

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



ANALISIS DE LA EXPRESION DIRIGIDA POR LA
REGION PROMOTORA URR DE LAS VARIEDADES
EUROPEA Y ASIATICO-AMERICANA DEL HPV
TIPO 16 EN LINEAS CELULARES HUMANAS

Por
Q.F.B. ANGEL LUGO TRAMPE

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Enero, 2004

TM

RC280

.U8

L8

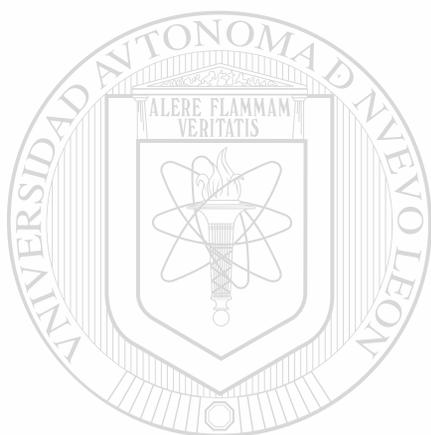
2004

c.1

2004



1080123143



UANL

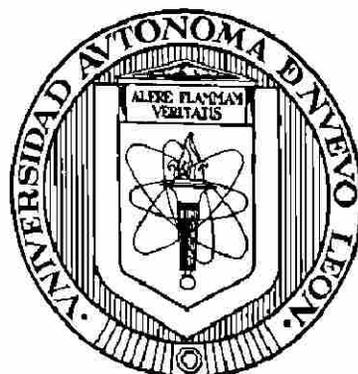
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIRIGIDA POR LA REGIÓN
PROMOTORA URR DE LAS VARIEDADES EUROPEA Y ASIÁTICO-
AMERICANA DEL HPV TIPO 16 EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS**

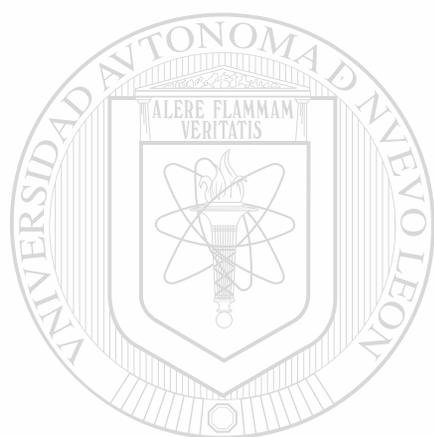
Por

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
QFB. ÁNGEL LUGO TRAMPE
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con especialidad en Biología Molecular e
Ingeniería Genética**

Enero, 2004

TM
RC280
.U8
L8
2 4



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIRIGIDA POR LA REGIÓN PROMOTORA URR
DE LAS VARIETADES ASIÁTICO-AMERICANA Y EUROPEA DEL HPV TIPO 16
EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS**

Aprobación de la Tesis:



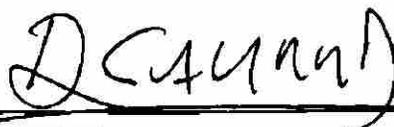
DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ
Director de Tesis



DRA. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Co-Director de Tesis

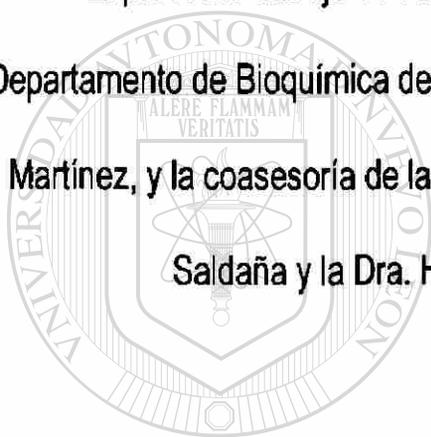


DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica de esta Facultad, bajo la dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez, y la coasesoría de la Dra. Rocío Ortiz López, el Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña y la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Vo. Bo.

DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ

Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Augusto y Dra. Rocio, por su valiosa asesoría y comentarios en la realización de ésta tesis

Al Dr. Barrera, por darme la oportunidad de entrar en la ULIEG y cumplir uno de mis sueños,

ser biólogo molecular.

A mis compañeros de laboratorio Irma, Naika, Iván y Christian, gracias por su amistad.

A mis compañeros de generación Kary, Canale, Naika y Vela, por su amistad.

A mis compañeros del posgrado en la ULIEG, por hacer de mi estancia un periodo inolvidable.

A todo el personal de la ULIEG que contribuyó a la realización del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado.

DEDICATORIA

Primeramente a Dios, por prestarme vida y salud para lograr cumplir mis sueños.

A mis padres, Federico y Laura por brindarme su apoyo y cariño, por dejarme ser.

A mis hermanos, José y Aldo, dos de mis mayores orgullos.

A Kary, por estar conmigo, por quererme, por apoyarme, en las buenas y en las malas, TQM.

A Iván, por su amistad y enseñanzas, sin tu ayuda no lo hubiera logrado.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

"Un placer coincidir en esta vida"

TABLA DE CONTENIDO

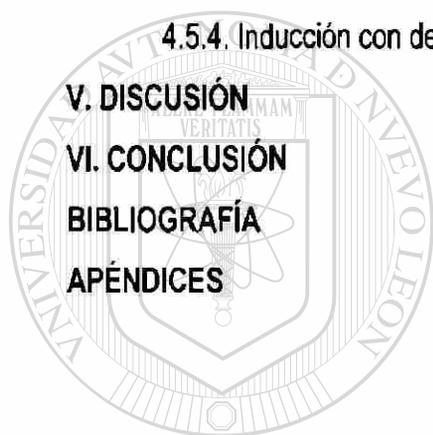
| Contenido | Página |
|---|--------|
| LISTA DE TABLAS | i |
| LISTA DE FIGURAS | ii |
| ABREVIATURAS | iv |
| RESUMEN | |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Generalidades del virus del papiloma humano | 1 |
| 1.2 Estructura del virión | 3 |
| 1.3 Ciclo viral | 4 |
| 1.4 Organización genómica de los papilomavirus | 5 |
| 1.4.1 Genes tempranos | 6 |
| 1.4.1.1 Gen E1 | 6 |
| 1.4.1.2 Gen E2 | 7 |
| 1.4.1.3 Gen E4 | 7 |
| 1.4.1.4 Gen E5 | 7 |
| 1.4.1.5 Genes E6 y E7 | 8 |
| 1.4.2 Genes tardíos | 9 |
| 1.4.2.1 Genes L1 Y L2 | 9 |
| 1.4.3 Región reguladora río arriba | 10 |
| 1.4.3.1 Características de la región URR | 10 |
| 1.5 Clasificación del HPV | 14 |
| 1.5.1 Subclasificación del HPV tipo 16 | 14 |
| 1.6 Justificación | 15 |
| II. OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 Objetivo general | 16 |
| 2.2 Objetivos específicos | 16 |
| III. MATERIAL Y MÉTODOS | 17 |
| 3.1 Origen de los reactivos | 17 |
| 3.2 Origen del material biológico | 18 |

| | |
|--|----|
| 3.3 Equipo | 18 |
| 3.4 Métodos | 19 |
| 3.4.1 Clonación de las regiones URR del HPV-16 y 18 | 20 |
| 3.4.2 Construcción de los vectores de expresión | 23 |
| 3.4.2.1 pLESS-EGFP (control negativo) | 24 |
| 3.4.2.2 pURRaa – EGFP u pURRe-EGFP (plásmidos problema) | 27 |
| 3.4.2.3 pURR ₁₈ – EGFP | 29 |
| 3.4.3 Purificación de los plásmidos | 31 |
| 3.4.4 Ensayos de transfección | 31 |
| 3.4.4.1 Condiciones de cultivo celular | 31 |
| 3.4.4.2 Optimización de las condiciones de transfección | 32 |
| 3.4.4.3 Optimización del método de lisis celular | 33 |
| 3.4.5 Evaluación de la eficiencia de transfección | 34 |
| 3.5.5.1 Cuantificación de la actividad de β -galactosidasa | 34 |
| 3.4.5.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford | 35 |
| 3.4.6 Evaluación de la fuerza promotora dirigida por URR | 35 |
| 3.5.6.1 Medición directa de la fluorescencia de EGFP | 35 |
| 3.4.7 Análisis y correlación de los resultados obtenidos | 36 |

IV. RESULTADOS 37

| | |
|--|----|
| 4.1 Clonación de las regiones URR del HPV-16 y 18 | 37 |
| 4.1.1 Clonación de la región URR del HPV-16 | 37 |
| 4.1.1.1 Amplificación de las regiones URR del HPV-16 | 37 |
| 4.1.1.2 Clonación de las regiones URR del HPV-16 | 37 |
| 4.1.1.3 Secuenciación e identificación de las regiones URR del HPV-16 clonadas | 38 |
| 4.1.2 Análisis de las regiones URR del HPV-16 clonadas | 40 |
| 4.1.3 Clonación de la región URR del HPV-18 | 42 |
| 4.1.3.1 Amplificación de la región URR del HPV-18 | 42 |
| 4.1.3.2 Clonación de las región URR del HPV-18 | 42 |
| 4.1.3.3 Secuenciación e identificación de la región URR del HPV-18 clonada | 43 |
| 4.1.3.4 Análisis de la región URR del HPV-18 clonada. | 44 |

| | |
|--|----|
| 4.2 Construcción de los vectores de expresión | 45 |
| 4.2.1 Caracterización del vector pLESS-EGFP | 46 |
| 4.2.2 Caracterización de los vectores pURRaa – EGFP y pURRe – EGFP | 47 |
| 4.2.3 Caracterización del vector pURR ₁₈ – EGFP | 47 |
| 4.3 Purificación, cuantificación y calidad de los plásmidos | 49 |
| 4.4 Ensayos de transfección | 50 |
| 4.5 Evaluación de la expresión dirigida por las diferentes variedades de URR | 50 |
| 4.5.1 Rango de cuantificación de EGFP | 51 |
| 4.5.2 Eficiencias de transfección | 52 |
| 4.5.3 Fuerza de promotores | 53 |
| 4.5.4. Inducción con dexametazona | 56 |
| V. DISCUSIÓN | 58 |
| VI. CONCLUSIÓN | 62 |
| BIBLIOGRAFÍA | |
| APÉNDICES | 63 |



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

| Tablas | Página |
|---|--------|
| Tabla I. Secuencia de los iniciadores utilizados | 21 |
| Tabla II. Condiciones de PCR | 21 |
| Tabla III. Mezcla de digestión preparativa de los vectores pBlueScript SK (+) y pGREEN lantern-1 con la enzima <i>Sal I</i> | 25 |
| Tabla IV. Mezcla de digestión preparativa de los vectores pBlueScript SK (+) y pGREEN lantern-1 con la enzima <i>Ngo M IV</i> | 25 |
| Tabla V. Mezcla de ligación del esqueleto plasmídico y el gen EGFP | 26 |
| Tabla VI. Mezcla de digestión doble preparativa de los vectores pLESS-EGFP y pTOPO-URR-HPV18 con las enzimas <i>Hind III</i> y <i>Pst I</i> | 27 |
| Tabla VII. Mezcla de ligación de pLESS-EGFP y la región URR del HPV tipo 16 | 28 |
| Tabla VIII. Mezcla de digestión doble preparativa de los vectores pLESS-EGFP y pBS-URR con las enzimas <i>Hind III</i> y <i>Pst I</i> | 29 |
| Tabla IX. Mezcla de ligación de pLESS-EGFP y la región URR del HPV tipo 18. | 30 |
| Tabla X. Cambios nucleotídicos y sitios de unión de factores transcripcionales afectados en las dos secuencias URR del HPV-16 empleada | 40 |
| Tabla XI. Cambios nucleotídicos y sitios de unión de factores transcripcionales afectados en la secuencia URR del HPV-18 empleada | 45 |
| Tabla XII. Calidad y cantidad de DNA plasmídico de las construcciones. | 50 |

LISTA DE FIGURAS

| Figuras | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. Árbol filogenético de los HPV | 2 |
| Figura 2. Estructura del HPV | 4 |
| Figura 3. Modelo del ciclo viral de los HPV genitales | 5 |
| Figura 4. Organización Genómica del HPV-16 | 6 |
| Figura 5. Representación esquemática del URR del HPV-16 | 11 |
| Figura 6. Esquema de los diferentes empalmes alternativos de la expresión del HPV | 13 |
| Figura 7. Estrategia General | 19 |
| Figura 8. PCR virtual generada por el programa Amplify 2.53β | 22 |
| Figura 9. Programa de temperaturas para PCR de URR | 22 |
| Figura 10. Mapas de restricción de las regiones URR clonadas en los vectores de clonación | 23 |
| Figura 11. Mapa de restricción del vector plasmídico pGREEN lantern-1 | 24 |
| Figura 12. Estrategia para la construcción de pLESS-EGFP | 26 |
| Figura 13. Estrategia para la construcción de pURR-EGFP | 28 |
| Figura 14. Estrategia para la construcción de pURR ₁₈ -EGFP | 30 |
| Figura 15. Gradiente de temperaturas de alineamiento de los iniciadores p971 y p972 | 37 |
| Figura 16. Caracterización de clonas por liberación de inserto clonado | 38 |
| Figura 17. Árbol filogenético de las variedades de HPV-16 | 39 |
| Figura 18. Representación gráfica de la región URR de la variedad Europea G131 clonada del HPV-16 | 41 |
| Figura 19. Representación gráfica de la región URR de la variedad Asiático-americana clonada del HPV-16 | 41 |

| | |
|--|----|
| Figura 20. Gradiente de temperaturas de alineamiento de los iniciadores p1051 y p1052 | 42 |
| Figura 21. Caracterización de clonas pTOPO-URR HPV 18 por liberación de inserto URR clonado | 43 |
| Figura 22. Árbol filogenético de las variedades de HPV-18 | 44 |
| Figura 23. Representación gráfica de la región URR de la variedad europea del HPV-18 clonada | 45 |
| Figura 24. Caracterización de la construcción pLESS-EGFP | 46 |
| Figura 25. Caracterización de las construcciones pURR _E -EGFP y pURR _{AA} -EGFP | 48 |
| Figura 26. Caracterización de la construcción pURR ₁₈ -EGFP | 49 |
| Figura 27. Curva estándar de cuantificación de EGFP en fluorómetro | 52 |
| Figura 28. Eficiencias de transfección | 53 |
| Figura 29. Fuerza promotora y especificidad de la región URR | 54 |
| Figura 30. Especificidad de la región URR | 55 |
| Figura 31. Potencia de los promotores en relación a la variedad europea del HPV-16 | 56 |
| Figura 32. Porcentaje de inducción con dexametasona | 57 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| μg | Microgramo |
| μl | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grados centígrados |
| AA | Asiático-americana |
| Amp(r) | Gen de resistencia a ampicilina |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| CMV | Citomegalovirus |
| CPRG | Rojo de clorofenol β -D-galactopiranosido |
| DMEM | Medio de Eagle modificado por Dulbecco |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| E | Europea |
| EDTA | Ácido etilendiamino tetracético. |
| EGFP | Proteína verde fluorescente incrementada |
| GRE | Elemento de respuesta a glucocorticoides |
| h | Horas |
| HNF-1 | Factor nuclear hepático 1 |
| HPV | Papilomavirus humano |
| HPV-16 | Papilomavirus humano tipo 16 |
| HPV-18 | Papilomavirus humano tipo 18 |
| HPVs | Papilomavirus humanos |
| kb | Kilobase |
| kDa | Kilodalton |
| KRF-1 | Factor restringido a queratinocitos 1 |
| LCR | Región de control larga |
| M | Marcador |
| mg | Miligramos |
| MgCl_2 | Cloruro de magnesio |

| | |
|------------------------|--|
| Min | Minutos |
| ml | Mililitros |
| NA1 | Norteamericana 1 |
| NF-1 | Factor nuclear 1 |
| ng | Nanogramo |
| nm | Nanómetros |
| ORF | Marco de lectura abierta |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Solución amortiguadora salina de fosfatos |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| pUC ori | Origen de replicación proveniente del plásmido pUC |
| RNA_m | Ácido ribonucleico mensajero |
| RPM | Revoluciones por minuto |
| SBF | Suero bovino fetal |
| SV40 | Virus del simio 40 |
| TBE | Tris-borato-EDTA |
| TEF-1 | Factor potenciador de la transcripción 1 |
| U | Unidades |
| URF | Unidades relativas de fluorescencia |
| URR | Región reguladora río arriba |
| V | Voltios |
| YY1 | Ying Yang 1 |

UJANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



RESUMEN

QFB. Ángel Lugo Trampe

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

Fecha de Graduación: Enero del 2004.

Área de Estudio: Terapia Génica

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de páginas: 64

Título del estudio: "ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIRIGIDA POR LA REGIÓN URR DE LAS VARIEDADES EUROPEA Y ASIÁTICO-AMERICANA DEL HPV TIPO 16 EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS".

Introducción. El virus del papiloma humano (HPV) es el responsable de casi la totalidad de los casos de cáncer cervico uterino (CaCU). La expresión del genoma viral del HPV está dirigida por la región URR, la cual contiene un potenciador transcripcional específico de queratinocitos. El HPV tipo 16 (HPV-16), que es el más prevalente en CaCU, se divide en cinco variedades: europea (E), asiática (As), asiática-americana (AA), africana-1 (Af1) y africana-2 (Af2). La variedad AA posee una actividad transcripcional de URR incrementada, comparada con la variedad E, lo que posiblemente correlaciona con una mayor actividad oncogénica.

Objetivos. Construir los vectores de expresión portadores de las regiones URR de HPV-16 de las variedades E y AA, dirigiendo la expresión del gen reportero EGFP. Evaluar los niveles de expresión del gen reportero dirigidos por la región URR en diferentes líneas celulares de origen humano.

Material y Métodos. Se realizaron construcciones portadoras de las regiones URR de las variedades E y AA del HPV-16; así mismo se realizó una construcción portando la región URR de la variedad E del HPV-18, como referencia de potencia transcripcional. También se utilizó una construcción comercial portadora del promotor de CMV, y se construyó un vector de expresión plasmídico sin promotor. Todas las construcciones empleadas contenían a EGFP como gen reportero. Para medir los niveles de expresión inducidos por las diferentes regiones URR, se realizaron lecturas de EGFP en fluorómetro a partir de lisados celulares de las células transfectadas. Se realizaron análisis estadísticos de ANOVA en el paquete estadístico SPSS 11.5.

Resultados. La región URR de la variedad AA del HPV-16 tuvo un incremento de tres veces en su potencia transcripcional comparada con la variedad de referencia, en líneas celulares de cáncer de cervix, mientras que la variedad E del HPV-18 presentó un incremento de un 20 % comparada con la variedad E del HPV-16. Las tres regiones URR ensayadas retienen su especificidad transcripcional, obteniéndose niveles de expresión indetectables en líneas celulares de origen no cervical. La variedad AA no posee sitios de unión de factores transcripcionales conocidos en el sitio 7729, responsable del incremento de tres veces en su potencia transcripcional. Los cambios nucleotídicos presentes en dos de los sitios de unión de GRE en la variedad AA del HPV-16 no afectan su nivel de inducción transcripcional con dexametasona, observando niveles de inducción transcripcional similares en todas las regiones URR evaluadas.

Contribuciones y Conclusiones. Se corroboró que la variedad AA del HPV-16 presenta una potencia transcripcional tres veces mayor que la variedad E del HPV-16 y que la variedad E del HPV-18 presenta una potencia transcripcional similar a la variedad E del HPV-16. Así mismo se afirmó la naturaleza específica de las regiones URR de los HPV evaluados. También se observó que cambios nucleotídicos presentes en dos de los sitios de unión de GRE en la variedad AA del HPV-16 no afectan un nivel de inducción transcripcional con dexametasona.



Dr. Augusto Rojas Martínez
Director de tesis

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del virus del papiloma humano.

Descritos en 1933, los primeros papilomavirus fueron relacionados a la aparición y persistencia de neoplasias de piel benignas (verrugas) en el conejo. Después de algún tiempo, las verrugas se convirtieron en malignas, sugiriendo que los papilomavirus podrían estar asociados al cáncer. Desde entonces, se han descrito otros papilomavirus asociados a verrugas benignas en otras especies incluyendo la humana. Los papilomavirus ganaron notoriedad a principios de la década de 1980 cuando se descubrió que algunos tipos de papilomavirus humanos (HPV por sus siglas en inglés: human papillomavirus) estaban asociados al cáncer cervical, una de las más amplias formas de cáncer alrededor del mundo. A la fecha, más de 100 genotipos de HPV han sido identificados [Figura 1], de los cuales un pequeño número, los de alto riesgo (HPVs 16, 18, 31 y 33) están causalmente asociados con el cáncer cervical. Otro conjunto de HPVs llamados de mediano riesgo han sido identificados en tumores cervicales y otras lesiones malignas de la región anogenital en hombres y mujeres (HPVs 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 70). El número de nuevos tipos de HPV aislados de papilomas benignos anogenitales y del tracto nasofaríngeo es significativamente bajo (HPVs 3, 32, 72, 73), mientras que la mayoría causa una variedad de lesiones benignas tales como verrugas (HPVs 5, 6, 11, etc.)^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7}.

El grupo de investigación pionero del Dr. H. zur Hausen publicó a mediados de los 80's fuertes evidencias de que dos tipos de HPV (16 y 18) eran detectados en cáncer cervical. Desde entonces se han venido realizando intensas investigaciones en torno a estos tipos de HPVs,

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

aunque gran parte de éstas se han enfocado en el HPV tipo 16 (HPV-16), debido a que éste tiene un mayor potencial oncogénico que el HPV tipo 18 (HPV-18), como lo demuestran distintos estudios en los que el 99.7 % de los carcinomas cervicales son HPV positivos, de los cuales cerca de un 50% se les ha detectado HPV-16 ^{8, 9, 10}.

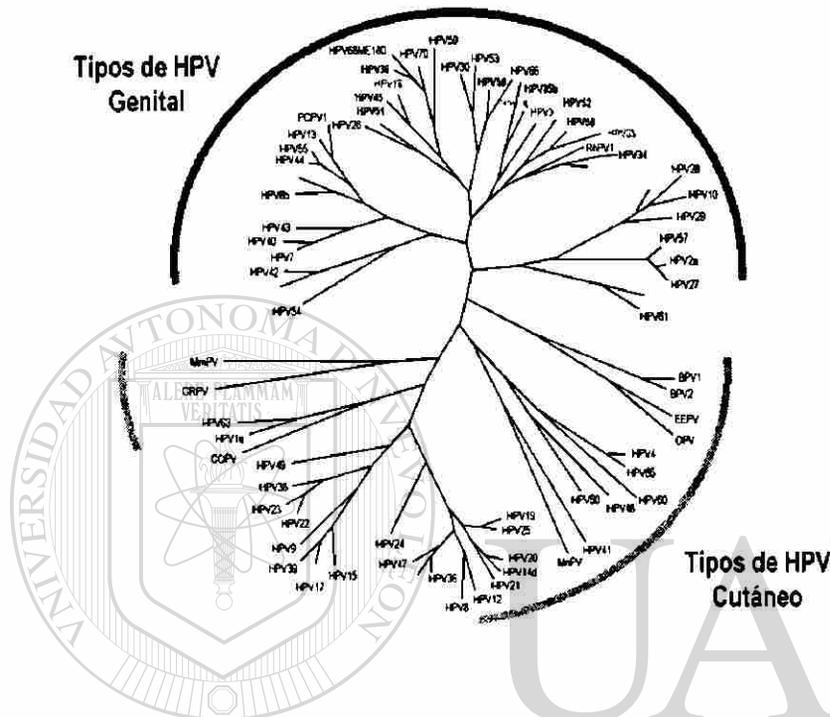


Figura 1. **Árbol filogenético de los HPV.** Se realizó alineando el gen E6 de los papilomavirus mediante análisis parsimony, y se observa la agrupación de los virus de alto, mediano y bajo riesgo (HPV tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 45, 51, 56, 58), lo que va directamente relacionado con su capacidad oncogénica. (Tomado de Myers et al, 1997).

Los papilomavirus son parte de la familia *papillomaviridae* de virus tumorales de DNA. A diferencia de otros papovavirus (por ejemplo los poliomavirus o el virus SV40), todos los genes de los papilomavirus son codificados en una de las dos hebras de DNA, utilizando tres marcos de lectura abierta (ORFs) y remoción diferencial de intrones para la expresión individual de cada gen. Como consecuencia, la expresión de los papilomavirus está caracterizada por un gran arreglo de RNAs codificados por diferentes genes. En papilomas animales (por ejemplo BPV-1 en el ganado, CRPV en el conejo), los transcritos tempranos y tardíos se originan de varios promotores, mientras que los transcritos de HPV comienzan a partir de uno o dos promotores ¹¹.

Todos los papilomavirus exhiben tropismo extremo por las células epiteliales ^{12, 13}. Aunque el mecanismo de la infección no está completamente entendido, la actividad génica viral

depende en gran parte de la interacción de factores de transcripción celulares específicos con la región reguladora viral conocida como la región de control larga (LCR) ¹⁴. La infección con papilomavirus normalmente resulta en la hiperproliferación celular huésped, y en ciertos tipos puede permitir la transformación e inmortalización. Lo anterior se debe a que los papilomavirus expresan dos o más proteínas que transitoriamente alteran el ciclo celular y estimulan la división celular, afectando al mismo tiempo los mecanismos celulares para la inhibición del crecimiento. Para una infección productiva, los papilomavirus requieren células diferenciadas terminalmente. Esta característica biológica del papilomavirus ha impedido la total reproducción de su ciclo de vida en condiciones de laboratorio, debido a la carencia de un modelo altamente eficiente de epitelio terminal diferenciado *in vitro*. Sin embargo, la mayoría de las diferentes etapas del ciclo de vida del papilomavirus han sido establecidas usando estrategias de biología molecular e ingeniería genética ¹⁵.

1.2 Estructura del virión.

Los papilomavirus son virus no envueltos de DNA de doble hebra, con un genoma circular de ~8000 pb, con una cápside de 55 nm de diámetro compuesta de 72 capsómeros de la proteína L1 que están arreglados en la superficie en forma de un icosaedro. Las partículas de papilomavirus [Figura 2] están constituidas por los productos de los genes L1 (proteína mayor de la cápside) y L2 (proteína menor de la cápside). Los capsómeros están localizados en cada uno de los 12 vértices y son pentavalentes (es decir, cada uno está rodeado por cinco capsómeros adyacentes). Los 60 capsómeros restantes son hexavalentes (cada uno adyacente a seis capsómeros). L1 es la región más conservada entre los papilomavirus¹⁶.

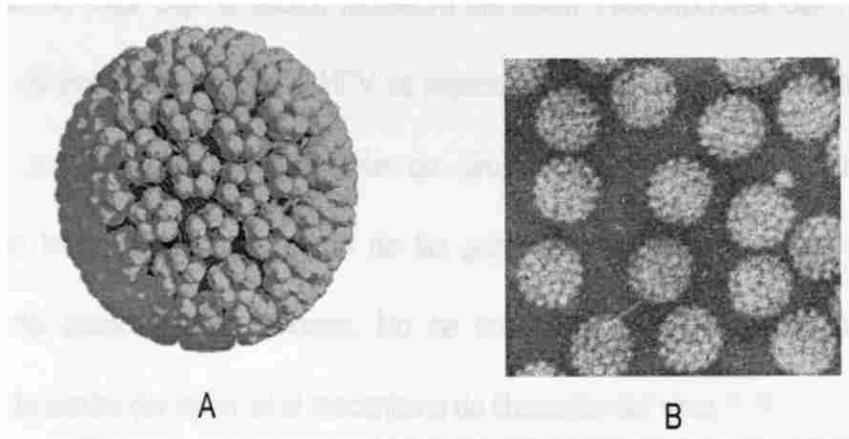


Figura 2. **Estructura del HPV A)** Dibujo tridimensional de la estructura del HPV, en el que se distingue perfectamente la conformación de la proteína L1 en la cápside viral. **B)** Fotografía en microscopio electrónico del HPV. (Tomado de Baker *et al*, 1991).

1.3 Ciclo viral.

El ciclo viral del papilomavirus comienza con la infección de la célula huésped. Este proceso es ampliamente desconocido, pero es aceptado que no hay un receptor blanco específico en la membrana celular. Cuando el DNA viral es liberado dentro del núcleo, numerosos factores de transcripción celulares interactúan con URR, comenzando entonces la

transcripción de los dos genes tempranos transformantes del HPV-16: E6 y E7 [Figura 6].

Después de la traducción, las proteínas transformantes productos de éstos genes interactúan con los reguladores celulares antioncogénicos p53 y pRB, alterando el ciclo celular e inhibiendo el arresto de la división celular. Concomitantemente, la expresión de los genes virales E1 y E2 regulan la replicación y transcripción del DNA viral. En los HPVs genitales, la proteína E2 reprime la transcripción temprana del propio virus, interactuando con sitios blancos específicos dentro de URR y desplazando a la maquinaria de transcripción basal. En los papilomavirus animales y HPVs cutáneos, la proteína E2 activa varios promotores, incluyendo a los promotores tardíos. No está claro si la proteína E2 estimula la transcripción tardía de los HPVs. El genoma de los papilomavirus se replica a bajo nivel (~20 copias por célula) en un modo de replicación "theta" en

epitelio basal, al estar bajo la acción represora del factor transcripcional CDP, abundante este epitelio. En células diferenciadas, el HPV se replica en un alto número de copias (> 100 copias por célula) por el modo de replicación de círculo rodante. En esta etapa, comienza la transcripción tardía con la producción de las proteínas de la cápside, las cuales tienen la capacidad de autoensamblar viriones. No se conoce como el DNA del papilomavirus es empaquetado dentro del virión, ni el mecanismo de liberación del virus ^{17, 18}.

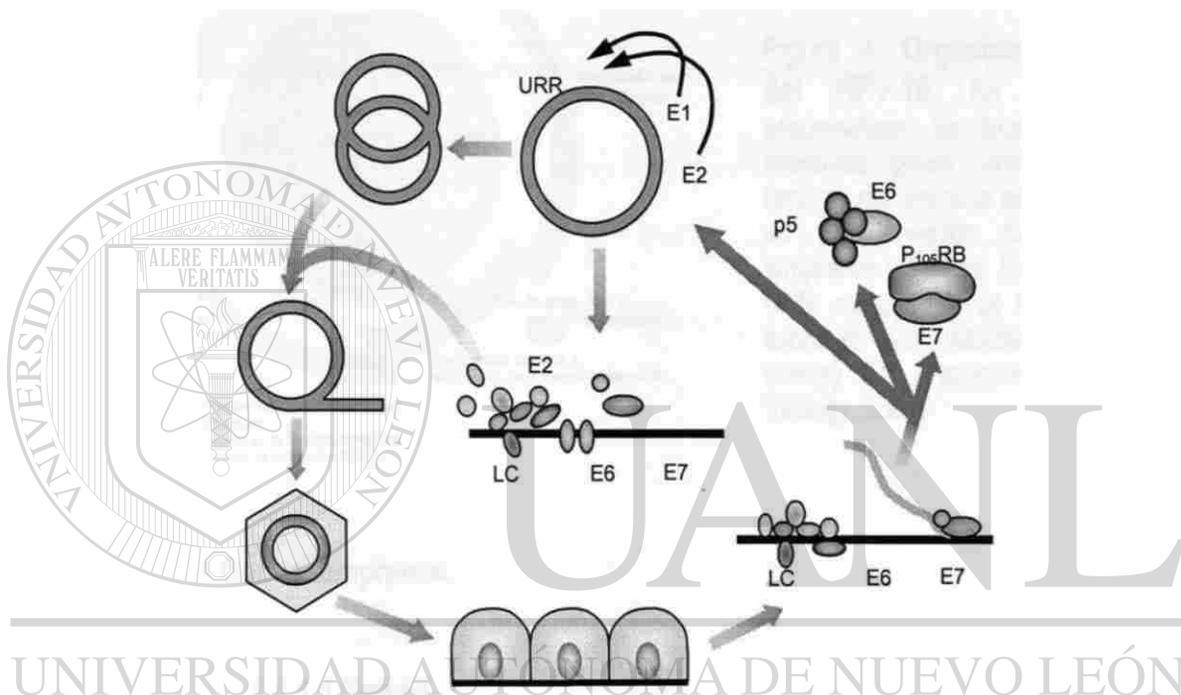


Figura 3. Modelo del ciclo viral de los HPV genitales. El virus infecta células basales del epitelio genital. En la fase temprana del ciclo se producen las oncoproteínas E6 y E7, las cuales interactúan con los reguladores celulares p53 y pRB, respectivamente, inactivándolos. Más tarde se producen las proteínas E1 y E2, esenciales para la replicación del genoma; asimismo la proteína E2 regula negativamente los genes E6 y E7 con la finalidad de permitir la diferenciación celular necesaria para la síntesis de las proteínas tardías y ensamble viral (Tomado de Alvarez-Salas *et al*, 1995).

1.4 Organización genómica de los papilomavirus.

La estructura genómica es una característica muy conservada entre los papilomavirus, pudiéndose distinguir tres regiones: la región temprana, la región tardía y la región reguladora río arriba, [Figura 3]. En la región temprana (E) reside el potencial de transformación e inmortalización del HPV. Esta contiene genes reguladores involucrados en la replicación viral,

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

transcripción de proteínas y transformación celular. La región tardía (L) contiene genes que codifican para las dos proteínas de la cápside viral. La región reguladora río arriba (URR) contiene todos los elementos reguladores cis actuantes necesarios para la transcripción del HPV, incluyendo el promotor temprano, además del origen de replicación (ori) ¹⁸.

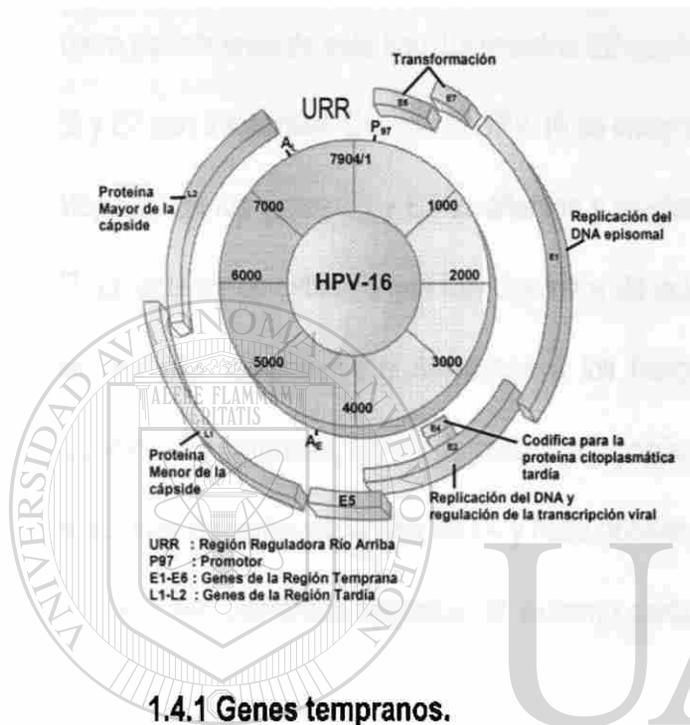


Figura 4. Organización Genómica del HPV-16. En esta figura se esquematizan las localizaciones de los diferentes genes virales (tempranos y tardíos), del promotor p97 y de las señales de poliadenilación de los transcritos tempranos y tardíos; además de la región URR, responsable de la regulación de la expresión viral. (Modificado de Lowy DR, Howley PM. Papillomaviruses. En Field Virology, 2001).

1.4.1 Genes tempranos.

1.4.1.1 Gen E1.

El gen E1 codifica la proteína más grande del HPV (68-76 kDa). E1 es una fosfoproteína nuclear esencial para la replicación viral que interactúa con E2 y se une con gran afinidad al origen de replicación localizado en LCR. Las funciones de E1 están asociadas con la replicación del DNA y consisten de actividad de helicasa ATP-dependiente e interacción física con numerosos componentes de la maquinaria de replicación del DNA celular (p. e. primasa y DNA polimerasa alfa) ^{19, 20, 21, 22, 23}.

1.4.1.2 Gen E2.

El gen E2 codifica una proteína altamente fosforilada de 48 kDa. E2 regula la replicación y transcripción del DNA viral a través de la interacción con secuencias parcialmente palindrómicas 5'- ACCN₆G(G/T)T-3' localizadas en LCR. En HPV-16 y HPV-18 hay cuatro palíndromes de este tipo. La proteína E2 suprime al promotor a partir del cual las proteínas E6 y E7 son transcritas. Cuando el HPV-16 se integra dentro del genoma de la célula huésped, la integridad de los genes E1 y E2 es alterada y se disminuye la represión de la expresión de E6 y E7. Lo anterior es debido a que hay dos sitios de unión de E2 localizados cerca de la caja TATA del promotor temprano que desplazan a los factores de transcripción basales, e inhiben la iniciación. En contraste, los HPVs cutáneos y papilomavirus animales tienen sus sitios de unión de E2 más distantes de la caja TATA y hace posible a E2 activar la transcripción. La proteína E2 contiene tres diferentes dominios: el extremo carboxilo es un dominio de unión al DNA y el extremo amino con capacidad de activación transcripcional, los cuales están separados por un dominio "bisagra" rico en prolina.^{2, 24, 25, 26, 27, 28, 29.}

1.4.1.3 Gen E4.

El gen E4 codifica una proteína de 10-34 kDa, la cual parece que cumple una función en la liberación del virus al inducir el colapso de la red de citoqueratina, aunque *in vivo* no se ha visto que cumpla esta función³⁰.

1.4.1.4 Gen E5.

El gen E5 codifica una pequeña proteína hidrofóbica comúnmente encontrada en compartimentos de membrana, incluyendo al aparato de Golgi^{31, 32, 33}. En BPV-1,

ésta es una proteína celular transformante de 7 kDa, la cual parece ejercer su efecto a través de la estimulación de receptores de factor de crecimiento, vía transducción de señal³⁴. Esta se une y activa al receptor PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), y también se une a la subunidad ATPasa de la proteína poro de 16 kDa y a la proteína relacionada a adaptina de 120 kDa de fibroblastos. Este es uno de los marcos de lectura abiertos (ORFs) más pobremente conservados entre los papilomavirus^{35, 36, 37, 38, 39, 40}.

1.4.1.5 Genes E6 y E7.

Los genes E6 y E7 codifican para proteínas pequeñas nucleares de entre 16-19 y 10-14 kDa, respectivamente^{41, 42}. Ambos genes se encuentran y expresan en todas las células que contienen HPV^{43, 44}. El producto de E6 de HPVs de alto riesgo (HPV-16 y HPV-18) interactúa con la proteína reguladora antioncogénica p53 y la proteína E6AP de la ruta de degradación de proteínas de ubiquitina, permitiendo la degradación de la propia p53^{45, 46, 47}. La proteína E6 de tipos de HPV de bajo riesgo (HPV-6 y HPV-11) no induce la degradación de p53, lo cual está correlacionado con su débil potencial transformante^{48, 49, 50}. La ausencia de la proteína p53 funcional hace a la célula altamente susceptible de daño a su DNA y previene la activación de la apoptosis mediada por p53. Es notable que la mayoría de los tumores cervicales HPV-positivos tienen p53 de tipo silvestre, mientras que los tumores cervicales HPV-negativos contienen p53 mutado.^{51, 52, 53, 54, 55}

El gen E6 de HPV-16 tiene dos sitios de empalme alternativo responsables de la producción de dos proteínas adicionales llamadas E6*I y E6*II. Sin embargo, sólo la proteína E6 completa tiene la capacidad de interactuar con p53 y debido a ésto, es la única isoforma de este gen con relevancia clínica. La proteína E6 contiene cuatro motivos Cys-X-X-Cys formando

estructuras de dedos de zinc similares a los presentes en varios factores de transcripción. Sin embargo, el papel de E6 en la transcripción del HPV no ha sido claramente establecido. ^{58, 56, 57,}

El gen E7 de HPV-16 es expresado como parte de un transcrito primario policistrónico que también contiene a E6. Como ambos genes transformantes son expresados a partir del mismo RNAm, este transcrito ha venido a ser un blanco para terapias de inhibición de genes. La proteína E7 contiene dos motivos Cys-X-X-Cys que también generan dos dedos de zinc y presentan funciones reguladores transformantes y transcripcionales similares a la proteína E1A de adenovirus y al antígeno T grande de SV40 ^{58, 59}. Aunque E7 puede por sí solo transformar e inmortalizar células *in vitro* ⁶⁰, la transformación e inmortalización de las células epiteliales requiere de la proteína E6 ^{61, 62}. Al igual que E1A y el antígeno T grande, E7 controla el ciclo celular por interacción con el regulador antioncogénico P₁₀₅RB ^{63, 64} y otras proteínas asociadas a RB, tales como P₁₀₇ y P₁₃₀, desplazando al factor de transcripción E2F ⁶⁵. Esto resulta en la activación derregulada del ciclo celular en la célula infectada. ^{3, 57, 58, 66, 67.}

1.4.2 Genes tardíos.

1.4.2.1 Genes L1 Y L2.

El gen L1 codifica para la proteína mayor de la cápside de 56-60 kDa. L1, la más antigénica de las proteínas de papilomavirus, está débilmente fosforilada y no se une al DNA ⁶⁸. ⁶⁹; puede ser glucosilada y formar puentes disulfuro, pero las implicaciones de estos cambios no están claras todavía. L1 está relativamente bien conservada entre todos los papilomavirus, tiene la capacidad de autoensamblaje y es la molécula predominante en la cápside viral ^{70, 71}. Por su parte el gen L2 codifica para la proteína menor de la cápside de 49-60 kDa, la cual está altamente fosforilada y se une al DNA. A diferencia de L1, L2 no se autoensambla. ^{72, 73.}

1.4.3 Región reguladora río arriba.

La región reguladora río arriba (URR por sus siglas en inglés: upstream regulatory region), también referida como región de control larga (LCR) o región no codificante (NCR), abarca desde la región de la terminación del gen L1 hasta la primera metionina del gen E6. URR es la región menos conservada entre los papilomavirus. Ésta contiene el promotor temprano y varios motivos reguladores transcripcionales, incluyendo elementos para la familia AP-1, YY1, NF-1/CTF, Oct-1, TEF-2, KRF-1y Sp1 y los sitios de unión para el regulador E2 viral. El origen de replicación también está localizado en URR, normalmente centrado entre dos sitios de unión de

E2 20, 30, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80.

1.4.3.1 Características de la región URR.

La longitud de URR varía entre 800 a 1000 pb para los diferentes tipos de HPVs. Esta región se encuentra localizada directamente río arriba de los genes E6 y E7. Los genes E1, E2 y

E5 se encuentran localizados río abajo de los genes E6 y E7. La región URR puede ser dividida en tres partes: la región 5', el segmento central y la región 3' [Figura 4]. La transcripción del RNA comienza a partir de un promotor situado en la región 3' del URR, directamente río arriba del gen E6. Este promotor es referido como P₉₇ para el HPV-16 y P₁₀₅ para HPV-18. El promotor consiste de una caja TATA y un sitio de inicio de la transcripción que es regulado por una región potenciadora localizada en la región central y 3' del URR. A éste se le unen factores de transcripción celulares. La región 3' de URR también contiene dos sitios de unión para los factor de transcripción viral E2 y los factores celulares SP1 y YY1. El origen de replicación contiene un sitio de unión para la proteína viral E1. ^{58, 82, 81,}

El segmento central de URR contiene un potenciador constitutivo que es más activo en células epiteliales y depende sólo de factores de transcripción celulares ^{83, 82, 83, 84}. Varios sitios de unión para factores de transcripción celulares se encuentran en esta región, tales como AP-1, NF1, Oct 1, TEF1, TEF2 y YY1, además de elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE por sus siglas en inglés: glucocorticoids response element). Todos estos factores son ubicuos y pueden funcionar en diferentes tipos celulares. La región 5' de URR contiene señales de terminación y poliadenilación de los transcritos virales tardíos ⁸³.

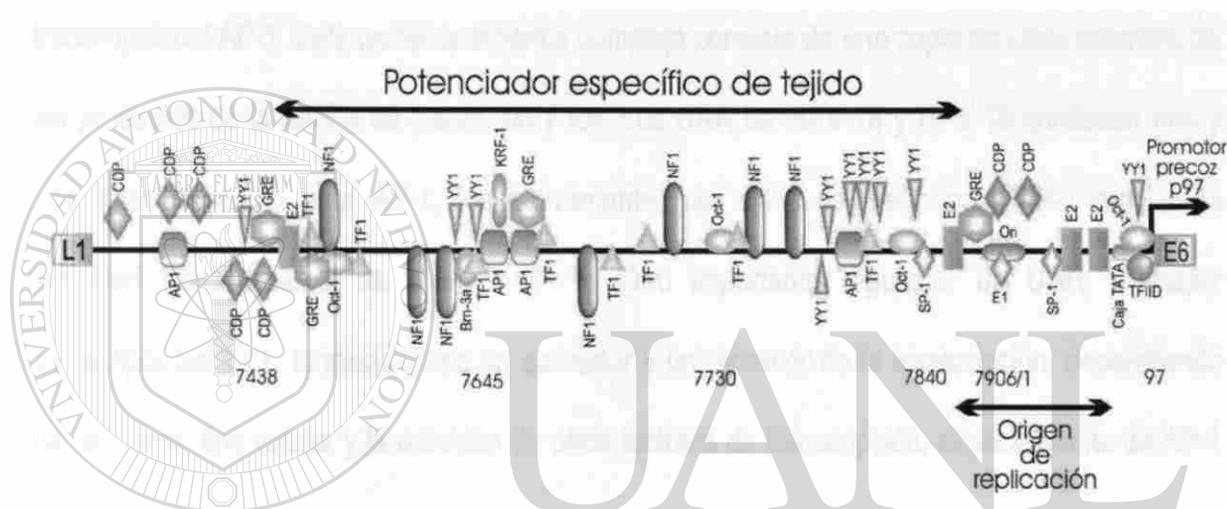


Figura 5. Representación esquemática del URR del HPV-16. El URR se divide en tres partes: el promotor precoz (región 3'), el potenciador (región central) y la región distal (región 5'). La región URR del HPV-16 posee distintos elementos de acción cis sobre los cuales se unen distintos factores transcripcionales, entre los que se encuentran los factores de transcripción basales que poseen todos los tipos celulares, además de los factores de transcripción específicos de tejido que le dan la especificidad de expresión en ciertos tejidos. Así mismo tiene sitios de unión para los factores transcripcionales virales E1 y E2; éste último regula la transcripción de los genes virales E6 y E7.

El factor transcripcional viral E2 es el único factor de tal origen de entre los numerosos factores transcripcionales capaces de interactuar con URR, y su actividad es importante para la función de los genes transformantes de HPV.

La región URR de HPV contiene cuatro sitios de unión para E2. Los datos concernientes al efecto de E2 en la transcripción de los genes E6 y E7 son contradictorios. Por un lado, los productos del gen E2 pueden funcionar como represores para los promotores del HPV-18 ³², y mutaciones en el gen E2 incrementan el nivel de células inmortalizadas por los productos de los

genes E6 y E7 ⁸⁵. Por otro lado, algunos datos indican que la proteína E2 de HPV-16 y HPV-18 activan al promotor URR ⁵⁸. Probablemente estas diferencias son causadas por la síntesis de RNAm empalmados alternativamente del gen E2, permitiendo la formación de formas incompletas de la proteína E2. El dominio N-terminal transactivador de la proteína E2 puede interferir con el potencial activador de la proteína E2 completa. ⁵⁸.

Entre los numerosos factores celulares que podrían interactuar con URR, hay unos que se ha visto que son esenciales para la manifestación de los genes E6 y E7. El primero es el factor transcripcional AP-1. Esta proteína dimérica compleja consiste de una copia de cada miembro de los productos de la familia de genes *jun* y *fos*. Los URR de HPV-16 y HPV-18 contienen tres y dos sitios de unión para AP-1, respectivamente. Los sitios de unión para AP-1 regulan la actividad transcripcional de URR ^{58, 78, 86}. Otro importante regulador de URR, el factor transcripcional YY1, funciona como un activador y un represor de la transcripción, dependiendo del tipo viral, tipo celular y la actividad de otros factores de transcripción, especialmente de AP-1 ^{86, 87}. Es posible que a otro grupo de sitios se les una C/EBP (Proteína de Unión al Aumentador –

CCAAT). Los factores de este tipo se pueden asociar no solo con la región correspondiente del DNA en el URR, sino por su unión a otros factores celulares. La principal función de este grupo de genes es regular la diferenciación celular y activar genes de varias citocinas. El factor de transcripción SP1 puede interactuar con un elemento de la caja GC y su sitio está directamente localizado río abajo de la caja TATA. Este factor es esencial para la transcripción del genoma viral ^{88, 89}.

Entre los factores de transcripción del grupo de receptores nucleares, dos clases (receptores de hormonas esteroides y receptores de retinoides y hormonas tiroideas) tienen sitios de unión dentro del URR. Los GRE pertenecen al grupo de receptores de hormonas esteroides. Un sitio responsable de la unión de glucocorticoides (GRE) está localizado en la región 3' entre

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

los sitios de unión AP-1 y Sp1. Ambos tipos de receptores activan la transcripción. Un factor de transcripción específico de queratinocitos, KRF1, se puede unir a AP-1 para la activación transcripcional^{91,90, 91, 92}.

URR también tiene varios sitios de unión para proteínas que contienen el llamado "dominio POU" que se une a la secuencia octamérica ATGCAAAT. Una de estas proteínas (Oct1) reprime al URR de HPV-18, mientras que otra (Epc1) tiene un efecto opuesto. Los factores de la familia NF1 tienen varios sitios de unión en la región de un represor constitutivo. Estos sitios tienen una relativa baja afinidad y son necesarios probablemente para la especificidad transcripcional en células epiteliales. Los factores transcripcionales TEF1 y TEF2 tienen cuatro sitios dentro del aumentador de HPV-16 y se piensa que activan al promotor P₉₇^{95, 93, 94}.

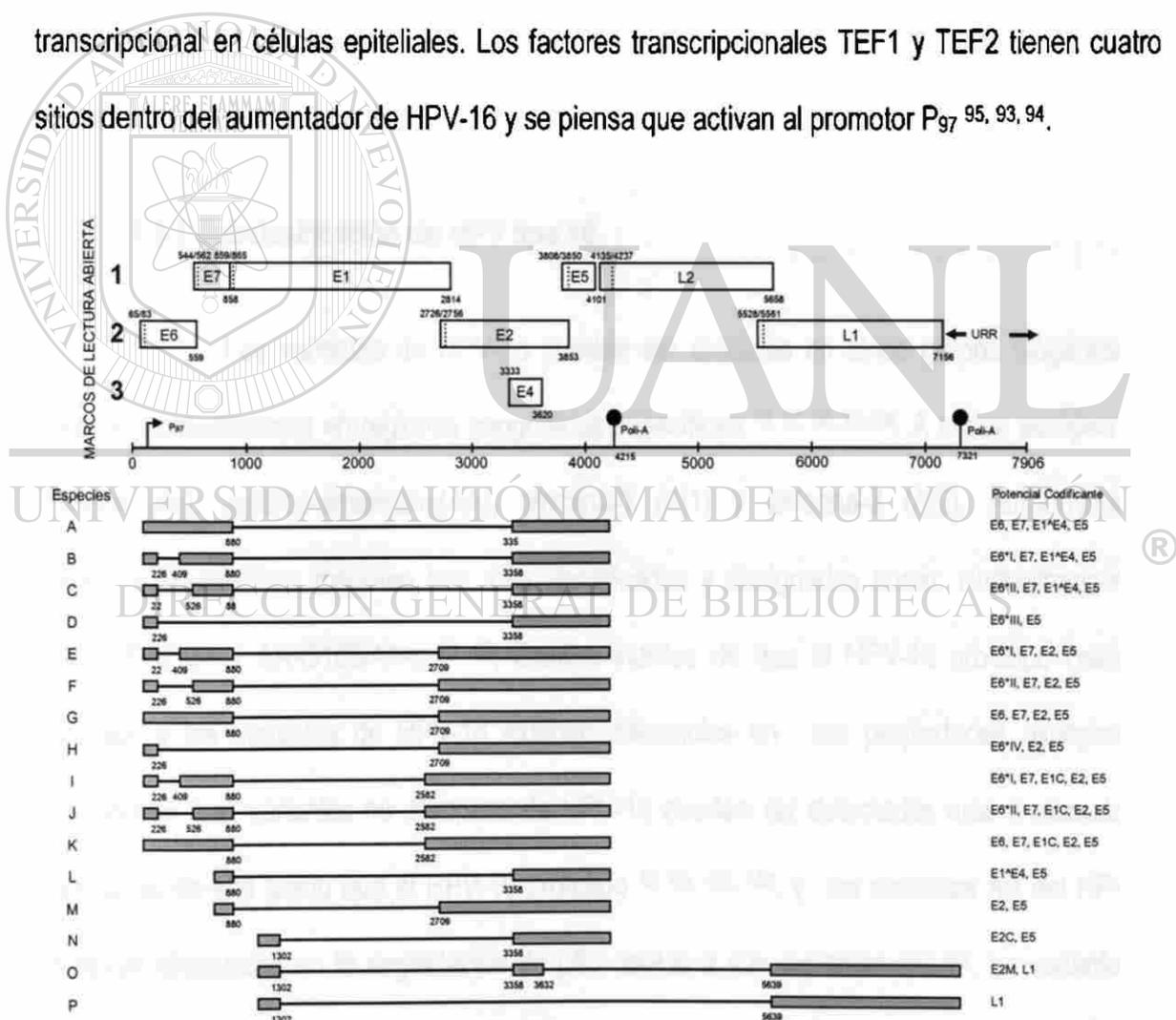


Figura 6. Esquema de los diferentes empalmes alternativos de la expresión del HPV. En este esquema se muestran los diferentes RNAm resultantes de la expresión del HPV, así como los diferentes marcos de lectura se generan (Tomado de Kiri Y and Matsukura T, 1998).

Los factores reguladores de la transcripción de los genes transformantes del HPV mencionados en el párrafo anterior proveen evidencia de que el control transcripcional es complicado y está regulado por numerosos factores que tienen efectos positivos y negativos. Estos no solo se unen a URR, sino que también interactúan con otros factores transcripcionales.

1.5 Clasificación de los HPV.

Los tipos de HPV son definidos por variaciones de secuencia de más de 10% entre sí. La secuencia de nucleótidos en sólo una región del genoma puede ser usada para definir el tipo de HPV y la variante intratipo. Las variantes intratipo varían hasta en un 2% en regiones conservadas del genoma (tales como E1 y L1) y más del 5% en la región URR ^{57, 76, 84, 95, 96}.

1.5.1 Subclasificación del HPV tipo 16.

Las variantes de HPV-16 pueden ser divididas en cinco grupos filogenéticos, cada una predominante en regiones geográficas específicas ^{76, 97, 99, 97, 98}. A saber: europea (E), asiática (As), asiático-americana (AA), africana-1 (Af1) y africana-2 (Af2). Adicionalmente variantes filogenéticas menores han sido identificadas y designadas como: Norteamericana-1 (NA1), E-G131 y AA-G183/AA-c ^{76, 99}. Existen indicios de que el HPV-16 prototipo (variante europea) y las variantes de HPV-16 exhiben diferencias en sus propiedades biológicas y bioquímicas. Las variantes no europeas de HPV-16 pueden ser detectadas más a menudo en neoplasias de alto grado que el HPV-16 prototipo ^{13, 99, 100, 101}, y las variantes AA del HPV-16 muestran diferencias en la degradación de p53 debido a sus proteínas E6 ¹⁰². La variante AA también exhibe una actividad incrementada del promotor p97 comparada con el HPV-16 prototipo, al igual que la variante NA1. Dicha variación en la actividad promotora se atribuye a un cambio nucleotídico de A/C en la posición 7729, la cual le incrementa la potencia tres veces

comparándola con la ejercida por el HPV-16 prototipo ^{31, 84}, por lo cual se le atribuye a este tipo una mayor virulencia en comparación con la variante E.

1.6 Justificación.

Este estudio pretende determinar si los cambios nucleotídicos en la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV-16 y europea del HPV-18 afectan la expresión tisular-específica del potenciador transcripcional. El estudio también persigue corroborar la potencia del promotor de cada variedad en líneas HPV positivas y determinar el efecto inductor de glucocorticoides que interactúan con el potenciador.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construir los vectores de expresión portadores de las regiones URR de interés, dirigiendo la expresión del gen reportero EGFP.
2. Evaluar los niveles de expresión del gen reportero dirigidos por la región URR en diferentes líneas celulares de origen humano.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Origen de los reactivos

El material plástico utilizado para cultivo bacteriano y extracción de DNA fueron adquiridos de Costar™ (Cambridge, MA, EUA), Falcon™ (Lincoln Park, NJ, EUA) y CEL Associates, Inc. (Pearland, TX, EUA).

Los reactivos utilizados para la preparación de medio de cultivo bacteriano y preparación de soluciones se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (Missouri, MI, EUA).

Las enzimas de restricción empleadas se obtuvieron de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, EUA).

El material plástico utilizado para cultivo celular (frascos, tubos, pipetas desechables y unidades de filtración) fueron adquiridos de Costar™ y Falcon™.

Los reactivos para la preparación de medio de cultivo, así como suero bovino fetal (SBF), tripsina, se adquirieron en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA), Hyclone, Inc. (Logan, UT, EUA) e Invitrogen™ (Carlsbad, CA, EUA), respectivamente. El reactivo LIPOFECTAMINE™ y el reactivo PLUS™ se adquirieron de Invitrogen.

El reactivo Rojo de Clorofenol-β-D-galactopiranosido fue adquirido de Calbiochem® (San Diego, CA, EUA). Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por Invitrogen™.

Los kits Endofree Maxi Plasmid Kit y QIAEX II utilizados fueron de la marca QIAGEN (Valencia, CA, EUA).

3.2 Origen del material biológico

Los plásmidos empleados fueron pBlueScript (STRATAGENE®, Cedar Creek, TX, EUA), pCMV Sport β -Gal (Invitrogen™) y pGREEN lantern-1 (Gibco – BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, EUA). Las líneas celulares SiHa, C33-A y HeLa fueron donadas por el Dr. Patricio Gariglio Vidal del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN; HepG2 por el Dr. Alejandro García Carrancá del Instituto Nacional de Cancerología, México, DF.; HuTu-80, JAR y U87MG por el Dr. José Luis Castrillo Díez (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España); y Huh7 por la Dra. Ana María Rivas Estilla del Laboratorio de Infectología Molecular de la ULIEG.

La cepa de Escherichia coli XL1-Blue empleada en los ensayos de transformación y propagación de los plásmidos recombinantes fue obtenida del cepario de la ULIEG.

3.3 Equipo

Se utilizó una balanza digital Sartorius modelo 1206 MP (Camibh Göttingen, Alemania), una balanza analítica OHAUS modelo AP1105 (Florham Park, Suiza), micropipetas Eppendorf Research (Camibh Göttingen, Alemania), un horno de microondas Goldstar modelo MA-857M, una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C (Camibh Göttingen, Alemania), un microscopio invertido Karl Zeiss (alemania), un lector de placas de ELISA Multiskan EX (Termo Labsystems, Vantaa, Finlandia), un fluorómetro (BIORAD), una campana de flujo laminar (Labconco Co, Kansas City, MO, EUA), un termociclador MJ Research modelo PTC-100 (Watertown, MA, EUA).

La captura de datos y de la tesis en su totalidad se realizó en una computadora SONY VAIO PCG-FXA32. El software utilizado fue el conjunto de programas de Office XP de Microsoft™, CorelDraw Graphics Suite 11, Redasoft Visual Cloning 2000. Para el diseño de

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

iniciadores y análisis de las secuencias de ácidos nucleicos se utilizaron los programas Oligo 4.0, Amplify 1.0, Amplify 2.53 β y DNAstrider 1.3, de la plataforma Macintosh. Para la búsqueda de sitios de unión de factores transcripcionales se utilizó el programa Primer Premier 5™ y la base de datos en línea MatInspector de la compañía Genomatix.

El análisis de los resultados se realizó en el programa estadístico SPSS 11.5 para PC. Para la búsqueda de información se recurrió a la página de Internet del National Center for Biotechnology Information, NIH, MD, EUA.

3.4 Métodos

El trabajo se realizó en tres etapas, como se muestra en la figura 7: 1) Construcción de los vectores de expresión experimentales y sus respectivos controles, 2) evaluación de los niveles de expresión dirigidos por URR en diferentes líneas celulares humanas y 3) análisis y correlación estadística de los resultados obtenidos.



Figura 7. **Estrategia General.** Se indican las tres etapas principales en las que consistió el presente trabajo.

3.4.1 Clonación de las regiones URR del HPV-16 y 18.

Para la obtención de las regiones URR del HPV-16 se partió de biopsias de pacientes con cáncer cervical, a las cuales se les extrajo el DNA. Posteriormente se amplificó la región URR [ver figura 8a] con iniciadores específicos para esta región de los HPV's tipo 16, los cuales contenían adaptadores para las enzimas de restricción *Sal* I y *Bcl* I, respectivamente P971 y P972 [ver tabla I y figura 9]. Los iniciadores fueron diseñados según la secuencia del HPV-16 de referencia ¹¹¹. Una vez amplificados, los fragmentos de 618 pb [ver figura 8a] resultantes fueron clonados en el vector de clonación pBlueScript SK+ por vector T y posteriormente secuenciados, para que a partir de su secuencia se pudiera identificar a las variedades de HPV-16. Para nuestro estudio se seleccionaron las clonas con las variedades europea y asiático-americana [ver figura 10a].

De igual manera, para la obtención de la región URR del HPV tipo 18 se partió de DNA de la línea celular HeLa, a partir del cual se amplificó la región URR con iniciadores específicos para esta región de los HPVs tipo 18, los cuales contenían adaptadores para las enzimas *Sal* I y *Bcl* I, p1051 y p1052, respectivamente [ver tabla I]. Los iniciadores fueron diseñados según la secuencia del HPV tipo 18 (gi:9626069). Una vez amplificado, el fragmento de 626 pb resultante [ver figura 8b] fue clonado en el vector de clonación pCR®-XL-TOPO® y posteriormente secuenciado para asegurarse de la identidad de la secuencia clonada [ver figura 10b].

Tabla I. **Secuencia de los iniciadores utilizados.** En esta tabla se muestran el nombre y la secuencia de los iniciadores diseñados para amplificar las regiones URR de los HPV-16 y 18.

| TIPO DE HPV | INICIADOR | SECUENCIA | Tm |
|-------------|-----------|--|---------|
| 16 | P971 | 5'-TTTGCTACGTCGACTTTTTGTTTTAT-3' <i>Sal I</i> | 64.4 °C |
| | P972 | 5'-TCTTTTGGTGATCAAATGTCTGC-3' <i>Bcl I</i> | 66 °C |
| 18 | P1051 | 5'-TGTTTGTGCGACTGGGTGTTGCTTGTTG-3' <i>Sal I</i> | 74.9 °C |
| | P1052 | 5'-CGCGCCTGATCATTGTGGTGTGTT-3' <i>Bcl I</i> | 75.6 °C |

Tabla II. **Condiciones de PCR.** En esta tabla se muestran las condiciones de PCR empleadas para la amplificación de las regiones URR, tanto del HPV-16 como del HPV-18.

| REACTIVOS | Volumen (1X) |
|---------------------------|--------------|
| Agua MiliQ | 15.35 µl |
| PCR Buffer II 10X | 2.5 µl |
| MgCl ₂ a 10 mM | 2 µl |
| dNTPs a 100 mM | 0.5 µl |
| AmpliTaq Gold™ a 5 U/µl | 0.15 µl |
| Iniciador 5' a 5 µM | 2 µl |
| Iniciador 3' a 5 µM | 2 µl |
| DNA (~ 100 ng/µl) | 0.5 µl |
| VOLUMEN TOTAL | 25 µl |

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.



Figura 8. **PCR virtual generada por el programa Amplify 2.53β.** A) Se muestra de manera gráfica el fragmento de 618 pb generado al amplificar la región URR del HPV-16 con los iniciadores p971 y p972. B) De igual manera se muestra de manera gráfica el fragmento de 626 pb generado al amplificar la región URR del HPV-18 con los iniciadores p1051 y p1052.

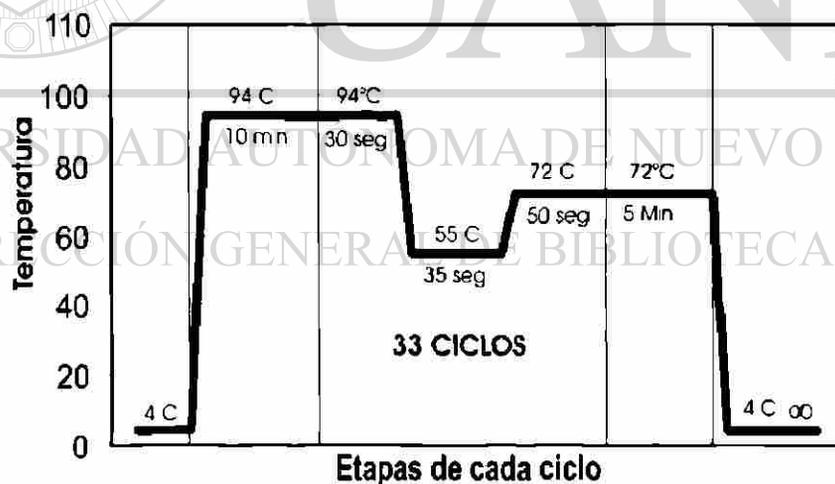


Figura 9. **Programa de temperaturas para PCR de URR.** Se muestra de manera gráfica el programa de temperaturas empleado para la PCR de la amplificación de las regiones URR tanto del HPV-16 como HPV-18.

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

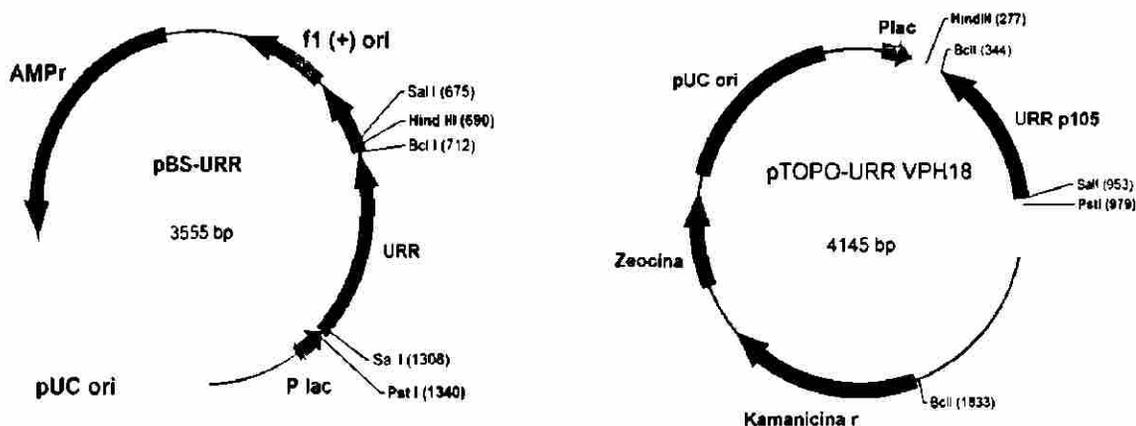


Figura 10. Mapas de restricción de las regiones URR clonadas en los vectores de clonación. **A)** Mapa de restricción de pBlueScript con la región URR del HPV tipo 16 clonada por vector T; en éste se muestran los sitios de restricción empleados para su subclonación en el vector de expresión. **B)** Mapa de restricción de la región URR del HPV tipo 18 clonado en el vector de clonación pCR[®]-XL-TOPO[®], indicando los sitios de restricción utilizados para su subclonación en el vector de expresión.

3.4.2 Construcción de los vectores de expresión

Para la evaluación de la fuerza promotora de las regiones URR se planteó la utilización del gen de la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) como gen reportero y el empleo del vector de clonación pBlueScript como esqueleto plasmídico.

A partir del plásmido pGREEN lantern-1 [figura 11] (el cual consiste del gen EGFP dirigido por el promotor de citomegalovirus y con una señal de poliadenilación de SV40) se obtuvo al gen reportero, el cual se usó para la construcción del plásmido control negativo y de los plásmidos problema. El control positivo fue el propio pGREEN lantern-1.

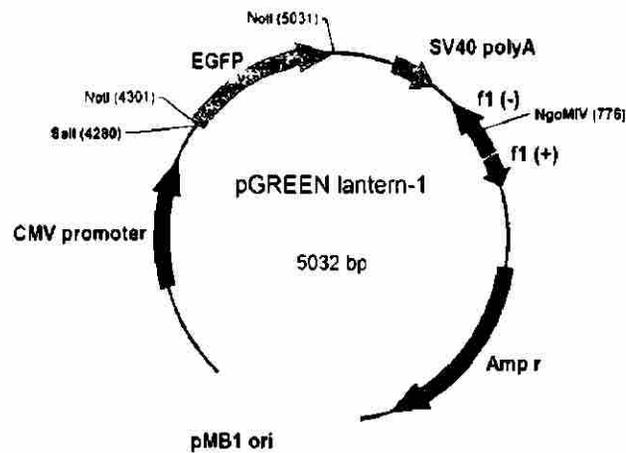


Figura 11. Mapa de restricción del vector plasmídico pGREEN lantern-1. En el mapa se muestran los sitios de restricción *Ngo M IV* y *Sal I* empleados para la liberación de EGFP y la secuencia de poliadenilación de SV40. También se muestran los sitios *Not I* con los que fue clonado el gen EGFP.

A continuación se describe la metodología seguida para la construcción del plásmido control negativo y de los plásmidos problema.

3.4.2.1 pLESS-EGFP (control negativo)

Con las enzimas de restricción *Ngo M IV* y *Sal I* se digirió al plásmido pBlueScript SK+, de manera secuencial, lo que generó dos fragmentos: 2615 pb y 346 pb [figura 12]. La reacción de digestión se incubó 12 h a 37°C [ver tablas III y IV], periodo tras el cual se inactivaron las enzimas de restricción por calentamiento a 80°C por 15 minutos. El fragmento de 2615 pb sirvió como esqueleto plasmídico.

Por otra lado el plásmido pGREEN lantern-1 se digirió de manera secuencial con las enzimas *Ngo M IV* y *Sal I* [ver tablas III y IV]. La reacción de digestión se incubó a 37°C por 12 h, periodo tras el cual se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer de corrida TBE 1X, con un voltaje constante de 75 V por un periodo de 1 h. Una vez transcurrido este periodo se tiñó el gel con bromuro de etidio a 2 µg/ml y se identificó la banda correspondiente a 1534 pb

(correspondiente al gen EGFP y la secuencia de poliadenilación de SV40) [figura 12], la cual se cortó del gel y se purificó siguiendo las instrucciones del estuche comercial QIAEX II.

Tabla III. Mezcla de digestión preparativa de los vectores pBlueScript SK (+) y pGREEN lantern-1 con la enzima *Sal* I.

| Reactivo | Volumen |
|---|------------------|
| DNA plasmídico (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 10 μl |
| Buffer Único de <i>Sal</i> I 10X | 5 μl |
| BSA 10X | 5 μl |
| Enzima <i>Sal</i> I (100 U/ μl) | 3 μl |
| Agua MiliQ | 27 μl |

Tabla IV. Mezcla de digestión preparativa de los vectores pBlueScript SK (+) y pGREEN lantern-1 con la enzima *Ngo* M IV.

| Reactivo | Volumen |
|---|------------------|
| DNA plasmídico (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 10 μl |
| Buffer NEB 4 10X | 5 μl |
| Enzima <i>Ngo</i> M IV (10 U/ μl) | 5 μl |
| Agua MiliQ | 30 μl |

Una vez purificado el fragmento de interés, se procedió a ligarlo con el esqueleto plasmídico de 2615 pb proveniente de pBlueScript. La ligación se llevó a cabo a 17°C \times 16 hrs. con T4 DNA ligasa [Tabla V] y posteriormente fueron transformadas a bacterias calcio competentes XL1-Blue, para finalmente estriar en placas petri con medio de cultivo LB agar con ampicilina 0.1 mg/ml, y seleccionar colonias. Tras un posterior análisis con enzimas de restricción, se caracterizaron las clonas resultantes [figura 12] y sus identidades fueron confirmadas por secuenciación parcial.

Tabla V. Mezcla de ligación del esqueleto plasmídico y el gen EGFP .

| Reactivo | Volumen |
|---|-----------|
| Esqueleto plasmídico <i>Ngo M IV</i> – <i>Sal I</i> (proveniente de pBS) (~ 300 ng) | 2 μ l |
| Inserto EGFP – PoliA <i>Ngo M IV</i> – <i>Sal I</i> (proveniente de pGREEN lantern-1) [~ 300 ng] | 8 μ l |
| Enzima T4 DNA ligasa (NEB) | 2 μ l |
| Buffer de ligación 10X (NEB) | 2 μ l |
| ATP 10 mM (Invitrogen) | 2 μ l |
| Agua MiliQ | 4 μ l |

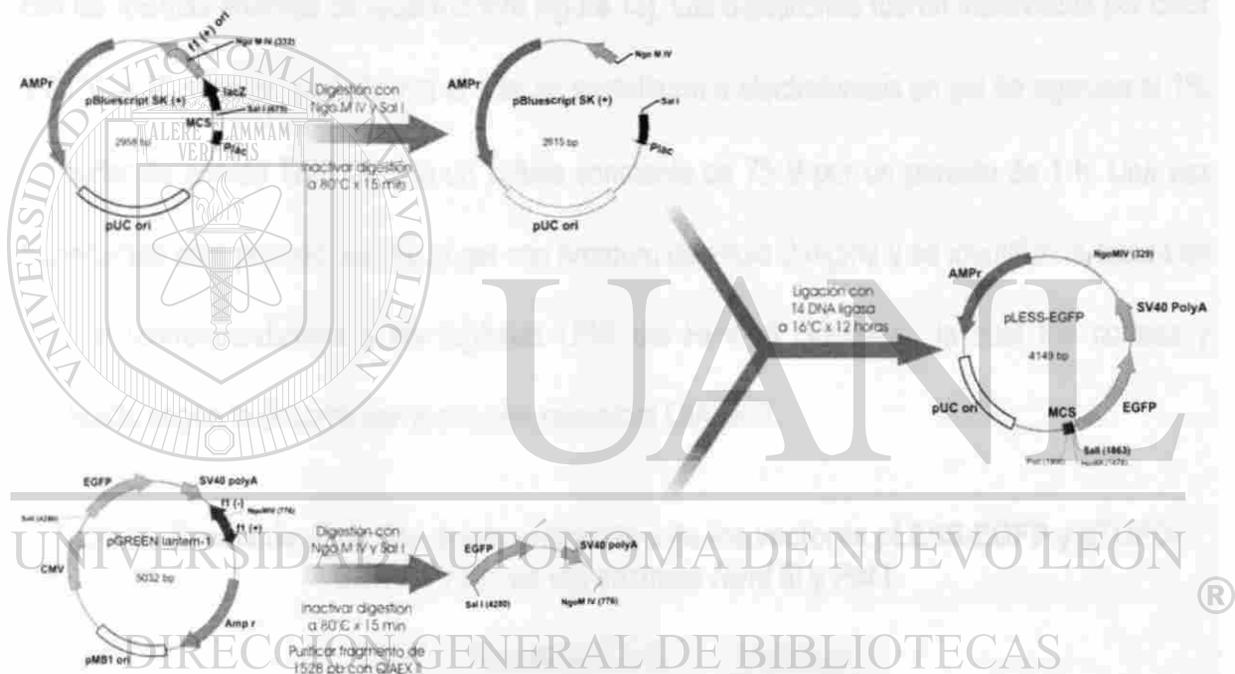


Figura 12. Estrategia para la construcción de pLESS-EGFP. El plásmido pBlueScript SK (+) fue empleado como esqueleto plasmídico. Primeramente pBlueScript SK (+) fue digerido con las enzimas de restricción *Ngo M IV* y *Sal I* en una digestión secuencial. Al mismo tiempo el plásmido pGREEN lantern-1 fue digerido con las mismas enzimas. La banda de 1528 pb correspondiente al gen EGFP y la secuencia de poliadenilación de SV40, fue purificada del gel con QIAEX II. Una vez recuperada la banda de 2615 pb proveniente de la digestión de pBlueScript SK (+) se ligó al fragmento de 1528 pb, para obtener finalmente la construcción pLESS-EGFP.

3.4.2.2 pURRaa – EGFP u pURRe-EGFP (plásmidos problema)

Una vez que se obtuvo la construcción pLESS-EGFP se procedió a la inserción de la región URR de ambas variedades.

El plásmido pLESS-EGFP fue digerido en una doble digestión con las enzimas *Hind* III y *Pst* I [tabla VI] a 37°C por 16 hrs., lo que generó un fragmento de 4127 pb y otro de 22 pb [figura 13]. La digestión fue inactivada por calor a 65°C × 10 minutos. Por otra parte, los plásmidos donde fueron clonadas las regiones URR de las variedades AA y E del HPV-16 fueron digeridos con las mismas enzimas de igual manera [figura 13]. Las digestiones fueron inactivadas por calor a 65°C × 10 minutos, periodo tras el cual se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer de corrida TBE 1X, con un voltaje constante de 75 V por un periodo de 1 h. Una vez transcurrido este periodo, se tiñó el gel con bromuro de etidio 2 mg/ml y se identificó la banda de 650 pb (correspondientes a las regiones URR del HPV-16 clonadas), la cual fue cortada y purificada según lo descrito por el estuche comercial QIAEX II.

Tabla VI. Mezcla de digestión doble preparativa de los vectores pLESS-EGFP y pTOPO-URR-HPV18 con las enzimas *Hind* III y *Pst* I.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

| Reactivo | Volumen |
|-----------------------------------|---------|
| DNA plasmídico (1 µg/µl) | 10 µl |
| Buffer NEB 2 10X | 5 µl |
| BSA 10X | 5 µl |
| Enzima <i>Hind</i> III (100 U/µl) | 3 µl |
| Enzima <i>Pst</i> I (100 U/µl) | 3 µl |
| Agua MilliQ | 24 µl |

Una vez purificados los fragmentos de interés se procedieron a ligarlos directamente con una porción de la digestión de pLESS-EGFP sin purificar, para que por competencia se generaran las clonas de interés. Las ligaciones se llevaron a cabo con T4 DNA ligasa a 17°C por

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

16 hrs [figura 13]. Posteriormente, las clonas fueron introducidas en bacterias calcio competentes XL1-Blue y estriadas en placas petri con medio de cultivo LB agar con Ampicilina 0.1 mg/ml, siendo incubadas a 37°C por 16 hrs. Finalmente se seleccionaron colonias, las cuales tras un posterior análisis, se caracterizaron con enzimas de restricción. Las clonas resultantes fueron confirmadas por secuenciación.

Tabla VII. Mezcla de ligación de pLESS-EGFP y la región URR del HPV tipo 16.

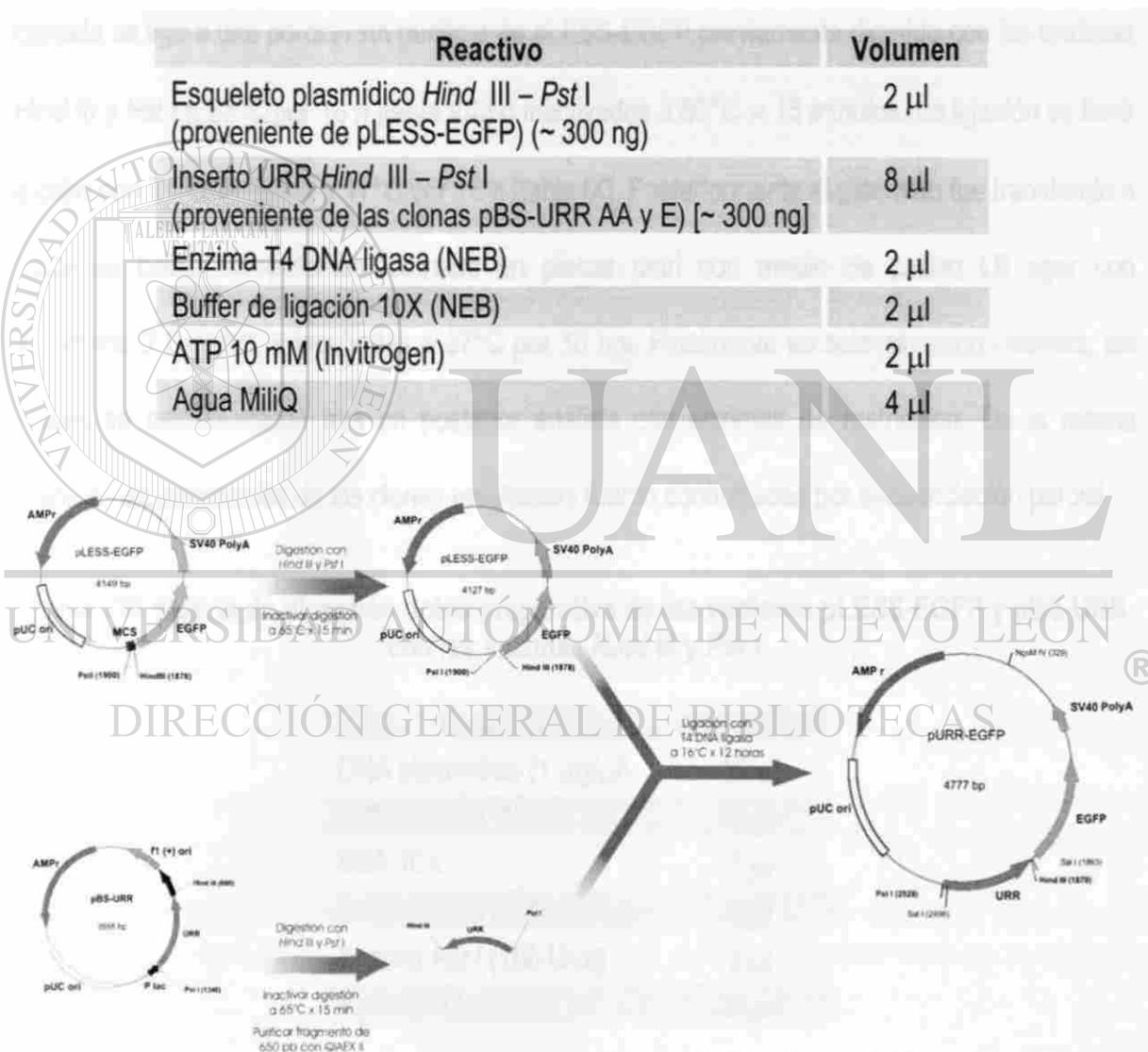


Figura 13. Estrategia para la construcción de pURR-EGFP. El plásmido pLESS-EGFP fue digerido con las enzimas de restricción *Hind* III y *Pst* I en una digestión doble. Al mismo tiempo las clonas pBS-URR AA y E fueron digeridos con las mismas enzimas y la banda de 650 pb correspondiente a la región URR fue purificada de gel con QIAEX II. Posteriormente se ligó a una porción de la digestión de pLESS-EGFP sin purificar, para obtener finalmente las construcciones pURR-EGFP con las dos variedades de URR empleadas.

3.4.2.3 pURR₁₈- EGFP

Para la construcción de este vector, se siguió la misma estrategia que para la construcción de los plásmidos problema pURR-EGFP, con la diferencia de que la región URR de HPV-18 fue tomada del plásmido donde anteriormente había sido clonada, mediante digestión con las enzimas *Hind* III y *Pst* I a 37°C por 16 h [tabla VIII], lo que generó un fragmento de 3443 pb y otro de 702 pb. El fragmento de 702 pb correspondiente a la región URR del HPV-18 clonada se ligó a una porción sin purificar de pLESS-EGFP previamente digerido con las enzimas *Hind* III y *Pst* I a 37°C por 16 h [tabla VIII] e inactivadas a 80°C × 15 minutos. La ligación se llevó a cabo con T4 DNA ligasa a 17°C por 16 h [tabla IX]. Posteriormente el plásmido fue transferido a bacterias calcio competentes, estriado en placas petri con medio de cultivo LB agar con ampicilina 0.1 mg/ml, e incubadas a 37°C por 16 hrs. Finalmente se seleccionaron colonias, las cuales se caracterizaron tras un posterior análisis con enzimas de restricción. De la misma manera, las secuencias de las clonas resultantes fueron confirmadas por secuenciación parcial.

Tabla VIII. Mezcla de digestión doble preparativa de los vectores pLESS-EGFP y pBS-URR con las enzimas *Hind* III y *Pst* I.

| Reactivo | Volumen |
|-----------------------------------|---------|
| DNA plasmídico (1 µg/µl) | 10 µl |
| Buffer NEB 2 10X | 5 µl |
| BSA 10X | 5 µl |
| Enzima <i>Hind</i> III (100 U/µl) | 3 µl |
| Enzima <i>Pst</i> I (100 U/µl) | 3 µl |
| Agua MilliQ | 24 µl |

Tabla IX. Mezcla de ligación de pLESS-EGFP y la región URR del HPV tipo 18.

| Reactivo | Volumen |
|--|-----------|
| Esqueleto plasmidico <i>Hind</i> III – <i>Pst</i> I (proveniente de pLESS-EGFP) (~ 300 ng) | 2 μ l |
| Inserto URR <i>Hind</i> III – <i>Pst</i> I (proveniente de la clona pTOPO-URR-HPV18) [~ 300 ng] | 8 μ l |
| Enzima T4 DNA ligasa (NEB) | 2 μ l |
| Buffer de ligación 10X (NEB) | 2 μ l |
| ATP 10 mM (Invitrogen) | 2 μ l |
| Agua MiliQ | 4 μ l |

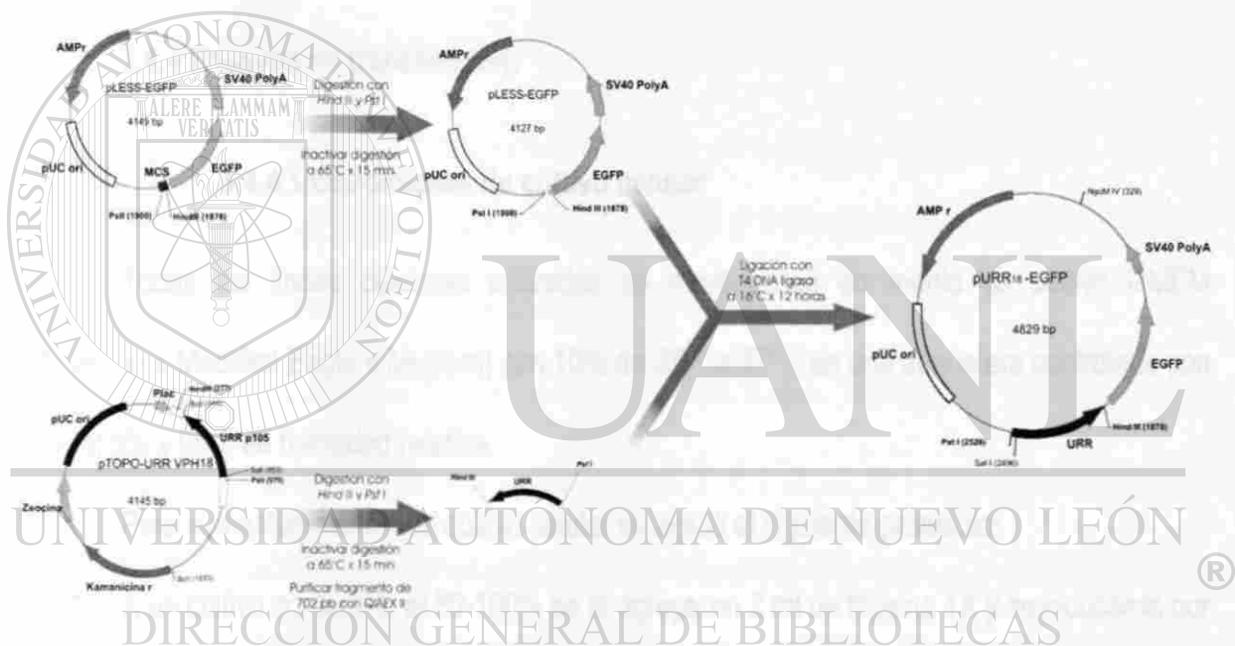


Figura 14. Estrategia para la construcción de pURR₁₈-EGFP. El plásmido pLESS-EGFP fue digerido con las enzimas de restricción *Hind* III y *Pst* I en una digestión doble. Al mismo tiempo la clona pTOPO-URR-HPV18 fue digerida con las mismas enzimas y la banda de 702 pb correspondiente a la región URR fue purificada de gel con QIAEX II. Posteriormente se ligó a una porción de la digestión de pLESS-EGFP sin purificar, para obtener finalmente la construcción pURR₁₈-EGFP.

3.4.3 Purificación de los plásmidos.

Una vez que ya habían sido obtenidos todos los plásmidos de interés, se procedió a crecerlos a gran escala en un volumen de 500 ml de medio LB con ampicilina 0.1 mg/ml y purificarlos por columna con el estuche comercial Endofree Maxi Plasmid Kit (QIAGEN), según las especificaciones descritas por el fabricante. Posteriormente se cuantificaron al espectrofotómetro mediante lectura a 260 nm para determinar la concentración del DNA y también se determinó su pureza mediante el índice resultante de las absorbancias a 260 y 280 nm.

3.4.4 Ensayos de transfección.

3.4.4.1 Condiciones de cultivo celular

Todas las líneas celulares utilizadas se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 10% de SBF a 37°C en una atmósfera controlada con CO₂ al 5% y 95% de humedad relativa.

Para el mantenimiento del cultivo celular se siguió el siguiente protocolo:

- 1) A un cultivo confluyente al 80-100% se le agregaron 2 ml de tripsina 1X y se incubaron por 5 minutos a 37°C.
- 2) Se recuperaron las células despegadas en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugaron a 2500 RPM x 1 minuto. Se descartó la tripsina y se resuspendieron en 5 ml de medio DMEM sin suero. Se centrifugaron a 2500 RPM x 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 3 ml de medio DMEM con 10% de SBF.
- 3) Se contaron las células y la viabilidad celular en una cámara de Neubauer y se transfirió una alícuota de 1×10^6 células a una nueva botella de 75 cm².

- 4) Se agregaron 20 ml de medio DMEM con 10% de SBF sin antibióticos.
- 5) Se incubaron en una atmósfera controlada de 5% de CO₂, 95% de humedad relativa a 37°C; y se les realizó cambio de medio cada 72 h.

Para preparar las células para los ensayos de transfección se partió de cultivos al 80% y en fase logarítmica. Se procedió a despegar las células con tripsina 1X y realizar la cuenta celular. Se inocularon 1×10^5 células en placas de 24 pocillos y se incubaron por un periodo de 24 h antes de los ensayos de transfección.

3.4.4.2 Optimización de las condiciones de transfección.

Para optimizar las condiciones de transfección, se realizaron diversos ensayos variando las concentraciones de lipofectamina y reactivo PLUS y cotransfectando al vector pGREEN lantern-1 con pCMV Sport βGal en diferentes concentraciones.

Las concentraciones de lipofectamina ensayadas fueron: 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0 y 0.5 μg; las cantidades de reactivo PLUS ensayadas fueron 6, 5, 4, 3, 2 y 1 μl; y las concentraciones de DNA empleadas fueron las siguientes: 2.0, 1.5, 1.0 y 0.5 μg de DNA total.

La mejor condición de transfección fue ensayada para todas las líneas celulares y se escogieron las que tuvieron la misma eficiencia de transfección.

De esta manera fue posible encontrar las condiciones óptimas para la introducción de los plásmidos, empleando el siguiente protocolo:

- 1) En un tubo de 1.5 ml se colocaron 396 μl de medio de cultivo DMEM sin suero y 4 μl de lipofectamina 2 μg/μl, se mezcló y se incubó por 15 min a temperatura ambiente.
- 2) Al mismo tiempo a otro tubos de 1.5 ml se agregaron 320 μl de medio de cultivo DMEM sin suero y 20 μl del plásmido a estudiar y 20 μl de pCMV Sport βGal, ambos a una

concentración de 0.100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, para generar una solución de 1 μg de DNA totales/100 μl .

La solución se mezcló y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente.

- 3) Pasados los 15 minutos se agregaron 12 μl del reactivo PLUS, se mezcló y se dejó incubar otros 15 minutos.
- 4) Transcurridos los 15 minutos, se mezcló el contenido de ambos tubos y se dejó incubar 30 minutos para permitir la formación del complejo DNA-lipofectamina.
- 5) Consumados los 30 minutos de incubación, se añadieron 200 μl de la mezcla a 3 pocillos de la placa de 24 pozos con células preparadas para la transfección 24 h antes.
- 6) Las células se incubaron por 4 horas con el complejo DNA-lipofectamina a 37°C en una atmósfera controlada al 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.
- 7) Pasado este tiempo se añadieron 300 μl de medio de cultivo DMEM con SBF al 16.66%, para tener una concentración final de SBF del 10% en un volumen de 500 μl . Las células se continuaron incubando a 37°C en una atmósfera controlada al 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.
- 8) A las 24 horas del comienzo de la transfección se cambió el medio de cultivo por medio de cultivo DMEM al 10% de SBF, y se continuó la incubación hasta las 48 h, tiempo en que se interrumpió el ensayo.

3.4.4.3 Optimización del método de lisis celular

Dado que la sensibilidad del método depende de una eficiente liberación de las proteínas de interés, se tuvo la necesidad de optimizar el método de lisis celular, variando la composición del buffer de lisis, volumen del buffer de lisis al momento de hacer el lisado, empleo o no de ciclos de congelación-descongelación.

3.4.5 Evaluación de la eficiencia de transfección.

3.5.5.1 Cuantificación de la actividad de β -galactosidasa.

Para la determinación de la actividad de β -galactosidasa se siguió el protocolo descrito por Huvar y Lernhardt, 1994. Una vez terminado el tiempo de incubación de la transfección las células fueron lavadas con 300 μ l de PBS 1X pH 7.5 y posteriormente se adicionaron 200 μ l de buffer de lisis (0.25 M Tris [pH 7.4], 0.25 % (v/v) NP-40, 2.5 mM EDTA). Se procedió a 2 ciclos de incubación a -20°C por 30 minutos y se descongeló a temperatura ambiente. El lisado se traspasó a tubos de 0.5 ml, para posteriormente clarificar por centrifugación a 12,000 rpm x 5 minutos. Del extracto proteico se tomaron 50 μ l para llevar a cabo una reacción con 150 μ l de sustrato para β -galactosidasa CPRG a una concentración de 1 mg/ml en buffer A [pH 7.5] (25 mM MOPS, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2). La reacción se llevó a cabo a 37°C y se determinó la intensidad de color midiéndose la absorbancia a 570 nm. La actividad de β -galactosidasa se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{\left[\frac{\{(\text{Abs } 570 \text{ nm} \times 55 \} \times \text{volumen total del ensayo} \}}{\text{Tiempo de incubación a } 37^{\circ}\text{C} \text{ en minutos}} \right]}{\text{Concentración de proteínas en mg}/\mu\text{g}} \times \text{Volúmen del lisado usado en el ensayo en } \mu\text{l}$$

Para calcular la actividad específica de β -galactosidasa en U/mg de proteína, se cuantificó la concentración de proteína total en el extracto celular mediante la técnica de Bradford.

3.4.5.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

En tubos de 0.5 ml se colocaron 1.0, 2.5, 5.0, 12.5 y 15 μ l de una solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 0.5 mg/ml, aforando a 50 μ l con una solución de NaCl 150 mM. Cada solución tenía una cantidad equivalente de 0.5, 1.25, 2.5, 6.25 y 7.5 μ g de proteína, respectivamente.

La reacción se llevó a cabo con la adición de 250 μ l de colorante azul brillante de Coomassie G-250, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. En paralelo, con la elaboración de la curva de calibración se determinó la concentración de proteínas de cada una de las muestras problema.

3.4.6 Evaluación de la fuerza promotora dirigida por URR

Para evaluar la fuerza promotora de las regiones URR se midió directamente la fluorescencia emitida por EGFP.

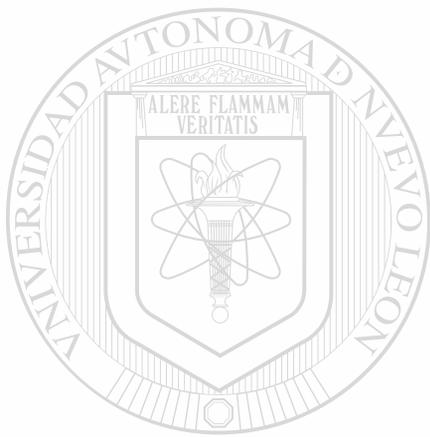
3.5.6.1 Medición directa de la fluorescencia de EGFP

La medición de la fluorescencia emitida por EGFP se hizo mediante lectura directa de 150 μ l del extracto proteico en fluorómetro, empleando una longitud de excitación de 488 nm, y una longitud de emisión de 507 nm, calibrado con un estándar de 10 μ g/ml de EGFP (Clontech).

La evaluación de la fuerza promotora de las diversas regiones URR se hizo previa normalización de la actividad de β -galactosidasa, para poder comparar entre sí la fuerza de las regiones promotoras en las diferentes líneas celulares y entre variedades de URR.

3.4.7 Análisis de los resultados obtenidos.

El análisis de los resultados se realizó en la hoja de cálculo Excel, así como las gráficas comparativas de todos los ensayos. Para determinar los valores de significancia estadística, se utilizó la prueba de ANOVA (comparación entre dos o más grupos). Éstos cálculos se realizaron con el programa estadístico SPSS versión 11.5 para PC. El valor fijado de significancia estadística para todas las pruebas fue ≥ 0.05 .



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Clonación de las regiones URR del HPV-16 y 18.

4.1.1 Clonación de la región URR del HPV-16

4.1.1.1 Amplificación de las regiones URR del HPV-16

Para la amplificación de la región URR se emplearon los iniciadores p971 y p972. Para encontrar la temperatura óptima de alineamiento se realizó un gradiente de temperaturas de 40 a 60°C, escogiendo como temperatura óptima 50°C [figura 15].

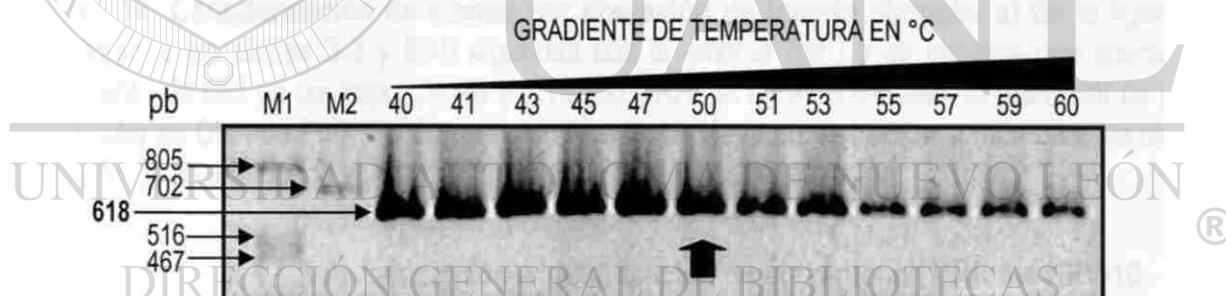


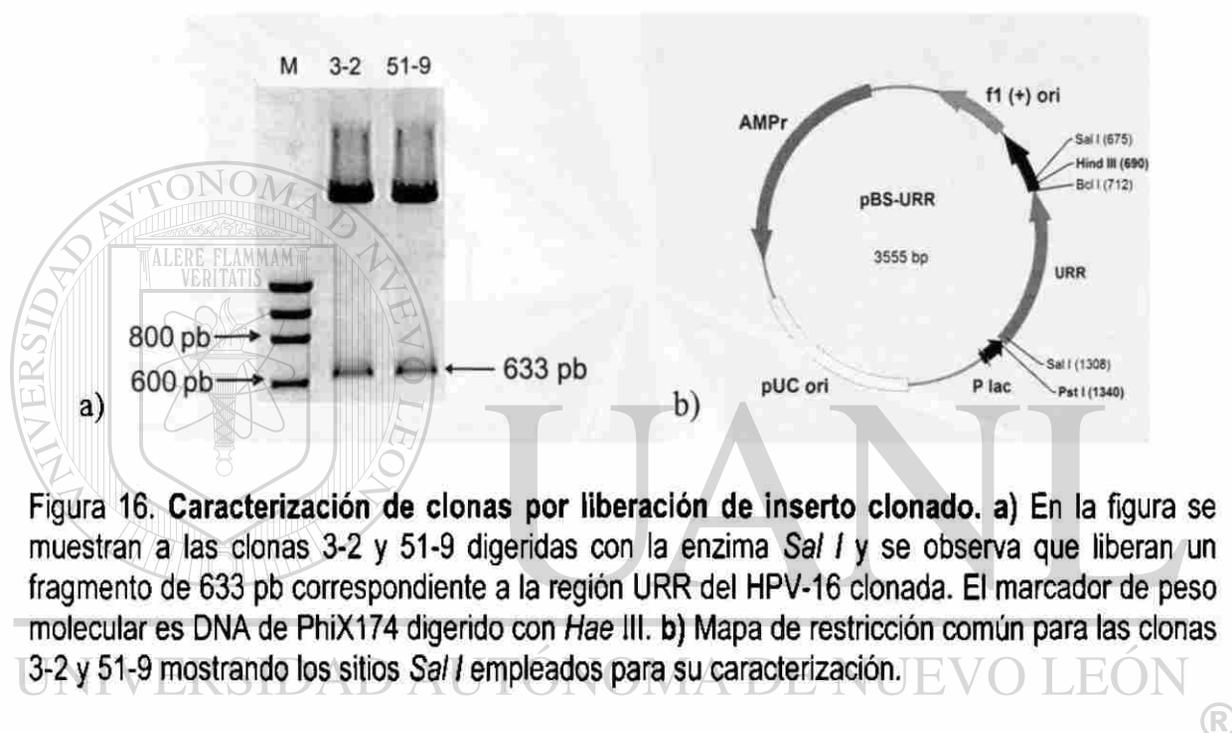
Figura 15. **Gradiente de temperaturas de alineamiento de los iniciadores p971 y p972.** En la figura se muestra un gel de agarosa al 1%, donde se aprecia la especificidad de los iniciadores y como aumenta la astringencia conforme se incrementa la temperatura. Carril M1: marcador de peso molecular λ + *Pst* I; Carril M2: marcador de peso molecular λ + *Bst* E II; carriles 3 – 14: productos de PCR empleando los iniciadores p971 y p972, variando únicamente la temperatura de alineamiento de los iniciadores de 40 a 60°C. Para la optimización de la PCR se empleó DNA de la línea celular CasKi.

4.1.1.2 Clonación de las regiones URR del HPV-16.

Una vez que se logró estandarizar la PCR para la amplificación de las regiones URR del HPV-16, se procedió a amplificar dichas regiones a partir de DNA de 12 biopsias de cervix

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

previamente tipificadas con infección de HPV-16, tras lo cual se procedió a clonaras por vector T [pBlueScript SK (+)]. Posterior al levantamiento de colonias de la ligación de vector T [pBlueScript SK (+)] con el producto de 618 pb proveniente de la PCR para la amplificación de la región URR de HPV-16, se caracterizaron con la enzima *Sal* I, para determinar la identidad de las clonas y su orientación [figura 16]. Finalmente se secuenciaron las regiones clonadas para confirmar su presencia e identificar a las variedades de HPV-16.



4.1.1.3 Secuenciación e identificación de las regiones URR del HPV-16 clonadas.

La secuenciación se realizó con los mismos iniciadores con los que se amplificaron las regiones URR. Las secuencias resultantes se alinearon en el programa en línea BLAST, para verificar la identidad y la variedad de HPV-16 (ver anexos), para posteriormente realizar un árbol filogenético empleando un análisis tipo Parsimony, utilizando todas las secuencias reportadas actualmente en el Genbank para la región URR del HPV-16, incluyendo las utilizadas por Yamada y Cols ^{73, 96}, para agruparlos en variedades. El árbol resultante se muestra en la figura 17, donde se señala la ubicación de las clonas 3-2 y 51-9, las cuales se escogieron como

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

representantes de las variedades europea y asiático americana, respectivamente. En el apéndice I se muestran las secuencias de las clonas 3-2 y 51-9.

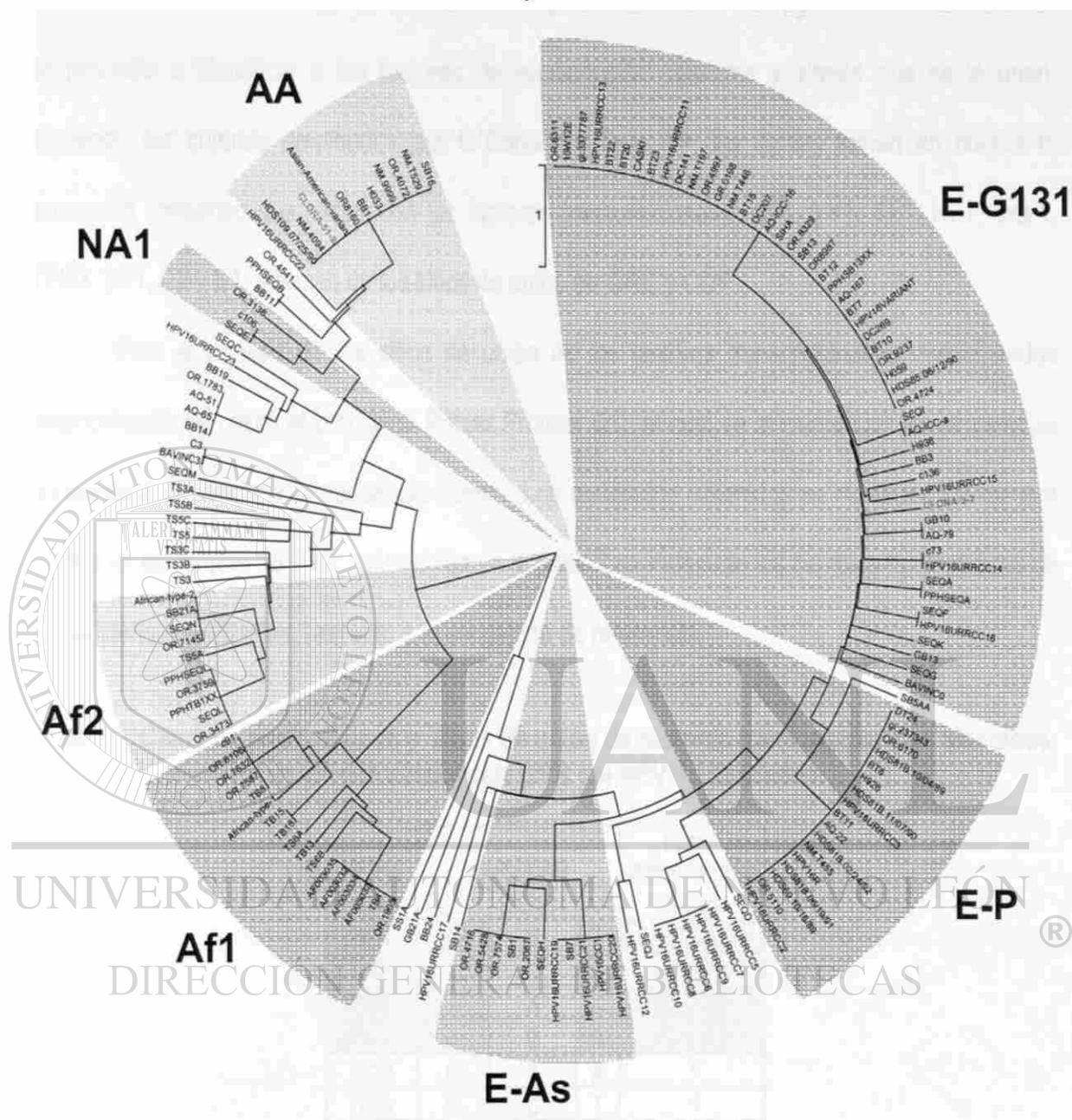


FIGURA 17. **Árbol filogenético de las variedades de HPV-16.** El árbol filogenético se realizó utilizando las regiones URR reportadas hasta el momento en el Genbank y en el HPV database para los HPV-16. El análisis fue realizado en el programa MEGA 2.1 con el método UPGMA y el método de cálculo de distancias se basó en el número de diferencias nucleotídicas. En esta figura se señalan la ubicación de las clonas 3-2 (variante europea G131) y 51-9 (variante asiático-americana). La organización del árbol en variantes se realizó tomando como referencia las secuencias reportadas por Yamada y Cols ^{73,96}.

4.1.2 Análisis de las regiones URR del HPV-16 clonadas.

Una vez identificadas las variedades de las secuencias de las regiones URR del HPV-16, se procedió a identificar a los factores de transcripción celulares y virales que se le unen, siguiendo los criterios empleados por O'Connor y Cols. ¹⁰⁵, los cuales toman en cuenta la secuencia consenso que reconocen los factores transcripcionales AP1, YY1, TF1, NF1, Oct-1, TFIID, SP1, E2 y E1, además de los sitios de unión de GRE y CDP.

Para el análisis de los sitios de unión de los factores transcripcionales mencionados anteriormente se utilizó el programa Primer Premier 5.0, el cual se alimentó con las secuencias consenso a identificar y la secuencia blanco. Los resultados obtenidos se muestran de manera gráfica en las figuras 18 y 19; así también en la tabla X se muestran los cambios nucleotídicos de las secuencias utilizadas, respecto a la secuencia de referencia.

Tabla X. Cambios nucleotídicos y sitios de unión de factores transcripcionales afectados en las dos secuencias URR del HPV-16 empleada.

| HPV16 Posición | VARIEDAD | | | Factor transcripcional afectado |
|-------------------|----------|--------|----|---------------------------------------|
| | P (E) | E-G131 | AA | |
| 7394 | C | C | T | GRE # 1 |
| 7395 | C | C | T | GRE # 1 |
| 7485 | A | A | C | GRE # 2 |
| 7489 | G | G | A | GRE # 2 |
| 7521 | G | A | A | * |
| 7669 | C | C | T | * |
| 7689 | C | C | A | TEF-1 |
| 7729 | A | A | C | * |
| 7743 | T | T | G | * |
| 7764 | C | C | T | * |
| 7786 | C | C | T | * |
| 7810 | A | G | A | AP1 |
| 7886 | C | C | G | * |

* Ningún sitio de unión de algún factor transcripcional conocido se ve afectado.

4.1.3 Clonación de la región URR del HPV-18.

4.1.3.1 Amplificación de la región URR del HPV-18.

Para la amplificación de la región URR del HPV-18 se emplearon los iniciadores p1051 y p1052. Para encontrar la temperatura óptima de alineamiento se realizó un gradiente de temperaturas, de 40 a 55°C, escogiendo como temperatura óptima 50°C [figura 20].

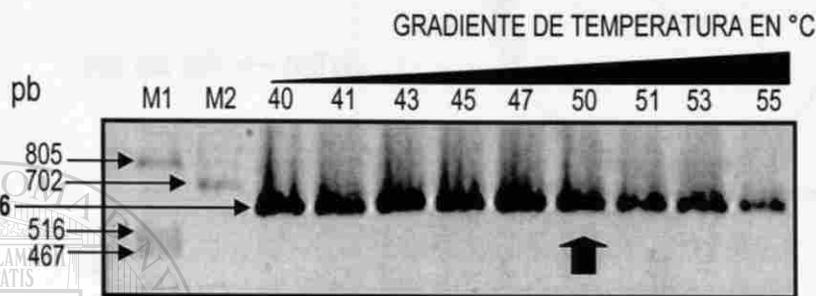


Figura 20. Gradiente de temperaturas de alineamiento de los iniciadores p1051 y p1052. En la figura se muestra un gel de agarosa al 1%, donde se aprecia la especificidad de los iniciadores y como aumenta la astringencia conforme se incrementa la temperatura, al igual que con la amplificación de URR para el HPV-16 (figura 14). Carril M1: marcador de peso molecular λ + Pst I; Carril M2: marcador de peso molecular λ + Bst E II; carriles 3 – 11: productos de PCR empleando los iniciadores p1051 y p1052, variando únicamente la temperatura de alineamiento de los iniciadores de 40 a 55°C. Para la optimización de la PCR se empleó DNA de la línea celular HeLa.

4.1.3.2 Clonación de las región URR del HPV-18.

Una vez que se logró estandarizar la PCR para la amplificación de la región URR del HPV-18, se procedió a amplificar dicha región a partir de DNA de la línea celular HeLa, la cual tiene integrada varias copias del genoma de HPV-18. Posteriormente se procedió a clonaras con el estuche comercial de clonación TOPO® XL PCR Cloning Kit. Posterior al levantamiento de colonias de la ligación con el vector TOPO, se les extrajo el DNA y se sometieron a caracterización con una doble digestión con las enzimas *Sal* I y *Bam* H I, para determinar la

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

identidad de las clonas y su orientación [figura 21]. Posteriormente se secuenciaron las regiones clonadas para confirmar su presencia e identificar a la región URR del HPV-18 clonada.

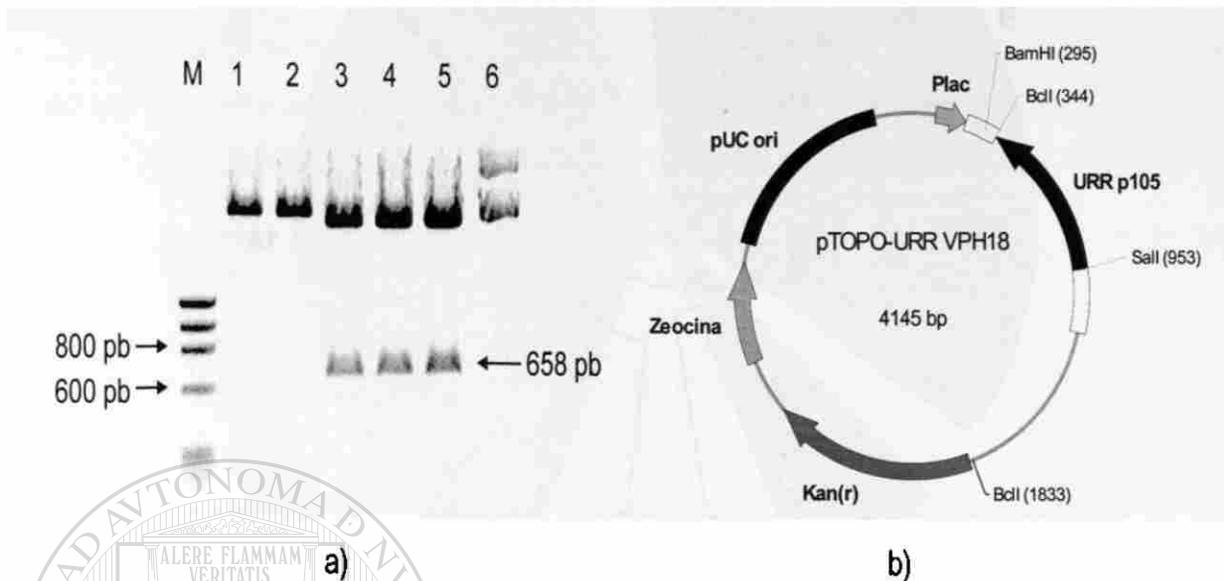


Figura 21. **Caracterización de clonas pTOPO-URR HPV 18 por liberación de inserto URR clonado.** a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se muestran diferentes clonas digeridas con *Sal I* + *Bam H I*, en las cuales, las que liberan un fragmento de 658 pb tienen la región URR del HPV-18 clonada, y se consideran positivas. Carril 1: marcador de peso molecular PhiX174 + *Hae III*; carriles 1 y 2: clonas pTOPO-URR HPV18 negativas; carriles 3-5: clonas pTOPO-URR HPV18 positivas. b) Mapa de restricción de la construcción pTOPO-URR HPV18 donde se muestran los sitios de restricción *Bam H I* y *Sal I* utilizados para su caracterización; además de los sitios *Bcl I* y *Sal I* contenidos en los iniciadores con los que se amplificó dicha región.

4.1.3.3 Secuenciación e identificación de la región URR del HPV-18 clonada.

La secuenciación se realizó con los mismos iniciadores con los que se amplificó la región URR. Los resultados de la secuenciación se alinearon en el programa en línea BLAST, para verificar la identidad y la variedad de HPV-18 con las que alineaban (ver anexo), para posteriormente realizar un árbol filogenético empleando un análisis tipo Parsimony, utilizando las secuencias referidas por Ong y Cols.¹¹² para la clasificación de los HPV-18 en variedades. El árbol resultante se muestra en la figura 22, donde se señala la ubicación de la clona resultante.

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

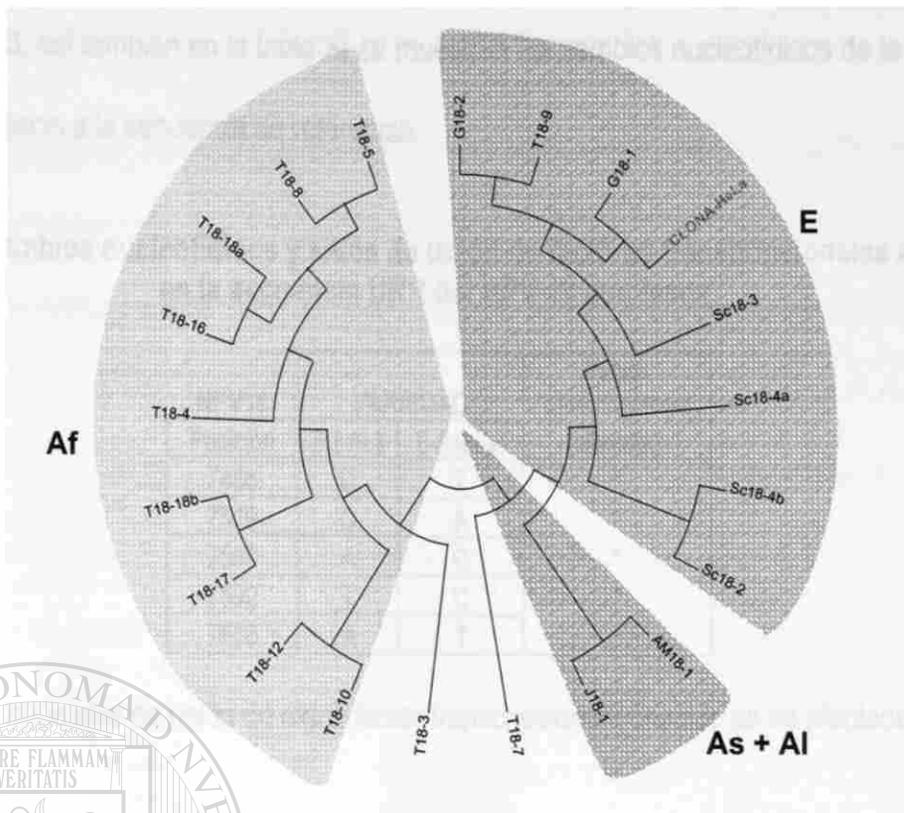


FIGURA 22. Árbol filogenético de las variedades de HPV-18. El árbol filogenético se realizó utilizando las regiones URR empleadas por Ong y cols.¹¹² para clasificar a los HPV-18 en variedades. El análisis empleando fue realizado en el programa MEGA 2.1 con el método Maximun Parsimony y el método de cálculo de distancias se basó en el número de diferencias nucleotídicas. En esta figura se señala la ubicación de la clona proveniente de HeLa (variante europea). La organización del árbol en variantes se realizó tomando como referencia las secuencias reportadas por Ong y colaboradores¹⁰⁵.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.1.3.4 Análisis de la región URR del HPV-18 clonada.

Una vez identificada la variedad de la secuencia de la región URR del HPV-18 proveniente de HeLa, se procedió a identificar a los factores de transcripción celulares y virales que se le unen, siguiendo los criterios empleados por O'Connor y Cols.¹⁰⁵, los cuales toman en cuenta la secuencia consenso que reconocen los factores transcripcionales AP1, YY1, TF1, NF1, Oct-1, TFIID, SP1, E2 y E1; además de los sitios de unión de GRE.

Para el análisis de los sitios de unión de los factores transcripcionales mencionados anteriormente se utilizó el programa Primer Premier 5.0, el cual se alimentó con las secuencias consenso a identificar y la secuencia blanco. El resultado obtenido se muestra de manera gráfica

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

en la figura 23; así también en la tabla XI se muestran los cambios nucleotídicos de la secuencia utilizada, respecto a la secuencia de referencia.

Tabla XI. Cambios nucleotídicos y sitios de unión de factores transcripcionales afectados en la secuencia URR del HPV-18 empleada.

| HPV18 | VARIEDAD | | Factor transcripcional afectado |
|-------|----------|----------|---------------------------------|
| | P (Al) | E (HeLa) | |
| 7486 | C | T | * |
| 7529 | C | A | * |
| 7567 | A | C | * |
| 7592 | T | C | * |
| 7670 | A | T | * |

* Ningún sitio de unión de algún factor transcripcional conocido se ve afectado.



Figura 23. Representación gráfica de la región URR de la variedad europea del HPV-18 clonada. En la figura se muestran los sitios de unión de varios factores de transcripción celulares y virales.

4.2 Construcción de los vectores de expresión.

Una vez que ya se tenían a las regiones promotoras clonadas, identificadas y caracterizadas, se procedió a la construcción de un vector que contuviera al gen EGFP, para posteriormente subclonar en éste a las regiones URR.

4.2.1 Caracterización del vector pLESS-EGFP.

La generación del vector pLESS-EGFP se llevó a cabo mediante la ligación de dos productos purificados: uno de 2615 pb proveniente de la digestión de pBlueScript SK (+) con las enzimas de restricción *Ngo M IV* y *Sal I*; y otro de 1534 pb proveniente de la digestión secuencial de pGREEN lantern-1 con las enzimas *Ngo M IV* y *Sal I*. Posteriormente fueron transformados en bacterias XL1-Blue. Se analizaron 18 colonias, obteniendo 2 como posibles clonas, las cuales tras una posterior caracterización con la enzima *Bam H I* (la cual se encontraba como sitio único en cada producto purificado ligado, pero después de la ligación se observó como sitio doble), donde en dos clonas se observó que liberaban un fragmento de 603 pb y otro de 3546 pb [figura

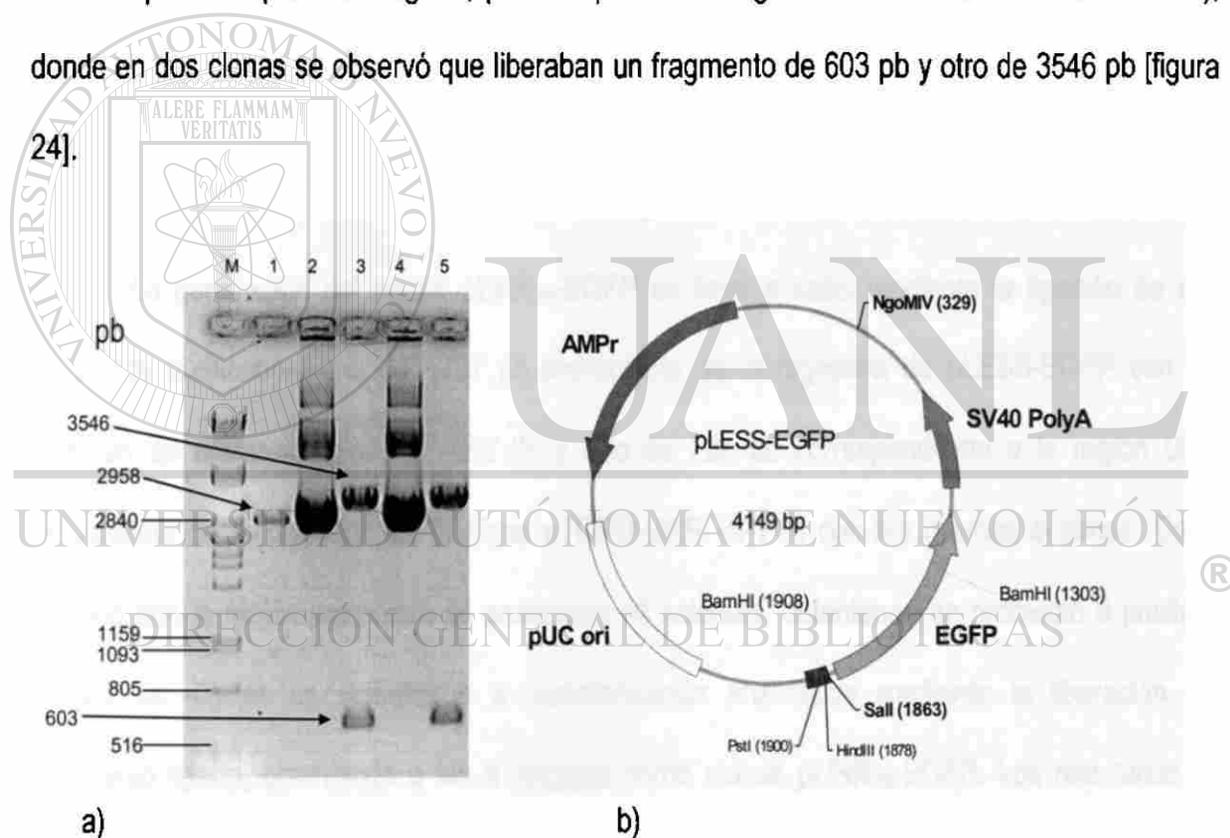


Figura 24. **Caracterización de la construcción pLESS-EGFP.** a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra en el carril 1: Control de corte [pBS SK (+) + *Bam H I*]; carriles 2 y 4: clonas 1-pLESS-EGFP y 2-pLESS-EGFP respectivamente, sin digerir; carriles 3 y 5: clonas 1-pLESS-EGFP y 2-pLESS-EGFP digeridas, donde se muestra su caracterización con *Bam H I*, donde al ser positivas liberan dos fragmentos, uno de 603 pb y otro de 3546. b) Mapa de restricción del vector pLESS-EGFP donde se muestran la localización de los sitios *Bam H I* utilizados para caracterizar a las clonas positivas. También se muestran los sitios *Ngo M IV* y *Sal I* empleados en la ligación para la generación de este vector.

4.2.2 Caracterización de los vectores pURRaa – EGFP y pURRe – EGFP.

La generación de los vectores pURR-EGFP se llevó a cabo mediante la ligación de dos productos purificados: uno de 4127 pb proveniente de la digestión de pLESS-EGFP con las enzimas de restricción *Pst* I y *Hind* III; y otro de 650 pb correspondiente a la región URR proveniente de la digestión de las clonas pBS-URR con las mismas enzimas. La metodología para la inserción de ambas regiones promotoras fue la misma en la variedad europea y asiático-americana. De la ligación con cada región promotora se analizaron 18 colonias, obteniendo en promedio 16 posibles clonas, de las cuales se escogió una de cada variedad para su caracterización, las cuales se muestran en la figura 25.

4.2.3 Caracterización del vector pURR₁₈ – EGFP.

La generación del vector pURR₁₈-EGFP se llevó a cabo mediante la ligación de dos productos purificados: uno de 4127 pb proveniente de la digestión de pLESS-EGFP con las enzimas de restricción *Pst* I y *Hind* III; y otro de 702 pb correspondiente a la región URR proveniente de la digestión de la clona pTOPO-URR HPV18 con las mismas enzimas. De la ligación con la región promotora se analizaron 18 colonias, obteniendo en promedio 9 posibles clonas, las cuales se sometieron a caracterización enzimática mediante la liberación del fragmento ligado, obteniendo a las 9 colonias como clonas pURR₁₈-EGFP. Los resultados se muestran en la figura 26.

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

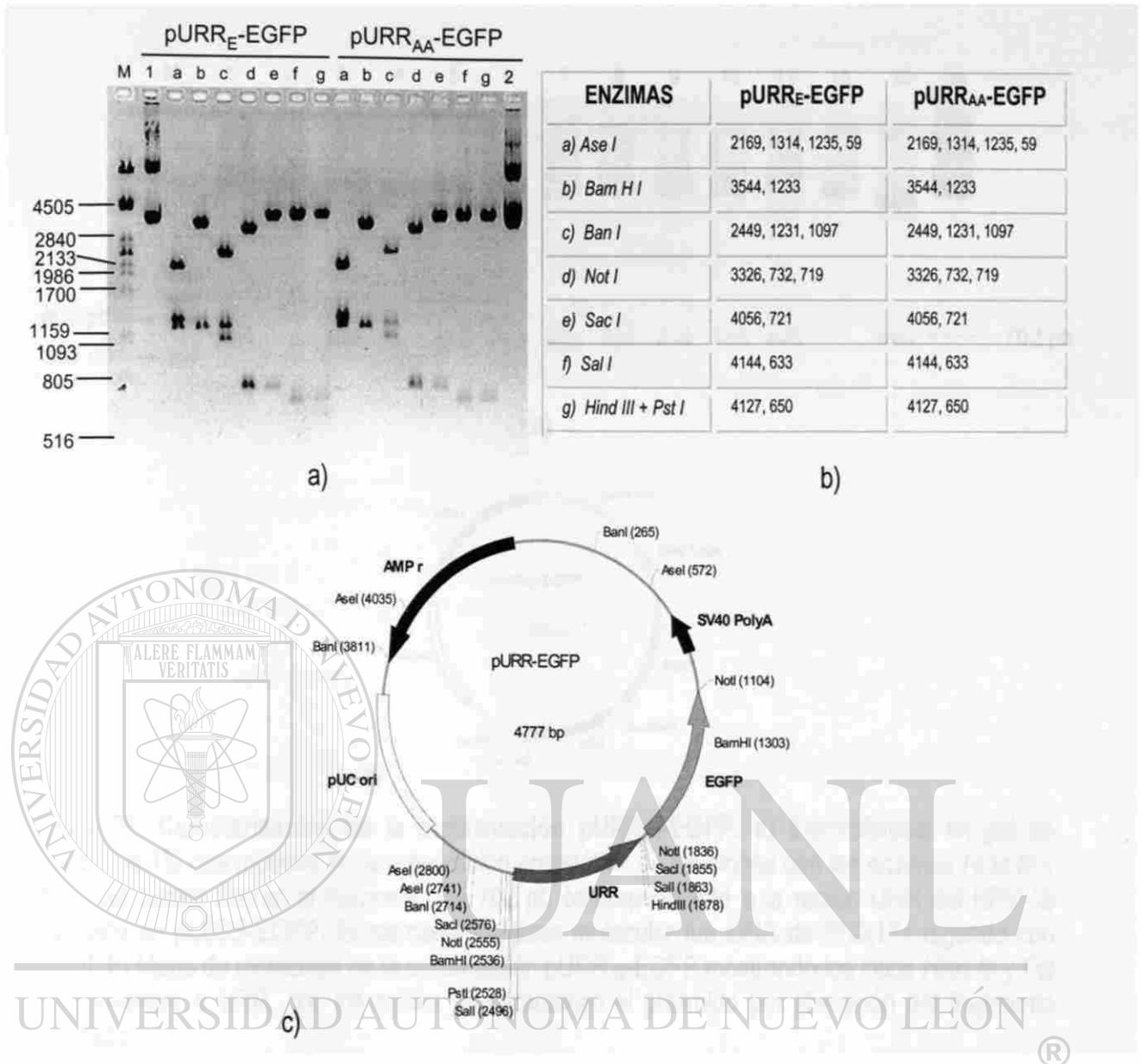


Figura 25. Caracterización de las construcciones pURRE-EGFP y pURRAA-EGFP. a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la caracterización enzimática de las construcciones pURRE-EGFP y pURRAA-EGFP con las enzimas localizadas en el mapa de restricción (figura 21 c) común para ambas construcciones; el marcador de peso meclular utilizado fue DNA de lambda digerido con *Pst I* b) La tabla muestra las enzimas de restricción empleadas y los tamaños de los productos de las digestiones generados.

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

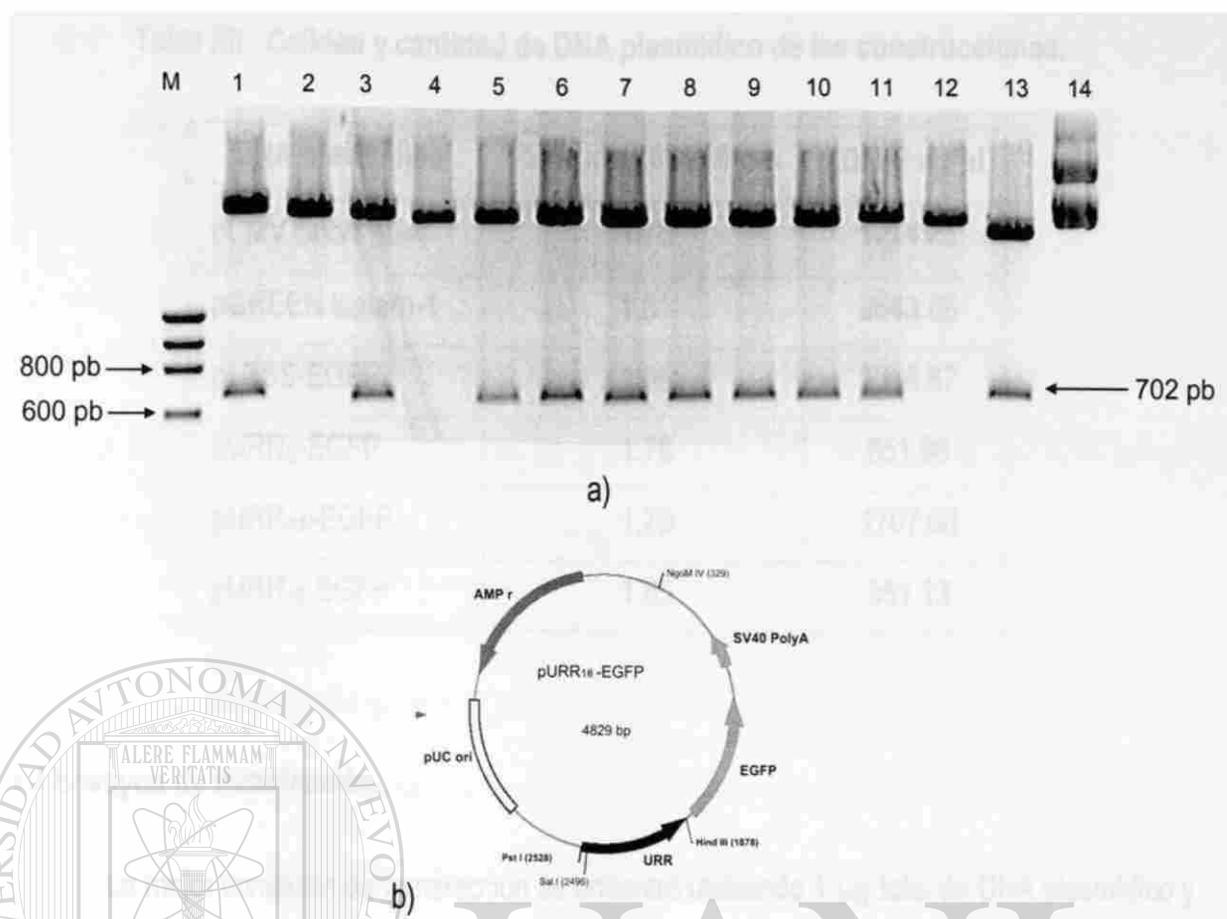


Figura 26. **Caracterización de la construcción pURR₁₈-EGFP.** a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la caracterización enzimática de las clonas con las enzimas *Hind III* y *Pst I*, las cuales liberan el fragmento de 702 pb correspondiente a la región URR del HPV-18 insertado en pLESS-EGFP. El marcador de peso molecular fue DNA de PhiX174 digerido con *Hae III* b) Mapa de restricción de la construcción pURR₁₈-EGFP mostrando los sitios *Hind III* y *Pst I* flanqueantes a URR, con los cuales se caracterizó el plásmido por liberación del fragmento insertado.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.3 Purificación, cuantificación y calidad de los plásmidos.

Las preparaciones a gran escala y purificación de todos los plásmidos resultaron de buena calidad y cantidad, ya que los resultados de la relación de absorbancias a 260/280 nm fueron superiores a 1.7. La cantidad obtenida de DNA plasmídico para cada construcción fue variable pero aceptable. Los resultados de pureza y cantidad de DNA obtenidos para cada construcción se muestran en la tabla XII.

Tabla XII. Calidad y cantidad de DNA plasmídico de las construcciones.

| DNA plasmídico | Relación 260/280 nm | [DNA] ng/ μ l |
|--------------------------|---------------------|-------------------|
| pCMV Sport β Gal | 1.76 | 1274.25 |
| pGREEN lantern-1 | 1.81 | 2643.88 |
| pLESS-EGFP | 1.85 | 2356.67 |
| pURR _E -EGFP | 1.76 | 851.96 |
| pURR _{AA} -EGFP | 1.79 | 1707.08 |
| pURR ₁₈ -EGFP | 1.85 | 551.13 |

4.4 Ensayos de transfección.

La mejor condición de transfección se encontró utilizando 1 μ g total de DNA plasmídico y empleando 1 μ l de lipofectamina y 3 μ l de reactivo PLUS, evaluando la eficiencia en base a la actividad específica de la β -galactosidasa.

Dicha condición de transfección se ensayó en 8 líneas celulares, las cuales presentaron igual eficiencia de transfección, y en las cuales se realizaron los ensayos de expresión dirigida por URR.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.5 Evaluación de la expresión dirigida por las diferentes variedades de URR.

Los ensayos de transfección se realizaron tanto en líneas celulares derivadas de tejido cervical, como en otras de origen no cervical, entre las que se incluyen dos de origen hepático.

Los plásmidos transfectados fueron pGREEN Lantern-1, pLESS-EGFP, pURRE-EGFP, pURRAA-EGFP y pURR18-EGFP. Para la normalización de los resultados, cada uno de los plásmidos anteriores se cotransfectaron con pCMV Sport β -Gal. Pasadas 48 hrs de la transfección, se lisaron las células y se hicieron lecturas del extracto en fluorómetro para cuantificar la cantidad de EGFP producida. Una vez tomada la lectura de EGFP en fluorómetro, el

extracto se reutilizó para cuantificar proteínas totales y la actividad específica de la β -galactosidasa.

4.5.1 Rango de cuantificación de EGFP.

Para verificar el rango de cuantificación de EGFP en fluorómetro, se hizo una curva estándar, la cual se muestra en la figura 27, y se observa una correlación del 99.80%, lo que indica la certidumbre de los resultados en un rango de 10 μ g/ml a 1 ng/ml.

Todas las líneas celulares empleadas presentaron la misma eficiencia de transfección, las cuales se pueden visualizar en la figura 28, donde la actividad específica de β -galactosidasa es muy similar entre los diferentes tipos celulares. Con base en estos resultados, las diferencias en la cantidad de EGFP cuantificada para cada ensayo fueron comparables, al no haber diferencias en la cantidad de plásmido ingresado. De esta manera las diferencias en las cantidades de EGFP producidas estuvieron determinadas por la fuerza de los diferentes promotores empleados.

Curva estándar de EGFP

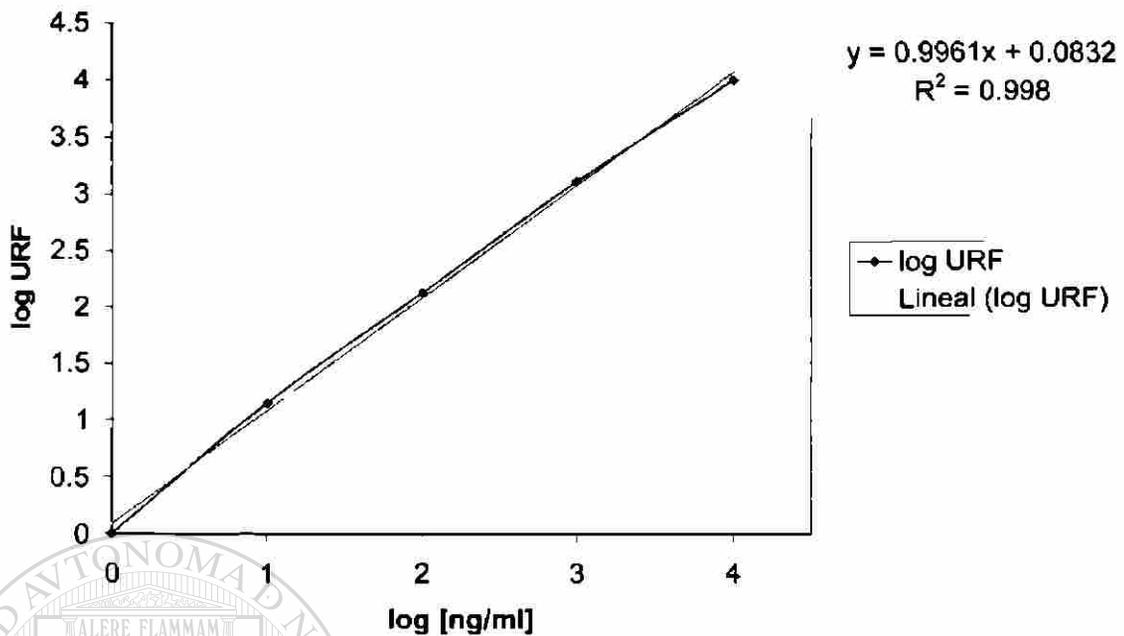


Figura 27. **Curva estándar de cuantificación de EGFP en fluorómetro.** La curva estándar se realizó calibrando el fluorómetro con un estándar de 10 $\mu\text{g/ml}$, y haciendo diluciones seriales hasta 1 ng/ml con un factor de dilución de 10. Los resultados de URF y las concentraciones de los estándares fueron convertidas a su forma logarítmica base 10 y se graficaron. El coeficiente de correlación observado con respecto a la recta corregida es de 99.80% en el rango de 10 $\mu\text{g/ml}$ a 1 ng/ml de EGFP lo que indica una confiable veracidad de las lecturas en este rango.

4.5.2 Eficiencias de transfección.

En la figura 27 se muestra una gráfica donde se observan las eficiencias de transfección de las nueve líneas celulares empleadas, en las que destaca la homogeneidad de las eficiencias de transfección, lo que da pauta para la comparación de la fuerza promotora de las diversas regiones promotoras empleadas.

COMPARACION DE EFICIENCIA DE TRANSFECCION

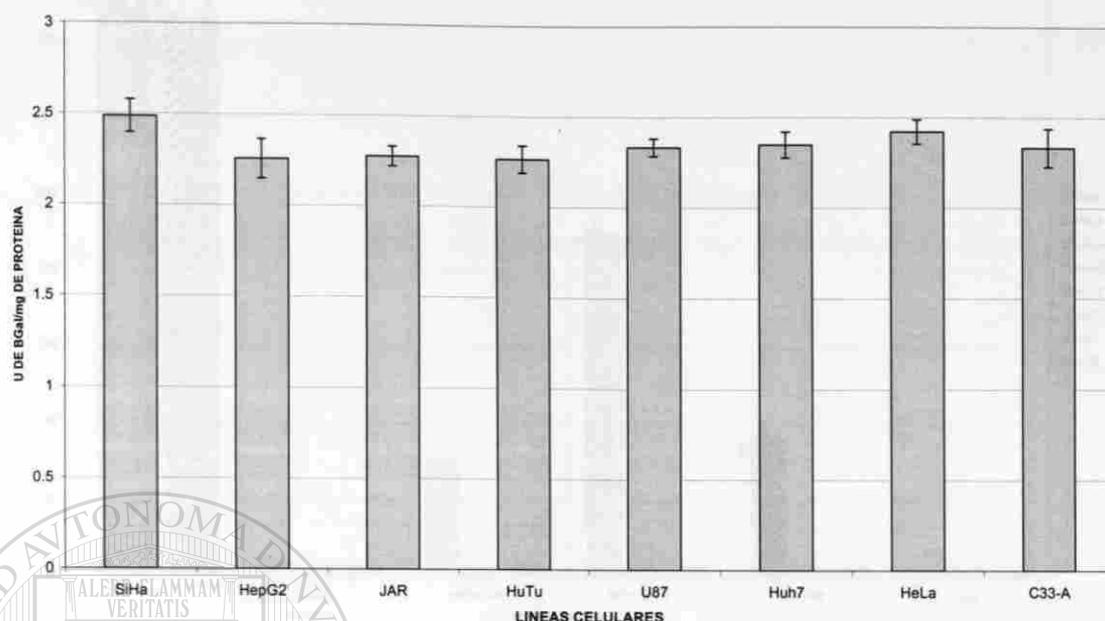


Figura 28. **Eficiencias de transfección.** En la gráfica se muestran los resultados de las eficiencias de transfección en las nueve líneas celulares ensayadas, siendo éstos muy homogéneos. Cada barra representa el promedio de 15 datos (5 condiciones por triplicado, en la que cada condición significa una cotransfección de pCMV Sport β -Gal con una construcción diferente). La desviación mostrada en cada barra indica la poca variación en los datos, lo que demuestra que los resultados de las diferencias en las fuerzas promotoras estarán dadas por el efecto mismo de cada región promotora evaluada y no por diferencias en la cantidad de plásmido transfectado en cada línea celular.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

4.5.3 Fuerza de promotores.

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En la figura 29 se pueden observar el conjunto de todos los resultados de la fuerza promotora de las cinco construcciones transfectadas que contienen al gen EGFP dirigido por cinco diferentes promotores en los nueve tipos celulares utilizados. En ella se pueden observar la fuerza y especificidad de la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV-16, y la región URR de la variedad europea del HPV-18, y su comparación en relación al promotor CMV.

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

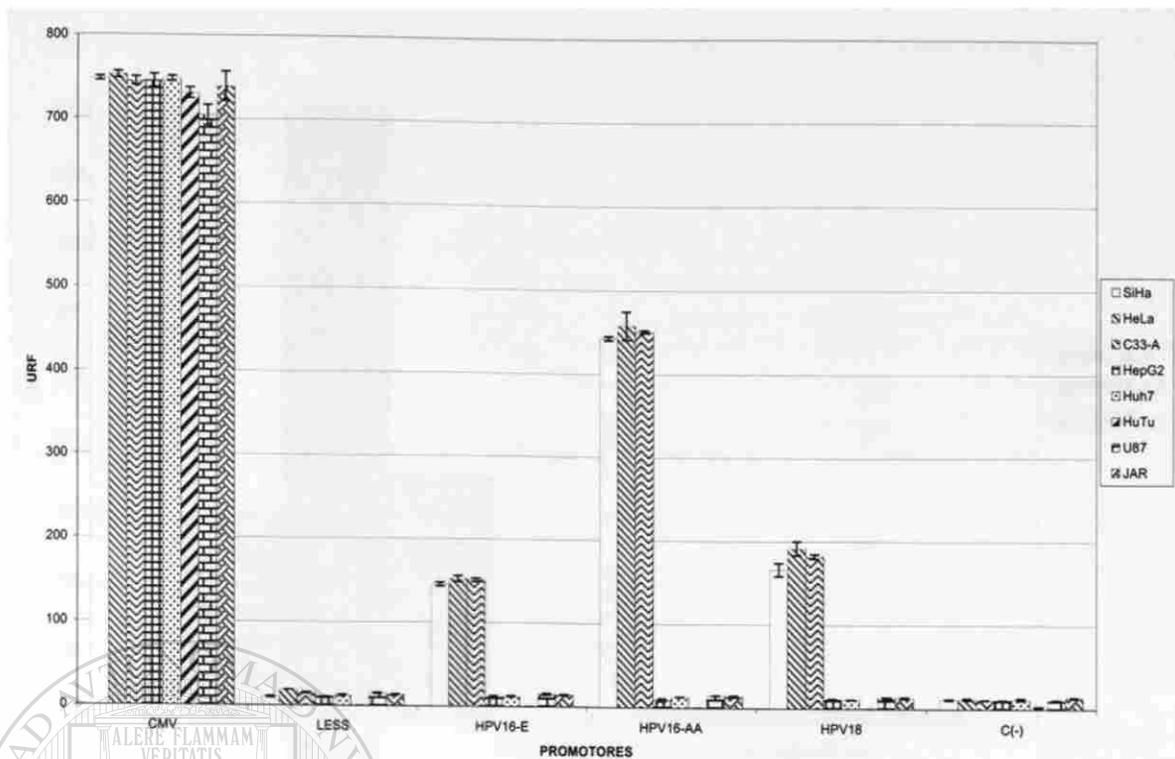


Figura 29. Fuerza promotora y especificidad de la región URR. En esta figura destaca la especificidad de tipo celular de las regiones URR empleadas, y el incremento en la fuerza promotora de la variedad asiático-americana de la región URR del HPV-16. Así también la comparación de la fuerza promotora de dichas regiones en relación al promotor CMV. Cada barra representa ensayos independientes por triplicado.

En la figura 30 se muestran en promedio la fuerza promotora y especificidad de las regiones URR del HPV-16 (variedades europea y asiático-americana) y 18. El promedio se realizó entre las fuerzas promotoras de estas tres regiones URR, agrupándolas en líneas de origen cervical y no cervical. En ésta se destaca la especificidad de las tres regiones URR ensayadas y la potencia de la variedad asiático-americana de la región URR del HPV-16.

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

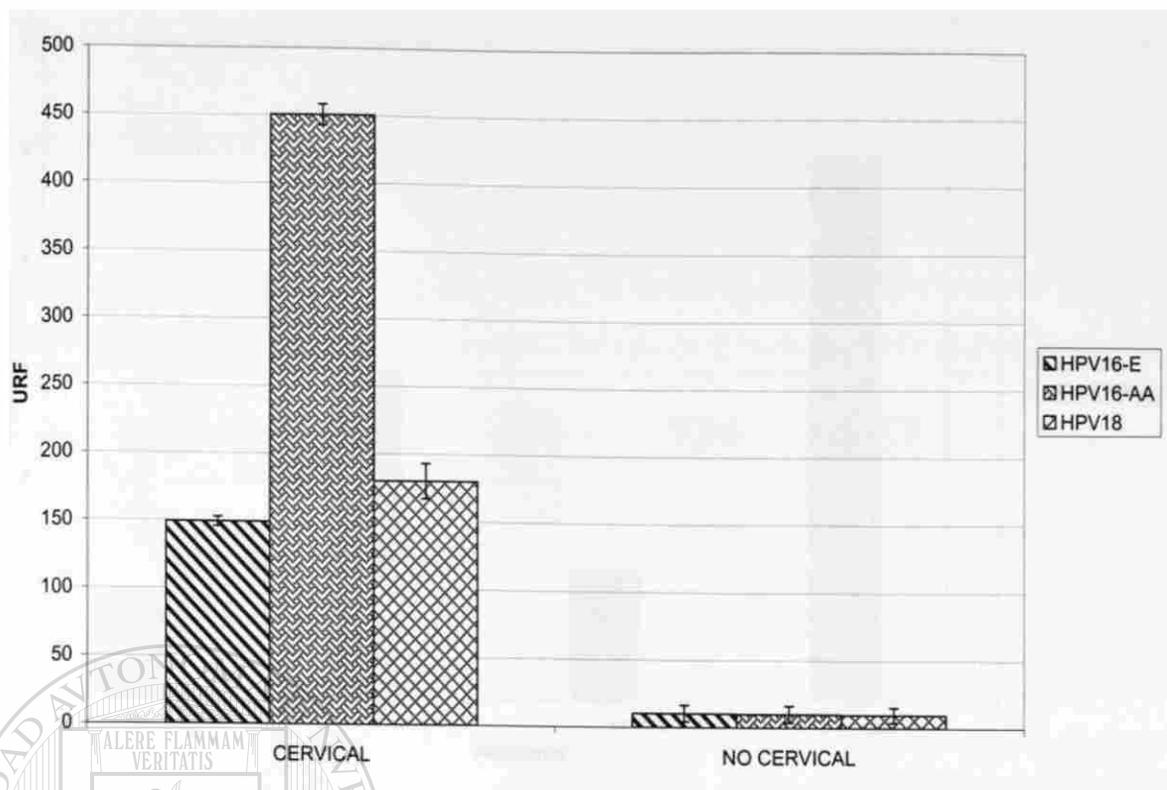


Figura 30. **Especificidad de la región URR.** En la figura se muestra el promedio de la fuerza promotora de las regiones URR en líneas celulares de origen cervical y no cervical, donde se observa la especificidad promotora de tipo celular.

De la comparación de las fuerzas promotoras de las tres regiones URR ensayadas en líneas celulares de origen cervical y no cervical y el promotor CMV con respecto a la variedad europea de la región URR del HPV-16 (que representa la unidad), se desprende la figura 31, donde se observa que la variedad asiático-americana es tres veces más potente ($p=0.000$). Se nota un 20 % de incremento en la potencia de la región URR de la variedad europea del HPV-18 ($p=0.017$) y que el promotor CMV es cinco veces más potente. También se observa el carácter constitutivo del promotor CMV.

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

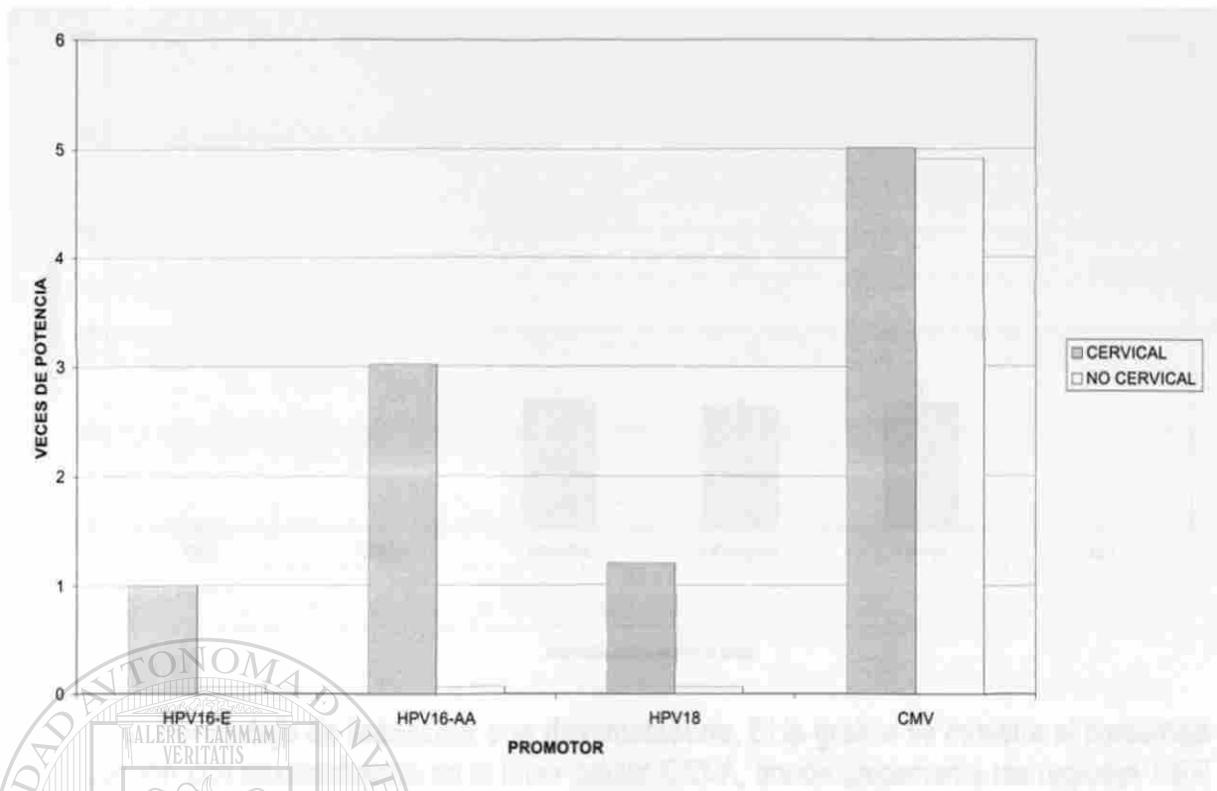


Figura 31. **Potencia de los promotores en relación a la variedad europea del HPV-16.** En la figura se observa que la región URR de la variante asiático-americana del HPV-16 es tres veces más potente ($p=0.000$). También se observa un incremento apreciable de un 20 % en la potencia promotora de la región URR de la variante europea del HPV-18, casi despreciable comparándolo con el 200 % de incremento de la variedad asiático-americana del HPV-16, pero significativa estadísticamente ($p=0.04$).

4.5.4. Inducción con dexametasona.

Para evaluar si las diferencias en secuencia afectaban la potencia y el nivel de inducción con glucocorticoides de las regiones URR de las variedades ensayadas, se realizaron inducciones con dexametasona a una concentración $1 \mu\text{M}$ en la línea celular C33-A. Los resultados se observan en la figura 32, donde solamente se muestra el porcentaje de inducción con dexametasona en las tres regiones URR ensayadas y en las cuales no hubo diferencia significativa ($p=0.935$).

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

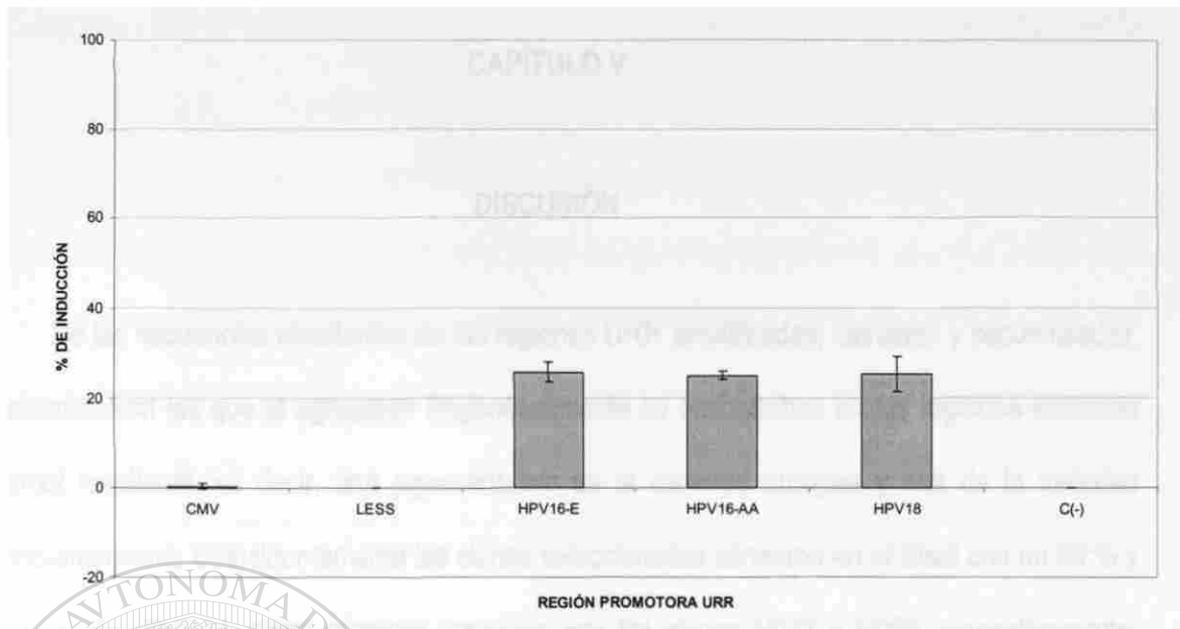


Figura 32. **Porcentaje de inducción con dexametasona.** En la gráfica se muestra el porcentaje de inducción con dexametasona en la línea celular C33-A, donde únicamente las regiones URR se muestran inducibles, y tanto el promotor CMV como los controles negativos no se inducen. El porcentaje de inducción de las tres regiones URR es casi el mismo, y se encuentran en un rango del 22 al 30 %. El ensayo se hizo por triplicado de manera independiente.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

De las secuencias resultantes de las regiones URR amplificadas, clonadas y secuenciadas, se seleccionaron las que al agruparse filogenéticamente se encontraban en las regiones extremas del árbol resultante, es decir, una representativa de la variedad europea y otra de la variedad asiático-americana. Coincidentemente las clonas seleccionadas alinearon en el Blast con un 99 % y un 100 % de similitud, como primeras opciones, con las clonas H033 y H059, respectivamente, empleadas por Veress y Cols.²⁸, las cuales son representantes de la variedad europea y asiático-americana, respectivamente. La región ampliada carece de un fragmento de la región 5' de URR, ya que es responsable de una disminución en la fuerza promotora al encontrarse de manera episomal según lo reportado por Stukel y cols.¹¹⁰

A partir de la secuencia de las clonas seleccionadas se realizó un análisis para evidenciar cambios en la unión de factores de transcripción, los cuales son los responsables de la potencia y especificidad de esta región promotora. Del análisis se desprende que la variedad asiático-americana presenta el cambio de A/C en la posición 7729 reportado por Kämmer y cols.⁸¹ como responsable del incremento en tres veces de la potencia promotora de esta variedad, mientras que en la variedad europea no hay cambio nucleotídico alguno en dicha posición. De los diferentes cambios nucleotídicos presentes en la región URR de la clona de la variedad asiático-americana, solamente cinco se encuentran en la vecindad de los sitios de unión de los primeros dos GRE y un sitio TEF-1. La clona de la variedad asiático-americana es idéntica en secuencia a la clona H033, como se mencionó en el párrafo anterior, mientras que la clona de la variedad europea G131

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

ensayada tiene un solo cambio nucleotídico de A/G con respecto a la secuencia de referencia en la posición 7810, la cual se encuentra en la vecindad del sitio de unión del factor transcripcional AP1, cuya función es de activador transcripcional, y que según lo reportado por O'Connor y cols.¹⁰⁴, es blanco de represión en URR por parte de los YY1 ubicados a su alrededor.

La secuencia representativa del HPV tipo 18 perteneciente a la variedad europea, presenta varios cambios nucleotídicos, ninguno de los cuales se encuentra en sitios de unión conocidos a factores de transcripción.

De los resultados de la evaluación de la fuerza promotora de las variedades analizadas del HPV tipo 16, la variedad asiático-americana presenta un incremento de tres veces en comparación con la variedad europea, lo cual está a favor de lo reportado por Kämmer y Cols.⁸¹, pero contrasta en la potencia según los resultados de Veress y Cols.²⁸, que reporta un incremento de 1.7 veces. Esto a pesar de que la secuencia ensayada es idéntica a la utilizada por este último. La especificidad de la región URR de las dos variedades ensayadas se conserva, es decir, la expresión dirigida por URR se limita a líneas derivadas de cervix, ya que no fue detectable expresión alguna en líneas no cervicales.

La región URR ensayada, representativa del HPV tipo 18, presenta una fuerza promotora similar a la de la variedad europea del HPV tipo 16, con un leve incremento en su potencia de un 20 %, pero el cual le otorga una diferencia significativa ($p=0.017$). Estos resultados están de acuerdo con los hallazgos reportados por Shillitoe y Noonan¹⁰³, que encuentran niveles de expresión similares entre los tipos 16 y 18 de HPV, pero de las variedades prototipo (europea y amerindia, respectivamente para HPV tipo 16 y HPV tipo 18). La especificidad de esta región se conserva aún en HPV 18 según los resultados, con una potencia similar en las diferentes líneas de origen cervical y expresión indetectable en las líneas de origen no cervical ensayadas.

En los ensayos de inducción transcripcional con dexametasona, el estímulo a la potencia fue similar en las tres regiones URR, con un 25 % de incremento, los cuales no presentan diferencia significativa (0.935), con lo que se puede decir que los cambios nucleotídicos presentes en la variedad asiático-americana del HPV tipo 16 no afectan la unión del factor transcripcional GRE, con respecto a la inducción observable en la variedad europea. De la misma manera se comporta la variedad europea del HPV tipo 18, cuyo incremento en potencia es de un 25 %, lo que indica que presenta el mismo nivel de inducción.

Con base en los resultados, se realizó una representación gráfica de los factores de transcripción que se unen a las regiones URR ensayadas, obteniendo que tanto a la variedad europea G131 como la variedad asiático-americana del HPV tipo 16 se le unen los mismos factores transcripcionales en las mismas posiciones genómicas, respecto a los factores transcripcionales que se saben se unen a URR, con lo que se puede decir que las regiones URR de las variedades europea prototipo, europea G131 y asiático-americana presentan de manera general, la misma distribución de factores transcripcionales, según los hallazgos hasta el momento. A pesar de que se sabe que el factor transcripcional YY1 ubicado sobre la caja TATA es responsable de un incremento de dos veces en la potencia transcripcional, éste no se encontró ausente en la variedad asiático-americana del HPV tipo 16, lo que está aún más a favor de que el cambio nucleotídico A7729C es el responsable del incremento en la potencia de dicha variedad, pero ninguno de los factores transcripcionales ya conocidos por su unión a la región URR parece verse afectado por dicho cambio, lo cual da pauta a la búsqueda de un factor transcripcional que se una a dicha región, y que se encuentre presente en la variedad europea, pero ausente en la variedad asiático-americana del HPV tipo 16. Una búsqueda en la base de datos MatInspector™ reveló que la variedad europea del HPV tipo 16 posee un potencial sitio de unión del factor nuclear hepático – 1 (HNF-1), el cual según la secuencia de ambas variedades ensayadas, se une a la europea, pero no a la asiático-americana.

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

HNF-1, además de restringir su expresión en células hepáticas, también se expresa en queratinocitos, y cumple funciones de regulador transcripcional.

El análisis de los factores de transcripción que se unen a la región URR del HPV tipo 18 no presenta cambios al compararla con la reportada por O'Connor y cols. ¹⁰⁵, a pesar de que la variedad del HPV tipo 18 aquí ensayada es de la variedad europea, y la que describen en el artículo de O'Connor y cols. es de la variedad prototipo del HPV tipo 18, es decir, de la variedad Amerindia.

El presente estudio indica que los cambios nucleotídicos presentes en la región URR de la variedad asiático-americana del HPV-16 no afectan la especificidad transcripcional, pero si la potencia. La región URR de la variedad asiático-americana del HPV-16 presenta un incremento en la potencia transcripcional de 3 y 2.5 veces comparada con la variedad europea del HPV-16 y con la variedad europea del HPV-18, respectivamente. La región URR de la variedad europea del HPV-18 presenta un incremento en potencia transcripcional de 0.2 veces en comparación con la variedad europea del HPV-16. Los cambios nucleotídicos presentes en los dos primeros sitios de unión del elemento de respuesta a glucocorticoides en la región URR de la variedad asiático-americana del HPV-16 no afectan la respuesta a dexametasona. Las regiones URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV-16 y de la variedad europea del HPV-18 presentan el mismo nivel de inducción transcripcional con dexametasona.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

1. Los cambios nucleotídicos presentes en la región URR de la variedad asiático-americana del HPV-16 no afectan la especificidad transcripcional, pero si la potencia.
2. La región URR de la variedad asiático-americana del HPV-16 presenta un incremento en la potencia transcripcional de 3 y 2.5 veces comparada con la variedad europea del HPV-16 y con la variedad europea del HPV-18, respectivamente.
3. La región URR de la variedad europea del HPV-18 presenta un incremento en potencia transcripcional de 0.2 veces en comparación con la variedad europea del HPV-16.
4. Los cambios nucleotídicos presentes en los dos primeros sitios de unión del elemento de respuesta a glucocorticoides en la región URR de la variedad asiático-americana del HPV-16 no afectan la respuesta a dexametasona.
5. Las regiones URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV-16 y de la variedad europea del HPV-18 presentan el mismo nivel de inducción transcripcional con dexametasona.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hubert WG y Laimins LA. Human papillomavirus type 31 replication modes during the early phases of the viral life cycle depend on transcriptional and posttranscriptional regulation of E1 and E2 expression. *J Virol.* 2002; 76: 2263-2273.
2. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1288: F55-F78.
3. Gissmann L y zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (Condylomata acuminata). *Int J Cancer.* 1980; 25: 605-609.
4. Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulon HJ, zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J Virol.* 1982; 44: 393-400.
5. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; 80: 3812-3815.
6. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 1984; 3: 1151-1157.
7. Myers, G., Lu, H., Calef, C., and Leitner, T., Heterogeneity of Papillomaviruses. *Seminars in Cancer Biology* 1997; 7: 349-358.
8. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87: 796-802.
9. Das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, Luthra UK. Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol.* 1992; 73: 2327-2336.
10. Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C and Singer A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer.* 1996; 69: 364-368.
11. Lowy D.R., Howley P.M., Papillomaviruses and their replication, En: Fields Virology, Fields B.N., Peter M., Howley M.D., Diane E.G. Eds., 4rd Edition, *Lippincott-Williams & Wilkins Publishers*, 2001. pp 2197-2229.
12. zur Hausen H, Schneider A. The role of papillomavirus in human anogenital cancer. En: Salzman NP, Howley PM, ed. *The Papovaviridae.* New York: *Plenum Press* 1987: 245-263.

13. zur Hausen H. Papillomaviruses as carcinomaviruses. En : Klein G, ed. *Advances in viral oncology*. New York: *Raven Press* 1989; 8: 1-26.
14. Chow L, Hirochika H, Nasser M, Stoler M, Wolinsky S, Chin M et al. Human papillomavirus gene expression in papillomaviruses. *Cancer cells* 1987; 5: 55-72.
15. Alvarez-Salas LM, Velazquez A, Lopez-Bayghen E, Woodworth CD, Garrido E, Gariglio P, DiPaolo JA. Transcriptional repression in normal human keratinocytes by wild-type and mutant p53. *Cancer Lett.* 1995; 91: 85-92.
16. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, et al. Structures of bovine and human papillomaviruses: Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 1991; 60: 1445-1456.
17. Strubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: Active and latent phases. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 379-386.
18. Howley P.M., Lowy D.R. Papillomaviruses, En: *Fields Virology*, Fields B.N., Peter M., Howley M.D., Diane E.G. Eds., 4rd Edition, *Lippincott-Williams & Wilkins Publishers*, 2001. pp 2231-2264.
19. Chiang CM, Dong G, Broker TR, Chow LT. Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J Virol.* 1992; 66: 5224-5231.
20. Kuo SR, Liu JS, Broker TR, Chow LT. Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J Biol Chem.* 1994; 269: 24058-24065.
21. Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase α /primase. *J Biol Chem.* 1999; 274: 2696-2705.
22. Liu JS, Kuo SR, Broker TR, Chow LT. Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J Biol Chem.* 1994; 269: 24058-24065.
23. Swindle CS, Zou N, Van Tine BA, Shaw GM, Engler JA, Chow LT. Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J Virol.* 1999; 73: 1001-1009.
24. B. A. Spalholz, Y. C. Yang, and P. M. Howley. Transactivation of a Bovine Papilloma Virus Transcriptional Regulatory Element by the E2 Gene Product. *Cell* 1985; 42: 183.
25. Phelps WC, Howley PM. Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *J Virol.* 1987; 61: 1630-1638.

26. McBride AA, Schlegel R, Howley PM. The carboxy-terminal domain shared by the bovine papillomavirus E2 transactivator and repressor proteins contains a specific DNA binding activity. *EMBO J.* 1988; 7: 533-539.
27. Thierry F, Yaniv M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J.* 1987; 6: 3391-3397.
28. Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol.* 1999; 80: 1035-1043.
29. Bernard B, Bailly C, Lenoir M, Darmon M, Thierry F and Yaniv M. The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol.* 1989; 63: 4317-4324.
30. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* 1991 Aug 29;352(6338):824-7.
31. Bubb V, McCance DJ, Schlegel R. DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation of its encoded protein. *Virology.* 1988; 163: 243-246.
32. Horwitz BH, Burkhardt AL, Schlegel R, DiMaio D. 44-amino-acid E5 transforming protein of bovine papillomavirus requires a hydrophobic core and specific carboxyl-terminal amino acids. *Mol Cell Biol.* 1988; 8: 4071-4078.
33. Burkhardt A, Willingham M, Gay C, Jeang KT, Schlegel R. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology.* 1989; 170: 334-339.
34. P. Martin, W. C. Vass, J. T. Schiller, D. R. Lowy, and T. J. Velu. The Bovine Papillomavirus E5 Transforming Protein Can Stimulate the Transforming Activity of EGF and CSF-1 Receptors. *Cell* 1989; 59: 21.
35. Goldstein DJ, Finbow ME, Andresson T, McLean P, Smith K, Bubb V, Schlegel R. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16K component of vacuolar H(+)-ATPases. *Nature.* 1991; 352: 347-349.
36. Goldstein DJ, Schlegel R. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus binds to a 16 kd cellular protein. *EMBO J.* 1990; 9: 137-145.
37. Goldstein DJ, Andresson T, Sparkowski JJ, Schlegel R. The BPV-1 E5 protein, the 16 kDa membrane pore-forming protein and the PDGF receptor exist in a complex that is dependent on hydrophobic transmembrane interactions. *EMBO J.* 1992; 11: 4851-4859.
38. Cohen BD, Lowy DR, Schiller JT. The conserved C-terminal domain of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein can associate with an alpha-adaptin-like molecule: a possible

- link between growth factor receptors and viral transformation. *Mol Cell Biol.* 1993; 13: 6462-6468.
39. Cohen BD, Goldstein DJ, Rutledge L, Vass WC, Lowy DR, Schlegel R, Schiller JT. Transformation-specific interaction of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein with the platelet-derived growth factor receptor transmembrane domain and the epidermal growth factor receptor cytoplasmic domain. *J Virol.* 1993; 67: 5303-5311.
40. Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol.* 1993; 67: 6170-6178.
41. Greenfield I, Nickerson J, Penman S, Stanley M. Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88: 11217-11221.
42. Fujikawa K, Furuse M, Uwabe K, Maki H, Yoshie O. Nuclear localization and transforming activity of human papillomavirus type 16 E7-beta-galactosidase fusion protein: characterization of the nuclear localization sequence. *Virology.* 1994; 204: 789-793.
43. Smotkin D, Wettstein FO. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83: 4680-4684.
44. Androphy EJ, Hubbert NL, Schiller JT, Lowy DR. Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *EMBO J.* 1987; 6: 989-992.
45. Huijbregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 1991; 10: 4129-4135.
46. Hubbert NL, Sedman SA, Schiller JT. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol.* 1992; 66: 6237-6241.
47. Gage JR, Meyers C, Wettstein FO. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol.* 1990; 64: 723-730.
48. Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *J Virol.* 1991; 65: 292-298.
49. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol.* 1992; 66: 2125-2134.
50. Crook T, Wrede D, Vousden KH. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene.* 1991; 6: 873-875.

51. Crook T, Wrede D, Tidy J, Scholefield J, Crawford L, Vousden KH. Status of c-myc, p53 and retinoblastoma genes in human papillomavirus positive and negative squamous cell carcinomas of the anus. *Oncogene*. 1991; 6: 1251-1257.
52. Crook T, Wrede D, Tidy JA, Mason WP, Evans DJ, Vousden KH. Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human-papillomavirus-negative tumours. *Lancet*. 1992; 339: 1070-1073.
53. Grossman SR, Laimins LA. E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene*. 1989; 4: 1089-1093.
54. Kämmer C, Tommasino M, Syrjanen S, Delius H, Hebling U, Warthorst U, Pfister H, Zehbe I. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *Br J Cancer*. 2002; 86: 269-273.
55. Kissel'ov FL. Virus-Associated Human Tumors: Cervical Carcinomas and Papilloma Viruses. *Biochemistry (Moscow)* 2000; 65: 68-77
56. Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol*. 1989; 63: 1404-1407
57. Phelps WC, Yee CL, Munger K, Howley PM. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*. 1988; 53: 539-547.
58. Phelps WC, Bagchi S, Barnes JA, Raychaudhuri P, Kraus V, Munger K, Howley PM, Nevins JR. Analysis of trans activation by human papillomavirus type 16 E7 and adenovirus 12S E1A suggests a common mechanism. *J Virol*. 1991; 65: 6922-6930.
59. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol*. 1991; 65: 473-478.
60. Barbosa MS, Schlegel R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene*. 1989; 4: 1529-1532.
61. Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NL, Haas JA, Lowy DR, Schiller JT. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol*. 1991; 65: 4860-4866.
62. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989; 243: 934-937.
63. Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*. 1989; 63: 4417-4421.

64. Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC, Nevins JR. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89: 4549-4553.
65. Morozov A, Shiyonov P, Barr E, Leiden JM, Raychaudhuri P. Accumulation of human papillomavirus type 16 E7 protein bypasses G1 arrest induced by serum deprivation and by the cell cycle inhibitor p21. *J Virol*. 1997; 71: 3451-3457.
66. Ruesch MN, Laimins LA. Initiation of DNA synthesis by human papillomavirus E7 oncoproteins is resistant to p21-mediated inhibition of cyclin E-cdk2 activity. *J Virol*. 1997; 71: 5570-5578.
67. Broudy VC, Lin NL, Buhring HJ, Komatsu N, Kavanagh TJ. Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer. *Blood*. 1998; 91: 898-906.
68. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89: 12180-12184.
69. Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, Lowy DR, Schiller JT. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol*. 1993; 67: 6929-6936.
70. Christensen ND, Hopfl R, DiAngelo SL, Cladel NM, Patrick SD, Welsh PA, Budgeon LR, Reed CA, Kreider JW. Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *J Gen Virol*. 1994; 75: 2271-2276.
71. Le Cann P, Coursaget P, Iochmann S, Touze A. Self-assembly of human papillomavirus type 16 capsids by expression of the L1 protein in insect cells. *FEMS Microbiol Lett*. 1994; 117: 269-274.
72. Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol*. 1998; 72: 142-150.
73. Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A and Jenison SA. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol*. 1995; 69: 7743-7753.
74. Chong T, Chan WK, Bernard HU. Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP1, steroid receptors and a possibly novel transcription factor, PVF: a model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18: 465-470.

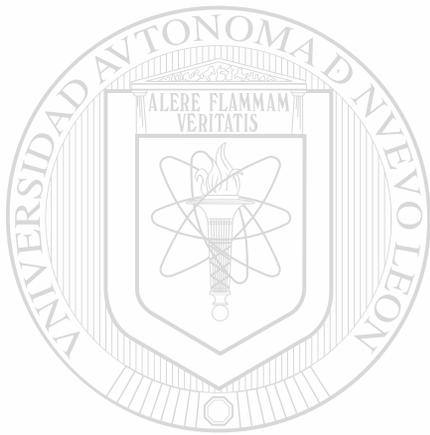
75. Chong T, Apt D, Gloss B, Isa M, Bernard HU. The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol.* 1991; 65: 5933-5943.
76. Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, Howley P. Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J Virol.* 1992; 66: 3740-3748.
77. Apt D, Chong T, Liu Y, Bernard HU. Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 1993; 67: 4455-4463.
78. SH Tan, LE Leong, PA Walker, and HU Bernard. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIIID. *J. Virol.* 1994; 68: 6411-6420.
79. MJ O'Connor, SH Tan, CH Tan, and HU Bernard. YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J. Virol.* 1996; 70: 6529-6539.
80. Garcia-Carranca A, Thierry F, Yaniv M. Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J Virol.* 1988; 62: 4321-4330.
81. Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol.* 2000; 81: 1975-1981.
82. Gloss B, Bernard H, Seedorf K and Klock R. The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J.* 1987; 6: 3735-3743.
83. Cripe TP, Alderborn A, Anderson RD, Parkkinen S, Bergman P, Haugen TH, Pettersson U, Turek LP. Transcriptional activation of the human papillomavirus-16 P97 promoter by an 88-nucleotide enhancer containing distinct cell-dependent and AP-1-responsive modules. *New Biol.* 1990; 2: 450-463.
84. Gius D, Grossman S, Bedell MA, Laimins LA. Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J Virol.* 1988; 62: 665-672.
85. Romanczuck H and Howley P. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 3159-3163.
86. Bauknecht T, Angel P, Royer HD, zur Hausen H. Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J.* 1992; 11: 4607-4617.
87. May M, Dong XP, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG, Pfister H. The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J.* 1994; 13: 1460-1466.

88. Hoppe-Seyler F, Butz K and zur Hausen H. Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. *J Virol.* 1991; 65: 5613-5618.
89. Hoppe-Seyler F, Butz K. Activation of human papillomavirus type 18 E6-E7 oncogene expression by transcription factor Sp1. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 6701-6706.
90. Medina-Martinez O, Morales-Peza N, Yaniv M, Garcia-Carranca A, Thierry F. A single element mediates glucocorticoid hormone response of HPV18 with no functional interactions with AP1 or hbrm. *Virology.* 1996; 217: 392-396.
91. Mack D and Laimins L. A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88: 9102-9106.
92. Yukawa K, Butz K, Yasui T, Kikutani H, Hoppe-Seyler F. Regulation of human papillomavirus transcription by the differentiation-dependent epithelial factor Epc-1/skn-1a. *J Virol.* 1996; 70: 10-16.
93. Chong T, Apt D and Gloss B. J The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol.* 1991; 65: 5933-5943.
94. Ishiji T, Lace M, Purkkinen S, Anderson R, Haugen T, Cripe T, Xiao J, Davidson I, Chambon P and Turek L. Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J.* 1992; 11: 2271-2281.
-
95. Wheeler CM, Yamada T, Hildesheim A and Jenison SA. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 11-19.
96. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol.* 1997; 71: 2463-2472.
97. Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, Bernard HU. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 1765-1772.
98. Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol.* 1993; 67: 6413-6423.

99. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, Kiviat NB. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89: 796-802.
100. Xi LF, Critchlow CW, Wheeler CM, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Hawes SE, Surawicz C, Goldbaum G, Holmes KK, Kiviat NB. Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Res.* 1998; 58: 3839-3844.
101. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* 1998; 58: 829-833.
102. Stoppler MC, Ching K, Stoppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol.* 1996; 70: 6987-6993.
103. Shillitoe EJ, Noonan S. Strength and specificity of different gene promoters in oral cancer cells. *Oral Oncol.* 2000 Mar;36: 214-220.
104. O'Connor MJ, Tan SH, Tan CH, Bernard HU. YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J Virol.* 1996 Oct;70: 6529-6539.
105. O'Connor MJ, Chan SY, Bernard HU. Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. Institute of Molecular Cell Biology, National University of Singapore. HPV Database Oct 95. III-21 – III-39.
106. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep;189: 12-19.
107. Kurvinen K, Yliskoski M, Saarikoski S, Syrjanen K, Syrjanen S. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *Eur J Cancer.* 2000 Jul;36: 1402-1410.
108. Swift FV, Bhat K, Youngusband HB, Hamada H. Characterization of a cell type-specific enhancer found in the human papilloma virus type 18 genome. *EMBO J.* 1987 May;6: 1339-1344.
109. Cid A, Auewarakul P, Garcia-Carranca A, Ovseiovich R, Gaissert H, Gissmann L. Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J Virol.* 1993 Nov;67: 6742-6752.
110. Stunkel W, Huang Z, Tan SH, O'Connor MJ, Bernard HU. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 repress or activate the E6 promoter, depending on the physical state of the viral DNA. *J Virol.* 2000 Mar;74: 2489-2501.

Análisis de la expresión dirigida por la región URR de las variedades europea y asiático-americana del HPV tipo 16 en líneas celulares humanas.

111. HPV Sequence Database. Los Alamos National Laboratory. Sequences of HPV-16 variants. OCT 95I-A9-62 – I-A9-149.
112. Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Pfister H, Tay SK, ter Meulen J, Villa LL, Bernard HU. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol.* 1993 Nov;67: 6424-6231.

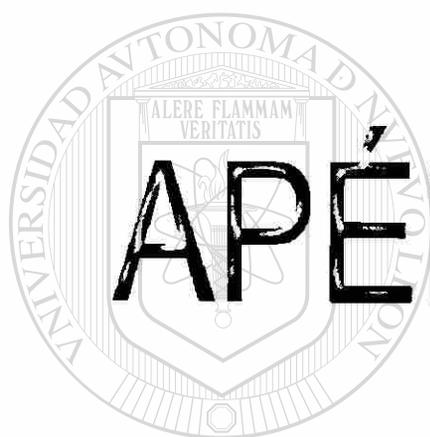


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



APÉNDICES

UANL

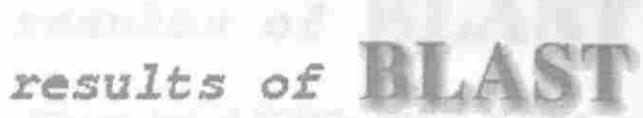
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANEXO 2

ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN URR DE LA VARIEDAD ASIÁTICO-AMERICANA DEL HPV-16
UTILIZADA

```

>gi|4092490|gb|AF067027.1|AF067027 Human papillomavirus type 16 isolate H033 long control
region, complete sequence
Length = 863

Score = 1255 bits (633), Expect = 0.0
Identities = 633/633 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1  tatatttgctacattttgtttttgtttatataactatattttgtagcgccagcggcc 60
          |||
Sbjct: 231 tatatttgctacattttgtttttgtttatataactatattttgtagcgccagcggcc 290

Query: 61  ttttgtagcttcaaccgaattcggttgcatgctttttggcacaactgtatttttttaa 120
          |||
Sbjct: 291 ttttgtagcttcaaccgaattcggttgcatgctttttggcacaactgtatttttttaa 350

Query: 121 tagttctatgtcagcaactatagtttaaactgtacgtttcctgcttgccatgctgcca 180
          |||
Sbjct: 351 tagttctatgtcagcaactatagtttaaactgtacgtttcctgcttgccatgctgcca 410

Query: 181 aatccctgttttctgacctgcaactgcttgccaaccattccattgttttttactgcac 240
          |||
Sbjct: 411 aatccctgttttctgacctgcaactgcttgccaaccattccattgttttttactgcac 470

Query: 241 tatgtgcaactactgaatcactatgtacattgtgtcatataaaataaattactatgcgcc 300
          |||
Sbjct: 471 tatgtgcaactactgaatcactatgtacattgtgtcatataaaataaattactatgcgcc 530

Query: 301 aacgccttaaataaccgctgttaggcacatatttttggttgttttaactcacctaattgc 360
          |||
Sbjct: 531 aacgccttaaataaccgctgttaggcacatatttttggttgttttaactcacctaattgc 590

Query: 361 atagttggcataagggtttaaacttttaaggccaactaaatgtcaccttagttcatacatg 420
          |||
Sbjct: 591 atagttggcataagggtttaaacttttaaggccaactaaatgtcaccttagttcatacatg 650

Query: 421 aactgtgtaaagggttagtcatacatgtttcatttgtaaaactgcacatgggtgtgtgcaa 480
          |||
Sbjct: 651 aactgtgtaaagggttagtcatacatgtttcatttgtaaaactgcacatgggtgtgtgcaa 710

Query: 481 accgtttgggttacacatttacaaggaacttatataataactaaactacaataattc 540
          |||
Sbjct: 711 accgtttgggttacacatttacaaggaacttatataataactaaactacaataattc 770

Query: 541 atgtataaaactaagggcgtaaccgaaatcggttgaaccgaaaccggttagtataaaagc 600
          |||
Sbjct: 771 atgtataaaactaagggcgtaaccgaaatcggttgaaccgaaaccggttagtataaaagc 830

Query: 601 agacattttatgcaCcaaaagagaactgcaatg 633
          |||
Sbjct: 831 agacattttatgcaCcaaaagagaactgcaatg 863

```

ANEXO 3

ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN URR DE LA VARIEDAD EUROPEA DEL HPV-18 UTILIZADA



>gi|2052453|gb|U89349.1|HPU89349 Human papillomavirus type 18 variant, partial sequence
Length = 5210

Score = 1241 bits (626), Expect = 0.0
Identities = 626/626 (100%)
Strand = Plus / Plus

```

Query: 1      tgtttgtggtatgggtgttgccttgggctatatattgtcctgtatttcaagttataaa 60
             ||||| | ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 1609  tgtttgtggtatgggtgttgccttgggctatatattgtcctgtatttcaagttataaa 1668

Query: 61      actgcacaccttacagcatccattttatcctacaatcctccattttgctgtgcaaccgat 120
             | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 1669  actgcacaccttacagcatccattttatcctacaatcctccattttgctgtgcaaccgat 1728

Query: 121     ttcggttgcccttggcctatggttgggtttctgcacaatacagtacgctggcactatt 180
             | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 1729  ttcggttgcccttggcctatggttgggtttctgcacaatacagtacgctggcactatt 1788

Query: 181     gcaaaatttaactctttgggcactgctcctacatatttgaaccattggcgcgcctcttt 240
             || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 1789  gcaaaatttaactctttgggcactgctcctacatatttgaaccattggcgcgcctcttt 1848

Query: 241     ggcgcatacaaggcgcacctggtattagtcattttcctgtccagggtgcgctacaacaatt 300
             | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 1849  ggcgcatacaaggcgcacctggtattagtcattttcctgtccagggtgcgctacaacaatt 1908

Query: 301     gcttgcataactataccctccctatgtaataaaaactgcttttaggcacatattttagt 360
             | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 1909  gcttgcataactataccctccctatgtaataaaaactgcttttaggcacatattttagt 1968

Query: 361     ttgttttacttaagctaattgcatacttggctgtacaactactttcatgtccaacatt 420
             ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 1969  ttgttttacttaagctaattgcatacttggctgtacaactactttcatgtccaacatt 2028

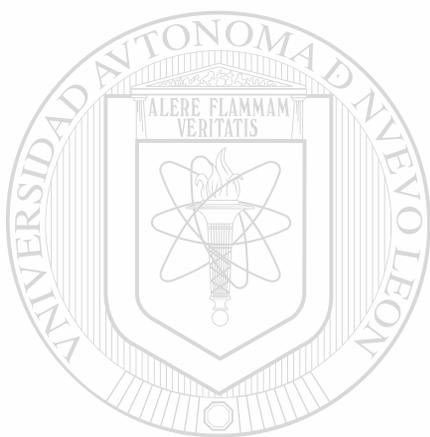
Query: 421     ctgtctacccttaacatgaactataatagactaagctgtgcatacatagtttatgcaac 480
             || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 2029  ctgtctacccttaacatgaactataatagactaagctgtgcatacatagtttatgcaac 2088

Query: 481     cgaaataggttggcagcacatactatacttttcattaatacttttaacaattgtagtat 540
             | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 2089  cgaaataggttggcagcacatactatacttttcattaatacttttaacaattgtagtat 2148

Query: 541     ataaaaaaggagtaaccgaaaacggtcgggaccgaaaacggtgtatataaaagatgtga 600
             ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 2149  ataaaaaaggagtaaccgaaaacggtcgggaccgaaaacggtgtatataaaagatgtga 2208

Query: 601     gaaacacaccacaataccatggcgcg 626
             ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 2209  gaaacacaccacaataccatggcgcg 2234

```



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



