

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

Q.F.B.

ANGEL

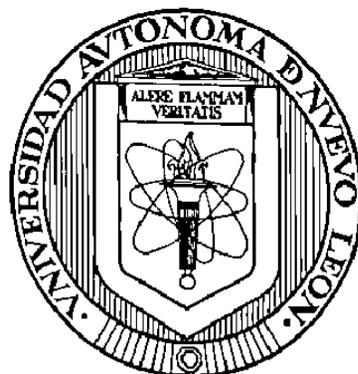
LUGO

TRAMPE



1080123143

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

QFB. ÁNGEL LUGO TRAMPE

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

Enero, 2004

TM

RC280

.08

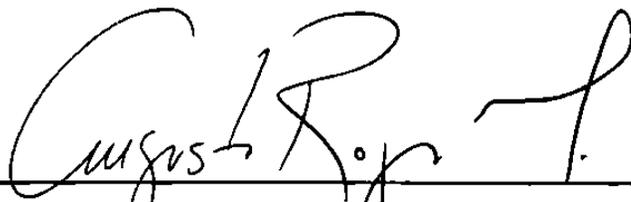
L8

2 4

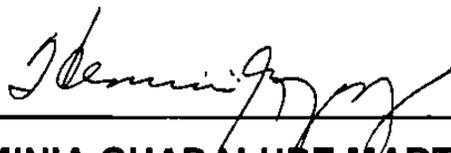


**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIRIGIDA POR LA REGIÓN PROMOTORA URR
DE LAS VARIETADES ASIÁTICO-AMERICANA Y EUROPEA DEL HPV TIPO 16
EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS**

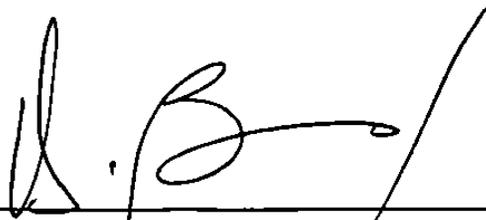
Aprobación de la Tesis:



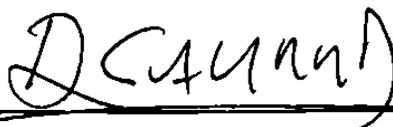
DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ
Director de Tesis



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.

Vo. Bo.



DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ
Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Augusto y Dra. Rocío, 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.

"Un placer coincidir en ésta 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	63
APÉNDICES	

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 2.53 β	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

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