



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**REGULACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE LA PROTEÍNA
ADENOVIRAL E1B 55-kDa POR FOSFORILACIÓN.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :
LIC. RAÚL EDUARDO LÓPEZ ANTONIO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA-CONDE
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR, UAEM

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. CARMEN NINA PASTOR COLÓN
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR, UAEM

DR. TOMÁS DAVID LÓPEZ DIAZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó bajo la Tutoría externa del Dr. Ramón A. González García-Conde del departamento de Virología molecular del Centro de investigación en Dinámica celular UAEM

Para la realización del mismo se contó con beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) CVU: 662169.

Durante este trabajo se contó con apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para la asistencia a congresos nacionales.

JURADO ASIGNADO:

Dr. Carlos Arias López
Dr. Christopher Wood
Dr. Lorenzo Segovia Forcella
Dra. Rosa Maria del Angel
Dra. Susana Castro Obregón

DEDICATORIAS:

A mis padres Asela Antonio Vazquez y Raúl López Portillo fuertes pilares que me han acompañado en este viaje, que me han enseñado tanto de la vida y me han motivado a seguir adelante.

A mi hermana Asela López Antonio por ser un ejemplo a seguir y por su apoyo.

A mi compañera de viaje Andrea Castillo Campos por darme en este tiempo la calidad y el amor incondicional y enseñarme a ser una mejor persona Te amo.

AGRADEZCO

Al Dr. Ramón A. González García-Conde por su apoyo en la realización de este trabajo así como por la confianza para desarrollar el proyecto y por los valiosos consejos y apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio Paloma, Berto, Kathya y Grisel por su apoyo y confianza durante el proyecto y por su amistad.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo brindado para la asistencia a congresos nacionales.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	4
1.1. GENERALIDADES DE LOS ADENOVIRUS.	4
1.2 CLASIFICACIÓN	5
1.3 ESTRUCTURA	6
1.4 CICLO DE REPLICACIÓN	8
1.4.1 ADHESIÓN Y ENTRADA	8
1.4.2 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA	8
1.4.3 EXPRESIÓN DE LOS GENES VIRALES TEMPRANOS	9
1.4.4 REPLICACIÓN DEL GENOMA	10
1.4.5 EXPRESIÓN DE GENES VIRALES TARDÍOS	11
1.4.6 ENSAMBLAJE Y LIBERACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES	11
1.5 CENTROS DE REPLICACIÓN	13
2.- LA PROTEÍNA E1B 55 KDA	14
2.1 LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA E1B	15
2.2 INTERACCIÓN DE E1B CON PROTEÍNAS CELULARES Y VIRALES.	16
2.3 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA PROTEÍNA E1B	17
3.- ANTECEDENTES	19
4.- HIPÓTESIS	23
5.- OBJETIVOS	23
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES:	23
6. MATERIALES Y METODOS	24
6.1 CÉLULAS Y VIRUS	24
6.2 MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA	25
6.3 ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE REPLICACIÓN VIRAL.	26
6.4 TITULACIÓN POR CONTEO DE FOCOS FLUORESCENTES.	26
6.5 ANÁLISIS DE LA SÍNTESIS DE DNA VIRAL POR PCR CUANTITATIVO.	27
6.6 ALGORITMO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS CR	27
7. RESULTADOS	29
7.1 CONSTRUCCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL VIRUS RECOMBINANTE T495A Y T495D.	29
7.2 LA FOSFORILACIÓN DE LA T495 EN E1B IMPACTA LA EFICIENCIA DE SÍNTESIS DE DNA VIRAL.	32
7.3 LA FOSFORILACIÓN DIFERENCIAL EN E1B IMPACTA SU LOCALICACIÓN DURANTE EL CICLO DE REPLICACIÓN.	36
7.4 LA FOSFORILACIÓN EN E1B IMPACTA LA CINETICA DE FORMACIÓN DE CR.	49
7.5 PREDICCIÓN DE SITIOS DE FOSFORILACIÓN EN LA E1B 55 KDA.	53
8. DISCUSIÓN	58

9. CONCLUSIONES.	65
10. PERSPECTIVAS.	66
11. REFERENCIAS	67

INDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1. Organización de la cápside de adenovirus</u>	<u>6</u>
<u>Figura 2. Organización del genoma de adenovirus</u>	<u>8</u>
<u>Figura 3. Ciclo de replicación de adenovirus</u>	<u>11</u>
<u>Figura 4 representacion lineal de la proteína E1B 55 kDa</u>	<u>14</u>
<u>Figura 5. Representación esquemática de la E3 ligasa de ubiquitina</u>	<u>16</u>
<u>Figura6. Secuenciación de los virus recombinantes T495A y T495D</u>	<u>29</u>
<u>Figura 7. Efecto de la fosforilación de E1B sobre la síntesis de DNA viral</u>	<u>33</u>
<u>Figura 8. Localización intracelular de las proteínas E1B ,DBP y E4orf3 en células HFF infectadas.</u>	<u>44</u>
<u>Figura 10. Localización intracelular de E1B T495A en células HFF tratadas con leptomicina B.</u>	<u>47</u>
<u>Figura 11. Análisis de la cinética de formación CR mediante el uso de DSLF.</u>	<u>51</u>
<u>Figura 12. Alineamiento de secuencias de E1B de diferentes serotipos de adenovirus (A – F)</u>	<u>53</u>
<u>Figura 13. Secuencia de aminoácidos de la E1B 55 kDa de adenovirus</u>	<u>54</u>
<u>Figura 14. Predicción de fosforilación de Serinas 490, 491 y Treonina 495 de la E1B de Ad5.</u>	<u>55</u>

ABREVIATURAS

1. Ad	Adenovirus
2. Ad Pol	DNA polimerasa del virus
3. Ala	Alanina
4. Asp	Ácido aspártico
5. BAK	Bcl-2 homologous antagonist killer
6. BAX	BCL2-associated X protein
7. CAR	Receptor de cosxsackie y adenovirus
8. CK1	Casein Kinasa 1
9. CK2	Casein Kinasa 2
10. CR	Centros de Replicación viral.
11. DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
12. DAXX	Death-associated protein 6
13. DBP	DNA Binding Protein
14. DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
15. DNA	Deoxyribonucleic Acid
16. DSB	Bouble Strain Break
17. dsDNA	DNA de doble cadena
18. E1B	E1B-55 kDa
19. ERA	Enfermedad Respiratoria Aguda
20. GOI	Gen de interés
21. h.p.i	Horas post infección
22. HEK-293	Human Embryonic Kidney 293 cells
23. HFF	Human Foreskin Fibroblast Cells
24. IgG	Inmunoglobulina G
25. ITR	Secuencias terminales repetidas invertidas
26. kDa	Kilodalton
27. mg	Miligramos
28. ML	Major Late
29. ml	mililitro
30. MLNP	Major Late No Procesado
31. MLP	Major Late Procesado
32. MOI	Multiplicidad de infección
33. MRN	MRE11-RAD50-NBS1
34. NES	Nuclear Export Signal
35. NLS	Nuclear Localization Signal
36. nt	Nucleótidos
37. NTC	No Template Control
38. orf3	E4orf3
39. orf6	E4orf6
40. p-PT	Proteína Pre-Terminal
41. PBS	Phosphate buffered saline
42. PML-NB	Cuerpos nucleares de PML
43. pRB	Proteína Retinoblastoma
44. q-PCR	PCR cuantitativo

45. RBX1	RING-box protein 1
46. REF	Gen de Referencia
47. ROX	Reference Dye
48. rpm	Revoluciones Por Minuto
49. SB	Suero bovino
50. SBF	Suero bovino Fetal
51. Ser	Serina
52. SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
53. SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
54. TAF	Transcription factor
55. Thr	Treonina
56. TP	Terminal Protein
57. UFF/célula	Unidades Formadoras de Focos/Célula
58. w/v	Weight/Volume
59. wt	silvestre
60. ZPR	Zona Periférica de Replicación

RESUMEN

Los adenovirus (Ad) constituyen a la familia de Adenoviridae; estos virus se han asociado con enfermedades del tracto respiratorio, el sistema gastrointestinal e infecciones de la conjuntiva. Estos virus son no envueltos con cápside icosaédrica y su genoma es DNA lineal de doble cadena organizado en unidades transcripcionales tempranas y tardías. La proteína E1B 55 kDa (E1B) es uno de los productos esta unidad transcripcional temprana. La E1B es una fosfoproteína de 496 aminoácidos que puede ser sujeta a modificaciones postraduccionales, puede ser fosforilada en los residuos 490, 491 y/o 495 además de que es blanco de SUMOilación en la lisina 104. Se ha demostrado que modificaciones en los sitios de fosforilación impactan en las actividades asociadas de E1B, sin embargo no se sabe cual es el impacto de estas en el ciclo de replicación viral. Trabajos previos muestran que la E1B es necesaria para la replicación eficiente y producción de progenie viral, sin embargo nada se sabe del impacto de estas modificaciones sobre algún mecanismo en particular. En este trabajo usamos virus mutantes sencillos, dobles y triples de los sitios de fosforilación y determinamos el impacto de estas modificaciones en la localización de la proteína, la replicación del DNA viral, la cinética de progresión de la infección así como la producción de progenie viral que presentan células normales infectadas. Nuestros resultados muestran que la fosforilación de la treonina 495 es clave para sus funciones asociadas en el ciclo de replicación, además sugieren muy fuertemente que existe una dinámica de fosforilación desfosforilación dependiendo de las distintas actividades asociadas a E1B y que podría existir un mecanismo donde la treonina 495 tenga que ser la primera en ser fosforilada para que ocurra la fosforilación en las serinas 490 y 491.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES DE LOS ADENOVIRUS.

En el invierno de 1953, Wallace Rowe, un becario postdoctoral de Robert Huebner, en el Instituto Nacional de Salud, aisló un agente citopatogénico filtrable que fue responsable de la degeneración espontánea de explantes de tejidos adenoides que se encontraban en estudio para el cultivo de células (Ginsberg, H. S. 1999 and Rowe, W. P., R. J. Huebner 1953). Al mismo tiempo, una epidemia de la enfermedad respiratoria aguda (ERA) en Fort Leonard Wood, que se pensaba era causada por un virus de influenza, estaba en investigación por Maurice Hilleman y Jacqueline Werner en el colegio de graduados de médicos militares. Sin embargo, no pudieron aislar el virus del tracto respiratorio de estos pacientes y en su lugar lograron aislar un agente infeccioso desconocido de lavados de garganta; Harold Ginsberg demostró que los agentes aislados por Rowe y Hilleman eran neutralizados por muestras de suero de pacientes con ERA de poblaciones militares de la segunda guerra mundial, pero no con suero de pacientes con otras condiciones respiratorias, como el resfriado común o neumonía primaria, estableciendo el virus como el agente etiológico detrás de ERA en poblaciones militares (Ginsberg, H. S. et. al. 1955).

Para este tiempo, Huebner y Rowe demostraron la relación antigénica entre doce agentes clasificados como virus "adenoides-faríngeo-conjuntival", que incluían los aislados por Hilleman, organizándolos en 6 serotipos sobre la base de reactividad cruzada por anti-suero de pacientes en los ensayos de neutralización (Huebner, R. J., W. P. Rowe 1954). Como se aislaron más cepas de agentes infecciosos que compartían características con estos virus, y la evidencia acumulada indicaba que estos agentes representaban una familia relacionada de virus, fueron llamados "adenovirus", proveniente del tejido originario del que se aislaron por Rowe. Posteriormente fue aprobado como una nueva familia de virus por recomendación de John Enders et. al. en 1956.

Actualmente por estudios epidemiológicos se sabe que los adenovirus son responsables del 5 al 35% de las infecciones respiratorias agudas (Michael Mandelboim, Pnina Dror 2011), y recientemente se reportó que alrededor del 60% de los casos de queratoconjuntivitis en Japón son debidos a adenovirus.

Los brotes son comunes en reclutas militares, usuarios de piscinas, instituciones residenciales, hospitales, guarderías, etc. Además, frecuentemente infectan niños antes de los 5 años, donde inducen principalmente diarrea, faringitis, y fiebre faringo-conjuntiva. En pacientes inmunosuprimidos, como aquellos que presentan síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), adenovirus puede causar infecciones fatales que resultan en hepatitis, neumonía y encefalitis.

1.2 CLASIFICACIÓN

Los virus de la familia *Adenoviridae* son clasificados en 5 géneros con base en análisis de la secuencia del genoma; los *Mastadenovirus* infectan mamíferos incluyendo a los humanos; los *aviadenovirus* infectan solo aves; los *Atadenovirus* que son llamados así por su alto contenido en A + T en su genoma, infectan reptiles, aves, marsupiales y mamíferos; los *Siadenovirus* que infectan réptiles y aves (Fields, Knipe et al. 2007); y los *Ichtyadenovirus* con un único miembro confirmado que infecta peces (Darelle Thomson, and Balázs Harrach 2002).

Los adenovirus humanos (Ad) se dividen en subgrupos (especies) de la A a la F basado en su hemaglutinación, su potencial oncogénico, la movilidad electroforética de proteínas del virión y homología de secuencias del genoma (Blackford & Grand 2009); además, estos se dividen en serotipos, basados en las propiedades inmunorreactivas de los epítopes variables expuestos en las proteínas de superficie, hexón y fibra.

Hasta la fecha, 57 serotipos humanos han sido identificados y asociados con varios síndromes, incluyendo infecciones del tubo respiratorio, enfermedades respiratorias agudas, queratoconjuntivitis epidémica y gastroenteritis.

1.3 ESTRUCTURA

Los Ad son virus no envueltos. Su cápside icosaédrica de aproximadamente 90 nm de diámetro (Figura 1) está conformada por tres estructuras mayoritarias llamadas hexón, pentón y fibra (compuestas por las proteínas II, III y IV, respectivamente) y cinco proteínas minoritarias (IIIa, IVa2, VI, VIII y IX). Además, otros seis componentes estructurales se sitúan en el core del virión, cinco de estos se asocian con el genoma viral (V, VII, μ , IVa2 y la proteína terminal (TP)) y el componente restante es la proteasa del virión, 23K, que desempeña un papel fundamental en el ensamblaje y maduración del virión.

Con los avances en la cristalografía de rayos X y reconstrucción por microscopía electrónica se ha llegado a una resolución de 3.5 Å, donde es evidente un mejor entendimiento de la disposición de un número de componentes estructurales. En la Figura 1 se muestra un diagrama del estado actual de nuestro entendimiento sobre la complejidad de la cápside icosaédrica de adenovirus (Glen R. Nemerow, V. Reddy et al. 2008).

La cápside está formada por 252 capsómeros: 240 hexones (formados por un trímero de la proteína II) que forman la mayoría de la superficie de la cápside y 12 pentones (formados por la base del pentón que son 5 moléculas de la proteína III), uno en cada vértice del icosaedro desde donde se proyecta una fibra (formada por un trímero de la proteína IV), que es el primer componente del virus que interacciona con la célula (Giberson, Davidson et al. 2012).

Los componentes minoritarios de la cápside VIII y IX estabilizan las interacciones entre algunos hexones; la proteína IIIa interacciona con la base del pentón y los hexámeros de cada cara estabilizan la interacción entre las caras. La proteína VI participa en la ruptura de la membrana endosomal para la liberación de la partícula viral durante la infección (Fields, Knipe et al. 2007).

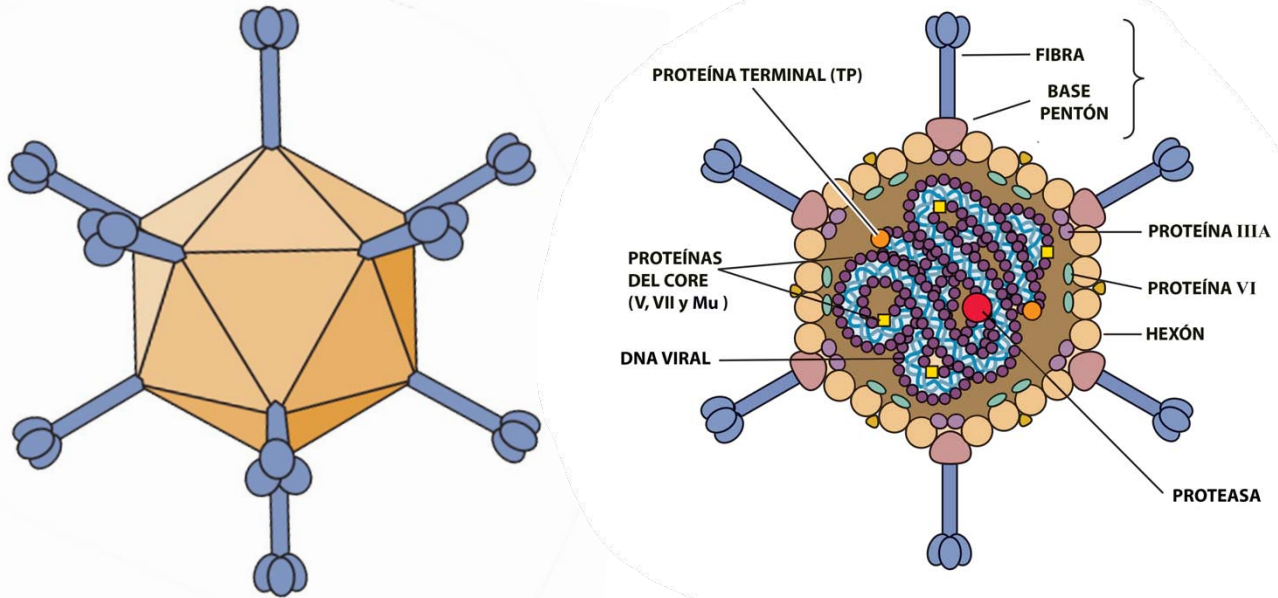


Figura 1. Organización de la cápside de adenovirus. Esquema de la composición y organización de la cápside viral, resume el modelo actual de la disposición de los polipeptidos estructurales. (modificado de *Principles of Virology S.J. Flint 2009*).

El resto de las moléculas estructurales están asociadas con el “core” del virión. Las proteínas VII, V y Mu (μ) son altamente básicas, lo que permite que interactúen con el DNA viral; la proteína VII es la principal proteína del core. El tratamiento con nucleasas de cores aislados sugiere que el polipeptido VII forma dímeros que condensan el DNA viral en un complejo nucleoproteína DNA-VII, conteniendo de 90 a 150 pb de DNA. Finalmente, una capa de la proteína V envuelve al complejo DNA-VII.

La proteína V se puede unir a la base del pentón y a la proteína VI, sugiriendo que puede enlazar al core con la cápside (Fields, Knipe et al. 2007; Giberson, Davidson et al. 2012). Mu es sintetizada como una proteína precursora de 79 aminoácidos, llamada pre-Mu, que posteriormente es cortada por la proteasa codificada por Ad para llegar a su forma madura, altamente básica de 19 aminoácidos; pre-Mu ayuda a mantener el DNA viral condensado dentro de la cápside (Giberson, Davidson et al. 2012). El core también contiene cerca de 10 moléculas de la proteasa viral 23 K que corta precursores de varias proteínas del virión durante el ensamblaje y maduración de la partícula viral, así como durante el

desensamblaje del virus y escape del endosoma durante la infección (Fields, Knipe et al. 2007).

1.4 CICLO DE REPLICACIÓN

1.4.1 Adhesión y entrada

El ciclo de replicación de los adenovirus se divide en dos fases, separadas por el inicio de la replicación del DNA viral. Los eventos tempranos comienzan cuando el virus interacciona con la célula hospedera. La entrada a la célula se facilita mediante la interacción entre la proteína fibra que se proyecta de cada vértice y el receptor de cosxsackie y adenovirus (CAR) localizado la superficie de la membrana celular. Después de esta interacción, las estructuras pentón de la cápside se unen a integrinas localizadas en la membrana de la célula hospedera y esto conduce a la entrada de la cápside mediante endocitosis (Wickham, T.J., et al., 1993). Posterior al desensamblaje parcial de la cápside y el escape del endosoma, el cual ocurre por un mecanismo dependiente de la proteína viral VI que no está bien entendido (Maier, O., et al. 2010, Moyer, C.L., et al 2011), la partícula viral es transportada a la periferia del núcleo por motores de dineína sobre los microtúbulos, en donde se desensambla completamente (Chardonnet, Y. and S. Dales 1970). El genoma viral unido a la proteína viral VII entra en el núcleo a través del complejo del poro nuclear, seguido por la iniciación del programa transcripcional viral a través de una interacción entre la proteína VII y factores de activación (TAF) ((Dales, S. and Y. Chardonne 1973) ver Figura 3 más adelante).

1.4.2 Organización del genoma

El genoma de adenovirus es una molécula de DNA lineal de doble cadena, de alrededor de 36 kpb que se organiza en unidades de transcripción tempranas, tempranas retrasadas y una unidad tardía. El extremo 5' de cada hebra del DNA

viral tiene una proteína terminal covalentemente unida, la cual actúa como cebador para la replicación del genoma viral, seguido por una región de invertidas repetidas que contienen el origen de replicación y los sitios de unión para factores de transcripción celulares (Nagata, K., R.A. Guggenheimer 1983).

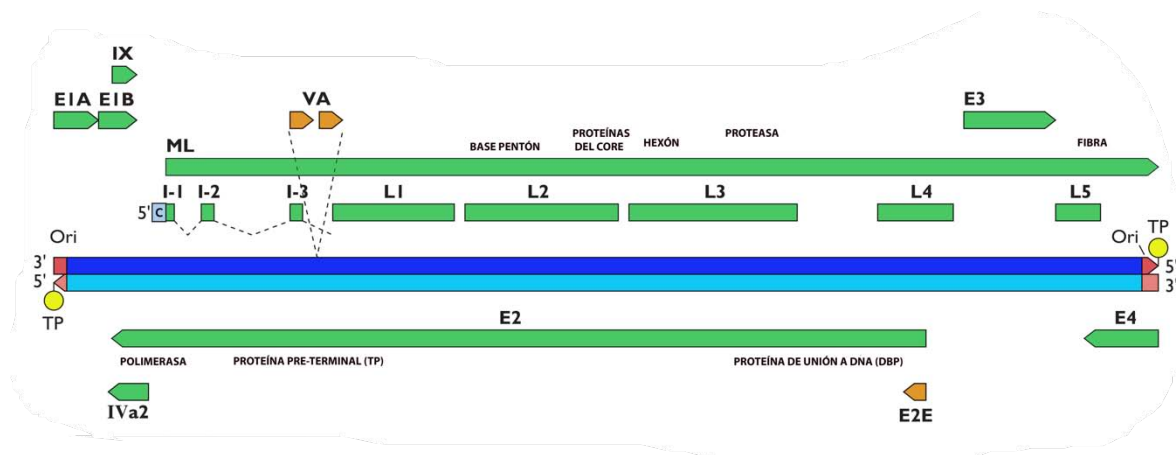


Figura 2. Organización del genoma de adenovirus. El DNA viral se representa en azul y las flechas verdes y amarillas representan los productos transcripcionales de las RNA polimerasas II y III, respectivamente. Por convención el genoma viral se esquematiza con la unidad transcripcional E1A del lado izquierdo y la cadena que se lee de izquierda a derecha codifica para las unidades E1A, E1B, IX, ML, VA y E3; la cadena complementaria codifica para las unidades E4, E2 y IVa2 (*modificado de Flint 2009*)

El genoma viral contiene 5 unidades de transcripción temprana: E1A, E1B, E2, E3 y E4; tres unidades tempranas retrasadas: IX, IVa2 y VA; y una unidad de transcripción tardía: principal tardía o ML (*major late*), que por selección de sitios de poliadenilación da origen a 5 familias de mRNA tardíos.

Todas las unidades transcripcionales del genoma viral, con excepción de IX y IVa2, codifican para múltiples mRNAs que se diferencian por splicing alternativo, y son expresados en etapas temprana y tardía, las cuales están divididas por el inicio de la replicación del DNA viral (Flint, S.J., P.H. Gallimore, and P.A. Sharp 1975).

1.4.3 Expresión de los genes virales tempranos

Durante la fase temprana de la infección adenoviral, la región transcripcional E1A

es expresada inmediatamente después de la entrada del genoma al núcleo (Nevins, J.R., et al 1979). Los productos de esta región son dos proteínas producidas por mRNA que son procesados por splicing alternativo y que conducen a la expresión de los genes virales tempranos E1B, E2, E3 y E4, mediante la unión a factores transcripcionales celulares (Berk, A.J., et al. 1979, Raychaudhuri, P., et al 1990).

Los productos de los genes tempranos establecen el ambiente celular favorable para la replicación del genoma viral, mediante la activación de la fase S del ciclo celular (E1A, E4) y constituyen la maquinaria necesaria para la replicación del DNA viral (E2) (Fields, Knipe et al. 2007). Algunos de los productos tempranos inhiben apoptosis y regulan las defensas anti virales de la célula (E1B, E3, E4) (Querido, E., et al. 1997 y 2001).

1.4.4 Replicación del genoma

La replicación del genoma de adenovirus ocurre de una manera semiconservativa, la cuál está mediada por el precursor de la proteína terminal (p-PT), la proteína de unión a DNA (DBP) y la DNA polimerasa (Ad Pol), los cuales son productos de la región temprana E2 (Seth 1999). La polimerasa y p-TP forman un complejo que se une a dominios específicos dentro de las regiones invertidas repetidas en el genoma viral (Seth 1999) p-PT provee el grupo hidroxilo libre, requerido para la iniciación de la síntesis de DNA. El reclutamiento de la proteína DBP y factores transcripcionales celulares NF-1 y Oct-1 resulta en el ensamble del complejo de pre-iniciación, lo cual permite a la polimerasa iniciar la síntesis de DNA, (Fields, Knipe et al. 2007) esto permite que la elongación del genoma inicie mediante desplazamiento de cadena; la cadena parental que está siendo desplazada se une y es estabilizada por monómeros libres de DBP, la cual permite la apertura del DNA no dependiente de ATP. La interacción entre monómeros de DBP es de tan alta afinidad que es suficiente para abrir las hebras de DNA conforme avanza la DNA polimerasa; DBP está presente en altas concentraciones al final de la fase

temprana (Field, J., R.M. Gronostajski 1984). Las secuencias invertidas repetidas presentes en el genoma hibridan, facilitando el ensamble del complejo de pre-iniciación y la síntesis de la cadena desplazada (Lechner, R.L. and T.J. Kelly, Jr, 1977).

1.4.5 Expresión de genes virales tardíos

Con el inicio de la replicación del DNA, la fase tardía del ciclo comienza y se activa la expresión de los genes virales tardíos, conducido por la expresión de la unidad transcripcional principal tardía o ML (*major late*); la unidad ML codifica para veinte mRNAs con un promotor común. Los mRNA virales tardíos son procesados por adición diferencial de poliadenilación y todos son procesados por splicing alternativo (Fields, Knipe et al. 2007).

El promotor ML es expresado en bajos niveles durante la fase temprana y su máxima activación requiere la unión del producto de la unidad IVa2 (Tribouley, C., et al. 1994) y factores transcripcionales celulares (Toth, M., W. Doerfler, and T. Shenk 1992, Parks, C.L. and T. Shenk 1997). Dos productos del gen tardío L4, L4 22 kDa y L4 33 kDa son expresados por un promotor menor tras la unión de E1A, E4orf3 y IVa2 (Morris, S.J., G.E. Scott, and K.N. Leppard 2010) y son requeridos para el correcto splicing de todo el repertorio de mRNAs del ML, aunque el mecanismo por el cual se regula este proceso no ha sido dilucidado (Morris, S.J. and K.N. Leppard 2009, Backstrom, E., et al. 2010).

Estos mRNAs han sido agrupados en 5 familias, de L1 a L5, y codifican principalmente para proteínas estructurales y otras proteínas que están involucradas en el ensamblaje del virión (McConnell and Imperiale 2004).

1.4.6 Ensamblaje y liberación de las partículas virales

El mecanismo por el cual las cápsides son ensambladas y el genoma es empacado en el núcleo aún no está resuelto, aunque se sabe que se requiere la

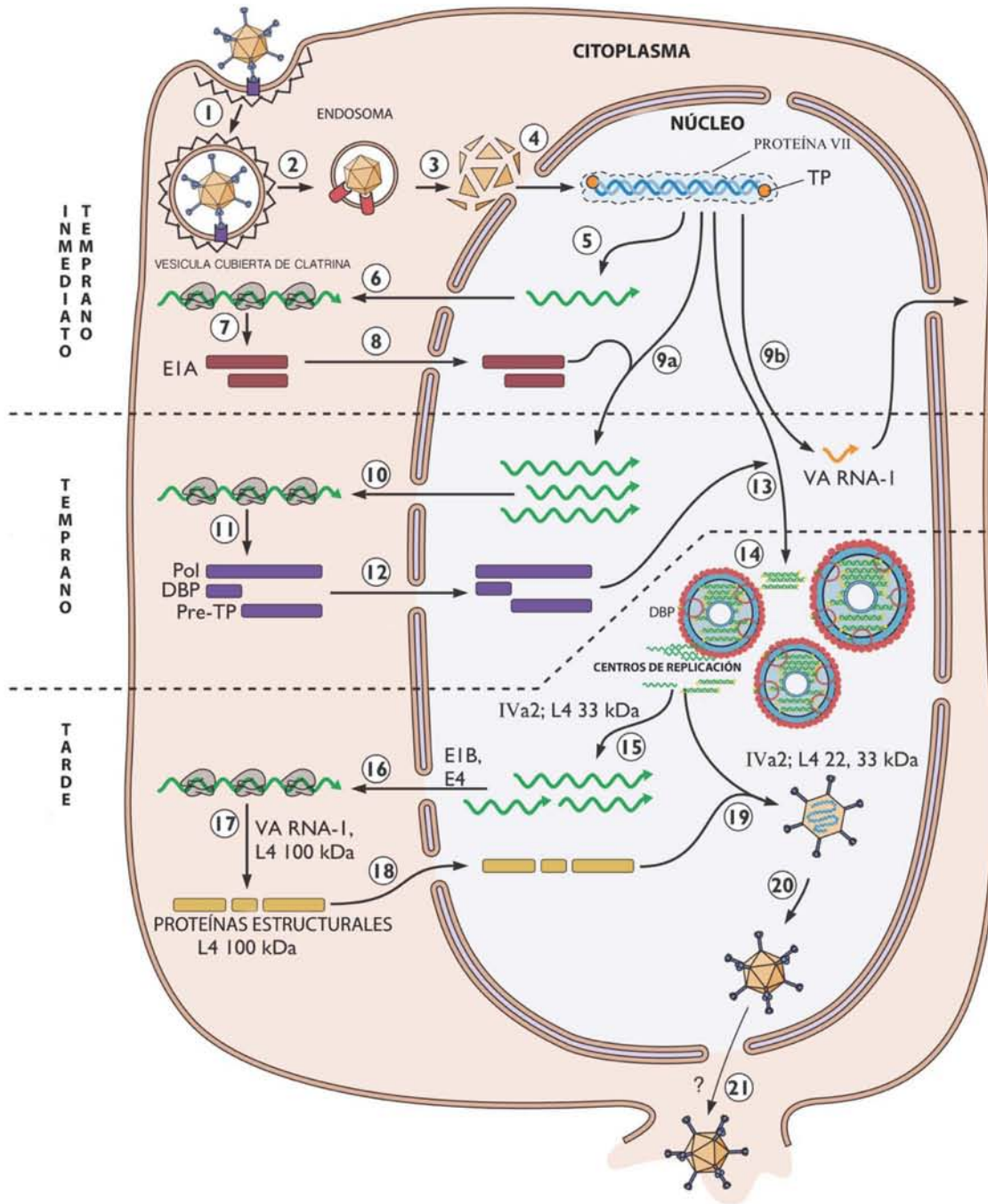


Figura 3. Ciclo de replicación de adenovirus. El esquema resume los eventos que suceden tras la infección con adenovirus, la adhesión y entrada (1 a 4), la expresión de genes tempranos (5 a 9a y b), la transición a la fase tardía (13), la formación de centros de replicación (14), la expresión de genes tardíos (15 a 19), ensamblaje y liberación de viriones (19 a 21) (modificado de *Principles of Virology* S. J. Flint 2009).

secuencia de empaquetamiento que se encuentra en el extremo izquierdo del genoma en combinación con las proteínas tardías IVa2 y L4 22 kDa (Ewing, S.G., et al 2007).

Para que la cápside viral llegue a su estructura madura las proteínas IIIa, VI, VII, VIII, μ , y TP deben ser procesadas por la proteasa viral p23. En ausencia de este corte la partícula viral no es capaz de salir del endosoma al infectar a una nueva célula y por tanto será degradada por la fusión con los lisosomas (Greber, U.F., et al 1996).

Se ha demostrado que la liberación de la partícula viral también depende de la proteasa viral p23, de la inducción de la muerte de la célula por la proteína temprana E3 11.6 kDa y de la separación de uniones celulares por trómeros de la proteína viral fibra (Chen, P.H., D.A. Ornelles, and T. Shenk 1993, Tollefson, A.E., et al 1996, Walters, R.W et al. 2002). Sin embargo, el mecanismo por el cual estos eventos llevan a la salida de partículas no se conocen.

1.5 CENTROS DE REPLICACIÓN

Durante el ciclo de replicación se induce la reorganización de componentes nucleares de la célula infectada; esta reorganización de dominios nucleares lleva al reclutamiento de maquinaria celular necesaria para la expresión de los genes virales a sitios nucleares definidos que se conocen como centros de replicación viral (CR), en los cuales se localiza el DNA viral, y a los que se reclutan proteínas celulares y virales que median la replicación, transcripción y al menos el inicio del procesamiento postranscripcional de los mensajeros virales (Pombo, et al.1994, Puvion-Dutilleul et al. 1994). Estas estructuras virales son inclusiones electrodensas con apariencia de anillos. El análisis por microscopía electrónica ha ayudado a entender la organización tan compleja de estos sitios virales. En la fase tardía el DNA viral de doble cadena (dsDNA) que no está siendo replicado ni transcrito se localiza en el centro de estos anillos (Puvion-Dutilleul and Pichard 1992). En la periferia de estas estructuras se encuentra la Zona Periférica de Replicación (ZPR), una red fibro-granular en la que está presente el DNA viral de cadena sencilla (ssDNA) (Puvion-Dutilleul and Pichard 1992), en el que ocurre la transcripción y replicación del genoma de adenovirus. Se sabe que la proteína

viral DBP se asocia a regiones de la ZPR, lo que sugiere que en estos sitios se sintetizan nuevas moléculas de DNA viral. En la ZPR también se localizan las proteínas virales tempranas E1B y E4orf6 (Ornelles and Shenk 1991).

Se sabe que a estos sitios especializados en la replicación viral, además de proteínas esenciales para la replicación, transcripción y procesamiento de los genes virales, también se recluta una amplia variedad de proteínas como: maquinaria de respuesta a daño en el DNA, factores transcripcionales, supresores tumorales, proteínas involucradas en la respuesta inmune innata, etc. Estas evidencias sugieren que los CR además de funcionar como sitios especializados en la replicación viral, funcionan como ambientes que modulan y suprimen los procesos celulares que se encargan de la respuesta antiviral.

2.- LA PROTEÍNA E1B 55 kDa

Como se describió anteriormente, la proteína de Ad5 E1B 55kDa (E1B) es un producto de la región transcripcional temprana E1B. Es una fosfoproteína multifuncional de 496 aminoácidos sujeta a fosforilación en los residuos S490, S491 y T495 (Figura 4) (Blackford and Grand 2009). Además, es modificada por SUMOilación en la lisina 104. La fosforilación de los tres sitios puede ocurrir por caseína cinasa II (CK2) (Ching, Dobner et al. 2012); sin embargo, la Thr 495 se encuentra en un sitio consenso para caseína cinasa I (CKI) y mientras que las Ser 490 y 491 se encuentran completamente conservadas entre los diferentes serotipos de adenovirus, la Thr 495 no lo está. La E1B también tiene secuencias características de un dominio putativo de dedo de zinc, C₂H₂, entre los aminoácidos 350 y 376; una secuencia de unión a RNA llamada RNP entre los aminoácidos 250 y 308; una señal de localización nuclear en el extremo carboxilo (NLS) y una secuencia de exportación nuclear (NES) rica en leucinas entre los aminoácidos 83 y 93.

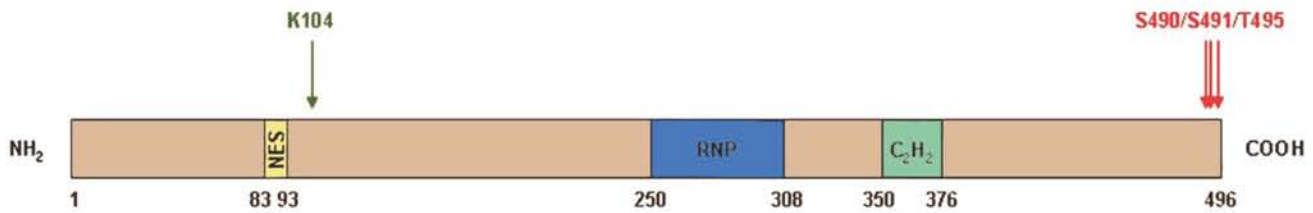


Figura 4. Representación lineal de la proteína E1B 55 kDa. Las cajas indican los diferentes motivos que se conocen hasta el momento de la E1B. NES (caja amarilla), señal de exportación nuclear; RNP (caja azul), región de unión a RNA; C₂H₂ (caja verde), dominio propuesto como dedo de zinc atípico. Las flechas indican las modificaciones postraduccionales a las que está sujeta la proteína, en rojo por fosforilación y en verde por SUMOilación.

Las funciones de la proteína E1B en el ciclo de replicación son indispensables para garantizar la replicación viral eficiente. Durante la fase temprana de la infección la E1B se encarga de contender con la respuesta antiviral de la célula mediante la inactivación del supresor tumoral p53 (ver más adelante) y la inhibición de la respuesta a daño en el DNA (DSB).

En la fase tardía de la infección las funciones principales de la proteína son: facilitar la exportación de los mensajeros virales tardíos y simultáneamente inhibir la exportación de los mensajeros celulares; así como inducir la degradación de blancos celulares al formar el complejo E3 ligasa de ubiquitina se describe en la sección 3.2 (Blanchette et al., 2004, Harada et al., 2002 y Querido et al., 2001).

2.1 LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA E1B

La proteína E1B muestra un patrón complejo de localización en células humanas infectadas; durante la infección la proteína se localiza principalmente en el núcleo. En la fase temprana de la infección la E1B se asocia a la proteína E4orf3 en los cuerpos nucleares de PML.

En la fase tardía la proteína E1B se asocia a la proteína viral E4orf6 y esta asociación resulta en el reclutamiento de la proteína E1B a centros de replicación viral (CR), (Ornelles and Shenk 1991), mientras que la proteína E4orf3 permanece

asociada a los cuerpos nucleares en estructuras filamentosas en forma de tracks, adyacentes a los CR.

Se ha reportado que el reclutamiento de E1B a CR es necesario para la replicación eficiente del genoma viral y la exportación de los mensajeros virales tardíos (González, Huang et al. 2006). Además, se ha observado que la localización de E1B y E4orf6 en los CR correlaciona con el reclutamiento de p53 y Mre11 a estos sitios (Cardoso, Sayuri E. M. Kato et al. 2008, Castillo Villanueva, Gonzalez et al. 2014).

Muy tarde en el ciclo de replicación, la proteína E1B se localiza en una estructura citoplasmática adyacente al núcleo que tiene las características de un agresoma, ya que mediante análisis por inmunofluorescencia se ha determinado que γ -tubulina y pericentrina (proteínas de agresoma) co-localizan con E1B en estas estructuras. Se ha sugerido que la proteína E1B utiliza la vía del agresoma para facilitar la degradación de proteínas celulares (Liu, Shevchenko et al. 2005).

2.2 INTERACCIÓN DE E1B CON PROTEÍNAS CELULARES Y VIRALES.

Como se mencionó anteriormente la proteína E1B forma un complejo con E4orf6, y las proteínas celulares culina 5, RING-box1 (Rbx1), elonginas B y C para formar una E3 ligasa de ubiquitina (Figura 5); la formación de este complejo es dependiente de E1B y se propone que E1B es responsable del reconocimiento de sustrato (Blanchette, P., et al. 2004).

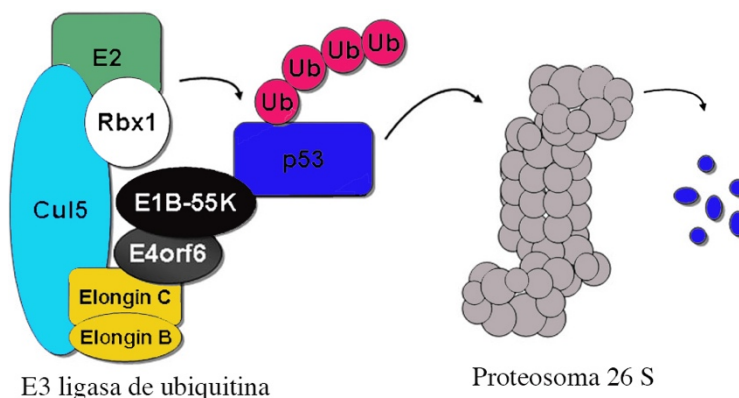


Fig 5. Representación esquemática de la E3 ligasa de ubiquitina. Las proteínas adenovirales E1B-55 kDa y E4orf6 forman un complejo E3 ligasa de ubiquitina que marca diferentes sustratos como p53 para su posterior degradación en el proteosoma (Blackford and grand 2009).

El complejo E3 ligasa de ubiquitina poliubiquitila a p53 e induce su degradación vía proteosoma. Además de p53, esta E3 ligasa de ubiquitina tiene como blanco a las subunidades Mre11 y Rad50 del complejo de reparación de DNA, MRN (compuesto por Mre11, Rad50 y Nbs1), la DNA ligasa IV, la integrina $\alpha 3$, la helicasa Bloom, Tip 60, ATRX y SPOC1 (Baker, A., et al 2007, Dallaire et al. 2009 and Orazio et al. 2011). La degradación de estas proteínas mediante la poliubiquitinación por la ligasa E3 viral resulta en la inhibición de apoptosis (p53) y de la respuesta al daño en el DNA (MRN, DNA ligasa IV), ambos perjudiciales para la infección viral productiva (Weitzman, M.D. and D.A. Ornelles 2005).

Por otra parte, se ha propuesto que la ligasa E3 viral promueve la expresión de genes virales tardíos mediante la inducción de la exportación selectiva de mRNAs virales y la retención nuclear concomitante de mRNAs celulares (Blanchette, P. et al 2008); sin embargo, no existen evidencias experimentales que muestren la degradación de algún componente de las vías de procesamiento postranscripcional o exportación de mRNA.

2.3 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA PROTEÍNA E1B

Como se describió anteriormente, la proteína E1B es modificada por fosforilación en la Ser 490, 491 y la Thr 495. Estos sitios pueden ser fosforilados por caseína cinasa II (Ching, Dobner et al. 2012) y se ha reportado que la Thr 495 se encuentra en un sitio consenso para caseína cinasa I (Teodoro, Halliday et al. 1994; Teodoro and Branton 1997).

Se ha reportado que la sustitución de las Ser 490 y 491 por alaninas (S490/491A)

resulta en la reducción de la eficiencia de replicación viral y de la frecuencia de transformación en roedores; además, estas sustituciones también resultan en que E1B es deficiente para inducir la degradación de Rad50. Sin embargo, es capaz de inducir la degradación de Mre11, la DNA ligasa IV y p53 (Schwartz, Lakdawala et al. 2008), procesos dependientes de la formación de la E3 ligasa de ubiquitina viral.

Por otra parte, cuando los tres sitios sujetos a fosforilación son sustituidos por alanina, se reduce la eficiencia de replicación viral (Ching, Dobner et al. 2012), la proteína pierde sus propiedades de represión transcripcional y la habilidad para bloquear apoptosis mediada por p53 (Teodoro and Branton 1997); además, pierde la capacidad de inducir la transformación de células de roedor en combinación con E1A (Wimmer, Blanchette et al. 2013). Adicionalmente, la degradación de Mre11, Rad50, Nbs1, DNA ligasa IV y p53 son deficientes (Schwartz, Lakdawala et al. 2008).

Datos recientes de nuestro grupo (Sollano Mendieta, 2014) sugieren que la fosforilación de la E1B es necesaria para su localización intracelular asociada a CR y para la producción de progenie viral. Se han diseñado y construido mutantes que han permitido obtener información sobre el impacto del estado de fosforilación de la proteína E1B sobre su función. Estos virus presentan sustituciones en los sitios sujetos a fosforilación en la proteína E1B (Ser 490, 491; Thr 495). La sustitución de cada residuo por alanina resulta en que la fosforilación en cada sitio no puede ocurrir y por el contrario la sustitución de cada residuo por ácido aspártico resulta en que fisicoquímicamente se mimetiza un estado fosforilado. Se han construido los siguientes virus: El virus llamado AA, en el que las Ser 490 y 491 fueron sustituidas por Ala (S490A/S491A); el virus delP en donde las Ser 490, 491 y la Thr 495 fueron sustituidas por alaninas (S490A/S491A/T495A); el virus pM donde los tres sitios fueron sustituidos por ácido aspártico (S490D/S491D/T495D); el virus DD donde las Ser fueron sustituidas por ácido aspártico (S490D/S491D). El uso de estos mutantes permitió determinar que cuando la proteína no puede ser fosforilada en las Ser y Thr, la E1B no se localiza eficientemente en CR y la

degradación de p53 no se induce. Algunas observaciones muy interesantes de estos experimentos han sido que en el mutante S490A/S491A/T495A, la síntesis de DNA viral y la producción de progenie son deficientes, mientras que cuando sólo las Ser 490 y 491 no pueden ser fosforiladas, S490A/S491A, la localización de la proteína es similar a la proteína wt y la síntesis de DNA es eficiente, pero la producción de progenie es deficiente. En contraste, cuando se mimetiza el estado fosforilado de las Ser y Thr, al sustituirlas por aspartato, S490D/S491D/T495D, la E1B se localiza más eficientemente en CR que la proteína wt, la p53 es degradada eficientemente y, la producción de progenie viral aumenta (Sollano Mendieta, 2014).

Además, mediante ensayos de complementación que consisten en infectar células con el virus mutante que no expresa E1B (4X) y posteriormente complementar mediante la transfección de un plásmido que dirige la expresión de E1B con sustituciones en los sitios de fosforilación, se observó que tras la complementación con la E1B donde la Thr 495 fue sustituida por aspartato se rescató el fenotipo silvestre (Sollano Mendieta, 2014).

En conjunto estas observaciones sugieren que la fosforilación en la Thr 495 es necesaria para las funciones de la E1B.

3.- ANTECEDENTES

La E1B está implicada en favorecer varios pasos del ciclo de replicación viral; sin embargo, los mecanismos moleculares en los que participa para favorecer la replicación del virus no se han determinado con detalle.

Como se describió anteriormente la E1B puede ser fosforilada en la serinas 490, 491 y/o la treonina 495. Análisis fenotípicos de virus mutantes con sustituciones en estos residuos apuntan a que la modificación por fosforilación en la E1B impactan las funciones de la E1B en el ciclo de replicación viral.

El estudio con mutantes en los sitios de fosforilación ha permitido determinar que estas modificaciones en E1B impactan en las actividades del complejo E3 ligasa de ubiquitina, pues la sustitución de las Ser 490 y 491 por alaninas (S490/491A) resulta en una degradación deficiente de Rad50, sin afectar la degradación de Mre11, la DNA ligasa IV y p53 (Schwartz, Lakdawala *et al.* 2008). Por otra parte, cuando los tres sitios sujetos a fosforilación son sustituidos por alanina (S490/491/495A), la degradación de Mre11, Rad50, DNA ligasa IV y p53 son deficientes (Schwartz, Lakdawala *et al.* 2008).

Una de las actividades de la proteína E1B es la de represor transcripcional y recientemente, datos obtenidos por análisis transcriptómico sugieren que la E1B inhibe la expresión de un número importante de genes; la mayoría de estos genes están involucrados en la respuesta anti-viral de la célula, particularmente la respuesta mediada por interferón tipo 1. De hecho, se ha sugerido que la E1B es necesaria para bloquear la inhibición de la progresión del ciclo de replicación mediada por interferón, ya que en ausencia de la E1B la replicación del genoma viral se ve disminuida (Jasdave S. and S. J. Flint 2012). Esta citosina no interfiere con la síntesis de proteínas virales necesarias para la replicación sino que bloquea la formación de CR, estructuras especializadas en la replicación y expresión del genoma viral. El mecanismo por el cual la E1B reprime la transcripción de genes específicos se desconoce y aunque, como se describió arriba, se sabe que la fosforilación de la E1B es determinante para sus actividades, hasta el momento el efecto de estas modificaciones sobre la regulación en la expresión de los genes de respuesta a interferón o sobre la expresión o replicación del genoma viral, no se han reportado. Sin embargo, datos de nuestro grupo (López Antonio 2015) muestran que la fosforilación de la E1B impacta directamente la síntesis de DNA viral. En estos experimentos se diseñaron y construyeron mutantes que han permitido obtener información sobre el efecto de la fosforilación en la proteína E1B sobre la eficiencia con la que se sintetiza el genoma viral. Estos virus presentan sustituciones en los sitios sujetos a fosforilación en la proteína E1B (serina 490, 491 y/o treonina 495), por alaninas o por aspartatos. La sustitución de cada residuo por alanina resulta en que la fosforilación en ese sitio no puede ocurrir y

por el contrario el cambio por ácido aspártico mimetiza el estado fosforilado. En el virus mutante en el que se han sustituido los tres sitios de fosforilación por alanina (virus ΔP), la eficiencia con la que se sintetiza el DNA viral comparado con el virus *wt* es menor, mientras que cuando estos sitios son sustituidos por ácido aspártico (virus PM) la eficiencia con la que se sintetiza el DNA viral es mayor. Un resultado inesperado es que en la infección con el virus PM la replicación del DNA viral inicia antes que en el virus *wt*, indicando que en células infectadas con este mutante la fase tardía del ciclo de replicación inicia antes. Por otra parte, cuando se sustituyen sólo las serinas por ácido aspártico (S490/S491D, virus DD), el efecto sobre la eficiencia de síntesis de DNA parece ser mínimo, mientras que cuando las serinas se sustituyen por alanina (S490/S491A, virus AA) la eficiencia de síntesis de DNA es prácticamente la misma que en el virus *wt*.

Estas observaciones sugieren que la fosforilación en las serinas 490/491 o en la treonina 495 tiene efectos distinguibles sobre las actividades de la proteína y que la fosforilación de la treonina es determinante para la síntesis eficiente del DNA viral. Como se describió anteriormente la E1B es fosforilada en las serinas por CKII mientras que la treonina está en un sitio consenso para CKI. Sin embargo, no se sabe si la fosforilación de cada uno de estos residuos está regulada o si existe un orden cronológico o secuencial en la fosforilación de cada uno de los residuos.

Datos preliminares de nuestro grupo (López Antonio 2015) muestran que la fosforilación de la E1B podría ser determinante para la formación de los CR. Cuando la proteína no puede ser fosforilada en las serinas o en serinas y treonina (virus AA o ΔP), la formación de CR se ve drásticamente disminuida; sorprendentemente algo similar ocurre cuando se mimetiza el estado fosforilado de las serinas (virus DD). En contraste, cuando se mimetiza el estado fosforilado de los tres sitios (virus PM) la formación de los CR es más eficiente que en la infección con el virus *wt*.

Estas observaciones sugieren que la fosforilación en la treonina 495 impacta la eficiencia con la que se sintetiza el DNA viral. Sin embargo, los experimentos que

se han hecho hasta ahora no permiten distinguir si la fosforilación de los diferentes residuos tiene un efecto sobre la expresión de los genes tempranos encargados de la replicación del DNA viral o un efecto directo sobre el mecanismo de replicación. Una tercera posibilidad es que, de acuerdo a otras observaciones descritas antes, la E1B participe en ensamblaje de los centros de replicación mediante el reclutamiento de factores celulares y virales encargados de replicar el DNA viral.

4.- HIPÓTESIS

- La fosforilación de la Treonina 495 en la proteína E1B 55 kDa es necesaria para la síntesis eficiente del genoma viral.

5.- OBJETIVOS

- Determinar el impacto de las modificaciones por fosforilación en la E1B sobre la eficiencia con la que se sintetiza el genoma viral.

5.1 Objetivos particulares:

- Construcción y amplificación de virus recombinantes con sustituciones en los sitios de fosforilación de la E1B-55kDa.
- Determinación del efecto de estos mutantes de E1B sobre:
 - La eficiencia de síntesis de DNA viral.
Determinación por q-PCR de la eficiencia con la que se sintetiza el DNA viral durante el ciclo de replicación viral.
 - La activación de genes tempranos durante la infección.
Análisis del nivel de expresión de genes tempranos encargados de la síntesis de DNA viral.
 - La localización intracelular de la proteína E1B durante el ciclo de replicación. Análisis por inmunofluorescencia de la localización de E1B asociada a CR.
 - La formación de CR.
Análisis cuantitativo de CR por un algoritmo desarrollado para cuantificar los CR a partir de micrografías obtenidas por inmunofluorescencia.
 - El reclutamiento de las proteínas celulares y virales que participan en la replicación del DNA viral a CR.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Células y virus

Células HFFs (Fibroblastos derivados de prepucio humano) se cultivaron en medio Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco-Invitrogen™) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF, Gibco-Invitrogen™) en pases no mayores a 13. Las células HEK-293 (derivadas de células embrionarias humanas de riñón, transformadas con la región E1 de Ad) fueron cultivadas en DMEM suplementado con 5 % SB (SB, Biowest™); todas las células se mantuvieron a 37°C con 5 % de CO₂. Las células 2E2 (derivadas de células embrionarias humanas de riñón, transformadas con la región E1, E2 y E4 de Ad HEK-293) fueron cultivadas en DMEM suplementado con 5 % SBF (SB, Biowest™); todas las células se mantuvieron a 37°C con 5 % de CO₂. Las células HeLa (derivadas de células de cáncer cervico uterino) fueron cultivadas en DMEM suplementado con 5 % SB (SB, Biowest™); todas las células se mantuvieron a 37°C con 5 % de CO₂.

En todos los experimentos se utilizaron adenovirus serotipo 5 wt 4100 (Ad5) H5pg4100, el cual es idéntico en secuencia al virus Ad5 silvestre (GenBank no. AY339865) excepto que carece de una porción de la región E3 (nt 28593 – 30471) y contiene un sitio único de restricción para BstBI (nt 30955) (Groitel, P., and T. Dobner. 2007); el virus wt 2250, el cual posee la región E3 en el fondo del H5pg4100; además de los siguientes virus recombinantes: el virus AA, en el cual las Ser 490 y 491 fueron sustituidas por alaninas (S490A/S491A), por lo cual estos sitios no pueden ser fosforilados; el virus DD, en el cual las Ser fueron sustituidas por ácido aspártico (S490D/S491D), mimetizando el estado fosforilado de los 2 sitios; el virus T/A y T/D que presentan cambios en la Treonina 495 por alanina y ácido aspártico respectivamente. Estos virus fueron construidos en el fondo genético de wt 2250. El virus DelP (S490/491/T495A) donde los 3 sitios de fosforilación fueron sustituidos por alaninas; el virus pM (S490/491/T495D) en el cual los 3 sitios de fosforilación fueron sustituidos por ácido aspártico; estos fueron construidos en el fondo genético de 4100, todos los virus fueron amplificados en células HEK-293, utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 unidades

formadoras de focos (UFF)/célula. A las 48 h.p.i las células se centrifugaron a 4,300 rpm durante 5 min a 4°C y el pellet se resuspendió en 100 µl de solución IV USB (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 0.1% w/v dextrosa). Después se lisaron las células para liberar las partículas virales mediante cambios bruscos de temperatura, 5 min en nitrógeno líquido y 10 min a 37°C (3 veces); posteriormente se centrifugó a 13,500 rpm durante 5 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo; los virus se titularon por microscopía de focos fluorescentes.

6.2 Microscopía de Inmunofluorescencia

Se utilizaron ensayos de inmunofluorescencia para titular los stocks de virus Ad5 wt y mutantes, por conteo de focos fluorescentes (en células HEK-293), así como para determinar la localización intracelular de las proteínas p53, E1B y E4orf3 en células HFF infectadas. Se sembraron células HFF en cajas de 12 pozos sobre cubreobjetos previamente lavados con etanol absoluto y esterilizados por autoclave. Las células fueron fijadas a las 16 y 36 h.p.i con 1 ml por pozo de formaldehído al 3.7% en PBS durante 20 min a TA, se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS por pozo (cada lavado de 10 min en agitación), se permeabilizaron con 1 ml por pozo de Tritón X-100 0.5%/PBS durante 5 min a TA sin mover y posteriormente se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS por pozo; se adicionó 300 µl por pozo del anticuerpo primario a la dilución indicada para cada anticuerpo y se incubó toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-E1B (2a6), 1:500; anti-p53 (ab32049 BioLegend), 1:1000, anti-DBP (α DBP), 1:500 y anti-E4orf3 (6A11) 1:500. Después de incubar con el anticuerpo primario se hicieron 3 lavados con 1 ml de PBS por pozo, y se adicionó 300 µl por pozo del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 488, Alexa 568 y Alexa 680 en una dilución 1:1500 (Jackson Inmuno Research), se incubó por 2 hrs a TA en agitación; posteriormente se dieron 3 lavados con 1 ml de PBS por pozo y se agregó 1 ml por pozo de DAPI en una dilución 1:20,000; se hizo un lavado con PBS por 5 min en agitación y después se montaron los cubreobjetos sobre glicerol

10%/PBS en portaobjetos y se sellaron con barniz. Las laminillas se mantuvieron a -20°C y se analizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia (Axiovert 200M, Carl Zeiss Inc.).

6.3 Análisis de la eficiencia de replicación viral.

Se infectaron células HFF con el virus wt o con cada uno de los virus recombinantes utilizando una MOI de 30 UFF/célula, y se cosecharon a las 36 h.p.i como se describe arriba. Los lisados fueron titulados por focos fluorescentes para determinar la eficiencia de producción de progenie. Se sembraron células HFF en cajas de 12 pozos sobre cubreobjetos y se infectaron con diluciones de 1×10^{-1} a 1×10^{-6} de cada virus; las células se fijaron con formaldehído al 3.7%/PBS a las 36 hpi y se prepararon para inmunofluorescencia como se describió anteriormente para posteriormente titularlos por conteo de focos fluorescentes.

6.4 Titulación por conteo de focos fluorescentes.

Los virus fueron titulados en células HFF, las cuales fueron infectadas al 90% de confluencia con diluciones seriadas de los stocks de virus utilizando diluciones desde 1×10^{-1} , hasta 1×10^{-6} . Posteriormente las células se fijaron a las 24 hpi y se prepararon para inmunofluorescencia como se describió anteriormente; como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo monoclonal B6-8 dirigido contra la proteína de adenovirus DBP, a una dilución 1:500 en PBS, y como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 488 (Jackson Immuno Research) a una dilución 1:1500 en PBS. El análisis de las muestras se realizó por microscopía de fluorescencia usando el objetivo 20X. Se tomaron fotos de 6 campos en cada dilución elegidos aleatoriamente, a partir de los cuales se determinó el porcentaje de células infectadas. El título de cada stock viral se obtuvo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$\text{Título en } \frac{UFF}{ml} = (\text{Número de células infectadas}) \times (\text{Dilución}^{-1}) \times (\mu\text{mL} / \text{Volumen inicial de lisado})$

Donde $\frac{UFF}{ml} = \text{Unidades formadoras de focos por mililitro}$

6.5 Análisis de la síntesis de DNA viral por PCR cuantitativo.

Se infectaron células HFF con el virus wt o mutantes y se cosecharon 4, 12, 16, 24 y 36 h.p.i. Las células se trataron con proteinasa K (1 mg/ml) y Tween 20 (1:200) en agua MQ estéril. Se incubó a 55°C por 1 h y 10 min a 95°C. El DNA se precipitó con 1/10 de acetato de sodio 3M pH 5.2 y un volumen de isopropanol, incubando a 4°C toda la noche. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4°C y el pellet se resuspendió en 20 μl de Tris pH 7.4 10 mM. El DNA se cuantificó por espectrometría utilizando NanoDrop™ (Ver anexo tabla 2).

Para el análisis cuantitativo de la síntesis de DNA, se utilizó el sistema de detección SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), Para la amplificación de los GOI, se utilizaron 50 ng del templado (DNA), 1X del Master Mix del kit (SYBR® Green I Dye, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase UP, dNTPs, referencia pasiva (ROX) y componentes optimizados de buffer). Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo StepOne (Applied Biosystems). Para cada par de primers se hicieron controles sin muestra templado (NTC) para verificar que no existía amplificación por formación de estructuras secundarias entre los primers. Además, se hicieron curvas con diluciones 1:5 partiendo de 50 ng totales de DNA de la muestra de wt para verificar que la eficiencia de amplificación de todos los pares de primers utilizados fuera similar. El análisis se realizó utilizando dos experimentos independientes para cada virus, y cada muestra se cuantificó por triplicado. Los resultados (fold-change) y la desviación estándar se graficaron utilizando el programa Graph Prism.

6.6 Algoritmo para la identificación y caracterización de los CR

El algoritmo se puede resumir en estos 4 puntos:

1.- Separar el canal de CR: La formación de los CR se siguió mediante microscopía de inmunofluorescencia marcando el anticuerpo DBP, proteína viral que se asocia a CR y está bien caracterizada. Por lo anterior, podemos separar el canal donde se tiene información solo de los CR.

2.- Filtrar los CR: Se umbralizó la imagen de forma que sea posible obtener con mayor claridad los CR de acuerdo a la intensidad de los niveles de gris. Es decir: se obtiene una nueva imagen $I_1 \Rightarrow T_{\text{lower}}$ Donde $T_{\text{Lower}} = M_I + 5S_I$.

3.- Binarizar y calcular las componentes conexas: Obtener arcos con una conectividad dada (puede ser 4 u 8), estos arcos pertenecen a centros de replicación viral y son los datos que deben ajustarse mediante elipses. El resultado de este paso son n arcos A_i , $i = 1, 2, \dots, n$, donde cada A_i es parte de un centro de replicación viral.

4.- Ajustar los arcos A_i usando elipses: Para cada uno de los arcos A_i aplicar el algoritmo DLSF (Flusser et al.1998)

7. RESULTADOS

7.1 Construcción y amplificación del virus recombinante T495A y T495D.

Como se describió anteriormente las funciones de la proteína viral E1B son reguladas en parte por fosforilación, Por lo anterior se han diseñado y construido mutantes en estos sitios (S490, S491 y T495) en los que mediante mutagénesis sitio dirigida se han sustituido estos aminoácidos por alaninas o ácidos aspárticos. La sustitución de estos residuos por alaninas resulta en que el sitio mutado no pueda ser fosforilado y por el contrario, la modificación por ácido aspártico resulta en que se mimetiza el estado fosforilado de estos sitios. En nuestro laboratorio se han diseñado y construido mutantes mediante el protocolo descrito por Peter Groitl y Thomas Dobner 2007.

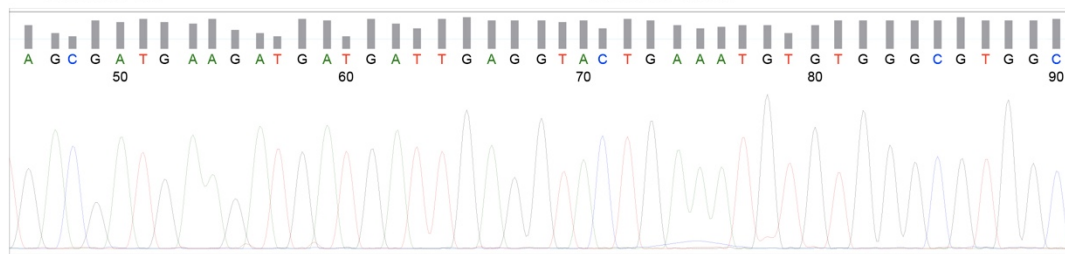
A

File: T495:D.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 3625
Mobility: KB_3500_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 11.9201
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 13921, C = 9906, G = 15588, T = 13987
Lane/Cap#: 7
Matrix: n/a
Direction: Native



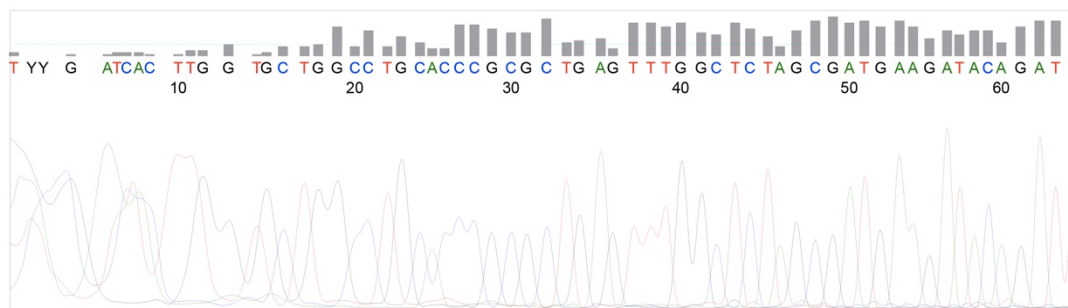
File: T495A.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 3624
Mobility: KB_3500_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 11.7849
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 8043, C = 6496, G = 8605, T = 8593
Lane/Cap#: 4
Matrix: n/a
Direction: Native

B



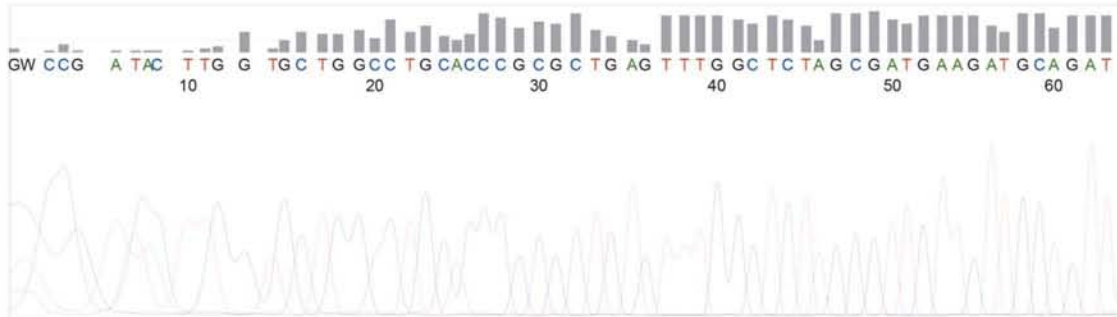
C

File: 15029.EIBT_Aab1.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 15029
 Mobility: KB_3500_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 11.676
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 11206, C = 9000, G = 12867, T = 12220
 Lane/Cap#: 14
 Matrix: n/a
 Direction: Native



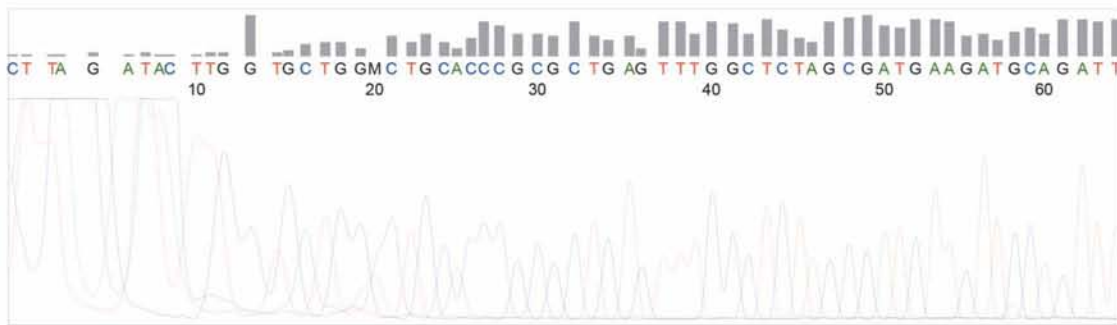
D

File: 18919-2.ab1

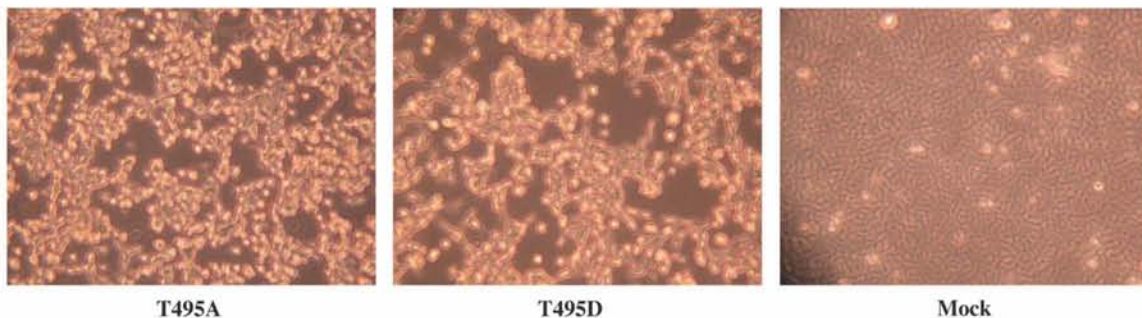
Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 18919
 Mobility: KB_3500_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 11.6835
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 4116, C = 3397, G = 4959, T = 3843
 Lane/Cap#: 12
 Matrix: n/a
 Direction: Native



E



T495A

T495D

Mock

FIGURA 6. Secuenciación de los virus recombinantes T495A y T495D. Se infectaron células HeLa y posteriormente se extrajo el DNA viral. Se amplificó una región de la secuencia de la proteína E1B y se verificó el cambio originado por la mutación. A) Secuenciación del virus mutante T495D en células 2E2. B) T495A C) Secuenciación del báculo 2250+t495A D) Secuenciación de partículas virales obtenidos en células HeLa infectadas con T495A. E) Efecto citopático en células Hek-293.

Sin embargo no se contaba con los mutantes solo en la T495 por A y D. Por lo anterior se amplificaron cada una de las semillas en células Hek-293. Estas células fueron infectadas y se monitorearon en búsqueda de efecto citopático por un lapso de 9 días post infección, al termino de este tiempo las células fueron lisadas y tituladas mediante conteo de focos fluorescentes como se describe en materiales y métodos. Las rondas de amplificación se repitieron hasta obtener lisados con títulos virales altos, posterior a esto se enviaron a secuenciar para confirmar la mutación. La figura 6 muestra el resultado de la amplificación de los mutantes sencillos de treonina (T495A y T495D). Para el virus mutante T/D se observó efecto citopático tras 4 rondas de amplificación (6E), en esta ultima ronda se dejó la infección por 8 d.p.i. Para el virus mutante T/A se observo efecto citopático abrupto de la tercera ronda de amplificación a la cuarta, en esta ronda se monitoreo la infección solo por 4 d.p.i. (6E) Posteriormente se infectaron células HeLa y se extrajo el DNA como se describe en materiales y métodos. Con este DNA se realizó un PCR para amplificar una región de 212 nucleótidos (ver materiales y métodos) dentro de la cual se encuentran las mutaciones originadas. Finalmente las muestras se enviaron a secuenciar. La figura 6A muestra los resultados de la secuenciación para los mutantes T/A y T/D. Los resultados de secuenciación confirmaron la mutación en la treonina por ácido aspártico (7A). Interesantemente para el virus T/A la secuenciación no mostró ningún cambio en la secuencia (7B). Por lo anterior se procedió a Transfectar nuevamente el bÁcmido que contiene el genoma de Ad5 2250+T495A en células 2E2 (ver materiales y métodos). Posterior a la transfección (como se describe en materiales y métodos) y a 4 rondas de amplificación se envió a secuenciar nuevamente el mutante T/A. Los resultados de secuenciación mostraron que no existe ningún cambio en la secuencia codificante para la E1B.

Estos resultados muestran que la mutación que portaba el bÁcmido revertió en las rondas de amplificación en células 2E2. Lo anterior pudo suceder por los mecanismos de recombinación en este tipo celular pues estÁn transformadas con la regi3n E1A, E1B y ademÁs con la regi3n E2 y E4 que son activadas mediante la inducci3n por tetraciclina. Evidentemente tambi3n existía la posibilidad de que el

bácmido no presentara la mutación y por tanto en las partículas virales producidas no estaba presente. Por lo anterior y pese a que el bácmido ya se encontraba secuenciado, decidimos secuenciarlo nuevamente. Los resultados de esta secuenciación confirmaron que efectivamente el bácmido si portaba la mutación en el codón ACA (Thr) por GCA (Ala) figura 6C y que en efecto las partículas virales producidas revierten este cambio. Por lo anterior decidimos cambiar el sistema celular para la amplificación de este mutante.

Se transfectaron células HeLa con el bácmido 2250+T495A y se confirmó la mutación mediante secuenciación, posteriormente se procedió a rondas de amplificación con la consecuente confirmación por secuenciación en cada nueva ronda. Finalmente en la tercer ronda se logró obtener partículas virales que tienen el cambio en el codón ACA por GCA (Thr por Ala) figura 6D.

7.2 La fosforilación de la T495 en E1B impacta la eficiencia de síntesis de DNA viral.

Datos de nuestro laboratorio muestran que la proteína E1B es necesaria para la progresión eficiente del ciclo de replicación viral. En células infectadas con un virus mutante que no expresa E1B (4x), se ha observado que la síntesis de DNA y la producción de progenie viral es deficiente; además, la formación de centros de replicación y reclutamiento de moléculas a estos sitios parece estar afectada. Recientemente resultados obtenidos en el laboratorio sugieren que no solo la ausencia de E1B impacta la eficiencia con la que se sintetiza el DNA si no que las modificaciones por fosforilación impactan la eficiencia de replicación del genoma viral(Lopez Raúl 2014). Estos datos muestran que cuando la E1B no puede ser fosforilada la eficiencia con la que se sintetiza el genoma viral disminuye y por el contrario cuando se mimetiza el estado fosforilado de la E1B la eficiencia de síntesis aumenta respecto al virus *wt* e inclusive este proceso inicia antes. Estos datos sugieren que la fosforilación de E1B es necesaria para la síntesis eficiente del genoma viral. Sin embargo estos resultados no permiten distinguir si el efecto en la fosforilación de la E1B sobre la síntesis de DNA viral es debido a un efecto

directo sobre el mecanismo de replicación o mediante un efecto indirecto. Lo anterior porque se ha reportado que durante la infección de células HFF con un virus mutante en el que E1B no se une ni a p53, ni a E4orf6 (H224) la síntesis de DNA viral es deficiente (Gonzalez, Huang et. al 2006). Además, la presencia de E1B en CR correlaciona con el reclutamiento de proteínas celulares y virales necesarias para la eficiente síntesis de DNA viral, por ejemplo p53 (Gonzalez, Huang et. al 2006; Cardoso, Sayuri E. M. Kato et al. 2008). Dado que cuando no se sintetiza la E1B o cuando se inhibe su fosforilación se afecta la síntesis de DNA viral, sugerimos que la proteína E1B es necesaria para el reclutamiento de moléculas a CR, donde favorece la síntesis de DNA viral. Sin embargo, el mecanismo molecular responsable de este efecto se desconoce. Con el propósito de analizar el efecto de la fosforilación de E1B sobre la síntesis de DNA viral, se infectaron células HFF con virus mutantes en los sitios de fosforilación de E1B, se cosecharon a diferentes tiempos post infección (4, 12, 16, 24 y 36) y se extrajo el DNA total (como se describe en materiales y metodos). Con el DNA de estas muestras se realizaron ensayos de PCR cuantitativo (q-PCR), utilizando primers que amplifican una región dentro de la unidad viral ML. En estos experimentos se determinó el numero de copias de genoma viral mediante el metodo de la curva estandar que de manera absoluta nos permite cuantificar el numero de copias de genoma viral (Carga viral) como se describe en materiales y métodos. La Figura 8A muestra los resultados de dos experimentos independientes cada uno por triplicado. Los datos fueron normalizados tomando como uno la cantidad de copias de genoma viral del virus silvestre a las 4 h.p.i. Estos resultados mostraron que la síntesis de DNA viral no aumenta hasta las 16 h.p.i excepto para el virus PM que aumentó 2.9 veces respecto al virus silvestre. A partir de las 24 h.p.i la síntesis de DNA viral aumentó significativamente para todos los virus, el virus *wt* aumentó 29.04 veces de las 4 a las 24 h.p.i (Figura 7A), mientras que para el virus delP fue de solo 2.89 veces , es decir una producción de 10 veces menor de genomas virales comparado con el virus *wt*, Para el virus que no expresa E1B (E1B -) se observó un aumento de 22.43, esto es 1.29 veces producción de genomas virales. En contraste, para el virus pM se observó un aumento de 56.47 veces, es decir

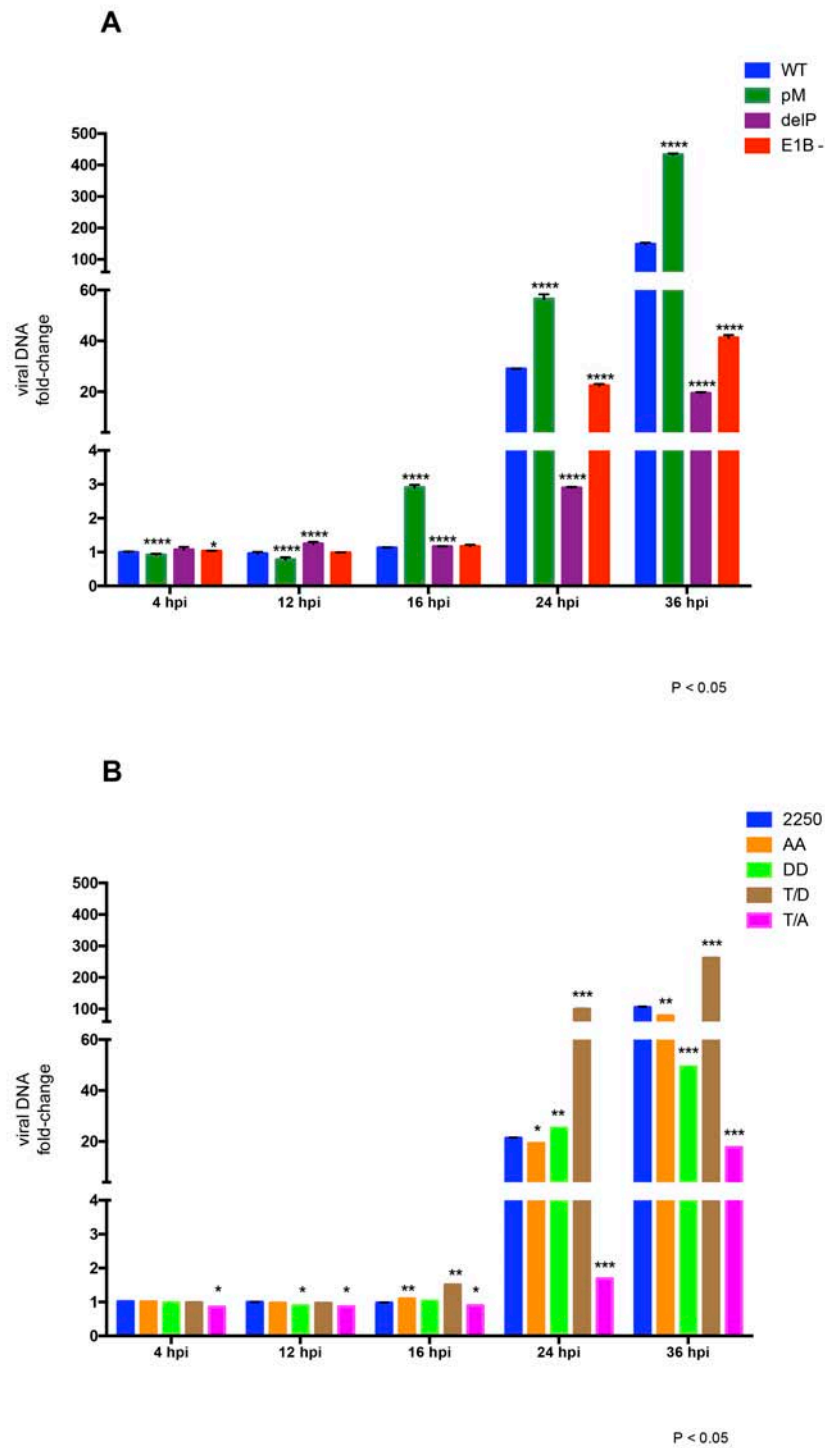


Figura 7. Efecto de la fosforilación de E1B sobre la síntesis de DNA viral. Células HFF fueron infectadas con el virus silvestre o recombinantes con sustituciones en los sitios sujetos a fosforilación, se cosecharon las células a 4, 12, 16, 24 y 36 h.p.i y el DNA fue extraído y se realizó PCR cuantitativo (método de la curva estándar). **A)** se muestra el fold-change de MLNP para los mutantes construidos en el fondo genético de wt 4100, la cantidad de copias de genomas virales en células infectadas con el virus silvestre cosechadas a 4 h.p.i se tomó como 1 para poder comparar con los diferentes mutantes. **B)** Fold-change de MLNP para los mutantes construidos en wt 2250 (P < 0.05).

1.94 veces mayor que el virus silvestre. Un resultado interesante fue que con el virus pM se observó una diferencia en el nivel de DNA de 2.9 veces por arriba del virus wt a las 16 h.p.i. Para las 36 h.p.i las diferencias se hacen más evidentes, el virus wt aumentó 148.56 veces con respecto a 4 h.p.i, mientras que para el virus delP este incremento fue de solo 19.43 veces, es decir 7.6 veces menos que en el virus wt, mientras que en el virus E1B – el aumento de 4 a 36 h.p.i fue de 41.25 veces, esto es 3.6 veces menos que en el virus silvestre. Interesantemente, el virus pM mostró un aumento de 432.90 veces a las 36 h.p.i que es 2.91 veces más que el virus wt.

Está reportado que en células HFF la replicación del DNA viral en células HFF inicia entre las 20 y 24 h.p.i, por lo que para determinar si esto se debía a diferencias en el input de DNA viral o bien a que la síntesis de DNA viral para el virus pM inicia antes que en el virus wt, se incluyeron tiempos tempranos de infección (4 y 12 h.p.i) en los que la replicación del DNA viral aún no ha iniciado. En este tiempo p.i. se observó que existían diferencias nominales en el input entre el virus wt y pM (0.087). Sin embargo, estas diferencias no invalidan nuestros resultados pues aunque hay un número menor de genomas en el virus pM a las 4 h.p.i para las 16 h.p.i hay un incremento en la eficiencia con la que se sintetiza el genoma, indicando que la síntesis de DNA viral inicia antes en el virus pM y que existe un retraso en la acumulación de DNA viral en el virus delP y E1B -.

Estos resultados muestran que cuando la proteína E1B no se encuentra o cuando se inhibe su fosforilación la eficiencia con la que el DNA viral se replica disminuye y, por el contrario, cuando se mimetiza el estado fosforilado de los tres sitios en E1B, la eficiencia de síntesis de DNA viral aumenta e inclusive inicia antes que en el virus wt. Estos experimentos no permiten distinguir el efecto de la fosforilación sobre las serinas o la treonina, pues como se describe anteriormente se ha sugerido que estos sitios están sujetos a fosforilación por CKI o CKII. Por tanto, para determinar el efecto de la fosforilación de las Ser y Thr sobre la replicación del DNA viral se utilizaron los mutantes AA, DD, T/D y T/A. **La Figura 7B** muestra los resultados obtenidos para estos virus mutantes. Los resultados muestran que a

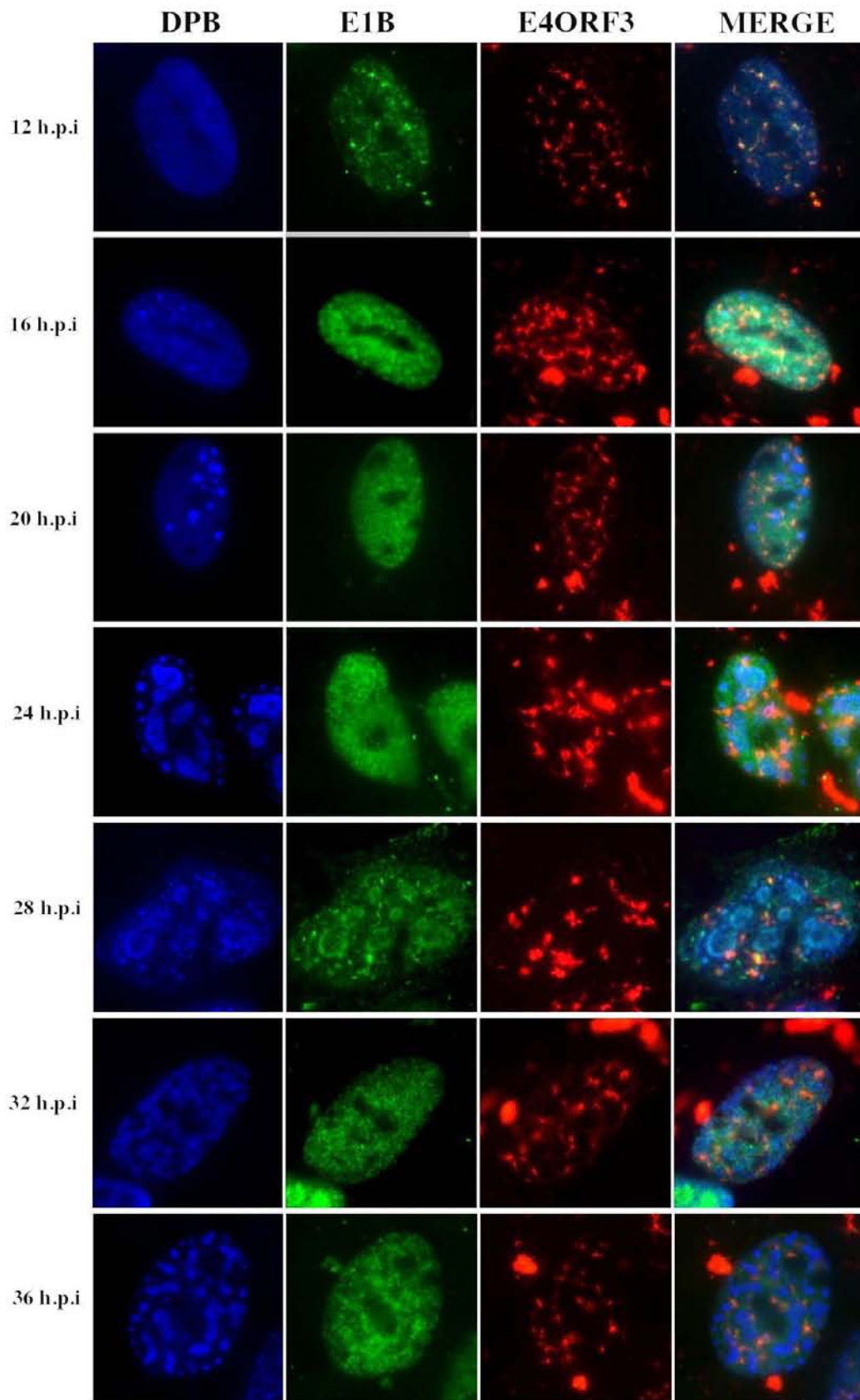
las 4 h.p.i no hay diferencias en la cantidad de DNA viral (input) comparado con el virus silvestre. Desde las 12 y hasta las 16 h.p.i se observaron diferencias nominales en los virus AA y DD. Sin embargo, en el virus T/D se observó una diferencia notable en el numero de copias sintetizadas para este tiempo. Para el virus *wt* se observó un aumento en el numero de genomas de las 4 a las 24 h.p.i de 21.3 veces. Para el virus AA y DD se observaron diferencias de 19.22 y 25.26 veces respectivamente. Es decir para las 24 h.p.i se observó una pequeña disminución en la síntesis de genomas del virus AA y un ligero aumento en el virus DD respecto al virus *wt*. Algo interesante es que para el virus T/D se observó un incremento en el numero de genomas de 99.47 veces respecto a las 4 h.p.i del virus *wt*, que representa 4.6 veces más que en el virus silvestre a las 24 h.p.i. En este mismo sentido el virus T/A mostró tan solo un incremento de 1.68 veces que es 12.67 veces menor que el *wt*. Para las 36 h.p.i el virus AA mostró una ligera diferencia en la acumulación del DNA viral (1.23 veces menor que el virus *wt*). Algo inesperado es que el virus DD mostró una disminución en el numero de genomas con respecto al virus silvestre (2.13) mientras que para el virus T/D se observó un incremento de 2.48 veces con respecto al virus *wt*. En contraste, el mutante T/A mostró un incrementeo de 4 h.p.i a 36 h.p.i de tan solo 17.69 veces. Esto es 5.96 veces menor que el virus *wt*. En conjunto estos datos sugieren que la fosforilación de las serinas 490 y 491 en E1B no es necesaria para la eficiencia con la que se sintetiza el genoma viral y que la fosforilación de la Thr 495 es clave para la replicación eficiente del DNA viral. Sin embargo, el aumento en el numero de genomas virales no corresponde como se esperaria de las 24 a 36 h.p.i en el virus DD, y la implicación de la fosforilación en estos sitios podría ser distinta (ver la sección de discusión).

7.3 La fosforilación diferencial en E1B impacta su localicación durante el ciclo de replicación.

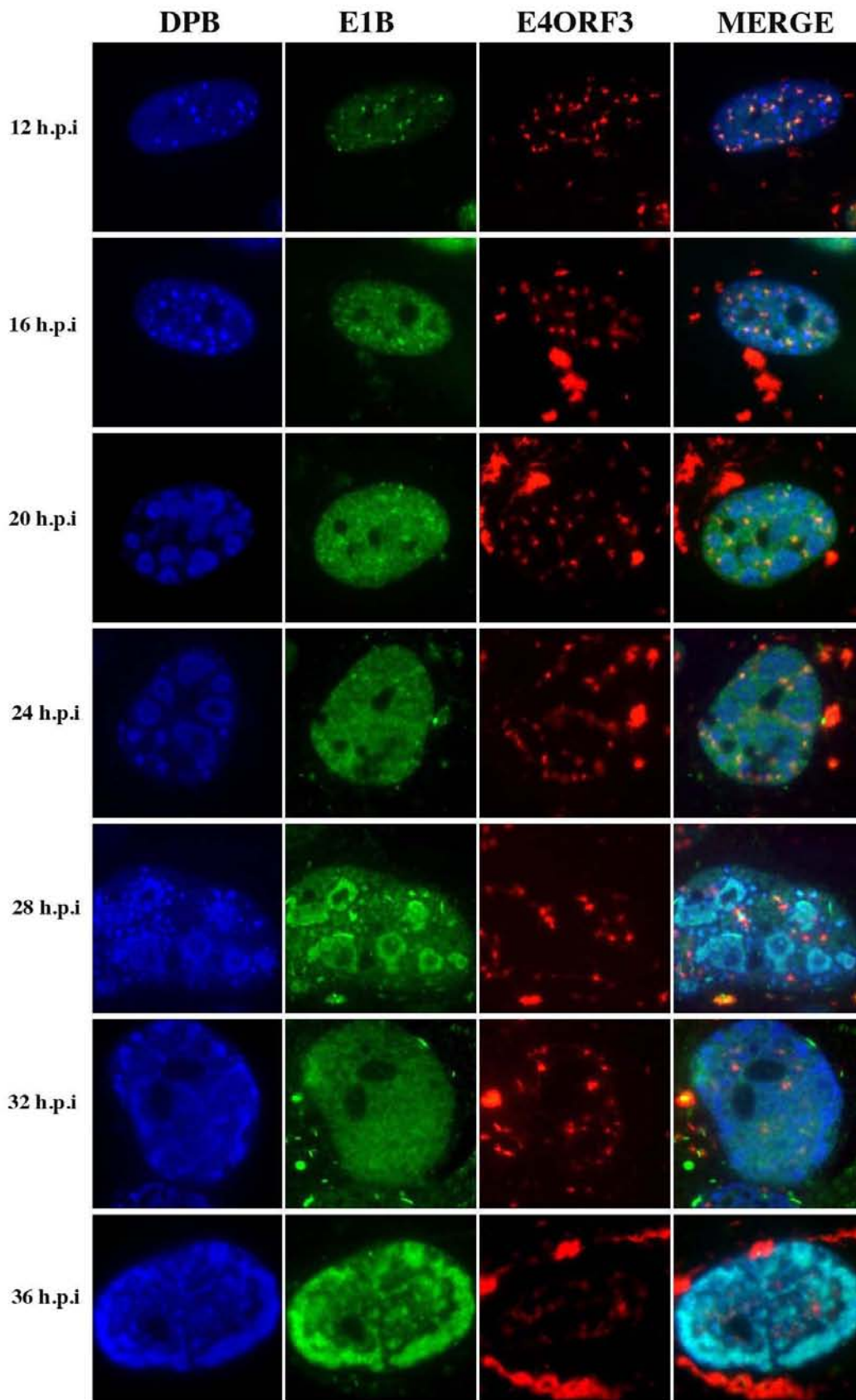
Como se describió previamente, durante la fase temprana de la infección, la E1B se localiza con la proteína E4orf3 en los cuerpos nucleares de PML; estas

estructuras que eventualmente son reorganizadas a estructuras filamentosas conocidas como “tracks” (Doucas, Ishov et al. 1996). En la fase tardía la E1B interacciona con la proteína E4orf6 (Orf6) y esto resulta en su relocalización a CR, mientras que E4orf3 permanece en tracks adyacentes a los CR. Resultados de proteómica de laboratorio muestran que E1B impacta la relocalización de varias proteínas celulares a los CR (maquinaria de síntesis de DNA, Splicing, moléculas que participan en la respuesta a daño en el DNA, supresores tumorales, etc.) se ha propuesto que la formación de estas zonas virales podrían ser una estrategia para evitar la respuesta antiviral y reclutar proteínas celulares necesarias para la replicación del genoma viral y de esta manera favorecer la progresión del ciclo de infección. Uno ejemplo de esto es el reclutamiento de p53 a CR pues correlaciona con la relocalización de E1B y E4orf6 y que esto correlaciona con la eficiencia de síntesis del DNA viral. Por lo anterior se ha sugerido que la E1B podría asistir de manera directa o indirecta el reclutamiento de proteínas celulares y de esta manera el ensamblaje de los CR virales. En base a lo anterior, las modificaciones por fosforilación en la E1B desde luego podrían impactar en la localización de esta proteína además de impactar las actividades asociadas a CR; se sabe que la fosforilación en la proteína E1B es necesaria para su localización. Sin embargo, no se sabe cuál o cuáles sitios son responsables de esto y de sus funciones asociadas a CR.

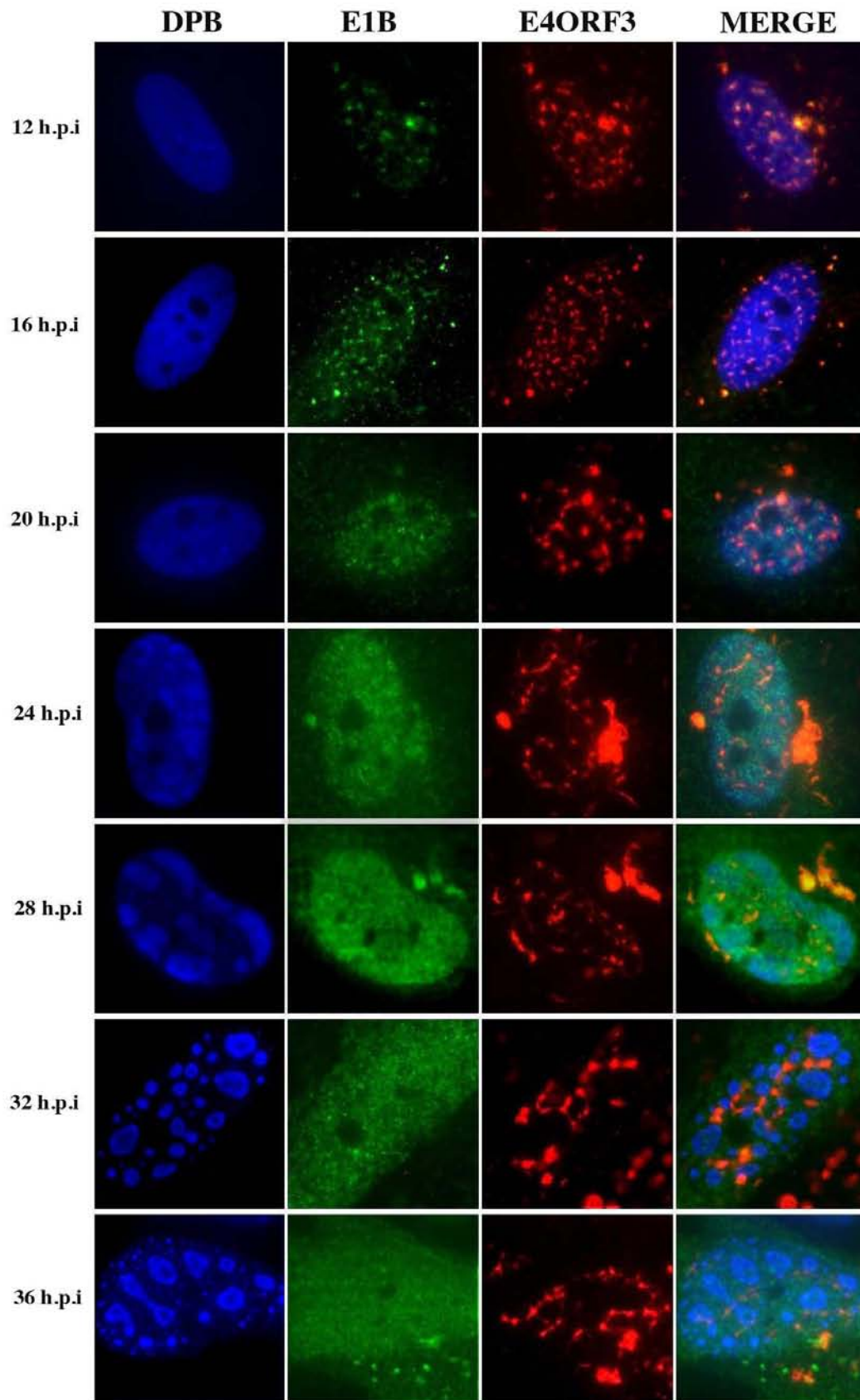
Con el objeto de analizar el efecto de la fosforilación en la proteína E1B sobre su localización intracelular, se infectaron células HFF con los virus silvestres (H5pg4100 y 2250) y mutantes con sustituciones en los sitios de fosforilación de E1B (delP, pM, E1B-, AA, DD, TD y TA como se describe en materiales y métodos), en tiempos tempranos (4, 12, 16 y 20 h.p.i) y tardíos de la infección (24, 28, 32, 36 h.p.i). Las muestras fueron fijadas y preparadas para inmunofluorescencia (ver materiales y métodos). Posteriormente mediante microscopía de inmunofluorescencia se analizó la distribución de las proteínas DBP, E1B y E4orf3. Se utilizaron las proteínas virales DBP y E4orf3 como marcador de CR pues se sabe que DBP se asocia al genoma viral de cadena



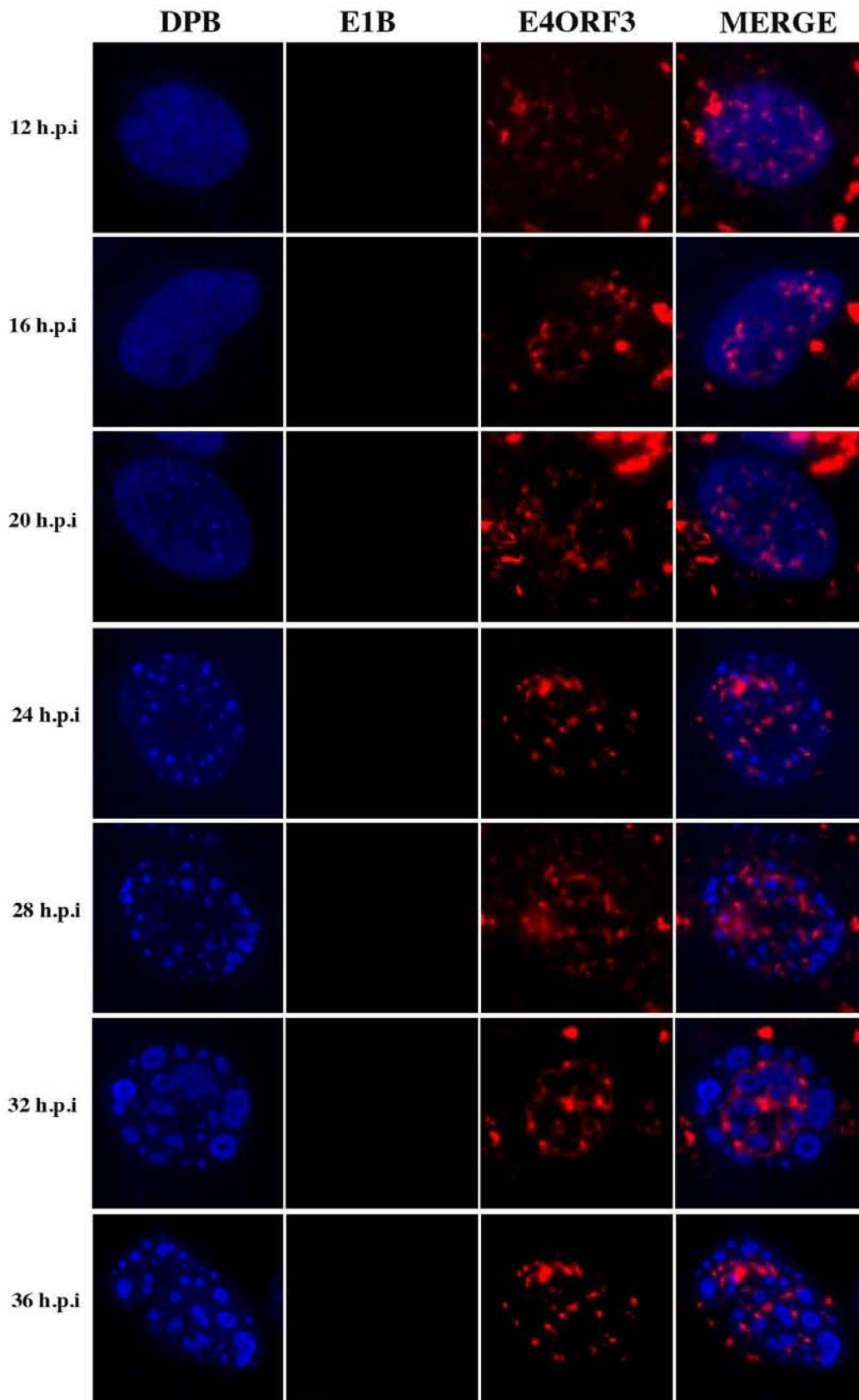
A) Ad5 4100



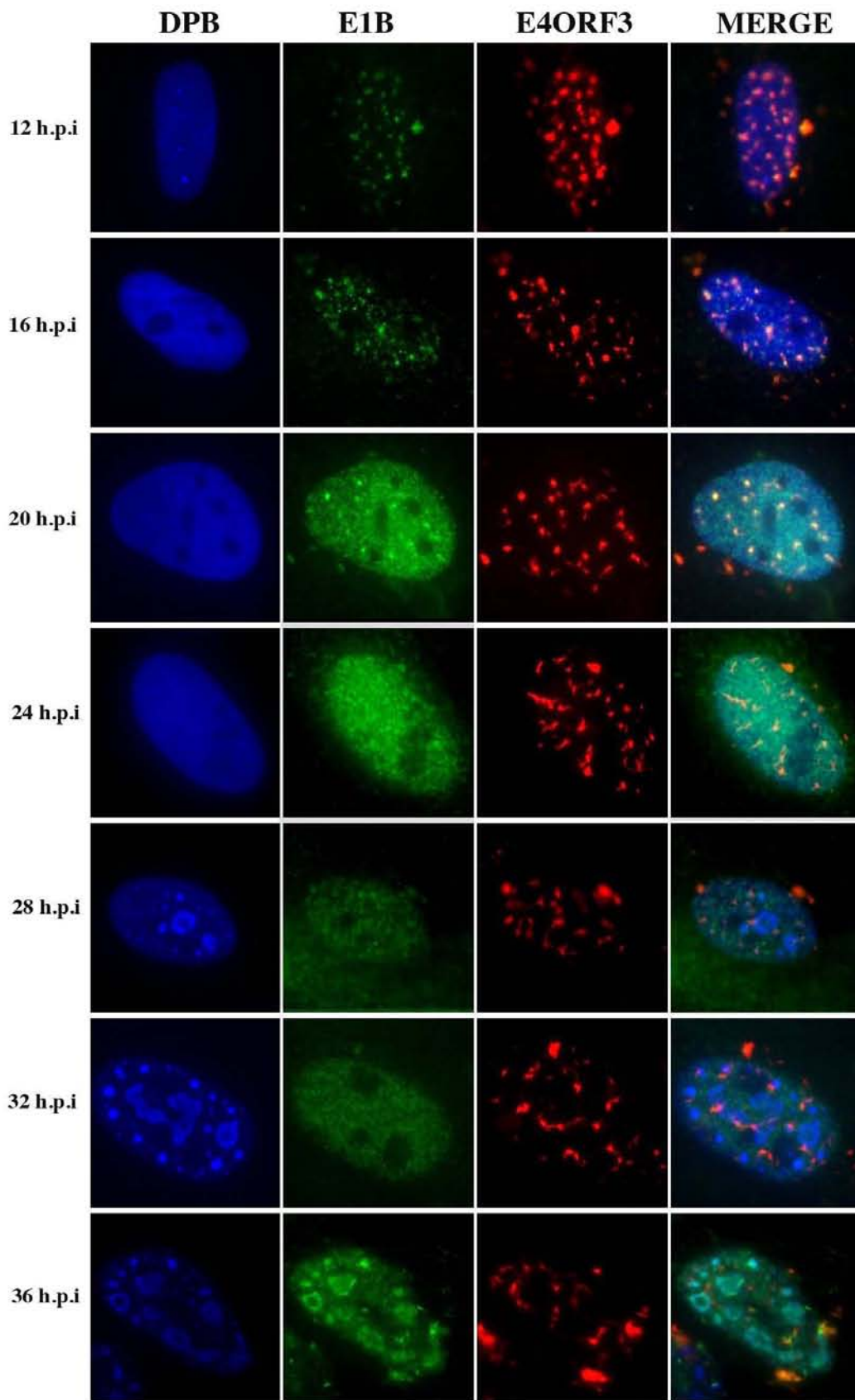
B) Ad5 PM



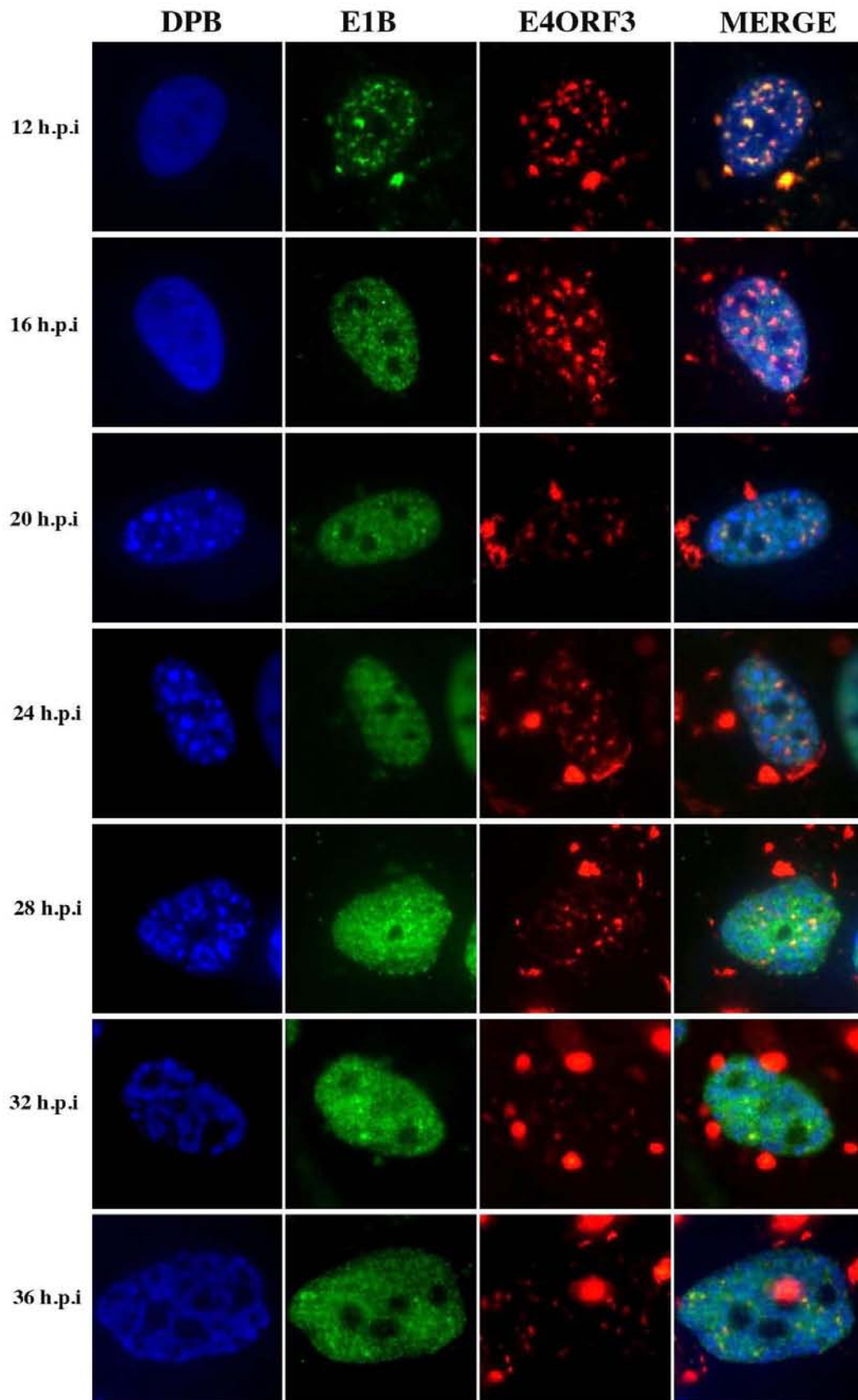
D) Ad5 DelP



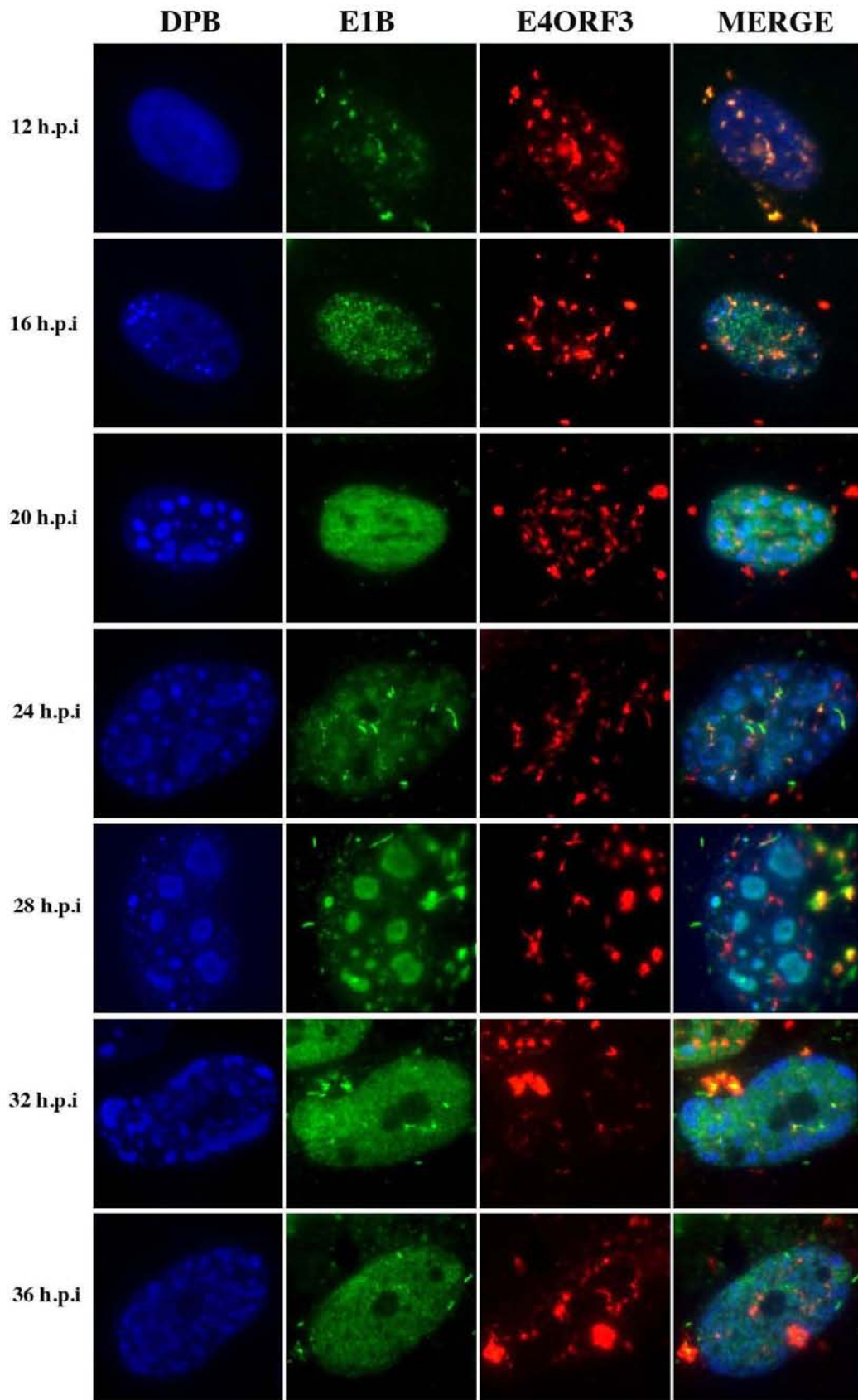
C) Ad5 E1B -



E) Ad5 AA



F) Ad5 DD



G) Ad5 T495D

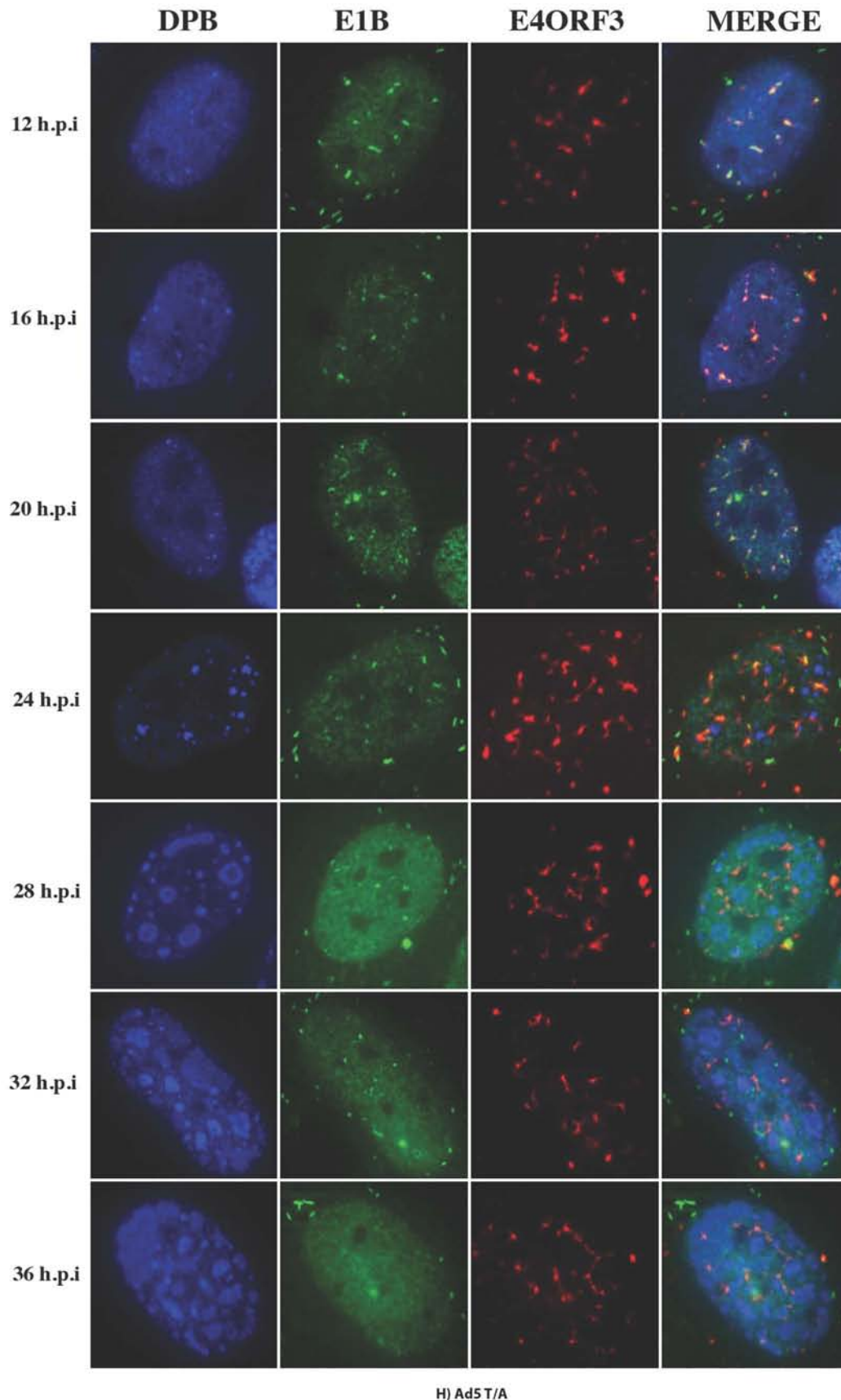


Figura 8. Localización intracelular de las proteínas E1B ,DBP y E4orf3 en células HFF infectadas. Las células HFF fueron infectadas con virus silvestre o virus recombinantes con sustituciones en los sitios de fosforilación; **A)** virus *wt* 4100 y 2250, **B)** pM (S490D/S491D/T495D), **C)** E1B- , **D)** delP (S490A/S491A/T495D), **E)** AA (S490A/S491A), **F)** DD (S490D/S491D), **G)** T/D (T495D) y **H)** T/A (T495A). Posteriormente las células fueron fijadas a 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 h.p.i y tratadas para inmunofluorescencia.

Para la detección de la proteína DBP se utilizó el anticuerpo monoclonal de conejo anti-DBP y la señal se detectó utilizando el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa 350 (Azul panel 1); la proteína E1B se detectó mediante el anticuerpo monoclonal de ratón anti-E1B (2a6) y la señal se detectó utilizando un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa 488 (verde panel 2); Como marcador de infección y de los centros de replicación se utilizó la proteína E4orf3 que fue detectada mediante un anticuerpo monoclonal de rata anti-Orf3 (6a11) y la señal fue detectada por un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 680 (rojo lejano panel 4). **A)** Células infectadas con el virus *wt*. **B)** pM. **C)** delP. **D)**E1B - **E)** AA. **F)** DD. **G)** T/D **H)** T/A.

sencilla que se está replicando en los CR y E4orf3, como se describió anteriormente se sabe que en la fase temprana de la infección se localiza en los cuerpos nucleares de PML y más tarde se encuentra adyacente a los centros de replicación.

La figura 8 muestra los resultados de la localización de estas proteínas mediante microscopía de inmunofluorescencia. Durante la fase temprana de la infección con el virus *wt* figura 8A (12 h.p.i), la proteína E1B se localizó en puntos en el núcleo sobre una distribución difusa en los que colocalizó con E4orf3 de acuerdo con lo previamente reportado (Doucas, Ishov et al 1996; Koing, Roth et al 1999 y Leppard, Everett 1999); con el avance del ciclo de replicación la E1B se acumuló en el núcleo excluida de nucléolo y en puntos de mayor intensidad. En la fase tardía del ciclo (28 h.p.i) la E1B se observó asociada a CR, E4orf3 se localizó adyacente a los CR y en fibras nucleares como se ha descrito anteriormente. En contraste durante la infección con el virus pM (8B) en la etapa temprana la E1B se localizó en puntos definidos en el núcleo sobre una distribución difusa en los que coincidió con E4orf3, similar al virus *wt*. En la fase tardía de la infección la E1B se observó asociada a CR (28 h.p.i) e inclusive permaneció asociada a estos sitios hasta muy tarde en el ciclo de replicación (36 h.p.i). En la infección con el virus delP (8C) temprano en la infección se observó a la E1B en puntos en el núcleo en los que se localizó con E4orf3 (12 y 16 h.p.i) . Sin embargo para tiempos tardíos la E1B se localizó difusa en núcleo y citoplasma y no se observó asociada a CR. Interesantemente tras la infección con el virus AA (8E) , en la etapa temprana se observó a la E1B en un patrón de localización similar al virus *wt*, sin embargo solo se observó asociada a CR en tiempos más tardíos con respecto al virus *wt* (36

h.p.i). Para el virus DD (8F) la localización de la E1B es similar al virus silvestre en la etapa temprana, en la etapa tardía se observó mayoritariamente una distribución difusa en núcleo y algunos puntos de mayor intensidad, sin embargo no se ven asociados a CR. Algo muy interesante es que tras la infección con el virus T495D (8G), en la etapa temprana se observó a la E1B localizada similar al virus wt, mientras que desde las 24 h.p.i se observó asociada a CR e inclusive en algunas fibras nucleares y citoplasmicas. En contraste en células infectadas con el virus T495A (8H) la proteína E1B se observó en puntos nucleares y citoplásmicos sobre una distribución difusa de 12 a 24 h.p.i. En tiempos tardíos la E1B se localizó difusa en el núcleo y en fibras de mayor intensidad tanto en núcleo como en el citoplasma.

En la infección con los diferentes virus se observaron patrones distintos de localización para la proteína viral DBP, sin embargo esto se discutirá en la siguiente sección.

En células infectadas con el virus silvestre (tanto 4100 como 2250), la proteína E4orf3 se localizó en estructuras en forma de tracks en los se localizó con la E1B, para la etapa tardía se observó principalmente en una distribución adyacente a los centros de replicación. Sorprendentemente durante la infección con el virus delP, la proteína E4orf3 se localizó en puntos en el citoplasma que, para la etapa tardía, se hicieron más evidentes. En el caso del virus pM, la E4orf3 mostró un patrón combinado, ya que se acumuló en tracks adyacentes a los CR, pero también se observó en numerosos puntos y fibras citoplasmáticas. Para el virus E1B – no hubo cambios en el patrón de localización. Sin embargo, se detecto una señal menor en tiempos tardíos de la infección. Los cambios en la distribución de la E4orf3 observados son muy variados y complejos, por lo tanto es difícil interpretar el efecto de la fosforilación de la E1B sobre la distribución intracelular de E4orf3, las posibles implicaciones de la fosforilación en E1B sobre la distribución de E4orf3 se discutirán más adelante.

Los resultados obtenidos en el mutante T495A mostraron que la E1B se localizó en fibras nucleares y citosólicas que aumentan conforme progresa el ciclo de

infección. Sin embargo, no sabemos si esto impacte la localización y sus funciones asociadas a esta. Se ha reportado que la fosforilación de en E1B impacta su SUMOilación y esto resulta en que se localiza eficientemente en el núcleo. Con el fin de obtener información sobre la localización y las funciones asociadas a la fosforilación en la treonina 495 (T495A) usamos un inhibidor de exportación nuclear (Leptomicina B).

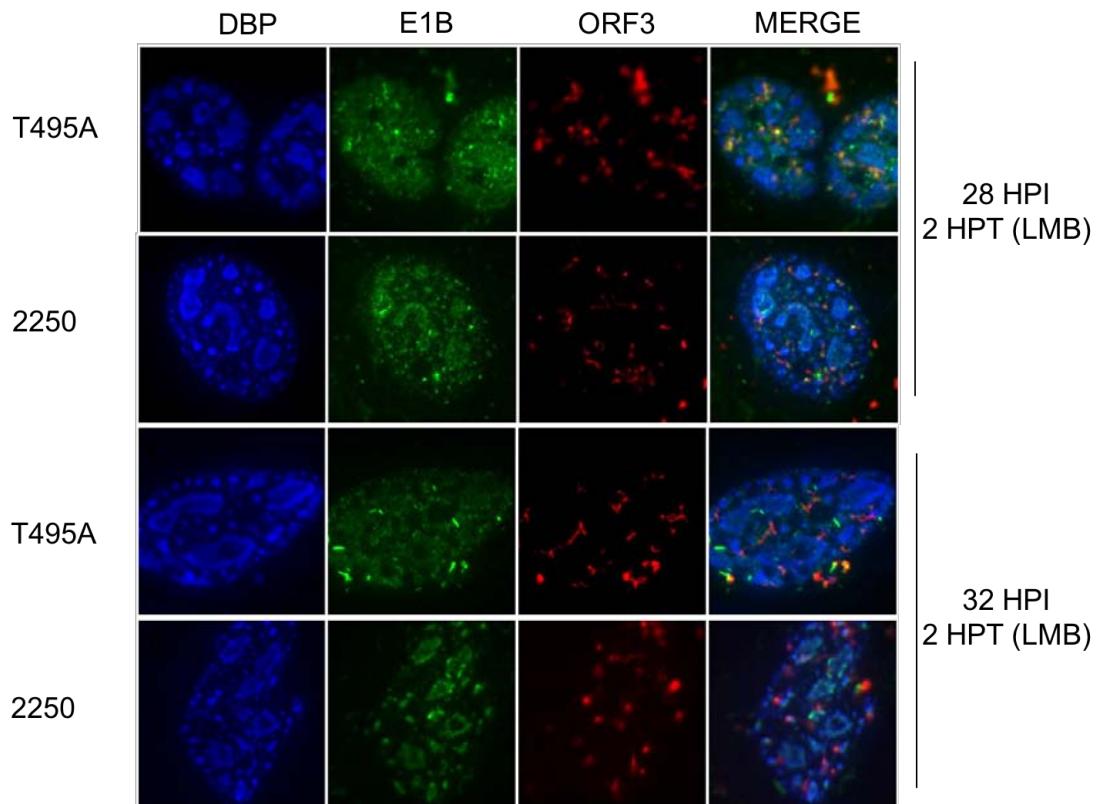


Figura 9. Localización intracelular de E1B T495A en células HFF tratadas con leptomicina B. Células HFF fueron infectadas con virus silvestre o TA y tratadas con LMB dos horas antes de ser fijadas (28 y 36 h.p.i), posteriormente se prepararon para inmunofluorescencia como se describió previamente.

La figura 9 muestra los resultados de la localización de E1B para el virus wt y T495A en células tratadas con leptomicina B (20 nM). En células infectadas con el virus silvestre y tratadas con LMB se observó a la E1B asociada en los CR como era de esperar tanto en 28 como en 36 h.p.i. En contraste, en células infectadas con el virus TA a las 28 h.p.i la E1B se localizó en fibras sobre una distribución difusa en el núcleo , que aumentaron para las 36 h.p.i. Por otra parte, no observamos cambios en la distribución de la proteína E4orf3. En conjunto estos

resultados muestran que la fosforilación en la treonina 495 es necesaria para la localización eficiente en CR, esto podría ocurrir si la T495 es requisito para la fosforilación de las Serinas 490 y/o 491 o si la sola fosforilación de este residuo es suficiente para favorecer la SUMOilación de la E1B (se discute más adelante).

7.4 La fosforilación en E1B impacta la cinética de formación de CR.

Como se describió anteriormente DBP es una proteína viral que se asocia al DNA viral de cadena sencilla que se está sintetizando; además tiene actividad de helicasa no dependiente de ATP y de esta manera participa en el mecanismo de replicación del genoma viral separando las hebras y uniéndose a la cadena retrasada para favorecer la estabilidad y una nueva ronda de replicación. Esta proteína se organiza en la periferia de los centros de replicación y su presencia en estos sitios se puede utilizar como un marcador para la formación de CR, por lo que el análisis de la cinética de distribución de DBP permite determinar la eficiencia con la que los centros de replicación se forman durante la infección. Debido a la observación de que las modificaciones por fosforilación en la proteína E1B impactan la localización de la proteína DBP, se infectaron células HFF con virus silvestres (H5pg4100 y 2250) y mutantes (delP, pM, E1B -, AA , DD y TD, como se describe en materiales y métodos) a tiempos de 12, 16, 20, 24, 28 , 32 y 36 h.p.i. Posteriormente se analizó la distribución de la proteína viral DBP mediante microscopía de inmunofluorescencia. La figura 10 muestra los resultados de estos experimentos. En células infectadas con el virus silvestre a las 12 h.p.i la proteína DBP se localizó difusa en núcleo y algunos puntos con mayor intensidad, a las 16 h.p.i estos puntos se hicieron evidentes sobre una distribución difusa, estos puntos nucleares eventualmente formaron zonas bien definidas en el núcleo en forma de anillos (CR a las 24, y 28 h.p.i), para tiempos tardíos de la infección estos anillos coalescieron y formaron estructuras diversas que invaden casi la totalidad del núcleo(wt 36 h.p.i). Para las células infectadas con el virus AA, E1B- y delP a tiempos tempranos se observó a DBP difuso en núcleo (12 a 20 h.p.i), solo

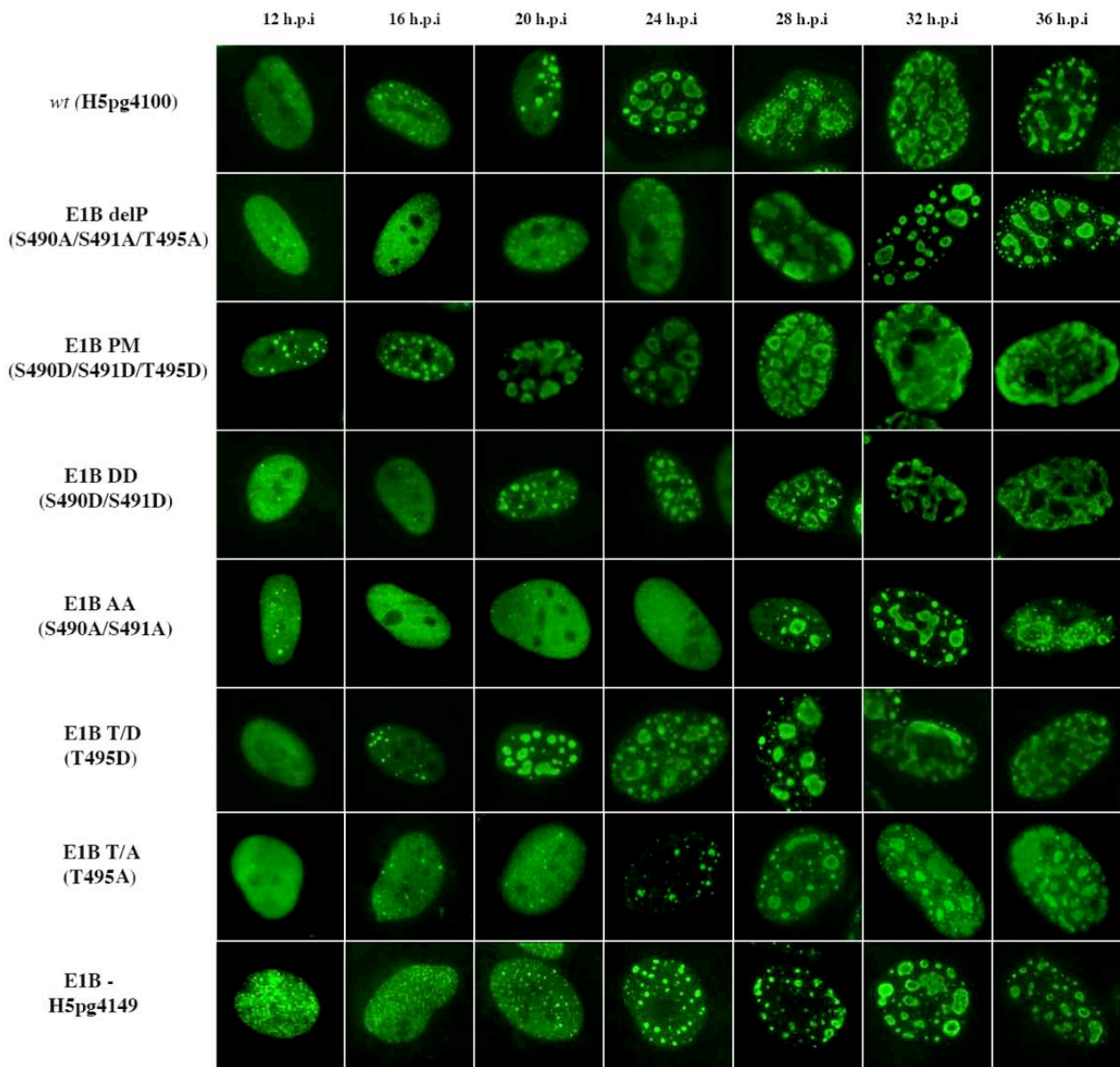


Figura 10 Análisis computacional de la cinética de formación de centros de replicación. Las imágenes fueron obtenidas mediante un microscopio de epifluorescencia (Axiovert 200M, Carl Zeiss Inc.) a 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 h.p.i posteriormente fueron tratadas con el algoritmo DLSF como se describe en materiales y métodos, los datos obtenidos se graficaron como dispersión de población a lo largo del tiempo, la barra roja indica la media de la población. A) Área de los CR obtenida a lo largo del tiempo para los virus construidos en el fondo genético 4100. B) Área de los CR obtenida para los virus construidos en el fondo genético 2250.

para el virus E1B – y delP a las 24 h.p.i se observó a DBP en puntos o engrosamientos bien definidos. Sin embargo, estos no formaron anillos en tiempos comparables con el virus wt. Para tiempos tardíos de la infección se observó a

DBP localizada en anillos bien definidos pero no se observó coalescencia. Para los virus DD y T/D la localización fue similar al virus silvestre, pero en tiempos tardíos se observó a los anillos coalescer más temprano. Interesantemente en el virus pM desde las 12 h.p.i se observó a DBP en puntos bien definidos sobre una distribución difusa comparable con las 20 h.p.i del virus silvestre. Para las 20 h.p.i se observó a DBP en anillos bien definidos e inclusive en tiempos tardíos (28 h.p.i) se observó un número mayor de anillos con respecto al virus wt.

Dado que hasta el momento la información obtenida de micrografías mediante microscopía de inmunofluorescencia acerca de la distribución de DBP en los CR ha sido cualitativa, hemos desarrollado un algoritmo para el análisis de imágenes obtenidas mediante microscopía que permite obtener información física de los CR (ver materiales y metodos) como: Area, perímetro, excentricidad, diámetro, intensidad media de fluorescencia y número de anillos por célula. De esta manera la selección de CR fué completamente automatizada. La figura 11 muestra los resultados de areas de CR obtenidas usando este algoritmo computacional en el conjunto de imágenes tomadas a lo largo del ciclo de replicación (60 imágenes por condición). Para el virus silvestre se observó un incremento progresivo en la media de la población desde las 16 horas hasta alcanzar un máximo a las 24 h.p.i, posterior a este tiempo se detectó una disminución de la media en el resto de los tiempos (figura 11 A). interesantemente en el virus PM se observó que el incremento en el intervalo de 12 a 16 h.p.i fue mayor y se alcanzó un pico máximo a las 20 h.p.i. Es decir, la población mostró CR de mayor tamaño en tiempos más tempranos con respecto al virus wt (Figura 11 B). En contraste, en los virus donde se afectó la fosforilación de la E1B o en el mutante que no la expresa, los graficos de violín no mostraron un incremento importante en el intervalo de 12 a 16 h.p.i. Además, se observó que aunque si hay un aumento conforme progresó el ciclo de infección, este fue discreto (Figura 11 C,D,E,y H). aunque los incrementos entre cada lapso de tiempo para el mutante T495D fueron mayores (Figura 11 G). Adicionalmente, se comparó la progresión en la formación de CR mediante las medias poblacionales (Figura 11 I). Este análisis mostró que cuando se afectan los

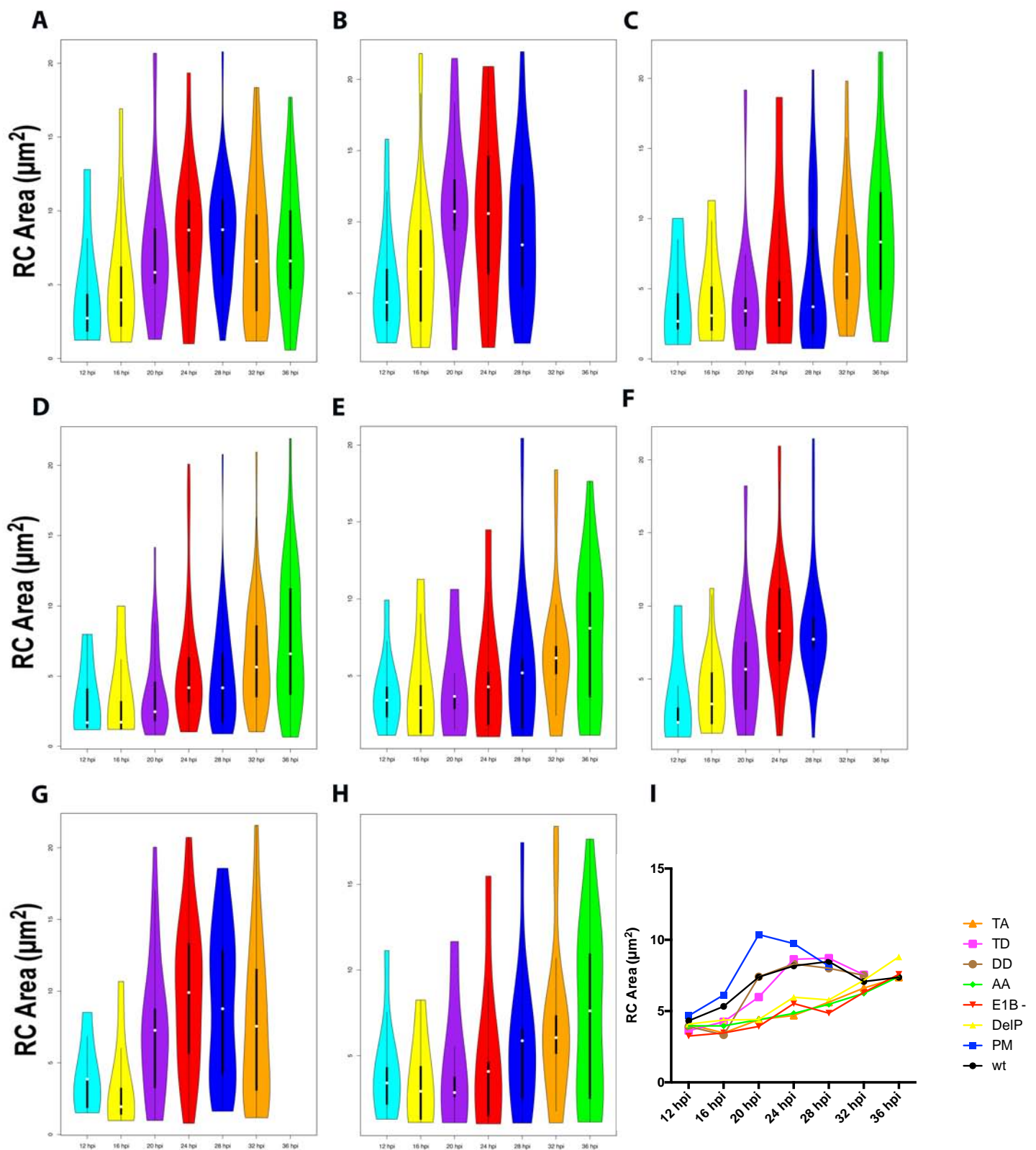


Figura 11. Análisis de la cinética de formación CR mediante el uso de DSLF. Células HFF fueron infectadas con virus silvestre o mutantes y fijadas a diferentes tiempos, posterior a esto se prepararon para inmunofluorescencia. El análisis de cada set de imágenes se muestra en los gráficos de violín desde 12 hasta 36 h.p.i **A) wt; B) PM; C) DelP; D) E1B -; E) AA; F) DD; G) T/D; H) T/A. I) Área de los CR obtenidos.** $n > 60$ células.

sitios de fosforilación en la E1B (serinas o treoninas) la progresión en la formación de CR es menor. Mientras que, cuando se mimetizó el estado fosforilado de serinas o treonina, no se afectó la eficiencia con la que se forman estos sitios. Sin embargo, es de notar que cuando se mimetizó el estado fosforilado de los 3 sitios, la progresión en el ciclo de infección es más eficiente incluso que en el virus wt. En conjunto estos datos sugieren que la fosforilación en las Ser y Thr de E1B tiene un efecto diferencial en la formación de centros de replicación viral y que impactan la cinética de formación de los CR. Hay que destacar que en la cinética de formación de CR en tiempos tardíos estos eventualmente coalescen e invaden todo el núcleo, desde luego que el uso de elipses para el ajuste de CR en estos tiempos carece de sentido. Sin embargo, proporcionan una primera evidencia que es útil para la caracterización de los CR. Los alcances del algoritmo y el uso en la cinética de infección se discuten más adelante.

7.5 Predicción de sitios de fosforilación en la E1B 55 kDa.

Como se describió en la introducción, la E1B es una proteína multifuncional de 496 aminoácidos que puede ser fosforilada en dos serinas 490/491 y/o la treonina 495. Recientemente se ha reportado que las serinas 490 y 491 son fosforiladas por CK2 (REF) y se ha propuesto que la treonina 495 puede ser fosforilada también por CK2 y por CK1. Sin embargo, no se tiene información acerca de la temporalidad de fosforilación. El análisis de secuencias de E1B de los 6 diferentes serotipos del género mastadenovirus humano (A a la F, Figura 12) mostró que el carboxilo terminal presenta una alta similitud de secuencia entre todos los serotipos y que las serinas 490 y 491 (referidas a Ad5) se encuentran completamente conservadas. Además, pese a que la treonina no se encuentra completamente conservada, en adenovirus 4 es sustituida por una serina que podría estar sujeta a fosforilación, En adenovirus 12 y 40 la treonina no está pero es sustituida por un ácido aspártico que provee una carga adicional en el C-terminal.


```
Adenovirus 5 (C) MERRNPSE RGV P A G F S G H A S V E S G C E T Q E S P A T V V F R P ---- P G N T D G G A A A A A G G S Q A      56
Adenovirus 2 (C) MERRNPSE RGV P A G F S G H A S V E S G C E T Q E S P A T V V F R P ---- P G N N T D G G A T A - G G S Q A A      55
Adenovirus 9 (D) M E P G H P T E Q Q L H P G L R S H A P V E G L D Q A A G T E N L L L A S T A S S G S S S S T Q T N I H V G G R N -      59
Adenovirus 36 (D) M E P G H P T E Q Q L H P G L R S H A P V E G L D Q A A G T E N L L L A S T A S S G S S S S T Q T N I H V G G R N -      59
Adenovirus 3 (B) M D P N S L Q Q G I R F G H S S F V E N M E G S Q D E D N L R L L A S A A S G S S R D T E P - T D H A S G S A -      58
Adenovirus 4 (E) M E S R N P F Q Q G L P A G F L S S S F V E N M E V P A P E C N L R L L A G T A A R H S E D P E S P - A ----      51
Adenovirus 12 (A) M E R E I P P E L G L H A G L H V N A A V E G M A --- E E E G L L L L A G A A F D H ----- A A A A D V      46
Adenovirus 40 (F) M E R P N S S V A G L Y S G L H G N G S V E N L A T -- E E E G L R L L A G A A S A R ----- F G S S - A      46
      * : * : * : . * * .          : :

Adenovirus 5 (C) A A A G A E P M E P E S R P G P S G M --- N V V Q V A E L F E L R R I L T I T E D --- G Q L K G V K R E R G A C      110
Adenovirus 2 (C) A A A G A E P M E P E S R P G P S G M --- N V V Q V A E L F E L R R I L T I N E D --- G Q L K G V K R E R G A S      109
Adenovirus 9 (D) -- E A G H G R E P E E R P G P S V G R G A G L N Q V S S L Y P E L S K V L T S ----- M A R G V K R E R S D G      109
Adenovirus 36 (D) -- E A G H G R E P E E R P G P S V G R G A G L N Q V S S L Y P E L S K V L T S ----- M A R G V K R E R S D G      109
Adenovirus 3 (B) --- G G A A G G Q S E S R P G P S G G G --- V A D L F P E L R R V L T R S T T --- S G Q N R G I K R E R N P S      107
Adenovirus 4 (E) --- A G S R R E S E S R P G P S G G G --- V A D L F P E L H R V L T R S S --- S G R E R G I K R E R H D E      99
Adenovirus 12 (A) A R G E G G G A E P C G G - G E V N ----- M E Q Q V Q E G H V L E R G E G P S C A D R R D K Q E K K E S L K      96
Adenovirus 40 (F) C R G G G - G G E P E G R P G P F N G I --- V T E P D P E E G T S S G Q R G G -- I N G Q R - G T K R M E N E      96
      . : *          :          : :

Adenovirus 5 (C) E A T E E A R N L F S L M T R H R P E C I T F Q Q I K D N C A N E L D L L A Q K Y S I E Q L T T Y W L Q P G D D F E E      170
Adenovirus 2 (C) E A T E E A R N L T F S L M T R H R P E C V T F Q Q I K D N C A N E L D L L A Q K Y S I E Q L T T Y W L Q P G D D F E E      169
Adenovirus 9 (D) G N T G M M T E L T A S L M N R K R P E R L T W Y E L Q Q E C R D E L G L M Q D K Y G L E Q I K T H W L N P D E D W E E      169
Adenovirus 36 (D) G N T G M M T E L T A S L M N R K R P E R L T W Y E L Q Q E C R D E I G L M Q D K Y G L E Q I K T H W L N P D E D W E E      169
Adenovirus 3 (B) G N N - S R T E L A L S L M S R R R P E T V W W H E V Q S E G R D E V S I L Q E K Y S L E Q L K T C W L E P E D D W E V      166
Adenovirus 4 (E) - T N - H R I E L T V G L M S R K R P E T V W W Y E V Q S T G T D E V S V M H E R F S L E Q V K T C W L E P E D D W E V      157
Adenovirus 12 (A) -- E A A V L S R L T V N L M S R P L E T V Y W Q E L Q D E F Q R G D M H L Q K Y S F E Q L K T H W L E P W E D M E C      155
Adenovirus 40 (F) -- G E D F L K E L T L S L M S R R H H E S V W W A D L E D F K N G E M N L L Y K Y T F E Q L K T H W L E A W E D F *      155
      . * : . * . * * : * : : : : : : . : : : : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

Adenovirus 5 (C) A I R V Y A K V A L R P D C K Y K I S K L V N I R N C C Y I S G N G A E V E I D T E D R V A F R C S M I N M W P G V L G      230
Adenovirus 2 (C) A I R V Y A K V A L R P D C K Y K I S K L V N I R N C C Y I S G N G A E V E I D T E D R V A F R C S M I N M W P G V L G      229
Adenovirus 9 (D) A I K K Y A K I A L R P D C K Y I V T K T V N I R H A C Y I S G N G A E V I D T L D K A A F R C C M M G R A G V M N      229
Adenovirus 36 (D) A I K K Y A K I A L R P D C K Y I V T K T V N I R H A C Y I S G N G A E V I D T L D K A A F R C C M M G R A G V M N      229
Adenovirus 3 (B) A I R N Y A K I S L R P D K Y R I T K K I N I R N A C Y I S G N G A E V I I D T Q D K A A F R C C M M G W P G V V D      226
Adenovirus 4 (E) A I R N Y A K L A L R P D R K Y K I T K L I N I R N A C Y I S G N G A E V E I C L Q D R V A F R C C M N M Y P G V V D      217
Adenovirus 12 (A) A I K A F A K L A L R P D C S Y R I T K T V T I T S C A Y I I G N G A E V E V D T S D R V A F R C R M Q G M G P G V V G      215
Adenovirus 40 (F) A L N T F A K V A L R P D T I Y T I K K T V N I R K C A Y V L G N A V V R P Q T C D R V A F N C A M Q S L P G L I G      215
      * : . : * * : * * * * : * : * : * * : * * : * * * * * * * * * * : * : * * * * * : * : * * * * * : * : * * * * * : * : * * * * *

Adenovirus 5 (C) M D G V V I M N V R F T G P N F S G T V F L A N T N L I L H G V S F Y G F N N T C V E A W T D V R V R G C A F Y C C W K      290
Adenovirus 2 (C) M D G V V I M N V R F T G P N F S G T V F L A N T N L I L H G V S F Y G F N N T C V E A W T D V R V R G C A F Y C C W K      289
Adenovirus 9 (D) M N S M I F M N K F N G E K F N G V L F M A N S H M L H G C S F F G F N N M C A E V W G A S K I R G C K F Y G C W M      289
Adenovirus 36 (D) M N S M I F M N I K F N G E K F N G V L F M A N S H M L H G C S F F G F N N M C A E V W G A A K I R G C K F Y G C W M      289
Adenovirus 3 (B) M E A V T L M N I R F R G D G Y N G I V F M A N T K L L H G C S F F G F N N T C V E A W Q V S V R G C S F Y A C W I      286
Adenovirus 4 (E) M D G V T F M N M R F R G D G Y N G I V F M A N T K L V H G C S F F G F N N T C I E A W Q V G V K G C S F S A N M W      277
Adenovirus 12 (A) L D G I T F I N V R F A G D K F K I M F E A N T C L V L H G V Y F L F N S I C V E S W N K V A R G C T F Y G C W K      275
Adenovirus 40 (F) M S G V T F M N V R F V V E G F N G T V F A S T T Q L T L H G V F F Q N C S G I C V D S W R V S A R G C T F V A C W K      275
      : . . : : * : : * * : : * : : * * * : * . . . * : *          : * * * * *

Adenovirus 5 (C) G V V C R P K S R A S I K K C L F E R C T L G I L S E G N S R V R H N V A S D C G C F M L V K S V A V I K H N M V C G N      350
Adenovirus 2 (C) G V V C R P K S R A S I K K C L F E R C T L G I L S E G N S R V R H N V A S D C G C F M L V K S V A V I K H N M V C G N      349
Adenovirus 9 (D) G V V G R P K S E M S V K Q C V F E K C Y L G V S T E G N A R V R H C S S L E T G C F C L V K G T A S L K H N M V K G C      349
Adenovirus 36 (D) G V V G R P K S E M S V K Q C V F E K C Y L G V S T E G N A R V R H C S S M E T G C F C L V K G T A S L K H N M V K G C      349
Adenovirus 3 (B) A T S G R V K S Q L S V K K C M F E R C N L G I L N E G A R V R H C A A T E T G C F I L I K G N A S V K H N M I C G H      346
Adenovirus 4 (E) G V V G R T K S M L S V K K C L F E R C H L G V M S E G A R I R H C A S T E T G C F V L C K G N A K I K H N M I C G A      337
Adenovirus 12 (A) G L V G R P K S K L S V K K C L F E R C V L A I L N E G D A H I R H N A A S E N A C F V L L K G M A I L K H N M V C G V      335
Adenovirus 40 (F) G V V G R N K S Q M S V K K C V F E R C I M A M V V E G Q A R I R H N A G S D N V C F L L L K G T A S V K H N M I C G G      335
      . * * * * * * * * * * * * * * : : : * * * : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Adenovirus 5 (C) C E D R A S Q M L T C S D G N C H L L K T I H V A S H R K A W P V F E H N I L T R C S L H L G N R R G V F L P Y Q C N      410
Adenovirus 2 (C) C E D R A S Q M L T C S D G N C H L L K T I H V A S H R K A W P V F E H N I L T R C S L H L G N R R G V F L P Y Q C N      409
Adenovirus 9 (D) T D E R M Y N M L T C D S G V C H I L K N I H V T S H P R K K W P V F E N N L I K C H M H L G A R R G T F Q P Y Q C N      409
Adenovirus 36 (D) T D E R M Y N M L T C D S G V C H I L K N I H V T S H P R K K W P V F E N N L I K C H M H L G A R R G T F Q P Y Q C N      409
Adenovirus 3 (B) S D E R P Y Q M L T C A G G H C N I L A T V H I V S H A R K K W P V F E H N V I T K T M H I G G R G M F M P Y Q C N      406
Adenovirus 4 (E) S D E R G Y Q M L T C A G G S H M L A A V H V A S H R K P W P E F E H N V M T R C N M H L G A R R G M F M P Y Q C N      397
Adenovirus 12 (A) S D Q T M R R F V T C A D G N C H T L K T V H I V S H S R H C W P V C D H N M F M R C T I H L G L R R G M F R P S Q C N      395
Adenovirus 40 (F) G H --- S Q L L T C A D G N C A L R V F V V S H P R P W P V F E H N M L M R C T V H L G A R R G M F S P Y Q S N      392
      . : : * * * * . * : * * . * * : * * * * * : * * : * * * * * : * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Adenovirus 5 (C) L S H T K I L L E P E S M S K V N L N G V F D M T M K I W K V L R Y D E - T R T R C R P C E C G G K H I R N Q P V M L D      469
Adenovirus 2 (C) L S H T K I L L E P E S M S K V N L N G V F D M T M K I W K V L R Y D E - T R T R C R P C E C G G K H I R N Q P V M L D      468
Adenovirus 9 (D) F S Q T K L L L E N D A F S R V N L N G I F D M D V S V Y K I L R Y D E - T K S R V R A C C G G R H T R M Q P V A L D      468
Adenovirus 36 (D) F S Q T K L L L E N D A F S R V N L N G I F D M D V S V Y K I L R Y D E - T K S R V R A C C G G R H T R M Q P V A L D      468
Adenovirus 3 (B) M N H V K V M L E P D A F S R V S L T G I F D M N I Q L W K I L R Y D D - T K P R V R A C C G G K H A R F Q P V C V D      465
Adenovirus 4 (E) L N Y K V L L E P D V M S R V S L T G V F D M N V E V W K I L R Y D E - Y K T R C R A C C G G K H A R F Q P V C V D      456
Adenovirus 12 (A) F S H S N I M L E P E V F S R V L C N G V F D L S V E L C K V I R Y N D D T R H R C R Q C E C G S S H L E L R P I V L N      455
Adenovirus 40 (F) F C H T K V M L E T D A F S R V W N G V F D L T M E L F K V V R Y D E - S K V R C R P C C G A N H I R L Y P A I L N      451
      : : : : * : * * : * : * * * : * : * * * * : * : * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Adenovirus 5 (C) V T E E L R P D H L V L A C T R A E F G S S D E D T D      496
Adenovirus 2 (C) V T E E L R P D H L V L A C T R A E F G S S D E D T D      495
Adenovirus 9 (D) V T E E L R P D H L V M A C T G T F S S S G E D T D      495
Adenovirus 36 (D) V T E E L R P D H L V M A C T G T F S S S G E D T D      495
Adenovirus 3 (B) V T E D L R P D H L V L A C T G A E F G S S G E E T D      492
Adenovirus 4 (E) V T E D L R P D H L V L S C T G T F G S S G E E S D      483
Adenovirus 12 (A) V T E E L R S D H L T S C L R T D Y E S S D E D D N      482
Adenovirus 40 (F) V T E Q L R T D H Q M M S C L R T D Y E S S D E D - -      476
      * * * * * * * * * * * * * * : * * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

Figura 12: Alineamiento de secuencias de E1B de diferentes serotipos de adenovirus (A - F).

Dado que nuestros datos sugieren que la fosforilación de la treonina 495 es necesaria para la fosforilación de las serinas 490 y/o 491 resulta indispensable obtener información sobre el impacto de modificaciones en serinas o treonina sobre la fosforilación de los residuos vecinos.

Con este objetivo, empleamos el algoritmo descrito por Blom N et. al. Esta herramienta permite predecir fosforilación en serinas, treoninas y tirosinas

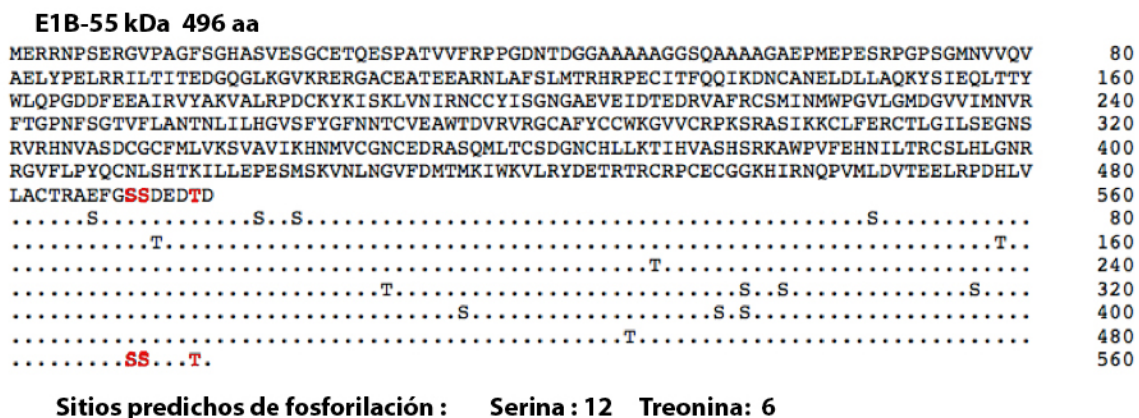


Figura 13: Secuencia de aminoácidos de la E1B 55 kDa de adenovirus . Las secuencias fueron analizadas mediante el algoritmo descrito por Blom N et. al. Los sitios predichos para fosforilación se muestran en la línea discontinua y los sitios confirmados experimentalmente se muestran en rojo.

para después generar tablas de probabilidades para diferentes cinasas, dada una secuencia en la proteína. Este algoritmo se basan en conjuntos de datos de sitios aceptores observados, ya sea por la exploraciones de bibliotecas de péptidos o extraídos de la literatura respectivamente, con la modificación de este algoritmo analizamos la secuencia de la proteína E1B silvestre (Figura 13). Los resultados mostraron que la E1B podría ser fosforilada en 12 serinas y 6 treoninas. Sin embargo de todas estas predicciones solo las serina 490, 491 y la treonina 495 han sido confirmadas experimentalmente, dado que el algoritmo toma en cuenta secuencias de 12 aa (xxxxxxS/Txxxxxx) no se predice el impacto de regiones lejanas al sitio y desde luego tampoco las implicaciones de la estructura terciara

de la proteína pudiera tener. Sin embargo por predicciones estructurales de la E1B se ha propuesto que el carboxilo terminal es intrínsecamente desordenado (REF). Por lo anterior enfocamos el análisis de los datos sobre la región c-terminal de la E1B wt y mutantes. Los resultados que se muestran en la figura 14 muestran que en la E1B wt las serinas 490 y 491 podrían ser fosforiladas con una probabilidad alta (0.831 y 0.998 respectivamente) por CK2. Adicionalmente, nuestros resultados proponen que la treonina es fosforilada por CK2 (0.950) y también CK2 o GSK3 aunque con menor probabilidad. Para la E1B mutante donde se sustituyen las serinas por alaninas (S490A/S491A), la probabilidad de que la treonina sea fosforilada se mantuvo sin cambios. Mientras que cuando se sustituyó las serinas por ácido aspártico, la fosforilación de la treonina 495 disminuye considerablemente con respecto al virus silvestre (0.200), Además cuando se sustituyo solo una de las dos serinas por alanina (S490A o S491A) no observamos impacto en la treonina y por el contrario, cuando se sustituyó serina por aspártico (S490A o S491D) solo en el cambio de S491A observamos una ligera disminución.

E1B 55 kDa	S490	S491	T495	S490	S491	T495
wt	0.831	0.998	0.950	0.831 unsp	0.998 unsp	0.980 CKII
S490A/S491A	---	---	0.952	0.736 CKII	0.599 CKII	0.747 GSK3
S490D/491D	---	---	0.200	0.517 CKI	0.472 cdc2	0.428 PKC
S490A	---	0.998	0.950	0.455 GSK3	0.433 GSK3	0.372 CKI
S490D	---	0.998	0.628	0.413 CaM-II	0.420 CaM-II	0.354 cdc2
S491A	0.760	---	0.560	0.379 cdc2	0.410 ATM	0.338 DNAPK
S491D	0.686	---	0.601	0.361 DNAPK	0.400 CKI	0.280 p38MAPK
T495A	0.274	0.098	---	0.338 RSK	0.352 DNAPK	0.273 PKG
T495D	0.984	0.997	---	0.310 ATM	0.316 RSK	0.242 ATM
				0.301 PKG	0.267 p38MAPK	0.241 RSK
				0.281 PKA	0.243 PKG	0.165 cdk5
				p38MAPK	0.190 PKA	0.109 PKA
				0.170 PKB	0.145 cdk5	0.096 unsp
				0.152 cdk5	0.108 PKB	0.082 CaM-II
				0.093 PKC	0.073 PKC	0.078 PKB

Figura 14: Predicción de fosforilación de Serinas 490, 491 y Treonina 495 de la E1B de Ad5 . Las secuencias fueron analizadas mediante el algoritmo descrito por Blom N et. al. A) Muestra las probabilidades obtenidas para cada residuo. B) cinasas propuestas para cada residuo.

Estos datos sugieren que modificaciones en las serinas impactan la fosforilación de la treonina y viceversa que la fosforilación de la treonina podría impactar la de

las serinas. Por lo anterior, se analizó el efecto en mutantes donde la treonina 495 se sustituyó por alanina o ácido aspártico. Interesantemente, en el mutante treonina por ácido aspártico la fosforilación de las serinas se vio favorecida (0.960 y 0.997), mientras que cuando se sustituye este residuo por alanina, la fosforilación en las serinas disminuye (0.274 y 0.398). En conjunto estos resultados muestran que la fosforilación en la treonina 495 favorece la fosforilación de las serinas 490 y 491 y que además la fosforilación de las serinas impacta la fosforilación de la treonina.

8. DISCUSIÓN

Como se describió en la introducción, la E1B es una proteína multifuncional que participa en múltiples procesos que median la progresión eficiente del ciclo de replicación de adenovirus (Berk 2005). El papel de la E1B en la fase temprana de la infección es clave para el progreso del ciclo de replicación pues inhibe la respuesta antiviral de la célula inactivando al supresor tumoral p53 e inhibiendo la respuesta celular al daño en el DNA. Como se describió anteriormente se sabe también que la proteína E1B es modificada por SUMOilación y por fosforilación y que estas modificaciones modulan varias de sus funciones durante el ciclo de replicación viral. En particular, se ha reportado que la fosforilación parece tener un efecto diferenciado dependiendo de qué residuos son fosforilados. En este trabajo se analizó el efecto de la fosforilación de la E1B sobre su localización y sobre el impacto de la síntesis de DNA viral.

Nuestros datos muestran que tras la infección La E1B se acumula en puntos nucleares que parecen estar en todo el núcleo a excepción de nucleolos y en los que se localizó con E4orf3 y que las modificaciones en los sitios de fosforilación parecen no impactar su distribución en el núcleo en tiempos tempranos . Con el avance del ciclo de replicación la E1B se observó asociada a CR (DBP) viral y E4orf3 adyacente a estos sitios, como se ha descrito antes (Evans and Hearing 2003; Araujo, Stracker et al 2005; Evans and Hearing 2005). Cuando las Ser 490 y 491 no pueden ser fosforiladas (S490A/S491A), la E1B se localizó en CR. Sin embargo, esto sucede más tarde que en el virus silvestre. Cuando ninguno de los tres sitios puede ser fosforilado (S490A/S491A/T495A), la E1B no se localizó en CR e inclusive se observó distribuida en núcleo y citoplasma. Esto correlaciona con datos que muestran que la fosforilación de la E1B favorece su SUMOilación y que esta forma es necesaria para su localización en el núcleo. Adicionalmente cuando se mimetizó el estado fosforilado de la E1B (S490D/S491D/T495D), E1B se relocalizó más eficientemente que en el virus silvestre. Interesantemente cuando se mimetizó el estado fosforilado de las serinas (S490D/S491D) la asociación de la E1B a CR es menor. Interesantemente el mutante T/A (T495A) la

E1B se localizó difusa en el núcleo y fibras citoplasmáticas que aumentaron de tamaño conforme progresa el ciclo de replicación. En contraste para el virus T/D (T495D) la E1B se localizó eficientemente en CR comparado con el virus wt lo que sugiere que la modificación por fosforilación en este residuo tiene un papel clave sobre su localización asociada a CR.

Estos datos muestran que la fosforilación de la E1B es necesaria para su localización en los CR y aún más, que la fosforilación de la Thr 495 podría ser necesaria para la localización eficiente asociada a estos sitios.

Dadas las diferentes combinaciones de mutantes en serinas y/o treonina y los diferentes fenotipos que observamos se esperaría que el fenotipo del virus DD fuera similar al virus pM pues en este mutante existe la posibilidad de que el tercer sitio sea fosforilado y como resultado de esto comportarse como el mutante triple por ácido aspártico. Pese a lo anterior, el mutante DD muestra defectos en la localización de E1B asociada a CR.

Estos datos podrían indicar que la fosforilación de las Ser podría inhibir la fosforilación de la Thr y que esta es clave para las funciones de la proteína. Lo anterior dado que en la infección con el mutante AA no se observan defectos en la localización de E1B asociada a CR y un efecto sutil en la síntesis de DNA viral. Adicionalmente, nuestros datos sugieren que la fosforilación de cada uno de los sitios sujetos a esta modificación, podría ser secuencial. Es decir, podría ser que la Thr tenga que ser fosforilada para que se fosforilen las Ser y/o que cuando se fosforilan las Ser no se pueda fosforilar la Thr. Sin embargo, estos resultados no permiten diferenciar entre estas posibilidades.

Se ha reportado que E1B es fosforilada en las serinas 490 y 491 por CK2 sin embargo nada se sabe sobre el responsable de la fosforilación de la Thr 495, se ha propuesto que la Thr 495 cae en un marco consenso para CK1 o que la misma CK2 pudiera fosforilar también este residuo. Además, se ha reportado que la fosforilación en las 2 serinas y la treonina e interesantemente en un mutante donde las serinas son remplazadas por alaninas la fosforilación de la treonina se

mantiene .

Dado que no se sabe que modificación o modificaciones en la E1B resultan en las actividad de la proteína, resulta indispensable diseñar experimentos que permitan obtener información sobre el estado fosforilado de la E1B cuando la Thr o las Ser se encuentren fosforiladas. Sin embargo, nuestros datos sugieren fuertemente que la fosforilación de la treonina en la E1B es clave en su localización y quizá en sus funciones asociadas a CR.

Se sabe que las Ser 490 y 491 se encuentran conservadas entre las E1B de los adenovirus de todos los diferentes serotipos, mientras que la Thr no lo está por completo. Por ejemplo, en Ad12 y Ad41, la Thr 495 no está. En ambos casos sabemos que pese a la ausencia de la Thr 495 el sitio está sustituido por un aminoácido cargado (D o E) y más aún en Ad12 que es uno de los virus más oncogénicos el cambio de esta treonina por un aminoácido cargado podría resultar en el incremento de la activación de la E1B. Por lo anterior, resulta fácil imaginar que las modificaciones de la Thr 495 en los demás adenovirus podría ser clave para la regulación de sus funciones. Sabemos que la fosforilación de las Ser es mediada por CKII, mientras que la Thr podría ser fosforilada por CKI pues se encuentra en un sitio consenso para esta cinasa. Además, por resultados bioinformaticos se ha predicho que las cinasas GSK3 y PKC pueden fosforilar la Treonina 495 y que esto favorece la probabilidad de fosforilación de las Serinas. Por esto, no es difícil imaginar que exista un orden en la fosforilación de cada sitio y que la fosforilación y desfosforilación de la Thr y Ser podrían estar sujetos a diferentes eventos de regulación de las actividades de la E1B.

Datos de nuestro grupo muestran que en células HFF infectadas con un virus mutante que no expresa la proteína E1B, la síntesis de DNA viral es deficiente; en este trabajo analizamos el efecto de la fosforilación de la E1B en las Ser y Thr sobre la síntesis de DNA viral. Nuestros datos muestran que cuando se mimetizó el estado fosforilado de los tres sitios (S490D/S491D/T495D) o solo de la T495 resultó en que la síntesis de DNA viral fue eficiente e inclusive se detectó un incremento en tiempos tempranos de la infección. Por el contrario, cuando las Ser

no pueden ser fosforiladas (S490A/491A) la síntesis de DNA viral es similar al virus silvestre. Interesantemente el virus mutante T495A la síntesis de DNA viral es deficiente similar al virus que no expresa a la E1B. Esto último sugiere que la fosforilación en la Thr 495 es clave para la síntesis eficiente de DNA viral. Sin embargo, no está claro por qué la fosforilación de los tres sitios o de la Thr resultaría en que la síntesis de DNA viral inicie antes. Una posibilidad es que la fosforilación resulte en que la síntesis de DNA viral sea un proceso altamente eficiente mediante un mecanismo directo o indirecto. Esto es, las copias nuevas sintetizadas se acumulan más rápido en comparación con el virus silvestre, esto explicaría el aumento que observamos para las 16 h.p.i en el virus pM. Alternativamente, el efecto que observamos puede corresponder a que el ciclo de replicación en estos mutantes avance más rápido y por tanto la síntesis de DNA viral sea anticipada. Sin embargo, estos experimentos no permiten distinguir entre estas posibilidades, y resulta necesario diseñar experimentos donde podamos diferenciar entre si la E1B tiene alguna actividad directa en el mecanismo de replicación o mediante interacción indirecta con factores celulares y/o virales necesarias para la replicación del DNA viral. En conjunto los datos muestran que cuando la E1B se localiza eficientemente en CR la síntesis de DNA viral es eficiente y que estos procesos son dependientes de fosforilación. Adicionalmente, nuestros datos muestran que no es necesaria la fosforilación de las Ser para la síntesis eficiente de DNA y que se requiere la fosforilación de la Thr 495 para la síntesis eficiente de DNA viral. Resultados previos del laboratorio muestran que en células infectadas la proteína E1B es relocalizada a centros de replicación viral y que su localización en estos sitios correlaciona con el reclutamiento del factor transcripcional celular p53 y con la síntesis eficiente de DNA viral, pero no se sabe si su asociación con estos sitios está directamente ligada a la replicación del DNA. Una posibilidad es que la E1B participe directamente en el reclutamiento de moléculas celulares involucradas en el mecanismo de síntesis de DNA viral a CR. Por lo que determinar el impacto de la fosforilación sobre la formación de CR podría ser clave en el entendimiento de este mecanismo.

Debido a la observación de que las modificaciones por fosforilación en E1B

impactan su localización y además la síntesis de DNA viral, analizamos si estas modificaciones tienen impacto sobre la progresión del ciclo de replicación viral, para esto analizamos la cinética de formación de centros de replicación en células HFF infectadas con el virus silvestre y mutantes, mediante el uso del algoritmo DLSFE (Yasel et. al. 2016). En células infectadas con el virus silvestre los CR se forman en la transición a la etapa tardía, por lo que para las 24 h.p.i estos sitios ya están formados. DBP se localiza en anillos y puntos nucleares bien definidos. Con el avance del ciclo de replicación estos sitios virales incrementan en tamaño y eventualmente coalescen formando estructuras diversas y complejas hacia el final del ciclo de replicación. Con el objetivo de caracterizar los CR empleamos un algoritmo computacional diseñado para evaluar los CR. Con esta herramienta pudimos caracterizar el área de los CR de cada población de células infectadas a lo largo del ciclo replicativo. Los resultados muestran que la fosforilación de la E1B impacta la distribución de la proteína DBP pues cuando se mimetizó el estado fosforilado se detectaron más CR de una mayor área, y por el contrario cuando se inhibió la capacidad de fosforilación de los tres sitios (delP) o cuando la proteína E1B no se produce (E1B -) la detección de CR se ve retrasada y solo a tiempos tardíos se logró detectar un incremento en el área de estas zonas virales. Algo interesante es que en el virus T/D se identificaron CR desde la etapa temprana que continúan creciendo en área hasta tiempos tardíos comparables con el virus wt. Sorprendentemente, en células infectadas con el virus T/A observamos un retraso en el incremento del área de los CR similar a los virus E1B – y AA. Estos resultados muestran que la fosforilación de la E1B favorece la formación de los CR viral y sugieren fuertemente que la fosforilación de la treonina 495 es necesaria para este proceso.

Dado que la fosforilación de serinas y treonina tienen un efecto diferencial sobre la formación de CR sugerimos que la fosforilación en E1B es necesaria para su localización asociada a CR y que la fosforilación de la T495 podría estar sujeta a un mecanismo regulado en el que existe un mecanismo de fosforilación secuencial o estados intermedios en donde tiene que ocurrir la fosforilación de la treonina 495 para que la fosforilación de la serinas o serina se favorezca.

El análisis de CR mediante el uso de un algoritmo automatizado permite la identificación y caracterización de regiones virales de interés. Hasta el momento no se ha reportado el uso de estas herramientas para el análisis de imágenes obtenidas por inmunofluorescencia. Los datos obtenidos mediante el uso de esta herramienta permiten hacer un análisis no solo sistematizado sino además estadístico de estos ambientes virales.

El análisis de secuencias muestra que la E1B presenta una gran similitud entre distintas E1B de los diferentes serotipos (de la A a la F) y que el carboxilo presenta solo algunas variaciones. Mediante el uso de un algoritmo para el análisis de secuencia e identificación de sitios sujetos a fosforilación encontramos que las serinas 490 y 491 se proponen como sitios sujetos a fosforilación mediada por CKII, esto correlaciona con lo ya reportado en la literatura. Interesantemente para la treonina 495 de la cual aún no se tienen datos experimentales sobre la cinasa que fosforila este sitio, encontramos que podría ser fosforilada con una probabilidad alta mediante CKII, GSK3 O CKI. Estos datos además sugieren que la fosforilación de la treonina precede la fosforilación de las serinas por lo que podría existir un mecanismo donde la treonina 495 tenga que ser fosforilada para favorecer la fosforilación de las serina 491 y adicionalmente la 490. Además, no tenemos información acerca del balance fosforilación desfosforilación de la E1B durante el ciclo de replicación, por lo que resulta clave diseñar experimentos que nos permitan obtener información del mecanismo de fosforilación en la E1B.

En conjunto nuestros datos sugieren que la fosforilación por lo menos de la Thr 495 es clave para las funciones de E1B para la eficiente progresión del ciclo de replicación viral. Esto ultimo además tomando en cuenta el hecho de que en los sistemas celulares Hek-293 y 2E2 no se logró amplificar el virus mutante T495A. Dado que en ambas líneas se encuentran transformadas con este oncogen, existe la posibilidad de que el cambio en esta posición sea critico y de tal manera cuando sucede este cambio en el genoma, las particulas virales que revierten el cambio predominan sobre la población y finalmente se genera una nueva población con el virus wt. Interesantemente cuando se amplificó en células HeLa no observamos

ninguna cambio en la secuencia y las partículas virales producidas contienen la mutación en la T495A. Sin embargo la cantidad de partículas virales infecciosas que se producen disminuye bastante con respecto a virus wt.

No obstante, podríamos esperar que la fosforilación diferencial de la E1B tuviera efectos sobre sus múltiples funciones y que éstas se definan por su asociación a otras moléculas.

9. CONCLUSIONES.

- La mutación de la treonina 495 en E1B por alanina es revertante en el sistema celular Hek-293 y en 2E2.
- La fosforilación de la Thr 495 es necesaria para la localización de E1B en CR.
- La localización de la E1B asociada a CR correlaciona con la síntesis eficiente del DNA viral.
- La fosforilación de la E1B es necesaria para la formación eficiente de centros de replicación.
- La fosforilación de las Ser 490 y 491 no es irrelevante para las funciones de la E1B. Sin embargo, la fosforilación de la T495 es clave para sus funciones.
- Existe un mecanismo regulado secuencial de fosforilación en la E1B.
- La caracterización de la cinética de formación de CR se puede realizar mediante el uso del algoritmo DLSF.
- La fosforilación de los tres sitios de la E1B favorece la relocalización de E1B a CR, esto correlaciona con la formación eficiente de estas zonas y con la replicación de DNA viral y producción de progenie eficiente.
- La fosforilación de los tres sitios de la E1B favorece la relocalización de E1B a CR, esto correlaciona con la formación eficiente de estas zonas y con la replicación de DNA viral y producción de progenie eficiente.

10. PERSPECTIVAS.

Debido a que hasta el momento no sabemos si el efecto de la fosforilación sobre la síntesis de DNA viral se debe a un efecto directo o indirecto, sugerimos realizar análisis de los genes tempranos que participan en el mecanismo de replicación y adicionalmente realizar inmunofluorescencias contra proteínas virales y celulares que están involucradas directamente en la síntesis de DNA viral, así como determinar el impacto que tiene la proteína E1B sobre la estructuración de los CR mediante el uso de microscopía de super resolución.

Como se describió anteriormente la proteína E1B puede ser fosforilada por la cinasa CKII en las Ser 490 y 491, sin embargo la Thr se encuentra en un sitio consenso para CKI, por lo que la inhibición de cinasas en el contexto de la infección contribuirá a obtener información acerca de si la Thr 495 es fosforilada independientemente de las Ser y que esto resulte en su estado funcional. Adicionalmente hacer uso de inmunoprecipitaciones con virus silvestre y mutantes contra E1B y determinar su estado fosforilado. Esto ultimo brindará información sobre el mecanismo de fosforilación y/o el impacto de la fosforilación en serinas o treonina sobre sus actividades.

Dado que hasta el momento no conocemos la estructura de la E1B resulta indispensable hacer ensayos de purificación de la proteína con el fin de resolver su estructura mediante el uso de NMR. De esta manera podremos obtener información sobre el impacto de mutaciones en los sitios sujetos a fosforilación sobre el plegamiento de la proteína.

11 REFERENCIAS

- Araujo, F.D., et al., Adenovirus type 5 E4orf3 protein targets the Mre11 complex to cytoplasmic aggresomes. *J Virol*, 2005. 79(17): p. 11382-91.
- Backstrom, E., et al., Adenovirus L4-22K stimulates major late transcription by a mechanism requiring the intragenic late-specific transcription factor-binding site. *Virus Res*, 2010. 151(2): p. 220-8.
- Baker, A., et al., Adenovirus E4 34k and E1b 55k oncoproteins target host DNA ligase IV for proteasomal degradation. *J Virol*, 2007. 81(13): p. 7034-40.
- Bates, S., et al., p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature*, 1998. 395(6698): p. 124-5.
- Benedict, C.A., et al., Three adenovirus E3 proteins cooperate to evade apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1 and -2. *J Biol Chem*, 2001. 276(5): p. 3270-8.
- Berk, A.J., et al., Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell*, 1979. 17(4): p. 935-44.
- Bernardi, R., et al., PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol*, 2004. 6(7): p. 665-72.
- Berscheminski, J., et al., The adenoviral oncogene E1A-13S interacts with a specific isoform of the tumor suppressor PML to enhance viral transcription. *J Virol*, 2013. 87(2): p. 965-77.
- Blanchette, P., et al., Both BC-box motifs of adenovirus protein E4orf6 are required to efficiently assemble an E3 ligase complex that degrades p53. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(21): p. 9619-29.
- Blanchette, P., et al., Control of mRNA export by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins during productive infection requires E4orf6 ubiquitin ligase activity. *J Virol*, 2008. 82(6): p. 2642-51.
- Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence *Proteomics*. 2004 Jun;4(6):1633-49. Review.
- Burgert, H.G., J.L. Maryanski, and S. Kvist, "E3/19K" protein of adenovirus type 2 inhibits lysis of cytolytic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(5): p. 1356-60.
- Cardoso, F. M., Sayuri E.M. Kato, et al. (2008). "An early function of the adenoviral E1B 55 kDa protein is required for the nuclear relocalization of the cellular p53 protein in adenovirus-infected normal human cells." *Virology* **378**: 339-346.
- Cheng, X. and H.Y. Kao, Post-translational modifications of PML: consequences and implications. *Front Oncol*, 2012. 2: p. 210.
- Corbin-Lickfett, K.A. and E. Bridge, Adenovirus E4-34kDa requires active proteasomes to promote late gene expression. *Virology*, 2003. 315(1): p. 234-44.

- de Stanchina, E., et al., E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev*, 1998. 12(15): p. 2434-42.
- de Stanchina, E., et al., PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell*, 2004. 13(4): p. 523-35.
- 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.
- Degli Esposti M, D.C., Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2003. 304(3): p. 455-61.
- de Stanchina, E., et al., PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell*, 2004. 13(4): p. 523-35.
- Endter, C., et al., Blockage of CRM1-dependent nuclear export of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa protein augments oncogenic transformation of primary rat cells. *Oncogene*, 2005. 24(1): p. 55-64.
- 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.
- Evans, J.D. and P. Hearing, Relocalization of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex by the adenovirus E4 ORF3 protein is required for viral replication. *J Virol*, 2005. 79(10): p. 6207-15.
- Everett, R.D. and M.K. Chelbi-Alix, PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie*, 2007. 89(6-7): p. 819-30.
- Everett, R.D., Interactions between DNA viruses, ND10 and the DNA damage response. *Cell Microbiol*, 2006. 8(3): p. 365-74.
- Farley, D.C., J.L. Brown, and K.N. Leppard, Activation of the early-late switch in adenovirus type 5 major late transcription unit expression by L4 gene products. *J Virol*, 2004. 78(4): p. 1782-91.
- Fogal, V.G.M., et al., Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J*, 2000. 19(22): p. 6185-6195.
- Frese, K.K., et al., Selective PDZ protein-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by the adenovirus E4-ORF1 oncoprotein. *Oncogene*, 2003. 22(5): p. 710-21.
- Frisch, S.M. and J.S. Mymryk, Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(6): p. 441-52.
- 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* **378**(2): 339-346.
- Gallimore, P.H., Interactions of adenovirus type 2 with rat embryo cells. Permissiveness, transformation and in vitro characteristics of adenovirus transformed rat embryo cells. *J Gen Virol*, 1974. 25(2): p. 263-73.
- Gill, G., SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev*, 2004. 18(17): p. 2046-59.
- 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.

- 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.
- Gostissa, M., Hofmann, T. G., Will, H., and Del Sal, G., Regulation of p53 functions: let's meet at the nuclear bodies. *Curr Opin Cell Biol.*, 2003. 15(3): p. 351-7.
- Grand, R.J., et al., Definition of a major p53 binding site on Ad2E1B58K protein and a possible nuclear localization signal on the Ad12E1B54K protein. *Oncogene*, 1999. 18(4): p. 955-65.
- Hay, R.T., SUMO: a history of modification. *Mol Cell*, 2005. 18(1): p. 1-12.
- Hilleman, M. R., J. H. Werner, and M. T. Stewart. 1955. Grouping and occurrence of RI (prototype RI-67) viruses. *Proc Soc Exp Biol Med* 90:555-562.
- Hilleman, M. R., J. H. Werner, H. E. Dascomb, and R. L. Butler. 1955. Epidemiologic investigations with respiratory disease virus RI-67. *American journal of public health and the nation's health* 45:203-210.
- Hilleman, M. R., J. H. Werner, H. E. Dascomb, R. L. Butler, and M. T. Stewart. 1955. Epidemiology of RI(RI-67) group respiratory virus infections in recruit populations. *American journal of hygiene* 62:29-42.
- Hobom, U. and M. Dobbelstein, E1B-55-kilodalton protein is not required to block p53-induced transcription during adenovirus infection. *J Virol*, 2004. 78(14): p. 7685-97.
- Huang, W. and S.J. Flint, The tripartite leader sequence of subgroup C adenovirus major late mRNAs can increase the efficiency of mRNA export. *J Virol*, 1998. 72(1): p. 225-35.
- Jasdave S. Chahal* and S. J. Flint, The p53 Protein Does Not Facilitate Adenovirus Type 5 Replication in Normal Human Cells, *J. Virol.* May 2013; 87(10): 6044–6046.
- Jones, K.A., et al., A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell*, 1987. 48(1): p. 79-89.
- Jordan Wright and Keith N. Leppard, The Human Adenovirus 5 L4 Promoter Is Activated by Cellular Stress Response Protein p53 *J Virol.* Nov 2013; 87(21): 11617–11625.
- Kao, C.C., Yew, P. R., and Berk, A. J., Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55K proteins. *Virology*, 1990. 179(2): p. 806-14.
- Leppard, K.N. and R.D. Everett, The adenovirus type 5 E1b 55K and E4 Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components. *J Gen Virol*, 1999. 80 (Pt 4): p. 997-1008.
- Lowe, S.W. and H.E. Ruley, Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev*, 1993. 7(4): p. 535-45.
- Luo, K., et al., Adenovirus E4orf6 assembles with Cullin5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase through an HIV/SIV Vif-like BC-box to regulate p53. *FASEB J*, 2007. 21(8): p. 1742-50.

- Martin, M.E. and A.J. Berk, Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. *J Virol*, 1998. 72(4): p. 3146-54.
- Morris, S.J. and K.N. Leppard, Adenovirus serotype 5 L4-22K and L4-33K proteins have distinct functions in regulating late gene expression. *J Virol*, 2009. 83(7): p. 3049-58.
- Morris, S.J., G.E. Scott, and K.N. Leppard, Adenovirus late-phase infection is controlled by a novel L4 promoter. *J Virol*, 2010. 84(14): p. 7096-104.
- O'Shea, C.C., et al., Heat shock phenocopies E1B-55K late functions and selectively sensitizes refractory tumor cells to ONYX-015 oncolytic viral therapy. *Cancer Cell*, 2005. 8(1): p. 61-74.
- Pennella, M.A., et al., Adenovirus E1B 55-kilodalton protein is a p53-SUMO1 E3 ligase that represses p53 and stimulates its nuclear export through interactions with promyelocytic leukemia nuclear bodies. *J Virol*, 2010. 84(23): p. 12210-25.
- 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.
- Querido, E., et al., Identification of three functions of the adenovirus e4orf6 protein that mediate p53 degradation by the E4orf6-E1B55K complex. *J Virol*, 2001. 75(2): p. 699-709.
- Querido, E., et al., Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J Virol*, 1997. 71(5): p. 3788-98.
- Rowe, W. P., J. W. Hartley, and R. J. Huebner. 1956. Additional serotypes of the APC virus group. *Proc Soc Exp Biol Med* 91:260-262.
- Rowe, W. P., R. J. Huebner, L. K. Gilmore, R. H. Parrott, and T. G. Ward. 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 84:570-573.
- Schreiner, S., et al., Proteasome-dependent degradation of Daxx by the viral E1B-55K protein in human adenovirus-infected cells. *J Virol*, 2010. 84(14): p. 7029-38.
- Soria, C., et al., Heterochromatin silencing of p53 target genes by a small viral protein. *Nature*, 2010. 466(7310): p. 1076-81.
- Steegenga, W.T., et al., Distinct modulation of p53 activity in transcription and cell-cycle regulation by the large (54 kDa) and small (21 kDa) adenovirus E1B proteins. *Virology*, 1995. 212(2): p. 543-54.
- Teodoro, J.G. and P.E. Branton, Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J Virol*, 1997. 71(5): p. 3620-7.
- Teodoro, J.G., et al., Phosphorylation at the carboxy terminus of the 55-kilodalton adenovirus type 5 E1B protein regulates transforming activity. *J Virol*, 1994. 68(2): p. 776-86.
- White, E., et al., Adenovirus E1B 19-kilodalton protein overcomes the cytotoxicity of E1A proteins. *J Virol*, 1991. 65(6): p. 2968-78.

- Whyte, P., et al., Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 1988. 334(6178): p. 124-9.
- Wimmer, P., et al., Cross-talk between phosphorylation and SUMOylation regulates transforming activities of an adenoviral oncoprotein. *Oncogene*, 2013. 32(13): p. 1626-1637.
- 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.
- Yew, P.R. and A.J. Berk, Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature*, 1992. 357(6373): p. 82-5.
- 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.