanford, Ph.D., Heidi G.E. Sutherland, Ph.D. *Nuclear Protein Database 2001-2002 07/13/200 [cited 2008]*.
40. Lamond, A.I. and D.L. Spector, *Nuclear speckles: a model for nuclear organelles*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(8): p. 605-12.
41. Spector, D.L. and A.I. Lamond, *Nuclear speckles*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. **3**(2).
42. Misteli, T., *Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression*. *Science*, 2001. **291**(5505): p. 843-7.
43. Borden, K.L., *Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(15): p. 5259-69.
44. Carvalho, T., et al., *Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies*. *J Cell Biol*, 1995. **131**(1): p. 45-56.
45. Bridge, E., et al., *Nuclear organization of splicing small nuclear ribonucleoproteins in adenovirus-infected cells*. *J Virol*, 1993. **67**(10): p. 5792-802.
46. Aspegren, A. and E. Bridge, *Release of snRNP and RNA from transcription sites in adenovirus-infected cells*. *Exp Cell Res*, 2002. **276**(2): p. 273-83.
47. Rebelo, L., et al., *The dynamics of coiled bodies in the nucleus of adenovirus-infected cells*. *Mol Biol Cell*, 1996. **7**(7): p. 1137-51.

48. Puvion-Dutilleul, F., et al., *Rearrangements of intranuclear structures involved in RNA processing in response to adenovirus infection*. J Cell Sci, 1994. **107 ( Pt 6)**: p. 1457-68.
49. Pombo, A., et al., *Adenovirus replication and transcription sites are spatially separated in the nucleus of infected cells*. Embo J, 1994. **13(21)**: p. 5075-85.
50. Chang, L.S. and T. Shenk, *The adenovirus DNA-binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters*. J Virol, 1990. **64(5)**: p. 2103-9.
51. Bridge, E., et al., *Adenovirus early region 4 and viral DNA synthesis*. Virology, 1993. **193(2)**: p. 794-801.
52. Bridge, E., et al., *Dynamic organization of splicing factors in adenovirus-infected cells*. J Virol, 1995. **69(1)**: p. 281-90.
53. Reed, R., *Coupling transcription, splicing and mRNA export*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15(3)**: p. 326-31.
54. Cheng, C.Y., et al., *The E4orf6/E1B55K E3 ubiquitin ligase complexes of human adenoviruses exhibit heterogeneity in composition and substrate specificity*. J Virol, 2011. **85(2)**: p. 765-75.
55. Liu, Y., A. Shevchenko, and A.J. Berk, *Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex*. J Virol, 2005. **79(22)**: p. 14004-16.
56. Cardoso, F.M., et al., *An early function of the adenoviral E1B 55 kDa protein is required for the nuclear relocalization of the cellular p53 protein in adenovirus-infected normal human cells*. Virology, 2008. **378(2)**: p. 339-46.
57. Babiss, L.E., H.S. Ginsberg, and J.E. Darnell, Jr., *Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport*. Mol Cell Biol, 1985. **5(10)**: p. 2552-8.
58. S. J. Flint, R.A.G., *Regulation of mRNA Production by the Adenoviral E1B-55kDa and E4 Orf6 Proteins*, in *Regulation of mRNA Production*. p. 287-322.
59. Yatherajam, G., W. Huang, and S.J. Flint, *Export of adenoviral late mRNA from the nucleus requires the Nxf1/Tap export receptor*. J Virol, 2011. **85(4)**: p. 1429-38.
60. Blackford, A.N. and R.J. Grand, *Adenovirus E1B 55-kilodalton protein: multiple roles in viral infection and cell transformation*. J Virol, 2009. **83(9)**: p. 4000-12.
61. Kindsmuller, K., et al., *Intranuclear targeting and nuclear export of the adenovirus E1B-55K protein are regulated by SUMO1 conjugation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104(16)**: p. 6684-9.
62. Muller, S. and T. Dobner, *The adenovirus E1B-55K oncoprotein induces SUMO modification of p53*. Cell Cycle, 2008. **7(6)**: p. 754-8.
63. Muramatsu M, S., K., and Busch, H., *Quantitative aspects of isolation of nucleoli of the Walker carcinosarcoma and liver of the rat*. H. Cancer Res., 1963. **25**: p. 693-697.
64. Wu, B., C. Hunt, and R. Morimoto, *Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70*. Mol Cell Biol, 1985. **5(2)**: p. 330-41.
65. Matthews, D.A., *Adenovirus protein V induces redistribution of nucleolin and B23 from nucleolus to cytoplasm*. J Virol, 2001. **75(2)**: p. 1031-8.
66. Boisvert, F.M., et al., *The multifunctional nucleolus*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8(7)**: p. 574-85.
67. Besse, S. and F. Puvion-Dutilleul, *High resolution localization of replicating viral genome in adenovirus-infected HeLa cells*. Eur J Cell Biol, 1994. **63(2)**: p. 269-79.

68. Besse, S. and F. Puvion-Dutilleul, *Compartmentalization of cellular and viral DNAs in adenovirus type 5 infection as revealed by ultrastructural in situ hybridization*. Chromosome Res, 1994. **2**(2): p. 123-35.
69. Endter, C., et al., *SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11312-7.
70. Daniely, Y., D.D. Dimitrova, and J.A. Borowiec, *Stress-dependent nucleolin mobilization mediated by p53-nucleolin complex formation*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(16): p. 6014-22.
71. Kim, K., et al., *Novel checkpoint response to genotoxic stress mediated by nucleolin-replication protein a complex formation*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(6): p. 2463-74.
72. Lo, S.J., C.C. Lee, and H.J. Lai, *The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings*. Cell Res, 2006. **16**(6): p. 530-8.

## 11. MATERIAL SUPLEMENTARIO

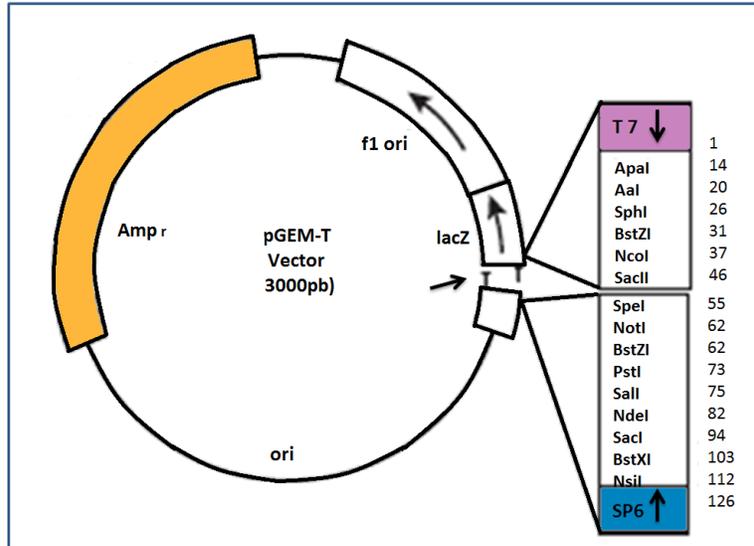
### 11.1 Generación de sondas para FISH

#### 11.1.A Generación de cDNA por RT-PCR.

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.a**, se muestran los extractos de RNA total a partir de HFFs, infectadas y no infectadas con Ad5, que se usaron como moldes para las reacciones de retrotranscripción. El RNA proveniente de HFFs no infectadas, se usó para la producción de cDNA de los mensajeros de ACTB. El RNA proveniente de HFFs infectadas, se usó como templado para producir los cDNA de L2 y el de Hsp70, ya que se ha reportado un aumento en el mRNA de HSPA1A en la infección con Ad5 [64]. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.b**, se muestra el cDNA resultante de las reacciones de retrotranscripción (el tamaño de producto esperado para cada sonda, se muestran en la **Tabla III**

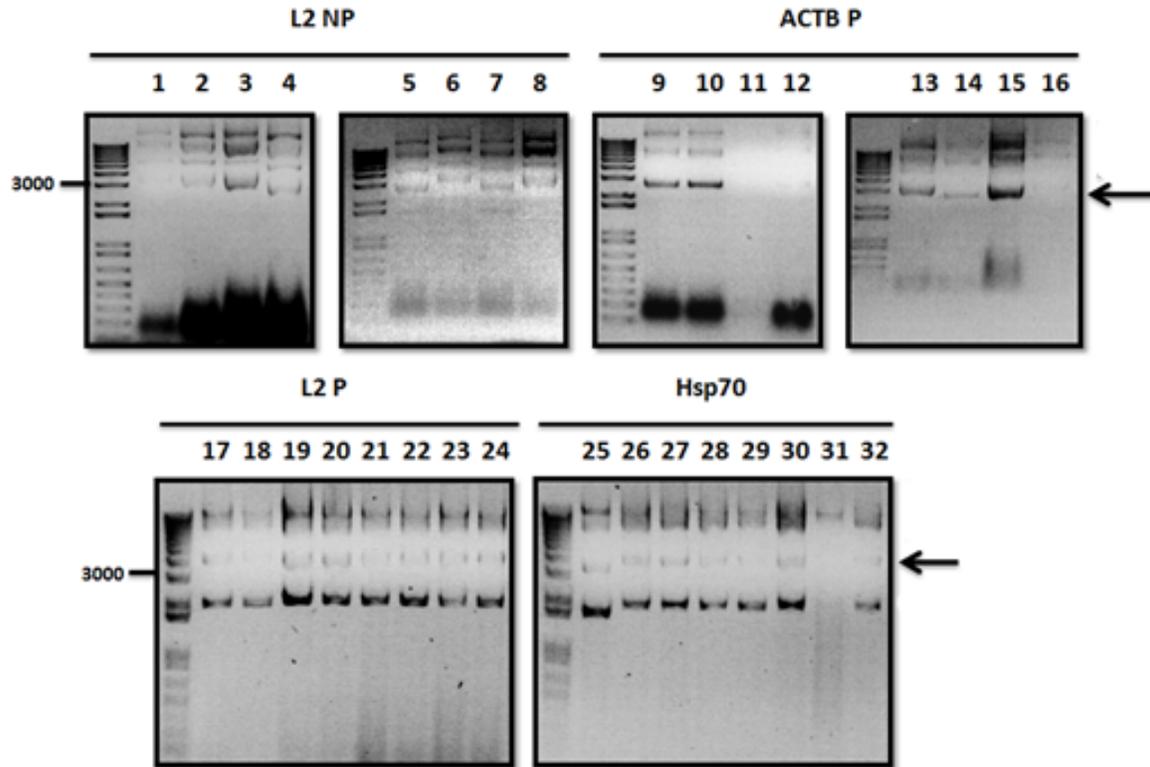
#### 11.1.B Clonación de los productos de RT-PCR.

Los productos de PCR se ligaron en el plásmido pGEM-T easy**Figura 13**, que es un plásmido linearizado con secuencias T en los extremos 3', en el sitio de clonación. Esto permite que la clonación sea mucho más eficiente, debido a que los productos de PCR de la polimerasa Taq, tienen extremos A sobresalientes. Además, flanqueando el sitio de ligación, el plásmido tiene las secuencias de los promotores para las RNA polimerasas T7 y SP6 (ver **Figura S2**).



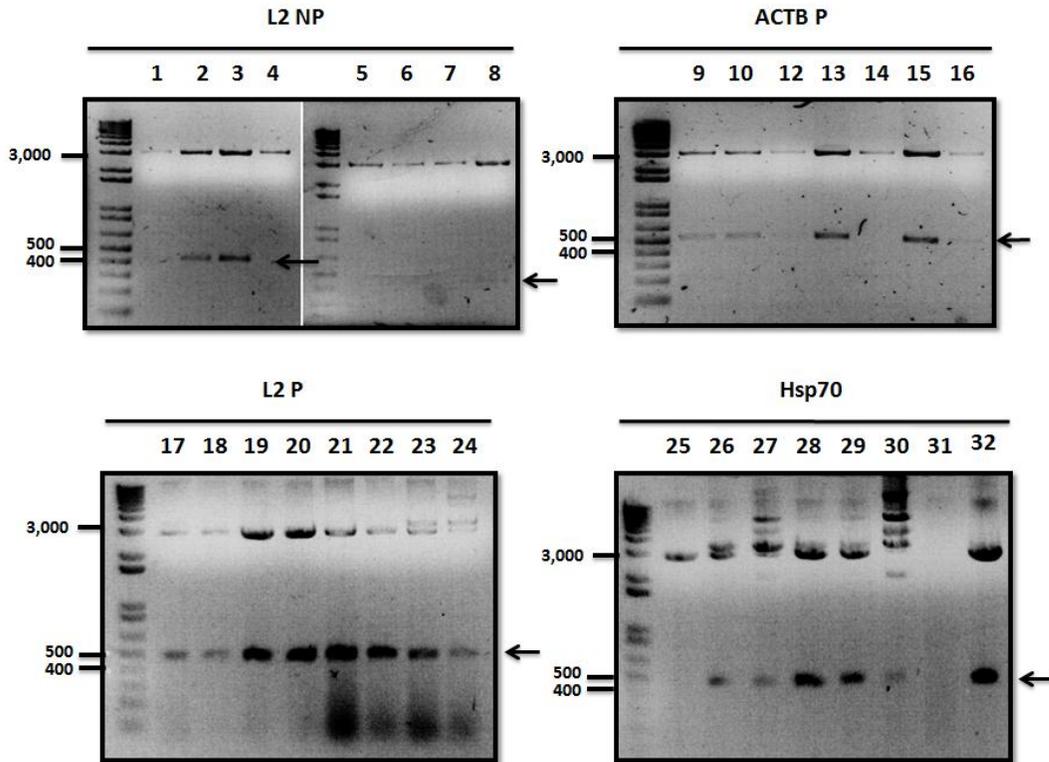
**Figura S2.** Esquema del plásmido pGEM-T easy. Con una flecha se indica el sitio de ligación con T-3' sobresalientes en la región múltiple de clonación, la cual está flanqueada por los promotores T7 y SP6. En amarillo se muestra el cassette de resistencia a ampicilina.

Posteriormente, con cada construcción, se hizo una transformación y minipreps como se describe en materiales y métodos (**Figura S3**).



**Figura S3.** Extracción de DNA plasmídico (minipreps). Geles de agarosa 1% con DNA plasmídico, obtenido de colonias diferentes.

En la **Figura S4**, se muestran los productos generados de la digestión de cada plásmido, con los que se verificó la inserción de los fragmentos de interés (entre 400-500pb), utilizando enzimas de digestión que escinden el fragmento completo de cada plásmido. Estas construcciones, positivas para los insertos, se utilizaron como plantados para la síntesis de las sondas de RNA por transcripción *in vitro*, como se describe más adelante.



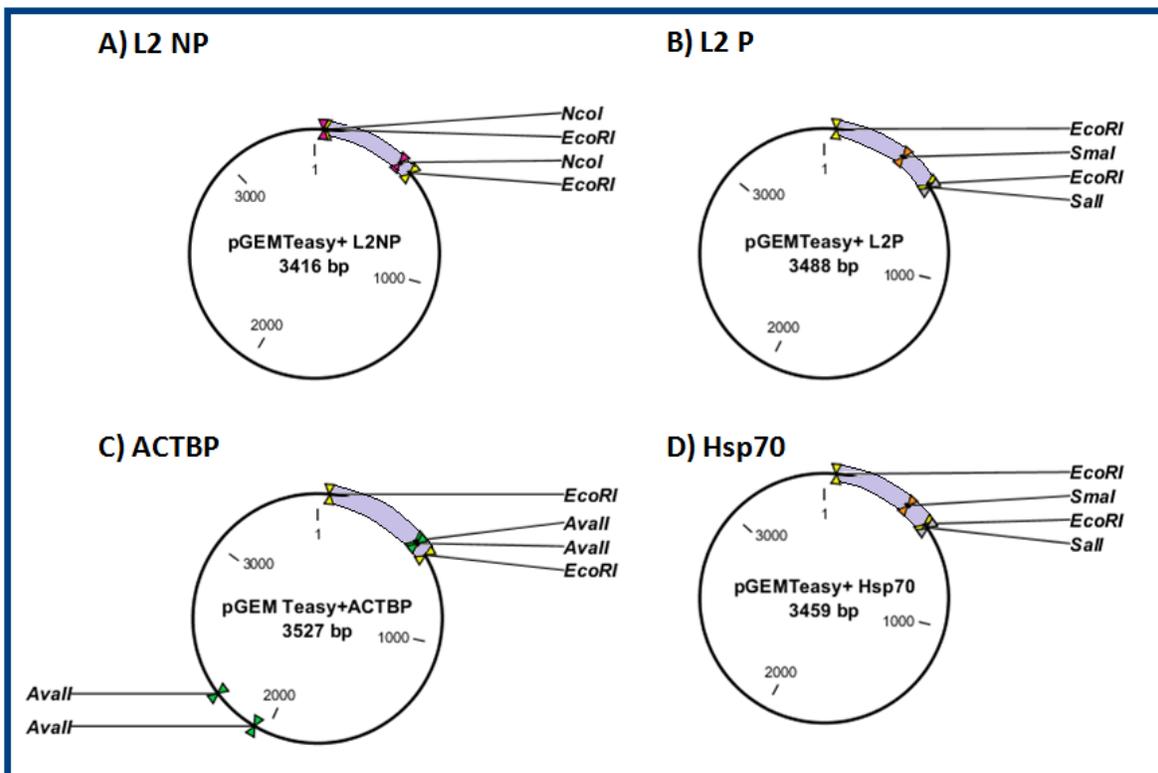
**Figura S4. Verificación del inserto.** Geles de agarosa 1% con extractos de DNA plasmídico digeridos con EcoRI. Las flechas indican las bandas esperadas para los plásmidos que contienen el inserto.

### 11.1 .C Orientación de los insertos en las construcciones para FISH.

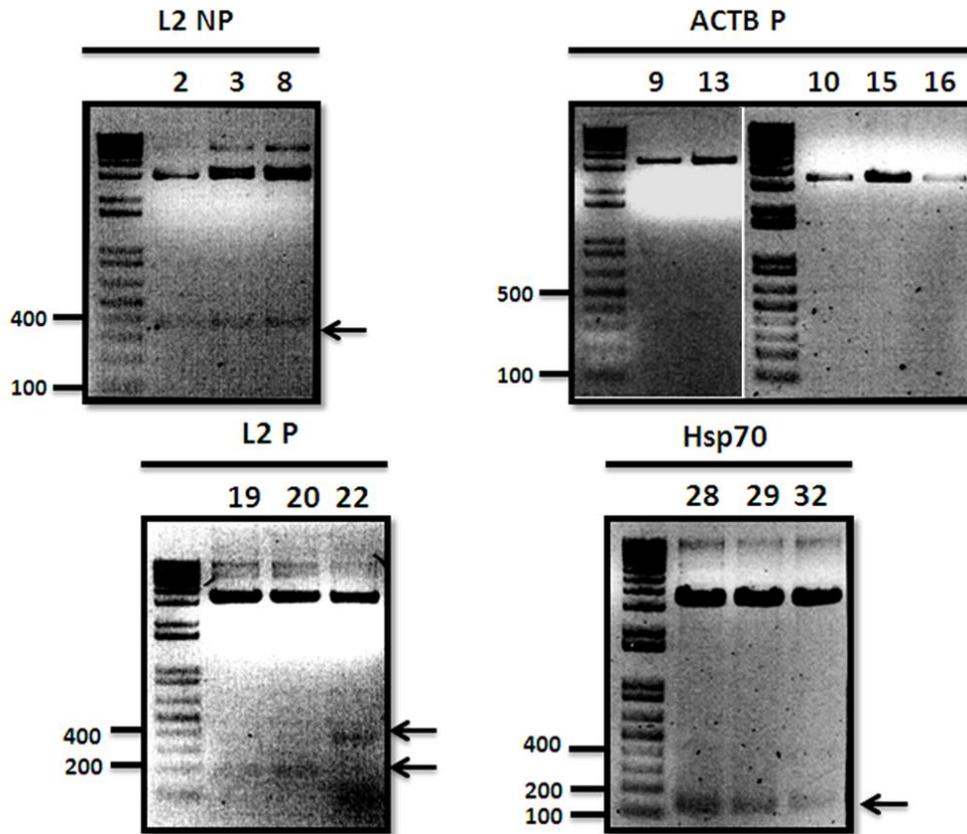
Para verificar que los plásmidos aislados tuvieran el inserto y determinar la dirección del mismo, se hicieron digestiones con enzimas de restricción para escindir el fragmento insertado y verificar que concuerde en tamaño. Para ello, se utilizó la enzima EcoRI; los sitios de corte para esta enzima se encuentran flanqueando el sitio de clonación en el plásmido y ninguna de las secuencias insertadas tiene el sitio de reconocimiento para esta enzima. Para cada construcción se obtuvo más de una colonia transformante con el inserto (**Figura S6**).

Se seleccionaron colonias de cada construcción para verificar la orientación del inserto. Para ello, se hicieron mapas de restricción para cada inserto usando el programa CLC sequence viewer. Se escogieron enzimas que no cortan, o cortan pocas veces dentro del

plásmido, y que su sitio de corte, en la secuencia inserto, permite deducir su orientación con digestiones dobles o sencillas (**Figura S5**). Para Hsp70 y L2 P se hicieron digestiones dobles con SmaI y Sall. Las construcciones de L2 NP se trataron con una digestión sencilla usando NcoI. Finalmente, para ACTB P, se hizo una digestión doble con AvaI y Sall. La digestión con las enzimas usadas resultó en fragmentos de tamaños distintos dependiendo de la orientación de la secuencia insertada en relación al plásmido y los promotores T7 y SP6 (**Figura S6 y Tabla IV**



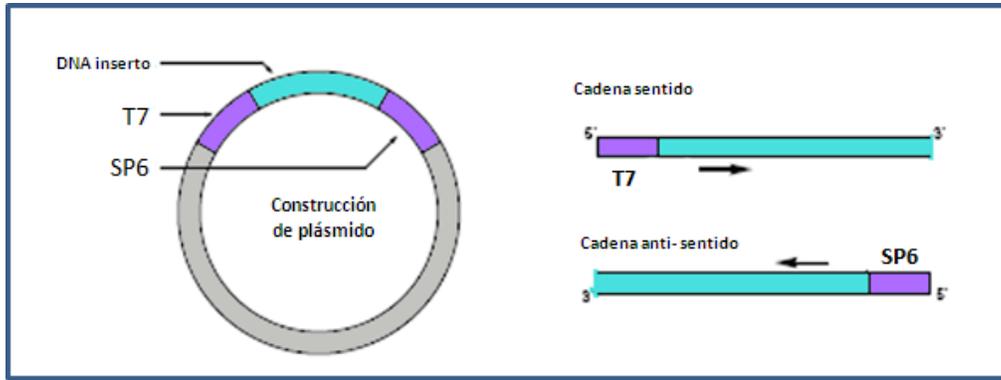
**Figura S5.** Mapas de restricción de los plásmidos pGEM-T easy con los insertos correspondientes de L2, actina y Hsp70. Se muestran los mapas de restricción para el plásmido pGEM-T easy con las secuencias insertadas para L2 no procesado, L2 procesado,  $\beta$ -actina procesada y Hsp70 (A, B, C y D, respectivamente). En cada caso se muestran los sitios de corte para EcoRI, que escinde el fragmento integrado y los sitios de corte de las enzimas usadas para ver la orientación del inserto en cada caso. En todos los casos, el inserto se muestra en la orientación 5' -> 3' (o T7-> SP6). Los mapas se hicieron con el software CLC Sequence Viewer.



**Figura S6. Orientación de los insertos en cada construcción.** Se muestran geles de agarosa 1% con el producto de la digestión para cada construcción. Las flechas indican los productos obtenidos que permiten deducir en qué sentido se ligó el inserto.

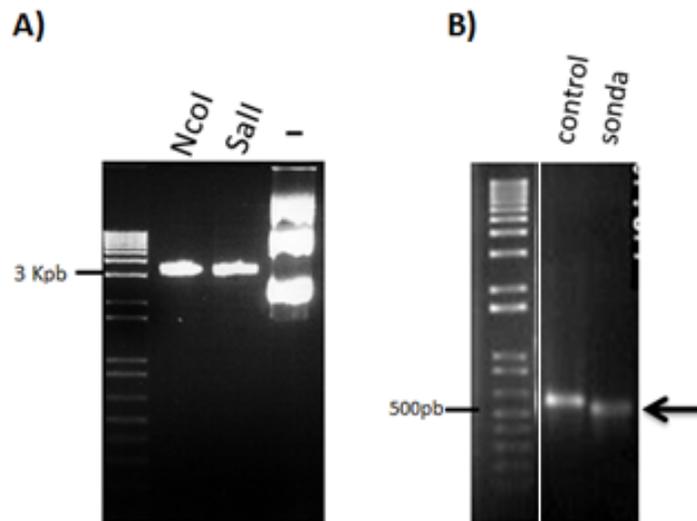
#### 11.1.D Transcripción *in vitro*.

En cada una de las construcciones, los insertos se encuentran flanqueados por los promotores de la polimerasa SP6 y T7. Esto permitió que a partir de la misma construcción se sintetizaran las sondas anti-sentido y la sonda sentido, que funciona como control negativo, dependiendo del promotor seleccionado (ver **Figura S7**). Antes de proceder con las reacciones de transcripción *in vitro*, los plásmidos fueron linearizados para asegurar el tamaño de los transcritos deseados. La linearización y purificación de los plásmidos se corroboró por geles de agarosa (**Figura 12a**).



**Figura S7. Síntesis de sonda y control.** Se representa en un esquema del plásmido pGEM-T easy con sus dos promotores, SP6 y T7, flanqueando a la secuencia que se usará como templado para sintetizar las sondas para FISH. En este caso para sintetizar la sonda (cadena anti-sentido), se usa el promotor 2, y para sintetizar la sonda control (cadena sentido) se usa el promotor 1. En ambos casos se lineariza el plásmido cortando con una enzima de restricción al final de la secuencia insertada, para evitar que se produzcan transcritos que abarquen más de la secuencia deseada.

Estos plásmidos, se utilizaron como plantados para la transcripción *in vitro*, durante la cual, se incorporó a la sonda uridina acoplada a Digoxigenina o Bromouridina (como se describe en materiales y métodos). Una vez sintetizadas las sondas, se analizaron por gel de agarosa y se determinó su concentración (**Figura S8b**).



**Figura S8. Ensayos de restricción enzimática con los plásmidos de interés y obtención de transcritos.** A) Restricción del plásmido pGEM-T easy con las enzimas de restricción NcoI (carril 2) y SalI (carril 3) en donde se observa una sola banda. En el carril 4 se muestra el plásmido no digerido. B) Transcripción *in vitro* de la sonda anti-sentido a partir del plásmido linearizado con NcoI y la RNA pol SP6 (carril 2) o de la sonda

sentido a partir del plásmido linearizado con la enzima Sall, y utilizó la RNAPol T7 (carril 3). El tamaño de los transcritos corresponde al esperado. Carril 1, marcadores de peso molecular.

## 12. TABLAS

**Tabla I**

SONDA	SECUENCIA	ORGANISMO	REFERENCIA
ACTINA PROCESADA (ACTB P)	Beta actina (gen)	Homo sapiens	NC_000007.1 3
ACTINA NO PROCESADA (ACTB NP)	Beta actina (mRNA)	Homo sapiens	168480144
LATE 2 PROCESADO (L2 P)	Genoma completo de Ad5	Adenovirus 5	56160492
LATE 2 NO PROCESADO (L2 NP)	Genoma completo de Ad5	Adenovirus 5	56160492
HEAT SHOCK 70 (Hsp70)	Proteína de choque térmico 70kDa 1A (mRNA)	Homo sapiens	194248071

**Tabla II**

Primer de ACTB NP	Secuencia (5' ->3')	Cadena en templado	Longitud	Inicio	Término	Tm	%GC
derecho	TGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCTG	positivo	24	2226	2249	60.06	58.33%
reversa	GAGGAGCAATGAT/CTAGGAGGGAAGG	Negativo	27	2723	2697	59.91	55.56%
Longitud del producto	498						

<b>Primer de ACTB P</b>	<b>Secuencia (5'-&gt;3')</b>	<b>Cadena en templado</b>	<b>Longitud</b>	<b>Inicio</b>	<b>Término</b>	<b>Tm</b>	<b>%GC</b>
derecho	TGTGCCCATCTACGAGGGGTATGC	positivo	24	570	593	60.12	58.33%
reversa	GGAGCAATGATCTTGAT/CTTCATTGTGCTG	Negativo	30	1079	1050	58.76	43.33%
Longitud del producto	510						

<b>Primer de L2 NP</b>	<b>Secuencia (5'-&gt;3')</b>	<b>Cadena en templado</b>	<b>Longitud</b>	<b>Inicio</b>	<b>Término</b>	<b>Tm</b>	<b>%GC</b>
derecho	CCTGCTGGGCGAGGAGGAGT	positivo	20	13766	13785	59.97	70.00%
reversa	GCGCCGCATAC/TAAGGGGAATACA	Negativo	24	14164	14141	58.95	54.17%
Longitud del producto	del 399						

<b>Primer de L2 P</b>	<b>Secuencia (5'-&gt;3')</b>	<b>Cadena en templado</b>	<b>Longitud</b>	<b>Inicio</b>	<b>Término</b>	<b>Tm</b>	<b>%GC</b>
derecho	ACAGTCGCAAG/ATGCGGCG	positivo	19	113	131	58.27	63.16%
reversa	AGCGAGCGCGACACCATCAC	Negativo	20	581	562	60.11	65.00%
Longitud del producto	469						

<b>Primer de Hsp70</b>	<b>Secuencia (5'-&gt;3')</b>	<b>Cadena en templado</b>	<b>Longitud</b>	<b>Inicio</b>	<b>Término</b>	<b>Tm</b>	<b>%GC</b>
derecho	TCACCAACGACAAGGGCCGC	positivo	20	1751	1770	59.90	65.00%
reversa	AAACAGCAATCTTGAAAGCCCC	Negativo	24	2192	2169	58.90	50.00%
Longitud del producto	del 442						

**Tabla III**

<b>Oligos</b>	<b>Tm F</b>	<b>Tm R</b>	<b>Condiciones de PCR</b>	<b>Tamaño esperado</b>
<b>ACTB P</b>	78	86	Alineamiento 60°C 30'' Extensión 68°C 30''	510pb
<b>ACTB NP</b>	76	84	-----	498pb
<b>L2 P</b>	66	66	Alineamiento 70°C 1' Extensión 72°C 30''	470pb
<b>L2 NP</b>	68	74	Alineamiento 60°C 30'' Extensión 68°C 30''	399pb
<b>Hsp70</b>	66	72	Alineamiento 70°C 1' Extensión 72°C 30''	442pb

**Especificaciones usadas para la síntesis de cDNA.** Se muestra la temperatura de fusión (Tm) de cada oligo (F, forward y R, reverse), las condiciones de PCR que funcionaron para cada par de sondas. Finalmente se indica el tamaño de producto esperado para cada reacción.

**Tabla IV**

<b>Orientación:</b>	<b>ACTB P</b>	<b>L2P</b>	<b>L2 NP</b>	<b>Hsp70</b>
<b>T7-&gt;SP6</b>	470-490pb	176pb	376pb	124pb

SP6->T7	70-90pb	346pb	72pb	369pb
---------	---------	-------	------	-------

**Orientación de las construcciones.** Se muestra el tamaño de banda esperado en la digestión de cada plásmido en relación a la orientación del inserto.