

Susana López Charretón*

Biología molecular de virus Interacciones de los virus con su célula huésped

Los virus son parásitos obligados y como tales, dependen totalmente de la maquinaria celular para todos los eventos necesarios para la replicación de su genoma. Independientemente del virus del que se trate, el ciclo replicativo de los virus tiene varios pasos comunes que requieren de mecanismos y proteínas presentes en la célula huésped:

1. La unión y la entrada a la célula depende del reconocimiento específico de receptores en la superficie de la célula, y la entrada depende en general de algún mecanismo de endocitosis que normalmente es empleado por la célula huésped; 2. Ya en el interior de la célula, los virus requieren de transcribir y replicar su genoma, y traducir sus proteínas. Para todos estos procesos, los virus utilizan la maquinaria celular, tomando el control de ésta y dándole preferencia a su ciclo replicativo, en detrimento de su huésped. 3. Finalmente para concluir el ciclo, se ensamblan nuevos virus que salen de la célula, a la que ya han desgastado, para infectar nuevas células y así continuar con su replicación. En todos estos procesos existen múltiples interacciones entre las proteínas virales y celulares a través de las cuales los virus desvían las funciones de las proteínas celulares para su beneficio. En esta serie de cuatro presentaciones se revisan ejemplos de cómo virus pertenecientes a distintas familias interaccionan con diversas proteínas celulares durante su ciclo replicativo.

Para su entrada, el virus del dengue (un flavivirus), utiliza varios receptores en la superficie de la célula, entre estos receptores hay cuando menos dos proteínas de choque térmico que están organizadas en microdominos lipídicos de la membrana y que aumentan en respuesta a un tratamiento de calor. En este trabajo se propone que la entrada del virus del dengue podría depender del estado fisiológico

co en el que se encuentre la célula huésped.

Los astrovirus, agentes causales de gastroenteritis, requieren de ser procesados proteolíticamente para poder infectar a su célula huésped, y la proteasa responsable de este procesamiento es una proteasa que normalmente se encuentra en el lumen del intestino delgado, lugar donde estos virus se replican. También durante su morfogénesis para ser liberados, estos virus dependen de un procesamiento proteolítico en el interior de la célula. Interesantemente estos virus inducen apoptosis en las células infectadas y hacen uso de las caspasas que se activan en este proceso para su liberación.

Durante la infección, los rotavirus se apoderan de la maquinaria de traducción de la célula para que se sintetizan preferencialmente sus proteínas a expensas de las proteínas celulares. Una de las proteínas no estructurales del virus interacciona con un factor de iniciación de la traducción y así bloquea la síntesis de las proteínas celulares. ¿Cómo se lleva a cabo la traducción de las proteínas de rotavirus en ausencia de este factor? es una pregunta que aun sigue sin contestarse.

Finalmente, los adenovirus que se replican en el núcleo de la célula huésped también se apoderan de la maquinaria celular para su beneficio, en este caso una de las estrategias que emplean es que una de las proteínas tempranas del virus interacciona con una proteína celular y esta interacción promueve que se exporten preferencialmente los mensajeros del virus al citoplasma de la célula, donde serán traducidos. Este mecanismo a la vez inhibe el transporte de los mensajeros celulares, en detrimento de la síntesis de proteínas celulares.

* Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México, Depto Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Av. Universidad 2001, Col Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62210, México. E-mail: susana@ibt.unam.mx

Proteínas celulares involucradas en la unión y entrada del virus del dengue

Rosa M. del Angel,* Salvador Chávez-Salinas,* Jorge Reyes-del Valle,** Ivonne Ceballos-Olvera,* Fernando Medina*

* Depto. de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN, México, D.F. 07360. E-mail: rmangel@cinvestav.mx

** Molecular Medicine Program, Mayo College of Medicine Rochester, MN, USA 55905.

El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante a nivel mundial. Los cuatro serotipos del virus, miembros del género Flavivirus (familia Flaviviridae), son virus con un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de 10.7 kb cuyo único marco de lectura abierto codifica para las tres proteínas estructurales: E, M y C y para siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5).

Como ocurre con otros virus, el primer paso en la infección por dengue requiere la interacción entre la partícula viral y el complejo receptor presente en la superficie de la célula huésped. La glicoproteína E, es la proteína viral que interacciona con el complejo receptor y lo hace a través del dominio III o carboxi-terminal (Crill and Roehring, 2001).

Con respecto al complejo receptor para dengue, se ha descrito que el glicosaminoglicano heparán sulfato (HS), presente en la superficie de diversas células, une al virus (Germi et al. 2002) y permite el primer contacto, mientras que en las células dendríticas este primer contacto lo realiza la lectina de unión a ICAM3, DC-SIGN (Lozach et al. 2005). Adicionalmente el virus también usa algunas proteínas celulares como parte del complejo receptor, entre las que se han descrito el receptor de alta afinidad de laminina de 37/67 kDa y la proteína GRP78 (Thepparat, and Smith, 2004; Jindadamrongwech et al. 2004). Nuestro grupo, usando cromatografía de afinidad con la proteína E de dengue 4 (Reyes-del Valle and del Angel, 2004), logramos purificar cinco proteínas de superficie de las líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY-5Y y promonocítica U937, dos de las cuales fueron identificadas como las proteínas de choque térmico de 90 (HSP90) y 70 kDa (HSP70) (Reyes-del Valle et al. 2005). Los anticuerpos contra ambas proteínas inhiben la infección de manera dosis-dependiente (Reyes-del Valle et al. 2005) sugiriendo su participación como receptores. Mediante ensayos de FACS sobre células no permeabilizadas y permeabilizadas logramos demostrar que ambas HSPs se encuentran tanto en el citoplasma como en la superficie de la célula. Como es bien sabido que en muchos casos las HSPs son capaces de asociarse a estructuras compactas ricas en colesterol de la membrana plasmática conocidas como mi-

crodominios membranales o rafts, aislamos las fracciones correspondientes a microdominios membranales de células incubadas y no incubadas con el virus del dengue encontrando que ambas HSPs se relocalizaron a los rafts sólo después de haber sido incubadas con dengue, sugiriendo que la interacción virus-célula ocurre a través de estos elementos de la membrana plasmática. Dado que la abundancia de colesterol en los rafts determina su comportamiento, decidimos eliminar el colesterol de las células U937 con la droga metil-β-ciclodextrina (MCD) y someterlas a infección por dengue. Bajo estas condiciones encontramos que MCD inhibió la infección de manera dosis dependiente (Reyes-del Valle, et al. 2005), sugiriendo que el colesterol es indispensable durante la infección.

Dado que las HSPs se inducen en respuesta a estrés decidimos analizar el efecto de distintas condiciones de estrés como el choque térmico o el tratamiento con geldanamicina en la infección por dengue. Primeramente encontramos que la cantidad de HSP90 y HSP70 en la superficie celular se aumentó como consecuencia del estrés y no solamente esto, sino que éstas se relocalizaban a rafts. Concomitantemente, se observó un aumento en la entrada viral (Chávez-Salinas et al. enviado), apoyando la idea de que el estrés podría jugar un papel importante en la infección viral.

Con lo antes expuesto es probable que el estado fisiológico en el que se encuentre la célula huésped, el tipo y la cantidad de las proteínas celulares que se expresan en ese momento determine la susceptibilidad y la respuesta inmune inducida por el virus.

REFERENCIAS:

1. Crill, W. D. and Roehring J. T. 2001. Monoclonal antibodies that bind to domain III of DEN E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J. Virol.* 75, 4002-4007
2. Germi, R., Crance, J. M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, L., et al. 2002. Heparan sulfate-mediated binding of infectious DEN type 2 and yellow fever virus. *Virology* 292, 162-168.
3. Jindadamrongwech, S. and Smith, D. 2004. Identification of GRP78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch. Virol.* 149, 915-927.

4. Lozach, P-Y, Burleigh, L., Staropoli, I., Navarro-Sánchez, E., et al. 2005. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J. Biol. Chem.* 280, 23698-23708
5. Reyes-del Valle, J. and Del Angel, R. M. 2004 Isolation of putative DEN receptor molecules by affinity chromatography using a recombinant E protein ligand. *J Virol Methods* 116, 95-102.
6. Reyes del Valle, J., Chávez-Salinas, S., Medina F and del Angel, R.M. 2005. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of Dengue virus receptor complex in human cells. *J. Virol.* 79, 4557-4567.

La liberación y la entrada de astrovirus humano en su célula huésped son promovidas por proteasas de origen celular

Ernesto Méndez

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, 62210, México. E-mail: ernesto@ibt.unam.mx

Los astrovirus son la segunda causa de gastroenteritis viral en niños menores de cinco años. Estos virus también se han asociado a casos de gastroenteritis en otros mamíferos y a enfermedades de alta mortalidad, en algunas aves. El genoma de estos virus está formado por una sola cadena de RNA de polaridad positiva (6.8 Kb), lo cual significa que en ausencia de proteínas virales, éste es capaz de iniciar un ciclo de replicación para producir progenie infecciosa (Mendez y Arias, 2006). El RNA genómico contiene tres marcos abiertos de lectura: ORF1a, ORF1b y ORF2, de los cuales, los dos primeros se utilizan para sintetizar poliproteínas no estructurales, que se procesan proteolíticamente para generar productos más pequeños que son necesarios en la replicación del genoma viral (Méndez et.al., 2003). Por otro lado, el ORF2 codifica para una poliproteína (denominada VP90), que al igual que las proteínas no estructurales, debe sufrir un procesamiento proteolítico para generar a la proteína VP70, presente en el virión maduro. Este procesamiento ocurre en el carboxilo terminal de VP90, en una región rica en aminoácidos ácidos, es intracelular, y se genera después de que VP90 se ha ensamblado en partículas virales. Además, este corte está muy relacionado con la liberación del virus al medio extracelular y, por lo tanto, es importante para que el virus complete exitosamente su ciclo replicativo (Méndez et.al., 2004).

Durante el proceso infeccioso de un virus en su célula huésped, los productos virales interactúan con componentes celulares, para facilitar: 1) su adsorción y penetración a la célula, 2) la replicación de su genoma, 3) el ensamble de nuevos viriones y, 4) la liberación de estos viriones. Por el lado de la célula, tales interacciones provocan en muchos casos, una respuesta antiviral que puede manifestarse a diferentes niveles y cuya finalidad es la de bloquear la replicación del virus. La activación de la muerte celular por apoptosis es un ejemplo de tal

tipo de respuesta (Teodoro y Branton, 1997). Durante este proceso, se activan enzimas proteolíticas (denominadas caspasas), que degradan moléculas celulares que son esenciales para la célula, provocando eventualmente su muerte.

En el caso de astrovirus, se ha observado que este virus induce la activación de caspasas en la célula infectada por un mecanismo aún desconocido; sin embargo, este proceso en lugar de bloquear la replicación del virus, promueve el corte de la proteína VP90 generando VP70, lo que resulta en la liberación del virus al medio extracelular. De esta manera, la interacción de algunos componentes del astrovirus con la célula inducen una respuesta, que aprovechada para su liberación, completando así, su ciclo replicativo (Mendez et.al., 2004).

Los partículas maduras de astrovirus que han sido liberadas de la célula huésped están formados por la proteína VP70. Estas partículas virales no son infecciosas por sí mismas, ya que la proteína VP70 debe de sufrir una serie de cortes proteolíticos que resultan en la generación de tres proteínas de 25, 27 y 34 kDa (denominadas VP25, VP27 y VP34, respectivamente) y que son necesarios, para que el virus pueda establecer una infección productiva (Méndez et.al., 2002). La proteasa responsable de este procesamiento es la tripsina, enzima producida por el huésped y normalmente secretada al lumen del intestino delgado, sitio donde se localizan las células blanco a la infección por astrovirus. El tratamiento de las partículas de astrovirus que contienen VP70 con tripsina incrementa hasta 1,000 veces la capacidad del virus para infectar a su célula huésped. Durante este proceso de activación de la infectividad, ocurren al menos seis cortes proteolíticos sobre VP70, generando cinco intermediarios, además de VP25, VP27 y VP34, que son los productos finales (Mendez et.al., 2002). Existen muchos

indicios de que estos cortes por tripsina provocan y/o facilitan los cambios estructurales y funcionales tanto en el virus como en la célula huésped que son necesarios en las primeras interacciones para lograr la penetración del virus.

A pesar de los avances logrados en el estudio de las vías de procesamiento de las proteínas estructurales de astrovirus, de las proteasas celulares responsables, y de su importancia en los procesos de liberación y entrada del virus, existen interrogantes aún por responder acerca de los mecanismos y moléculas celulares directamente involucradas en estos últimos procesos.

El uso de enzimas proteolíticas de origen celular por los astrovirus para procesar sus proteínas y facilitar tanto su liberación como su entrada a su célula huésped, son ejemplos de cómo los astrovirus han desarrollado estrategias que les permiten contrarrestar, y/o aprovechar, la re-

spuesta celular para establecer una infección productiva y completar su ciclo de replicación.

REFERENCIAS

1. Méndez E., M.T. Fernández, Méndez-Toss, M., and Arias, C.F. 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J. Virol.* 76:7996-8002.
2. Méndez, E. , M. P. E. Salas-Ocampo, M. E. Munguía and C. F. Arias . 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of a human astrovirus serotype 8. *J. Virol.* 77:11378-11384.
3. Méndez, E., M. P. E. Salas-Ocampo y C. F. Arias. 2004. Caspases mediate the processing of the capsid precursor and the cell release of human astroviruses. *J. Virol.* 78:8601-8608.
4. Méndez, E. and C.F. Arias. 2006. "Astroviruses" In D. Knipe, P. Howley (Eds) *Fields Virology*, Lippincott-Raven, Philadelphia, In Press.
5. Teodoro, J. G., and P. E. Branton. 1997. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J. Virol.* 71:1739-1746.

Secuestrando la maquinaria biosintética de la célula: La estrategia de los rotavirus

Hilda Montero y Susana López

Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México, Depto Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Av. Universidad 2001, Col Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62210, México. E-mail: susana@ibt.unam.mx

Las gastroenteritis infecciosas agudas son la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años en los países en desarrollo, con alrededor de mil millones de episodios diarreicos y entre cuatro y cinco millones de muertes por año. Los rotavirus del grupo A son la causa principal de las diarreas deshidratantes severas en niños menores de dos años, y se ha estimado que una vacuna efectiva contra estos virus podría evitar cerca de 600,000 muertes de infantes cada año (Parashar et al., 2003).

Los rotavirus del grupo A, miembros de la familia *Reoviridae*, son virus no envueltos que tienen aproximadamente 100 nm de diámetro. El virión maduro está compuesto por tres capas concéntricas de proteínas que engloban al genoma viral, el cual consta de once segmentos de RNA de doble cadena. La capa más interna del virión está formada por 60 dímeros de la proteína VP2, que rodea al genoma viral y a pequeñas cantidades de la RNA polimerasa VP1, y de la guanililtransferasa VP3. VP6, la proteína más abundante del virión, constituye la capa intermedia. La capa más externa está formada por dos proteínas, VP4 y VP7, que son las proteínas responsables de las primeras interacciones del virus con su célula huésped. El genoma viral también codifica por seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6), que

son sintetizadas en las células infectadas y que participan durante los procesos de replicación del genoma viral y la morfogénesis del virus (Estes, 2001).

Durante la infección, el virus se apropia del control de la maquinaria de síntesis de proteínas, de manera que la síntesis de proteínas celulares está casi completamente inhibida, mientras que la célula sintetiza casi exclusivamente proteínas virales. ¿Cómo logran los rotavirus establecer este control? Normalmente, en el proceso de síntesis de proteínas, la mayoría de los mRNAs celulares contienen una estructura Cap en su extremo 5' y una cola de poliA en el extremo 3'. El Cap es reconocido por la proteína eIF4E que es la proteína que une Cap, y ésta a su vez interacciona con la proteína eIF4G que es una proteína de andamiaje que junto con la helicasa eIF4A, forman el complejo de iniciación de la traducción conocido como eIF4F. La proteína PABP (por sus siglas en inglés de Poli-A Binding Protein) se une al extremo poli-A de los mRNAs y a su vez se une a la proteína eIF4G, con la consecuente circularización del mRNA (Hershey & Merrick, 2000). Se ha propuesto que esta circularización del mRNA durante el inicio de la traducción es necesaria para la eficiente traducción

de los mRNAs (Imataka et al., 1998). Ahora bien, los mRNAs de rotavirus tienen Cap en su extremo 5', pero no contienen poli-A en su extremo 3', en su lugar todos los mRNAs de rotavirus contienen un tetranucleótido (GACC-3') que esta conservado entre todos los mRNAs del virus. Hace algunos años, Piron et al (Piron et al., 1998) mostraron que la proteína no estructural NSP3 es capaz de interaccionar con la proteína celular eIF4G. Por otra parte, se había encontrado que esta proteína viral también interacciona de manera secuencia específica con la secuencia consenso presente en el extremo 3' terminal de todos los mRNAs, de modo que se propuso que la proteína NSP3 es capaz de sustituir a la PABP celular y de esta manera garantizar la síntesis de proteínas virales y a la vez de inhibir la síntesis celular (Piron et al., 1998).

En nuestro laboratorio, recientemente implementamos la metodología de interferencia del RNA (RNAi) en la que mediante RNAs pequeños de 21 pares de bases (siRNAs) se puede inducir la degradación secuencia-específica de un mRNA, con el consecuente silenciamiento de la expresión de la proteína codificada por dicho mRNA (Arias et al., 2004). Utilizamos siRNAs dirigidos a silenciar la expresión de la proteína NSP3 para estudiar el efecto de la ausencia de esta proteína *in vivo*, ya que los experimentos en los que se propuso su función habían sido realizados principalmente *in vitro*, o en sistemas heterólogos. Encontramos que al silenciar la expresión de esta proteína, la síntesis de proteína celular ya no fue inhibida, como era de esperarse, sin embargo sorprendentemente encontramos que la síntesis de proteína viral no se vio afectada por la ausencia de NSP3. Al analizar el efecto del silenciamiento de esta proteína sobre la producción de progenie viral, encontramos que las células infectadas en las que se inhibió la expresión de NSP3 produjeron hasta 3 veces más partículas virales infecciosas, comparadas con células control que fueron transfectadas con un siRNA irrelevante; estos hallazgos correlacionaron con el hecho de que la síntesis del mRNA viral y del RNA genómico

también aumentaron hasta tres veces. Para corroborar que la interacción entre NSP4 y el factor eIF4G no era necesaria para la síntesis de la proteína viral, silenciamos la expresión de este factor mediante RNAi y encontramos que la síntesis de proteínas virales no se afectó significativamente en ausencia de este factor (Montero et al, sometido). En conjunto estos resultados sugieren que: i) la interacción de NSP3 con el factor eIF4G inhibe la síntesis de proteínas celulares, pero no es necesaria para la traducción de las proteínas virales; y ii) en ausencia de NSP3 hay una mayor transcripción y replicación del genoma viral muy posiblemente debido al hecho de que en ausencia de NSP3, la RNA polimérica viral, VP1, que normalmente se une al extremo 3' de los mRNAs, tiene un mayor acceso a los mRNAs virales. Queda ahora por determinar cual es el mecanismo que utilizan los rotavirus para garantizar la síntesis de su proteínas y cuales son las proteínas celulares involucradas en este mecanismo.

REFERENCIAS

1. Arias, C. F., Dector, M. A., Segovia, L., López, T., Camacho, M., Isa, P., Espinosa, R. & López, S. 2004. RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res* 102,43-51.
2. Estes, M. K. 2001. Rotaviruses and their replication. In *Virology*, 4th edn, pp. 1747-1785. Edited by D. N. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, PA.: Lippincott Williams and Wilkins.
3. Hershey, J. W. B. & Merrick, W. C. 2000. Translational control of gene expression, pp. 33-88. Edited by N. Sonenberg, J. W. B. Hershey & M. B. Mathews. New York: Cold Spring Laboratory.
4. Imataka, H., Gradi, A. & Sonenberg, N. 1998. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.* 17,7480-7489.
5. Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A. & Glass, R. I. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 9,565-572.
6. Piron, M., Vende, P., Cohen, J. & Poncet, D. 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* 17,5811-5821.

Regulación de la producción de mRNA por los oncogenes E1B Y E4 de adenovirus

González R. A,* S. J. Flint**

* Facultad de Ciencias, UAEM, Cuernavaca, Morelos, 62209. E-mail: rgonzalez@buzon.uaem.mx

** Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, NJ, 08544.

Los adenovirus (Ad) pertenecen a la familia *Adenoviridae*; son virus icosaédricos, no envueltos, con un genoma de DNA lineal de doble cadena, de ca. 36 kilobases (kb). El genoma está organizado en unidades transcripcionales tempranas y tardías. Los genes tempranos se encargan de establecer condiciones óptimas para la expresión de los genes tardíos, lo que resulta en la producción de grandes cantidades de progenie viral. Las unidades tempranas de transcripción, E1 y E4 contienen genes con actividades diversas. Los productos de E1A activan la transcripción de genes virales y celulares e inducen la entrada en la fase S del ciclo celular; los de E1B y E4 inhiben la actividad de supresores tumorales y apoptosis y, pueden cooperar con E1A en la transformación oncogénica de la célula (Shenk T. 1996). En la fase tardía las proteínas virales no controlan la transcripción de genes celulares, pero la síntesis de proteínas celulares es inhibida por mecanismos que permiten la acumulación preferencial de mRNA virales en citoplasma y favorecen su traducción (Shenk 1996; Flint y González 2003). Las proteínas tempranas E1B 55 kDa (E1B) y E4 orf6 (orf6), son esenciales para la replicación eficiente del virus. Estas proteínas se asocian entre sí y como complejo son necesarias, tanto para la exportación selectiva de los mRNA virales tardíos, como para inducir la degradación del supresor tumoral, p53 (Flint y González 2003). La E1B interacciona también con la proteína E4 orf3 (orf3) y con una proteína celular denominada E1B-AP5 (AP5). La orf3 es necesaria para formar microdominios nucleares en los que se replica y transcribe el genoma viral (Centros de replicación nuclear-CRN) (Tauber y Dobner 2001), mientras que AP5 se asocia directamente con TAP, encargada de la exportación de mRNA en metazoarios (Kang y Cullen 1999). Se ha propuesto que la unión de la E1B con AP5, favorece la exportación selectiva de los mRNA virales; la AP5 interacciona también con p53, pero la función de esta interacción se desconoce (Gabler, et al. 1998; Barral et al. 2005). Aunque es claro que las interacciones que se establecen entre las proteínas E1B y E4 y, entre éstas con proteínas celulares no pueden suceder simultáneamente, no se ha descrito cómo la formación de cada complejo regula: i) la reorganización del núcleo, ii) la exportación selectiva de mRNA virales y iii) la proliferación y muerte celular.

Para aprender sobre las funciones de las E1B y E4 en estas actividades, se han utilizado mutantes de Ad con inserciones en el gen de la E1B. Estos mutantes han sido muy útiles, ya que la inserción en diferentes sitios del polipéptido altera de manera específica la unión de la E1B ya sea con orf6, p53 o AP5 y permite relacionar los fenotipos de cada mutante a la ausencia de cada complejo (Flint y González. 2003). Al analizar el efecto de las alteraciones en la E1B sobre el metabolismo de los mRNA del virus, encontramos que la localización de la proteína en los CRN, así como la exportación selectiva de mRNA virales, depende del complejo E1B-orf6. Estos experimentos nos permitieron sugerir que el mecanismo de exportación selectiva de mRNA depende de la organización funcional del núcleo en la célula infectada (González y Flint 2002). En estos experimentos, se utilizaron células HeLa, una línea celular transformada que no expresa niveles normales de p53. Para estudiar el papel de las interacciones de las E1B y orf6 en presencia de p53, analizamos la replicación de Ad en fibroblastos humanos (HFF) que expresan niveles normales de p53. Para estos experimentos seleccionamos mutantes en los que la E1B no interacciona con la orf6 (A143) o con defectos en la interacción de E1B tanto con orf6 como con p53 (H224). Encontramos que estos mutantes no inhiben la síntesis de proteínas celulares y sintetizan niveles muy bajos de proteínas virales tardías, comparables a los obtenidos con un mutante de Ad que no expresa la E1B (Hr6). Al medir la concentración de mRNA virales tardíos, encontramos que en ausencia del complejo E1B-orf6 (A143), se induce una exportación deficiente de los mRNA virales, mientras que la reducción en la interacción de E1B con orf6 y p53 (H224), disminuye la producción de mRNA virales en el núcleo. En el caso del mutante que no expresa la E1B (Hr6), los niveles de mRNA virales fueron apenas detectables. La síntesis de DNA viral en células infectadas con los mutantes A143, H224 y Hr6, se encontró casi totalmente abatida en ausencia de la E1B (Hr6) y muy reducida en ausencia de la interacción eficiente de la E1B con orf6 y p53 (H224), no así cuando sólo se abate la unión entre E1B y orf6 (A143) (González et al. 2006). Estos resultados no eran esperados: en células HeLa infectadas con Hr6, la exportación de mRNA virales es deficiente, pero no exhiben otros defectos en la síntesis

de mRNA o en la progresión del ciclo de replicación viral. En conjunto, los resultados sugieren que la E1B es necesaria para la entrada a la fase tardía del ciclo de replicación en células HFF, un requisito que no se ha observado en células transformadas. Además, estas observaciones sugieren que la formación de diferentes complejos entre las proteínas E1B y E4 con proteínas celulares -en particular p53- son determinantes para el mecanismo postranscripcional encargado de regular la exportación selectiva de mRNA virales en células infectadas por Ad.

REFERENCIAS

1. Barral PM, Rusch A, Turnell AS, Gallimore PH, Byrd PJ, Dobner T, Grand RJ. 2005. The interaction of the hnRNP family member E1B-AP5 with p53. *FEBS lett.* 579:2752-8.
2. Flint S.J. & R.A. Gonzalez. 2003. Regulation of mRNA production by the adenoviral E1B 55 kDa and E4 orf6 proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 272:287-330.
3. Gabler, S., H. Schutt, P. Groitl, H. Wolf, T. Shenk, and T. Dobner. 1998. E1B 55 kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J. Virol.* 72:7960-7971.
4. Gonzalez RA,& Flint SJ. 2002. Effects of mutations in the adenoviral E1B 55 kDa protein coding sequence on viral late mRNA metabolism. *J. Virol.* 76:4507-4519.
5. Gonzalez RA, Huang W, Finnen R, Bragg C, and S.J. Flint. 2006. Adenovirus E1B 55-Kilodalton Protein Is Required for both Regulation of mRNA Export and Efficient Entry into the Late Phase of Infection in Normal Human Fibroblasts. *J. Virol.* 80:964-974.
6. Kang Y, Cullen BR. 1999. The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes Dev.* 13:1126 -1139.
7. Shenk , T. 1996. Adenoviridae and their replication, p. 2111-2148. In B. Fields, P. Howley, and D. Knipe (ed.), *Fields Virology*. Raven Press, New York, N.Y.
8. Tauber B, Dobner T. 2001. Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene.* 278:1-23.

Correspondencia:

Susana López

Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México. Depto. Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62210, México. E-mail: susana@ibt.unam.mx