

83



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

FORMACION IN VITRO DEL COMPLEJO PROTEICO NF-1/E 2 EN LA REGION LARGA DE CONTROL DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 18.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ANSELMO VICTOR GONZALEZ GARCIA

DIRECTOR: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS



MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"FORMACION IN VITRO DEL COMPLEJO PROTEICO NF-1/E2
EN LA REGION LARGA DE CONTROL DEL VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO TIPO 18".

realizado por González García Anselmo Víctor

con número de cuenta 8436416-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dr. Mauricio Salcedo Vargas

Salcedo

Propietario

M. en IBB. Benito Estrada Mena

Propietario

M. en C. Maura Cárdenas García

Suplente

M. en IBB. Rocío Alcántara Hernández

Suplente

Biol. Alfonso José Vilchis Poluyera

[Handwritten signatures]

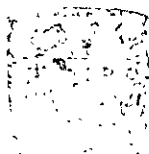
FACULTAD DE CIENCIAS

U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ.



DEPARTAMENTO

DE CIENCIAS

INDICE

INDICE.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ABREVIATURAS.....	iv
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCION.....	1
DESCRIPCION MOLECULAR DEL VPH.....	3
PROTEINA E2 DEL VPH.....	5
FUNCION DE NF-1.....	6
MECANISMOS DE TRANSFORMACION.....	7
ESPECIFICIDAD TISULAR DE LOS VPH.....	7
HIPOTESIS.....	8
OBJETIVOS.....	8
MATERIAL Y METODOS.....	9
DIGESTION DE PLASMIDOS CON ENZIMAS DE RESTRICCION.....	10
PREPARACION DE VECTORES.....	11
LIGACION.....	11
TRANSFORMACION DE BACTERIAS.....	12
PREPARACION DE BACTERIAS COMPETENTES.....	13
MAXIPREPARACION DE PLASMIDOS.....	13
PURIFICACION.....	15
CUANTIFICACION DEL ADN.....	15
MARCAJE TERMINAL DEL ADN CON α - ³² P.....	16
LINEAS CELULARES.....	17
AISLAMIENTO DE NUCLEOS Y PREPARACION DE EXTRACTOS.....	18
TITULACION.....	19
EXPERIMENTOS DE RETARDAMIENTO.....	19
EXPERIMENTOS DE COMPETENCIA.....	20
RESULTADOS.....	21
DISCUSION.....	24

CONCLUSIONES.....	28
GLOSARIO.....	29
BIBLIOGRAFIA.....	31
FIGURAS.....	38

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en su totalidad en el laboratorio del Dr. Patricio Gariglio del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN. Éste no hubiera sido posible sin la colaboración y asesoría del Dr. Mauricio Salcedo Vargas, a quien le agradezco ante todo su Amistad, su Apoyo y en él su Enseñanza.

- Agradezco a Dios el que me haya brindado la bella oportunidad de llegar a este momento.
- Agradezco a mis Maestros que me han guiado en el camino de la vida: mis Padres Zenón González y Paulina García.
- Agradezco a tres valiosos ejemplos en mi vida: mis Hermanos, Ma. del Carmen González García, Ramiro Zenón González García y Norma González García.
- Agradezco el apoyo de ese importante núcleo: Toda la Familia.
- Agradezco a mis guías en el terreno académico: mis Maestros.
- Agradezco a los que me apoyaron en los momentos más difíciles: mis Amigos.
- Agradezco a mis 7 amigos que me han permitido abrir las puertas al saber: ¿Porqué?, ¿Qué?, ¿Para qué?, ¿Cómo?, ¿Cuándo?, ¿Dónde? y ¿Quién?.
- Agradezco a mis sinodales sus comentarios y el apoyo para este trabajo: Benito Estrada Mena, Maura Cárdenas García, Rocío Alcántara Hernández y Alfonso José Vilchis Peluyera.

ABREVIATURAS

ADN. Ácido 2' desoxirribonucleico

AP-1. Factor regulador de la transcripción de origen celular (del inglés activator protein-1)

APS. Persulfato de amonio.

ARN. Ácido ribonucleico.

CaCu. Cáncer cérvico-uterino.

CIP. Cóctel de inhibidores de proteasas.

cpm. Cuentas por minuto.

Curie. Unidad de medida empleada para la actividad radiactiva de los elementos.

dNTP 2' deoxinucleótido 5' trifosfato

DTT. Dithiothreitol.

E2. Proteína viral tipo 2, que es capaz de activar o reprimir la transcripción temprana de los papilomavirus humanos. Su sitio consenso es: **ACCGN₄CGGT**, donde N es cualquier nucleótido.

EDTA. Ácido etileno-diaminotetraacético.

EGTA. Ácido etileno-guaninotetra-acético.

HeLa. Línea celular de origen humano, que tiene integrada la secuencia del VPH-18 y contiene el factor NF-1.

Hepes. N-2 hidroxietil-piperazina-N'-2-ácido etano sulfónico.

μCi. Micro curie = millonésima parte de un Curie.

MLA. Marco de lectura abierta.

NF-1. Factor de transcripción de células epiteliales cuyo sitio consenso es: **TTTGGCTT**

ng. nanogramos.

mM. milimolar

NP-40 Nonidet-P-40.

pb. Pares de bases.

α-³²P.-Alfa- Fósforo 32.

PMSF. Fluoruro de fenilmetil sulfonilo

pKGEM. Plásmido de 36 pares de bases, que contiene los sitios E2 y NF-1 separados entre sí por tan solo cuatro nucleótidos, con múltiples sitios de clonación, destacando el sitio Eco RI y Hind III.

PGEM4Z. Plásmido de 2746 pares de bases, útil para llevar a cabo las clonaciones de este trabajo ya que cuenta con los sitios únicos Eco RI y Hind III.

rbcS. Ribulosa bifosfato carboxilasa de plantas.

RLC. Región larga de control.

SV-40. Virus de simio tipo 40 (Del inglés Simian Virus-40)

TBE. Tris Borato-EDTA.

TE. Tris -EDTA.

VPH. Virus del Papiloma Humano.

VPH-18. Virus del Papiloma Humano tipo 18.

Tris. Hidroximetil-aminometano.

RESUMEN

El acervo del conocimiento sobre los mecanismos moleculares por los cuales, los genes pueden ser diferencialmente expresados durante el desarrollo de un organismo, con una alta especificidad tisular, o por la acción de un inductor ambiental, se ha incrementado gracias al descubrimiento de las secuencias de ADN, que son mediadoras de la transcripción. Éstas, funcionan como sitios de reconocimiento para proteínas, por lo que la regulación de un gen, está controlada por las interacciones ADN-Proteína. De esta manera, se caracterizó la actividad de unión de NF-1 a su sitio consenso en el ADN y de igual forma se hizo con la proteína E2, mediante experimentos de retardamiento en gel, además, se determinó la orientación del complejo de retardamiento para NF-1. Para ello se obtuvieron extractos nucleares de varias líneas celulares y de leucocitos humanos circulantes, los cuales se incubaron con diferentes sondas radiactivas de ADN, las mezclas se depositaron en geles nativos de poliacrilamida a baja fuerza iónica y se sometieron a electroforesis. Los resultados, se visualizaron en placas de autoradiografía, en donde los complejos ADN-Proteína, se detectaron debido al decremento de su movilidad electroforética, a diferencia del corrimiento del ADN libre de factores. Por último, se infirió la existencia de la interacción entre E2-NF-1, con experimentos de retardamiento en gel, al realizar la clonación de pKGEM (que posee el sitio E2) y de pKI 8 (que posee el sitio NF-1) separados entre sí por 28 pb.

INTRODUCCION

El cáncer es uno de los problemas más relevantes en la medicina moderna y es uno de los más fascinantes en la investigación de la Biología Molecular. Éste, es una patología que integra una serie de anomalías de regulación molecular, que son visibles a nivel celular, por las alteraciones manifestadas en los mecanismos básicos de control de la regulación metabólica, división y diferenciación celular de los organismos superiores (1,2,4). La célula cancerosa se caracteriza por una mayor velocidad de división, una diferenciación parcial o imperfecta, presencia de metástasis, pérdida de inhibición por contacto, poca cohesión, cambios tanto en la morfología como en la estructura antigénica, bioquímica y por lo regular cariotípica, pérdida de unión por contacto con células de otro tejido, aumento de los movimientos celulares en sus cultivos, elaboración de toxinas para las otras células y sobrevivencia en trasplantes (1,2). Al proceso que origina la aparición de cáncer se le llama carcinogénesis y encierra una serie de eventos consecutivos o simultáneos, donde debe de existir un inicio, que involucra estímulos exógenos y/o endógenos, además, de rebasar un umbral para que se implante el estado carcinogénico. La iniciación es seguida por un estado de latencia, donde se llevan a cabo los cambios a nivel molecular, para adquirir e implantar el fenotipo transformado. Los estímulos endógenos bien pueden ser genéticos, hormonales o inmunitarios y dentro de los exógenos se han mencionado a factores: **biológicos** (virus), **físicos** (radiaciones ionizantes) y **químicos** (compuestos orgánicos e inorgánicos; 1,2,7). Los procesos tumorales pueden presentar diversas manifestaciones clínicas, sin embargo; se ha visto que todos ellos tienen causas comunes que los desencadenan. A nivel molecular dos de los factores más importantes que intervienen en la carcinogénesis son los oncogenes y los **virus** (1-6). Los virus del papiloma (VP), se descubrieron como agente causal de cáncer a principios de siglo. Estos virus, pertenecen a la familia PAPOVAVIRIDAE que incluye a Poliomasvirus y SV40 (3-7) Los VPH han sido intensamente estudiados en los últimos años debido a su estrecha asociación con cánceres genitales (3-8). En México, el cáncer ocupa el segundo lugar como causa de muerte y el carcinoma cérvico uterino (CaCU), es la causa más frecuente de mortalidad en países en desarrollo. En la población mexicana, aproximadamente un 30% de los tumores malignos de la mujer son de CaCU.

representando un serio problema de salud, por razones obvias, significa además un grave problema socioeconómico (10,59). Lo anterior ha dado lugar a una serie de investigaciones epidemiológicas del CaCU en nuestro país, así como al estudio de los mecanismos de regulación molecular de esta patología (11). Los VPH, tienen una alta especificidad por las células epiteliales estratificadas, como son las paredes intestinales, tejido pulmonar, cutáneo o cérvico uterino (4-6,11,12,17), llevándolas a un estado de transformación maligna (14). Esta especificidad, ha impedido realizar estudios genéticos y moleculares *in vitro*, como los reportados en SV40 ó poliomavirus. Hasta ahora se han descrito más de 100 tipos de VPH en el ámbito mundial (7), destacando los tipos **16,18,31** y **33** por su **alto potencial oncogénico** en tumores malignos y líneas celulares derivadas de CaCU (5-8,14,15,17,20,21). Sin embargo, existen algunos VPH como los tipos 6 y 11 que se asocian a las neoplasias benignas, es decir, los de bajo potencial oncogénico (3,7,30). En los tumores genitales malignos el genoma de los VPH, está integrado al genoma celular (3,4,17) y estas secuencias son transcripcionalmente activas (18). Este hecho tiene dos consecuencias importantes: a) la expresión de secuencias virales que son necesarias para propiciar y mantener el estado transformado de las células huésped. (5,20,33,63,70) y b) la interacción (activación ó represión) con genes celulares (por ejemplo, oncogenes ó antioncogenes) vecinos al sitio de la integración por parte de los elementos regulatorios del VPH implicado (3-6,11,15,16,19,20,28,32,34,41,44-46,49,54,56-58,61,62,65,69,70). Por otro lado, en las neoplasias benignas, se ha observado que las secuencias virales están en forma episomal (no integrada) y en ocasiones multimérica, transcribiendo la mayor parte de sus genes (17,30), principalmente del gen E2. Lo antes citado, muestra que la integración de secuencias virales al genoma celular y en asociación con otra anomalía celular como la activación de oncogenes y ausencia de antioncogenes, puede desembocar en algún tipo de cáncer (5,70). Sin embargo, el ADN viral en estado libre ha sido detectado dentro de tumores, indicando que la progresión a cáncer es posible con o sin la integración viral (22), mostrando que la infección por virus, así como la expresión de genes virales son factores necesarios, pero no suficientes para la inducción de ciertos tipos de cáncer (13,14,17).

DESCRIPCION MOLECULAR DEL VPH

Los VPH son virus pequeños que poseen un ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases (8 kb), compactado con histonas, formando nucleosomas y encapsulado en viriones icosaédricos que constan de 72 capsómeros (6,60). La organización genómica de todos los VPH descubiertos hasta ahora es extraordinariamente conservada (7,8,16,26,29,63,64) ya que presentan una estructura básica muy similar, con homología de secuencia entre ellos, que va de moderada con 45% a una alta de 85%. Por lo que es difícil explicar, con base a su organización genómica las diferencias de su potencial oncogénico (7). El VPH-18 está asociado a CaCU y su genoma de ADN circular está formado por 7857 pares de bases (5-8). La información codificada está localizada sobre una sola cadena y todos los marcos de lectura abierta (**MLA**) tienen la misma orientación transcripcional. Estos corresponden a los 7 genes que codifican para las proteínas de expresión temprana E (del inglés Early) y 2 regiones que codifican para proteínas de expresión tardía L (del inglés Late). Los genes E son: E1, E2, E4, E5, E6 y E7; donde el producto del gen E1, regula la replicación extracromosomal (4), mientras el producto **E2** es un factor transregulador, el cual modula positiva o negativamente la expresión del genoma viral a partir de promotores de la región temprana de E6 y E7 (9). E2 es un factor viral de amplio espectro funcional, que **participa en interacciones con otros factores tanto virales como celulares en el proceso de transcripción de los VPH** (4,9,25,28,30,32,41,61,62). **Los productos de los MLA, E6 y E7**, no se destruyen o inactivan durante la integración del ADN viral al genoma celular (como E1 y E2), al contrario, **son los responsables de la capacidad oncogénica del virus**, esto es debido posiblemente a la ausencia del represor E2 por ruptura de dicho gen (3,5,8,12,26,30,32,60). Es decir, la integración del ADN del VPH en el CaCU, proporciona una ventaja selectiva que lleva a la proliferación descontrolada de las células, debido a la expresión abundante de los genes E6 y E7. Las proteínas codificadas por los MLA E6-E7, poseen secuencias muy similares entre sí y entre los VPH en general (8,64). En ellas reside el potencial oncogénico de los VPH dada su capacidad de **inmortalización y transformación** (5,8,64). La oncoproteína E7 posee

similitud estructural y funcional con otros productos de oncogenes virales como la proteína E1a de Adenovirus o el antígeno T de SV40 (26,30, 64), ya que también interactúa con el producto del regulador antioncogénico RB (retinoblastoma). Los genes de E6 y E7 se expresan selectivamente en los tumores genitales y en líneas celulares derivadas de tumores humanos, ya que cooperan con oncogenes celulares activados (como ras), para producir fenotipos completamente transformados en células en cultivo (5,28,34). Por su parte L1 y L2 son los MLA tardíos, que codifican para las proteínas estructurales del virus; que sólo se expresan en tejidos productivamente infectados (20). Entre el inicio de la región temprana y el fin de la región tardía hay un segmento de ADN que no tiene capacidad codificante para proteínas; éste, contiene elementos regulatorios de la replicación y transcripción de la región temprana del virus. Esta secuencia conocida como **Región Larga de Control (RLC)**, de aproximadamente 1 Kilobase, es decir, 1000 pares de bases, en ella se han identificado, tanto el origen de la replicación viral, como secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción, que interactúan con factores transactivadores tanto celulares como virales (8,12, 19, 25-28,45,62; Figuras 1 y 2). Se han realizado numerosos estudios para conocer la funcionalidad de la RLC y de los elementos celulares que se asocian a ella. La RLC tiene regiones funcionales potenciadoras (enhancer), conocidas como Elementos Responsivos y conservadas en los VPH genitales; una de ellas es regulada por E2 -ER2-(Figura 3), ubicada cerca del origen de la transcripción de E6 y E7 (26). Existe otra región -ER6-(Figura 3), aproximadamente a 500 pb del inicio de E6 (cap E6), que posee una alternancia de AT para los VPH de bajo potencial oncogénico y de GC para los del grupo de alto potencial (63). Esta alternancia de purinas y pirimidinas en una secuencia, la hace susceptible de formar el ADN-Z, el cual es característico de algunos elementos con actividad transcripcional (2). Para los VPH-16 y 18, esta región es responsiva a la presencia de E6 (65). Sin embargo, el papel que desempeña E6 dentro de esta región no se conoce con exactitud y en todo caso no se relaciona directamente con la epiteliotropía. La especificidad tisular exhibida por los VPH puede ser explicada en términos de la región potenciadora activa de epitelios (EC) presente dentro de la RLC (Figura 3). Esta región guarda una alta similitud en su secuencia entre todos los VPH genitales

secuenciados hasta ahora. Esta similitud reside principalmente en dos secuencias de ADN, una exclusiva de los VPH de alto potencial oncogénico GGCACATATTT y otra conservada en todos los VPH genitales 5' TTTGGCTT 3' (12). Esta última secuencia es el sitio consenso del factor celular **NF-1**, que es de especial interés ya que la misma secuencia se encuentra en orientación antisentido 3' **AAGCCAAA** 5', en la región promotora de los genes humanos de las citoqueratinas e involucrina (Figura 14) y cuyos productos son expresados exclusivamente en epitelios de los huéspedes de estos virus (12). De esta manera, podemos decir que la RLC es compleja y redundante en sus funciones, además requiere de la asociación cooperativa entre los diferentes componentes que la integran (12). Con esta idea resulta ahora evidente que no es un sólo factor el responsable de la transcripción viral (12,22-26,65), sino probablemente la *homo* y *heterosinergia* en la actividad de una serie de factores celulares y virales tales como AP-1, NF-1/CTF, TFIID, C-MYC, NF-1, E2, etc., (12,22,28,62,65).

PROTEINA E2 DEL VPH

Se ha determinado recientemente, que la proteína viral E2 de 47 kd aproximadamente, es capaz de activar ó reprimir la transcripción temprana de los VPH (31-33). E2 forma dímeros (35), capaces de activar la transcripción viral cuando su secuencia blanco **ACCGN4CGGT** (N, representa cualquier nucleótido) se encuentra a una distancia mayor a 150 pb de la caja TATA, convirtiéndose así en un fuerte represor cuando su secuencia blanco se localiza cerca de la caja TATA (8,9,30,32,36,37). Los dímeros de E2 tienden a formar tetrámeros para potenciar la actividad de un promotor (8) y de esta manera, la presencia de sitios E2 puede incrementar la probabilidad de formar horquillas estables y tetrámeros por contactos E2-E2. De tal manera que E2 puede interactuar con factores de transcripción unidos en la vecindad del sitio de inicio de la transcripción (34). Con la implementación de las técnicas de Ingeniería Genética se han realizado disecciones moleculares de la proteína E2 (23), manifestando 3 divisiones funcionales: 1) **Dominio amino terminal** (función activadora de la transcripción), 2) **Dominio central** (por su alto contenido de prolínas es considerado una especie de bisagra) y 3) **Dominio carboxilo terminal** que reconoce la secuencia blanco en el ADN (40; Figura 4). El

dominio amino terminal de E2 desestabiliza el complejo ADN-proteína, envolviendo solamente un sitio, pero adquiere estabilidad cuando más de un sitio está presente (13,40). El transactivador E2 estimula la transcripción tanto en sitios de unión dependientes a E2, como a los independientes o no específicos a E2 (13). Además, se distingue de otros factores de unión enhancer/promotor debido a su alta capacidad de cooperación con factores heterólogos en la RLC (9,13,25,28,30,32,34,61). Con base en lo anterior, se han efectuado múltiples estudios para conocer la funcionalidad de la RLC (12,22) en los cuales se ha observado una clara participación de factores celulares (27,39,41,45,48,53,56,61); un ejemplo es AP-1, que es capaz de activar la transcripción viral temprana en los genomas de los VPH, tanto en estado libre como integrado, ya sea en forma complementaria ó independiente respecto a la presencia de E2 (4,27,41). La participación de otros factores celulares con E2 es factible, debido a la amplia capacidad de cooperación que tiene éste en la LCR de los VPH.

FUNCION DE NF-1

La presencia de los altos niveles del factor celular NF-1 en células epiteliales, aún no se le ha inferido su funcionalidad correspondiente, sin embargo, se han propuesto algunas alternativas, pero se necesitan de más estudios como el presente para esclarecer su funcionalidad. Puede ser enfocada en el marco de la regulación transcripcional de los VPH. La ubicación conservada de la secuencia NF-1 en la RLC de los VPH genitales (Figura 3), sugiere cierta implicación al formar parte de un complejo de preiniciación de la transcripción tejido específica. Esto es, que formará parte de un conjunto de factores necesarios para dar inicio a la transcripción viral en un momento dado del proceso de diferenciación epitelial (12). La función transitoria de NF-1, sería análoga a la del factor transcripcional ATF, el cual posiblemente facilita la unión de la ARN polimerasa mediante una interacción específica con el ADN y el factor TF-IIID en los promotores que contienen la caja TATA (27, 43,57). Por otro lado, la presencia del sitio NF-1 en los promotores de citoqueratinas, implica que no puede describirse como un elemento de replicación del ADN. Dada la entrada en el proceso de expresión diferencial de las citoqueratinas, podría tal vez enfocarse como sitio de señal de activación transcripcional, siendo una especie de

marcador para iniciar el proceso de diferenciación (12). Por lo tanto, es viable considerar que entre el factor NF-1 y la proteína viral E2 los cuales mantienen sus posiciones relativas en la RLC de VPH genitales (Figura 3), pueda existir alguna interacción, por la capacidad sinérgica de esta proteína con factores celulares (61). Sí es así, debe existir una posible inferencia de la interacción entre este factor y la proteína, que será visualizada por experimentos de retardamiento.

MECANISMOS DE TRANSFORMACIÓN

No se sabe cómo, ni en qué momento, el virus transforma a la célula (5-7). Se sabe que los VPH-6 y 11 se encuentran en estado episomal y en forma productiva en las lesiones benignas y precancerosas; los VPH-16,18,31 y 33 se encuentran en forma no productiva e integrados al genoma celular en las células cancerosas y generalmente se encuentran amplificados en unas 50 a 200 copias por célula (4-6). Esto parece indicar que la integración de los tipos 16,18, 31 y 33 está relacionada con el proceso de malignización de las células normales o la progresión tumoral (4). El ADN viral se abre generalmente en la región E1-E2 durante la integración al ADN celular (4): los sitios de inserción son muy variados, por lo que no hay un patrón característico. En algunas líneas celulares derivadas de carcinomas genitales, el ADN del VPH se ha encontrado cerca de oncogenes celulares como *myc*, *ras* y *src* (4,11,21,33,39). Además, se ha visto que la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 parecen tener un papel muy importante en el mantenimiento del estado transformado en la célula y los elementos regulatorios de la expresión de estos genes se localizan en la RLC (5,12,22,70). Se ha encontrado que en las biopsias de cáncer cérvico-uterino (CaCU) así como en líneas celulares derivadas de éste y en células transformadas con VPH, los productos de los genes E6-E7 son los que mayoritariamente se presentan. Por lo tanto, la amplia persistencia de estos transcritos en las células transformadas sugieren firmemente que estos productos juegan un papel importante en el proceso de la transformación maligna (3-6,11,34,42,64,69,70).

ESPECIFICIDAD TISULAR DE LOS VPH

Los VPH presentan especificidad tisular absoluta, debido a que solo infectan epitelios estratificados planos, como en CaCU (33,36,66,70; Figura 5)

HIPOTESIS

Sí conserva tanto el factor NF-1 como la proteína viral E2 sus posiciones relativas en la RLC de los VPH genitales, entonces, puede existir alguna interacción entre estos dos factores. Por la capacidad sinérgica que tiene E2 con los factores celulares. Sí es así, debe existir alguna inferencia de esta interacción que será visualizada por experimentos de retardamiento.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar uno de los mecanismos de regulación *in vitro* del Virus del Papiloma Humano-18

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Demostrar la Formación de un Complejo Nucleoprotéico utilizando fragmentos de ADN, que contienen los sitios de unión para el factor NF-1 y para la proteína viral E2.
- 2) Determinar sí la unión del factor NF-1 se lleva a cabo en sentido 5'-3'.
- 3) Inferir sí existe interacción entre NF-1 y E2 en un mismo ensayo.

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se realizó en 3 etapas básicas: a) Se dispuso de un abasto suficiente de los plásmidos pKGEM, pKI 8, pKI 12 y de los oligonucleótidos: E2, E2+AP-1, rbc S y UPE, para la realización de las clonaciones necesarias y de los experimentos de retardamiento (Figura 6), así como, de los ensayos de competencia. A continuación se presentan sus respectivas secuencias, donde se resaltan los sitios de unión para : E2, NF-1 y los sitios heterólogos de estos.

PLASMIDO	SECUENCIA	LONGITUD
pKGEM	5' TAGTGCAACCGATTTGCGGTTGCCTTTGGCTTATGT 3' E2 NF-1	36 pb
pKI 8	5' CTAGCGGTTGCCTTTGGCTTATGTCTGT 3' NF-1	28 pb
pKI 12	3' GATCGCCAACGGAAACCGAATACAGACA 5' NF-1	28 pb
E2	5' CTAGTGCAACCGATTTGCGTTGCC 3' E2	24 pb
E2+AP-1	5' CTAGTGACCGAAAACGGTCGGCGCTGACTCAGATT 3' E2 AP-1	35 pb
rbc S	5' AGCTTTTTCAATCTTGTGTGGTTAATATGA 3'	30 pb
UPE	5' TAGGCCACGTGACCGGGTGTTCTGCA 3'	28 pb

b) Se realizaron las clonaciones en el vector PGEM-4Z de las secuencias NF/1 y E2 para determinar la inferencia de su interacción (Figura 7). El plásmido pKGEM, contiene clonado el oligonucleótido E2+NF-1 (como se encuentra *in vivo* en el VPH-18, separados entre sí por 4 nucleótidos) en el sitio Xba I de la secuencia de policlonación (polilinker), que se encuentra flanqueado con los sitios Eco RI y Hind III de pGEM 4-Z (Figura 8). Este plásmido se utilizó para checar la inferencia de la interacción física a distancia entre E2-NF-1. De esta manera, se planteó la realización de varias construcciones plasmídicas y se obtuvo tanto a pKI 8 como a pKI 12, ambos con una longitud de 28 pb, flanqueados con los sitios Eco RI y Hind III, se clonó la secuencia NF-1 en el sitio Xba I en dirección 5'-3' y 3'-5', respectivamente (Figuras 8A y 8B). Esto se hizo con la finalidad de clonar a pKGEM + pKI 8, para aumentar la distancia entre el sitio E2 de pKGEM y NF-1 de pKI 8 (Figura 9). Igualmente se hizo lo propio con pKGEM + pKI 12 para determinar, si la inferencia de la interacción está o no sujeta a la orientación de la secuencia en el factor NF-1. c) Se realizaron los experimentos de retardamiento, utilizando los plásmidos, oligonucleótidos, las clonaciones realizadas y extractos nucleares de células de origen epitelial, así como células productoras de la proteína E2.

DIGESTIÓN DE PLASMIDOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción son endonucleasas (enzimas que cortan el ADN) que reconocen una secuencia específica e hidrolizan (cortan el ADN por adición de moléculas de agua), dejando extremos simétricos (rasurados) o asimétricos (cohesivos; Figura 10). Los plásmidos son material genético extracromosómico y con replicación autónoma de origen bacterial (generalmente ADN), son de doble hélice circular y su tamaño es de 1-200 Kb. Poseen las siguientes ventajas: generar resistencia a antibióticos sirviendo como marcadores de selección de las bacterias que los propagan, producción de antibióticos, gran facilidad de replicación, así como ser purificados y separados fácilmente de los ácidos nucleicos cromosómicos. Las digestiones se realizaron en las condiciones adecuadas, según el fabricante para cada enzima. A partir de 10 µg de ADN de cada plásmido (pKGEM, pKI 8 y pKI 12) fueron sujetos a tratamiento con la endonucleasa de

restricción Eco R1 (20-40 unidades), se le agregó un volumen de 2 μ l + 2 μ l de buffer de la enzima Eco RI 1 X y se llevó a un volumen total de 20 μ l con agua bidestilada; la mezcla se incubó durante 1 ½ horas a 37 ° C. Se añadió 1 μ l de la mezcla de digestión en el gel de agarosa al 1% y se corrió el ADN electroforéticamente durante 30 minutos. En cada caso, se observó una sola banda de 2838 pb, 2830 pb y 2830 pb que corresponden a los plásmidos pKGEM, pKI8 y pKI 12 en sus carriles respectivos (Figura 9). En forma similar, se restringieron los mismos plásmidos pero ahora con la enzima Hind III (Figura 11).

PREPARACION DE VECTORES

Nuestra estrategia, consistió en utilizar el vector pGEM 4Z (Figura 7), el cual posee sitios únicos de restricción Eco R1 y Hind III en la secuencia de policlonación (polilinker), además de ser altamente replicativo, resistente a la ampicilina y contar con un tamaño pequeño para conferirle estabilidad. El vector fue cortado en el sitio Eco R1 con la finalidad de clonar el fragmento de 160 pb en este sitio. También el vector fue cortado en Hind III (ver Figura 9).

LIGACION

La ligación se hizo con ambos plásmidos (pKGEM + pKI 8 ó pKI 12) digeridos en un mismo sitio y se defosforiló uno de ellos. Se añadió 1 μ l de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) y se incubó a 37° C durante 30 minutos. Se agregaron 80 μ l de agua bidestilada + 50 μ l de Fenol saturado, se mezclándose y se centrifugándose a 3000 rpm durante 5 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó con Etanol (al 100%)-Acetato de Amonio (7.5 M, pH 7.5) para remover las trazas de la actividad de la ALP, la cual evitó la recirculación de los plásmidos. De esta manera, los plásmidos previamente digeridos en los sitios Eco RI, así como Hind III, fueron ligados con la enzima ADN ligasa T4, se añadió 1 μ l de buffer de reacción de ligasa (10X) + 1 μ l de ATP (10 mM) y se llevó a un volumen final de 10 μ l con agua bidestilada. Esta mezcla se homogenizó y se le agregó 1 μ l de la enzima ADN ligasa T4, que catalizó la formación de un enlace fosfodiéster entre los nucleótidos adyacentes, con los grupos 5'PO₄ y 3'OH, gracias a la energía que provee el ATP agregado; de esta manera, resultó un plásmido de 5.6 kb aproximadamente. Las mezclas de ligación en el sitio Hind III fueron las siguientes. a) pKGEM + pKI 8

(defosforilado), b) pKGEM + pKI 12 (defosforilado). De igual forma, se hizo para el sitio Eco RI las mezclas de ligación que contienen: c) pKGEM + pKI 8 (defosforilado) y d) pKGEM + pKI 12 (defosforilado). Una vez efectuada la ligación de los plásmidos a y b que se encuentran flanqueados con sitios Eco RI, se procedió a su restricción donde se obtuvo un fragmento de aproximadamente 160 pb, que contiene los sitios E2 y NF-1 en posición cis separados entre sí por 28 nucleótidos aproximadamente. Este mismo fragmento se obtuvo de las mezclas c y d, solo que estas se encuentran flanqueadas por los sitios Hind III. Las restricciones las visualizamos por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (10 ml de Acrilamida-bisacrilamida del stock 30:0.75 + 5 ml de TBE). Se observaron 3 fragmentos resultantes, de los cuales dos son de un tamaño aproximado de 2754 pb cada uno y un tercer fragmento de aproximadamente 160 pb. Se cortó este último fragmento del gel de acrilamida y se transfirió a un gel de agarosa para ser eluido (Figuras 9 y 12).

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

A una alícuota de 200 μ l de suspensión de bacterias competentes *Escherichia coli* se agregó de 1 a 10 ng de ADN y se incubó por 20 minutos en hielo. La mezcla se incubó en baño María a 42 ° C durante 90 segundos y posteriormente en hielo por 2 minutos; se añadieron 800 μ l de medio SOC (medio SOB + 1/50 Glucosa al 20 % + 1/100 MgSO₄, 1M), se incubó en agitación a 200 rpm durante 45 minutos a 37 ° C. Las bacterias se espatularon directamente 50 μ l de este cultivo en cajas de medio Luria-agar + ampicilina [50 mg / ml], el resto se centrifugó y la pastilla se sembró de igual forma; se crecieron a 37 ° C por una noche, las cepas se almacenaron a 4° C (12). Las bacterias se sembraron en medio de cultivo Luria ampicilina [50mg / ml] (antibiótico que sirvió como marcador de selección de las clonas). La transformación consistió en preparar bacterias de la cepa α DH5 (que carece del gen Lac Z+), para la introducirles el ADN exógeno (agente de transformación) mediante choques osmóticos y térmicos. Las bacterias que crecieron en el medio Luria ampicilina [50mg/ ml], poseen el vector. Se adicionó IPTG para saber si tenían el inserto. El IPTG estimula la síntesis de lactosa, así como la de XGAL que es análogo de la lactosa. Como resultado se presentaron dos tipos de colonias bacterianas:

las de color azul que metabolizaron lactosa, por lo tanto no contenían el inserto y las de color blanco que carecen del gen *Lac Z+* por lo tanto, no metabolizó lactosa y sí contenían el inserto. Se realizaron minipreparaciones para checar el tamaño del inserto de aproximadamente 160 pb, posteriormente se aumentó la cantidad del ADN mediante maxipreparaciones.

PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Para la obtención de bacterias competentes, se utilizó la técnica descrita por Hanahan (68). Las cepas se inocularon en medio SOB (Bactotripton 20 gr, NaCl 0.5 gr, ajustar pH 7.5 con KOH, aforar a 1 litro), más 10 mM $MgSO_4$; Se crecieron a 37°C con agitación constante a 200 rpm toda la noche, 500 μ l de este precultivo se inocularon en 50 ml de mismo medio y en las mismas condiciones, hasta que el cultivo alcanzó una D.O. (Densidad Óptica) de 550 nm. El cultivo se transfirió a tubos estériles tipo Falcon en condiciones de esterilidad y se enfrió en hielo durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó 12 minutos a 4 ° C a 2500 rpm. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente y la pastilla se resuspendió en 16 ml de tampón RF1 (30 mM Kac, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % Glicerol, a pH 5.8 ajustado con 0.2 M de ácido metílico). La mezcla se centrifugó a 12 minutos a 4 ° C a 2500 rpm, el sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 4 ml de tampón RF2 (10 mM de MOPS [3-[N-Morfolino] ácido propano sulfónico] ó PIPES [piperazina-N,N'-bis [2-ácido etanosulfónico]; 1,4-ácido piperazina dietanosulfónico], 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% Glicerol [a pH 6.5 ajustado con KOH], se incubó 15 minutos en hielo y se distribuyó en alícuotas de 200 μ l, en tubos estériles preenfriados y se almacenaron a 80 °C bajo cero.

MAXIPREPARACIONES DE PLASMIDOS

Se sembró un pie de cultivo con la cepa portadora del plásmido de interés, en 5 ml de medio Luria estéril (10% Bactotripton, 5 % de extracto de levadura y 10 % de NaCl [a pH 7.5 ajustado con NaOH] más la ampicilina [50mg/ml], se creció en agitación moderada a 200 rpm, toda la noche a 37° C. Se inocularon 500 ml de medio Luria con 3 ml de precultivo y se agregó la ampicilina [50mg/ml], se dejó crecer en agitación

moderada a 200 rpm a 37° C, hasta que el cultivo alcanzó una D.O. de 600 nm y se procedió a realizar la amplificación del plásmido (incremento del número de copias por célula), deteniendo la síntesis de proteínas bacterianas con 170 µg/ ml de cloranfenicol, se dejó crecer en agitación a 200 rpm a 37 °C toda la noche. El cultivo se transfirió a botellas de polipropileno de 500 ml, se centrifugó durante 15 minutos a 5000 rpm en rotor Beckman JA-10, a 4°C. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 3.5 ml de solución Tris [50 mM a pH 7.5, Sacarosa al 25 %], la mezcla se transfirió a tubos de polialómero de rotor 50 Ti ó SW 40 de ultracentrífuga y se añadieron 3.5 ml de solución ELT [100 mM de EDTA a pH 8.0, 2 mg/ml de lizozima, triton X 100 0.1%]. La mezcla se agitó y posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y 10 minutos más a 70° C; se centrifugó a 40 000 rpm en ultracentrífuga Beckman a 4° C durante 25 minutos en rotor 50 Ti ó 20 minutos en rotor SW40. Se recuperó el sobrenadante y se añadió un volumen igual de solución PEG-NaCl [20 % polietilen glicol, 1M de NaCl] en tubos corex de 15 ml, se mezcló suavemente, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 10 minutos a 4°C a 3000 rpm en el rotor SS34. El sobrenadante se eliminó y se resuspendió la pastilla en un volumen de 4 ml de solución TE 1X, se incubó un instante en baño maría a 90 °C y se le agregó 4 ml de LiCl (cloruro de litio) 5 M frío y se mezcló suavemente, se incubó 5 minutos en hielo. La mezcla se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm SS34 a 4°C para eliminar el ARN. El sobrenadante se pasó a tubos corex de 30 ml y se agregó 20 ml de etanol absoluto frío (20 °C bajo cero), se mezcló suavemente y se centrifugó 30 minutos a 4 °C a 8000 rpm para precipitar el ADN. El sobrenadante se decantó y se agregaron 10 ml de etanol al 80 %, se centrifugó a 8000 rpm durante 3 minutos a 4°C y la pastilla se secó al vacío (de 5 a 10 minutos), se resuspendió en 400 µ l de solución TE 1X y la mezcla se pasó a tubos eppendorf, se lavó el tubo corex con otros 100 µl de TE 1X y se agregó al mismo eppendorf. Se agregó RNAsa (40 µg / ml) y se incubó 15 minutos a 37 ° C; después se le agregó 0.6 ml de solución de PEG-6000 13%, NaCl 1.6 N , se mezcló por inversión, se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4° C, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 150 µ l de solución TE + 150 µ l de solución cloroformo : alcohol isoamílico 24.1, se agitó y se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente A la fase

acuosa se le agregó 150 μ l de fenol saturado (0.1 % de Hidroxiquinoleína en 100 ml de fenol bidestilado, agregar 1 volumen de Tris 1M a pH 8.0 + 1 volumen Tris 0.1 M a pH 8.0) en TE (10 mM Tris, 1 mM de EDTA [ajustar el pH 8.0 con HCl]), se agitó y se centrifugó durante 5 minutos a 12 000 rpm a temperatura ambiente. A la fase acuosa se le agregó un volumen de solución de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 4M + 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío 20°C del anterior volumen final. Esta mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 14 000 rpm a 4°C; el sobrenadante se decantó, la pastilla de ADN se lavó con etanol al 80 %, se secó al vacío (5-10 minutos) y se resuspendió en agua para obtener la concentración deseada (12).

PURIFICACION

Se purificaron los plásmidos por la técnica de Gradiente Isopícnico de Cloruro de Cesio (CsCl). A la solución de ADN plasmídico se le agregó 1 gr. de CsCl en polvo por ml y se disolvió por inversión. Por cada 5 ml de la mezcla (CsCl TE, ácido nucleico) se le agregó 400 μ l de Bromuro de Etidio [10 mg/ml], para obtener una densidad de 1.55 gr/ml y poder observar el índice de refracción de 1.38, de esta manera, se procedió al llenado de los tubos de polialómero quick-seal, hasta su tope de 5.1 ml con una solución de CsCl + Bromuro de Etidio TE (de la misma densidad), se pesaron en balanza semi analítica a no más de 0.1 gr. de diferencia. Se sellaron los tubos por calor, se procedió a centrifugarlos a 55,000 rpm durante 6 hrs. a 20 °C en un rotor vti 65.2 en una ultracentrífuga L-7. Con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta de onda corta, se obtuvieron las bandas del plásmido con una jeringa. Previamente se rompió el vacío del tubo y luego se realizó la colecta, donde se procuró tomar solo de la forma 1 (super enrollada), se quitó el Bromuro de Etidio con isopropanol saturado con NaCl (en donde se formaron dos fases: la orgánica (abajo) y la acuosa (arriba), que es la que contiene al ADN), se repitió este paso hasta que se dejó de ver el color rojo. Se puso la fase acuosa en bolsitas de diálisis y se dializó contra TE durante 12 horas con al menos 3 cambios de TE, a continuación se visualizó el ADN en geles de agarosa y luego se procedió a su cuantificación.

CUANTIFICACION DEL ADN

Para la medición de ADN por espectofotometría, se hicieron diluciones de la muestra

:500 y se realizaron las mediciones con el espectrofotómetro Beckman DU-7, en el que se considera que un valor de densidad óptica a 260 nm = 1.00 corresponde aproximadamente a 50 µg / ml de ADN de doble cadena (31), de esta manera, para calcular la concentración se utilizó la siguiente relación:

$$\text{Concentración de ADN} = A_{260} \frac{(\text{Dilución}) (50 \mu\text{g})}{1000 \mu\text{l}} = \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

MARCAJE TERMINAL DEL ADN CON α - ^{32}P

El marcaje radiactivo de ADN con [α - ^{32}P] dNTP (Amersham,UK), se realizó empleando el fragmento Klenow de la enzima ADN polimerasa I, que incorpora nucleótidos marcados en los extremos 3' del ADN lineal de doble cadena, con extremos 5' salientes (oligonucleótidos ó fragmentos). La reacción para el marcaje de los oligonucleótidos, se realizó agregando 100 ng de ADN de doble cadena, 0.166 mM de tres dNTP distintos no marcados (además del que se incorpora marcado), 1.5 µl de Tampón Klenow 10 X (0.5 M de Tris a pH7.2, 0.1 M de MgSO₄, 1mM de Dithiothreitol y 500 µg /ml de albúmina sérica bovina) y 60 µCi (micro curie) de [α - ^{32}P] dNTP (dATP ó dCTP, dependiendo de la secuencia del extremo 5' terminal), la mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 15 µl con agua bidestilada estéril y se dejó incubar 30 a 45 minutos a temperatura ambiente; para separar el ADN marcado del [α - ^{32}P] dNTP no incorporado, se agregaron a la mezcla 100 µl de TE + 50 µl de fenol saturado + 50 µl de solución cloroformo: Alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugo durante 5 minutos a 14 000 rpm a temperatura ambiente, se tomó la fase acuosa y se agregó un volumen de CH₃COONH₄ 4 M, del nuevo volumen se agregó 2.5 volúmenes más de etanol absoluto y se centrifugó a 14 000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante, la pastilla se lavó con etanol al 80 %, se dejó secar de 5 a 10 minutos y se resuspendió con 100 µl de TE 1X. La actividad del ADN marcado fue usualmente de 20 a 50 cpm/ng de ADN Para el marcaje de los fragmentos, se digirieron de 1 a 2 µg de ADN plasmídico con la enzima de restricción adecuada y cortar una sola vez el polilinker en el cual se encuentra clonado el

fragmento de ADN viral; para probar si la digestión fue completa, se tomó una muestra y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1X. El marcaje se realizó en el sitio de restricción seleccionado de igual forma al de los oligonucleótidos. Una vez marcado el ADN lineal por ambos extremos del polilinker, se realizó una restricción secundaria para separar el inserto del vector, fraccionando la mezcla realizando una electroforésis en un gel nativo de poliacrilamida al 5 % en TBE 1X a 300 volts. Para visualizar la ubicación del fragmento en el gel, éste se expuso en una placa de autoradigrafía durante 5 minutos, la banda se separó del gel de poliacrilamida, se depositó en 400 μ l de tampón de elución (0.1 % de SDS, 10 mM de Tris a pH 7.5, 0.5 mM de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ y 1mM de EDTA), se incubó toda la noche a 37°C . La mezcla se depositó en una jeringa de 20 ml y se pasó por una unidad de filtración con membrana milipore de 0.45 μ m, el tubo se lavó con 300 μ l de tampón de elución y la jeringa con 700 μ l de isopropanol. La mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C; el sobrenadante se decantó, la pastilla resultante se dejó secar de 5 a 10 minutos y se resuspendió en 100 μ l de TE + 50 μ l de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 4M + 250 μ l de etanol absoluto, se centrifugó a 14 000 rpm durante 30 minutos a 4°C ;el sobrenadante se decantó, la pastilla resultante se lavó con etanol al 80 % , se dejó secar de 5 a 10 minutos y se resuspendió con TE 1X, con una actividad de 25 a 50 cpm / ng de ADN (Figura 13).

LINEAS CELULARES

Para la realización de los experimentos de retardamiento, se emplearon las siguientes líneas celulares: **HeLa** (tiene integrada la secuencia del VPH-18 en aproximadamente 20 copias y contiene al factor NF-1), **SiHa** (posee la secuencia integrada del VPH-16 en 2 copias aproximadamente y contiene al factor NF-1), **CaSki** (posee integrado el genoma del VPH-16 en más de 500 copias y contiene al factor NF-1), **Cos** (células de riñón de mono verde africano, transfectadas con el vector pC59, el cual tiene clonado la secuencia del gen E2 viral, productoras de E2) y **Linfocitos humanos** (para ser nuestros controles negativos). Las cuatro primeras líneas celulares, se crecieron en medio Eagle modificado por Dulbecco, suplementado con 7% de suero fetal de ternera, a una atmósfera húmeda conl 5% de CO_2 .

AISLAMIENTO DE NÚCLEOS Y PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Se obtuvieron los extractos de proteína a partir de cultivos celulares al 90% de confluencia, los núcleos fueron aislados por el método de detergente que a continuación se describe: las células fueron lavadas con tampón salino de fosfatos (37 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 0.7 mM de Na_2HPO_4 y 25 mM de Tris, se resuspendieron en tampón A (10 mM de Hepes [N-2-Hidroxiétil piperazina-N'-2 ácido etanosulfónico] a pH 7.9, 85 mM de KCl, 5.5 % de Sacarosa, 0.5 mM de espermidina , 0.15 mM de espermina, 0.5 mM de DTT, 0.5 mM de PMSF). Para el lisado de los núcleos se agregó un volumen de tampón "A", (de NP-40 al 1%). Los núcleos se obtuvieron por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C en centrífuga clínica DAMON/REC HN S -II y fueron lavados con tampón "A" (12). Los extractos nucleares fueron preparados como se describe a continuación: los núcleos fueron resuspendidos en tampón "C" (20 mM Hepes a pH7.9, 25 % de glicerol, 420 mM de NaCl, 1.3 mM de CaCl_2 , 0.2 mM de EDTA, 0.5 mM de DTT, 0.5 mM PMSF). La suspensión se agitó suavemente a 4°C durante 45 minutos, posteriormente la cromatina fue sedimentada durante 33 minutos a 16000 rpm, en la ultracentrífuga Beckman L855 con el rotor SW50.1. Las proteínas solubles fueron precipitadas por adición de 1.6 volúmenes de una solución que contiene 3.8 M de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ y 20 mM de Hepes a pH 7.9; la mezcla fue agitada durante 45 minutos a 4° C y centrifugada a 35 000 rpm durante 20 minutos en el rotor SW40. Las proteínas fueron resuspendidas en 400 μl de tampón D (20 mM de Hepes a pH 7.9; 60 mM de KCl, 20 % de glicerol, 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 0.2 mM de EDTA). Se dializaron durante un tiempo de 2 a 3 horas contra 500 volúmenes de tampón "D". Los extractos nucleares fueron separados en alícuotas y almacenados en nitrógeno líquido (12). En algunos extractos se adicionó CIP (epestatin a 0.2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de solución, Antipaína 0.2 $\mu\text{M}/\text{ml}$, leupeptina 1 nM/ml, benzamidina 0.05 nM/ml, quimostatina" A", "B" y "C" 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$), como agentes inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas fue determinada mediante la técnica descrita por Bradford, usando albúmina sérica bovina como estándar (1 mg/ml). El aislamiento de núcleos y la preparación de extractos se obtuvieron a partir de dos tipos de líneas celulares de origen epitelial HeLa, SiHa y CaSKi para obtener NF-1 y

a partir de células COS transfectadas con pC59, productoras de la proteína viral E2 en grandes cantidades.

TITULACION

En este procedimiento se emplearon condiciones limitantes. Es decir, se varió la concentración del ADN radiactivo para obtener la cantidad adecuada. Finalmente se visualizó en placa autoradiográfica.

EXPERIMENTOS DE RETARDAMIENTO

Esta técnica es utilizada para separar moléculas de ADN libre, de complejos ADN-Proteína y se basa en las diferencias de su movilidad electroforética (12), a fin de caracterizar la actividad de reconocimiento de factores protéicos por secuencias funcionales específicas de ADN lineal, que pueden estar involucrados en mecanismos de regulación transcripcional o de replicación (9,12,22,42,62,65). Las reacciones fueron realizadas en un volumen de 20 μ l en presencia de 10 mM de Hepes a pH 7.9 ; 30 mM de KCl; 10% (v / v) de glicerol, 1mM de DT, 0.5 mM de PMSF, 1 a 2 μ g de Poli dI-dC como ADN competitivo no específico, 4 mM de espermidina. La mezcla se incubó con 5 a 25 μ g de extractos nucleares durante 10 minutos en hielo, posteriormente se agregó 1 a 2 ng de oligonucleótidos de doble cadena marcados radiactivamente con α -³²P (sondas de ADN), se incubaron nuevamente durante 10 minutos en hielo; terminada la incubación, la mezcla se cargó en un gel nativo de poliacrilmida al 6 % (Acrilamida-bisacrilamida 30:0.75, desionizada con resina de intercambio iónico [Amberlita MB-1], conteniendo TBE 0.5X (Tris-Boratos: 44.5 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA); se sometió a electroforesis a 70 volts, durante un tiempo de 1.5 a 2 .5 horas dependiendo del tamaño de la sonda; los geles fueron secados y expuestos en película Kodak X-Omat. Para los experimentos de retardamiento fue necesario tener la secuencia de interés (fragmento de 160 pb con los sitios NF-1 y E2, pKI 8, pKI 12 y el oligonucleótido E2) marcados radiactivamente con α -³²P en posición 3' terminal. A este fragmento se les unió las proteínas NF-1 y E2, quienes formaron un complejo ADN-proteína que migró comparativamente más lento con respecto al ADN libre (sin proteína). Así, estrategia que se utilizó para realizar estos experimentos fue: 1) Preparación de los Extractos Nucleares. 2) Marcaje terminal del ADN

en el sitio Eco R1 usando dATP marcado con ^{32}P en la posición α . 3) Separación y Purificación del fragmento marcado, utilizando los geles de poliacrilamida. 4) Titulación del ADN marcado. 5) Experimentos de retardamiento y 6) Experimentos de competencia.

EXPERIMENTOS DE COMPETENCIA

Para establecer la especificidad de los complejos retardados y el tipo de interacción entre sus componentes, se realizaron competencias homólogas con fragmentos de ADN fríos (no marcados radiactivamente) que poseían las secuencias NF-1, E2 y heterólogas diferentes a éstas.

RESULTADOS

Observamos que el factor NF-1 interactúa con su sitio consenso TTTGGCTT, guardando una posición relativamente conservada en el genoma de los VPH genitales (Figuras 14 y 18). Esta posición se ubica cerca del potenciador epitelio-específico de los VPH entre los sitios E2 sencillos que se encuentran distales de E6 y los sitios E2 imperfectos de los VPH malignos 16,18 y 33; así como, los sitios E2 perfectos en los VPH benignos 6 y 11. El VPH-18 presenta un sitio NF-1 a solo 4 bases del sitio E2 distal y un sitio similar cuyo sitio consenso es TTGGCT que se ubica en la misma posición relativa al potenciador epitelial y los sitios E2 (Figura 2).

Interacción específica de NF-1 con su sitio consenso. En la Figura 15 se demuestra la interacción específica del factor celular NF-1 con su sitio consenso (TTTGGCTT), empleando a pKGEM que es la versión *in vitro* entre los sitios E2 y NF-1 del VPH-18 (Figura 8) y también a pKI 8 en cuya secuencia de 28 pb posee el sitio NF-1 (Figura 8 A). La incubación tanto de pKGEM (carriles a-c) como de pKI 8 (carriles e-g) marcados terminalmente, más extractos nucleares totales de células HeLa, en presencia de poli dI-dC, resultó de la formación del complejo principal denominado NF-1.

Ensayo de Competencia para el sitio NF-1. En la Figura 15A se demuestra el ensayo de competencia del sitio NF-1, empleando a pKGEM marcado, con extractos nucleares totales de células HeLa, carriles (b y e), observamos los complejos CI, CII y CIII. En los carriles (c y d), CI está ausente, debido al empleo de pKI 8 sin marcar (frío). CI por lo tanto corresponde al sitio NF-1. El carril (a) está libre de extracto nuclear.

Interacción de E2 con su sitio consenso. En la Figura 16 se demuestra la interacción de la proteína E2 con su sitio consenso ACCGN₄CGGT, empleando al oligo E2. La incubación de E2 marcado radiactivamente con α -³²P, en extractos nucleares totales de células Cos transfectadas con el plásmido pC59, resultó del complejo principal E2.

Ensayo de competencia para el sitio E2. En la Figura 16 A se demuestra el ensayo de competencia para el sitio E2, empleando a pKGEM marcado con extractos nucleares de células Cos transfectadas con el plásmido pC59, carriles (b y c), donde la banda superior corresponde al sitio E2, en los carriles (d-f), no se observa esta banda debido al empleo

del oligo E2 (frío), que compite el sitio E2. El carril (a) está libre de extracto nuclear.

Nula Interacción entre NF-1 y E2 en la secuencia original del VPH-18. En la secuencia original del VPH-18 (Figura 8), no se ha reportado la existencia de alguna interacción entre el factor NF-1 y la proteína viral E2. De ahí que nuestro interés a realizar un ensayo de retardamiento con esta secuencia NF-1 y E2 separados por cuatro nucleótidos únicamente. Para ello, empleamos a pKGEM que como ya se describió previamente es la versión in vitro de la secuencia original del VPH-18. La incubación de pKGEM marcado con extractos nucleares totales de células HeLa, resultó en la formación de tres complejos denominados CI, CII y CIII. (Figura 17 A). Para determinar a que sitios consensos corresponden éstos, se realizaron los ensayos de competencia donde empleamos al plásmido pKI 8 y a los oligos E2+AP1, rbc S y UPE. Se demostró que el complejo CI corresponde al sitio consenso de NF-1, ya que no es competido por oligos heterólogos no marcados como los que contienen el sitio AP-1 (Figura 17 B, carriles e-f), rbc S (g y h) y UPE (i e j). CI sólo es competido por pKGEM no marcado (Figura 17 B, carriles c y d) como se espera para una interacción ADN-proteína. Por el contrario CII y CIII sí son competidos por los oligos no relacionados y no por el competidor homólogo pKGEM (Figura 17 B, carriles e-j) demostrando que estos complejos son resultado de una interacción inespecífica probablemente no relacionada con el sitio NF-1. La probable interacción de algún factor nuclear con la secuencia blanco de E2, incluida en pKGEM queda eliminada al no existir competencia con el oligo E2+ AP-1, que también contiene un sitio E2 (Figura 17 B, carriles e-f).

Orientación del sitio de unión del factor NF-1 La ubicación de sitios NF-1 en genes humanos expresados en Queratinocitos, Involucrina y VPH genitales (Figura 18) nos muestra una relación importante en la orientación de sus secuencias, presentándose en la dirección 5'-3' o sentido (S) y en la dirección 3'-5' o antisentido (AS), por lo que fué interesante analizar si la secuencia NF-1 tiene preferencia de orientación para su sitio de unión y que ésta sea crucial para alguna interacción con otro factor. En este ensayo de competencia se incubó a pKGEM marcado radiactivamente con α -³²P en extractos nucleares totales de células HeLa, como agentes heterólogos se emplearon a los

oligonucleótidos rbc S (Figura 19, carril e) y UPE (carril h), como agentes homólogos a pKl 12 (carriles c y d) y pKl 8 (carriles a,b,f,g,i). Sin embargo, los resultados nos advirtieron que para pKl 12 con la secuencia de NF-1 (AS) no hubo competencia (Figura 19, carriles c y d), contrario a pKl 8 donde no encontramos el complejo CI característico del sitio de unión de NF-1. Además observamos a los complejos CII y CIII (Figura 19, carriles e y h) ya reportados en este trabajo previamente (Figura 17 B).

Interacción entre el factor NF-1 y la proteína viral E2. Con la finalidad de explorar las posibles relaciones de NF-1 con otros factores importantes para la transcripción viral, como es el caso de E2, se planteó la siguiente estrategia *in vitro*. Aumentar la distancia entre la secuencia original de NF-1 y E2 del VPH-18, empleando a pKGEM (Figura 8) y ligándolo con la secuencia NF-1 de pKl 8 (Figura 8A), es decir, pKGEM + pKl 8. De esta manera, si existe algún bloqueo estérico entre los sitios E2 y NF-1, con este simple ensayo de clonación se eliminará. El resultado de esta clonación fue la obtención de un fragmento de 160 pb, donde la distancia entre el sitio E2 de pKGEM y el sitio NF-1 de pKl 8 es de 28 nucleótidos (Figuras 9 y 12). Se realizaron los ensayos de retardamiento en gel, empleando extractos nucleares de células HeLa y células Cos (transfectadas con pC59, que expresa constitutivamente la proteína E2 del Virus del Papiloma Bovino tipo 1). La incubación simultánea de cantidades limitantes de estos extractos con el fragmento de 160 pb, resultó en la formación de un complejo CE2, que aparentemente es una forma optimizada del complejo formado por E2 con su secuencia blanco (Figura 20). Esta estimulación de la interacción E2-ADN en presencia de NF-1, pudiera resultar de una modificación estructural del ADN propiciada por la interacción de NF-1.

Modelo de la funcionalidad de NF-1. La figura 21 ilustra las posibles funciones de NF-1. Una de ellas es la transcripción viral dependiente de epitelios; pero también NF-1 pudiera estar relacionado con la replicación viral, o bien con la asociación con otros factores nucleares como AP-1, ATF, TFII-D, E2, etc que interactúan con la región control de los VPH

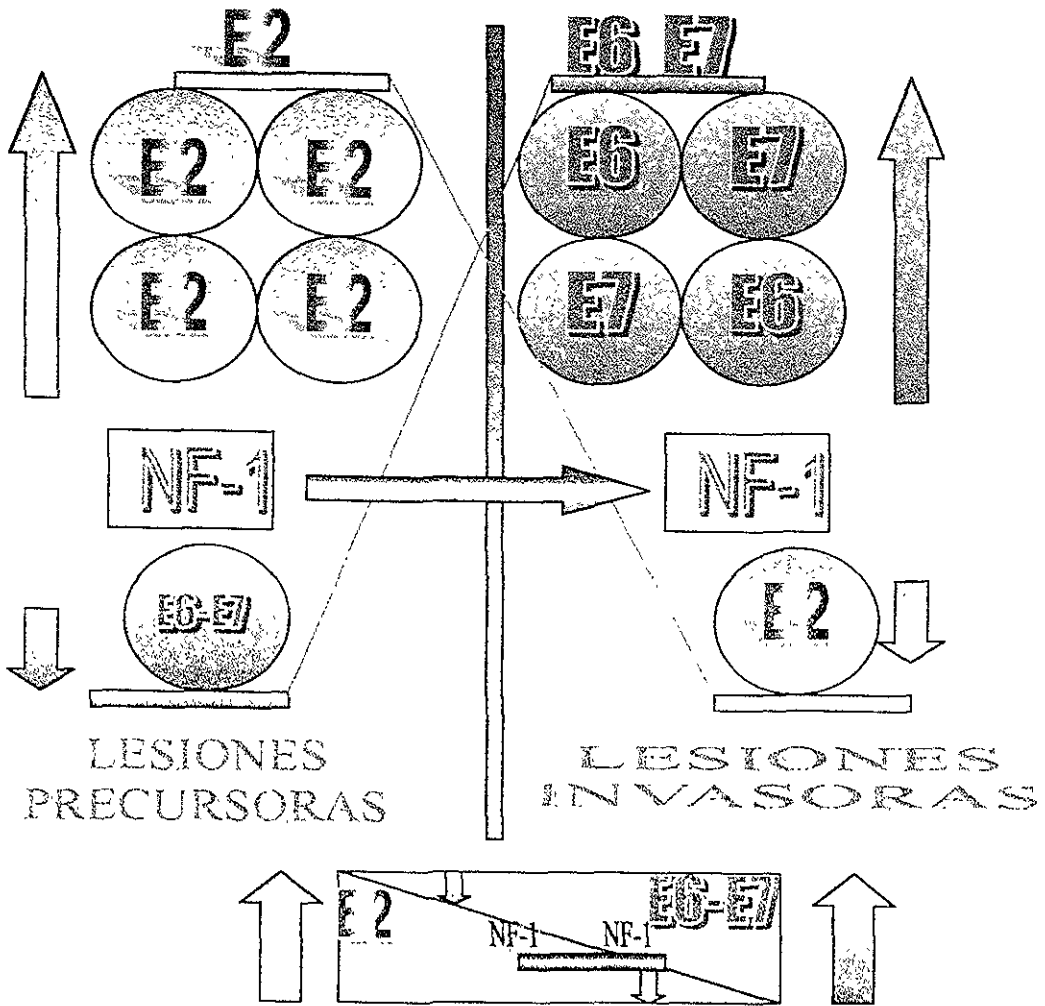
DISCUSION

Mediante la técnica de retardamiento en gel para la determinación y caracterización de los complejos ADN-Proteína, se demostró la existencia específica del factor NF-1 con su sitio consenso (TTTGGCTT), el cual se encuentra presente en las regiones regulatorias (LCR) de los VPH genitales así como, en genes que se expresan en epitelios (Involucrina Humana y Queratinocitos). Este factor se identificó como CI en los ensayos de competencia realizados (Figuras 15A, 17B y 19). Otro factor de suma importancia en los VPH genitales es E2, donde también se demostró la existencia específica de éste con su sitio consenso (ACCGN₄CGGT), el cual guarda una posición relativamente conservada cerca del factor NF-1 en la secuencia nativa (nucleótido 7453 al 7487) del VPH-18 (12). Esta posición de tan solo cuatro nucleótidos de separación entre los sitios E2 y NF-1 (Figura 8), nos motivó a demostrar si existe interacción entre ambos factores. Tomando como base el plásmido pKGEM, que resultó de clonar dicha secuencia nativa, en el sitio Xba-I, del sitio de policonación del vector pGEM 4Z. El resultado fue negativo (Figura 17B), o tal vez la interacción no es posible por un impedimento estérico entre estos dos factores (71). De esta manera, se diseñó una clonación donde se aumentó la distancia entre el sitio E2 y NF-1 de la secuencia original del VPH-18, resultando las construcciones entre pKGEM + pKI 8 y entre pKGEM + pKI 12 (Figura 12), que nos permitieron definir si la orientación 5'-3' o sentido (S) y 3'-5' o antisentido (AS) respectivamente son importantes para la interacción; observamos que la preferencia de orientación en el ensayo de competencia fue la de 5'-3', de tal manera, que la preferencia fue TTTGGCTT (Figura 19).

La inferencia de la interacción entre el complejo proteico NF-1/E2 *in vitro*, fue probada empleando la construcción entre el sitio E2 de pKGEM + el sitio NF-1 de pKI 8. Separados entre sí por 28 nucleótidos que puso de manifiesto, la interacción entre estos dos factores. Al resultar la formación de un complejo (CE2), que aparentemente es una forma optimizada del complejo formado por E2 con su secuencia blanco (Figura 20) Esta estimulación de la interacción E2-ADN en presencia del factor celular NF-1, pudiera resultar de una modificación estructural del ADN propiciada por la interacción de NF-1, sin embargo se requiere de una mayor evidencia para determinar si NF-1 es

un factor importante en la unión de E2. Por lo tanto, la realización de la técnica de Hibridación *in situ* sería la indicada, ya que detecta fragmentos específicos de ADN y proteínas tanto en células como en tejidos. De esta manera, nos permitiría conformar el mapa de las moléculas informacionales (DNA, RNA y Proteínas), que incluyen a los factores celulares como NF-1 y a la proteína viral E2 del RLC del VPH-18. La asociación E2/NF-1 puede ser interesante ya que en la diferenciación de los queratinocitos, podría proporcionar a la proteína E2 una mayor eficiencia de enlace a su secuencia blanco, tal vez por una modificación de la estructura del ADN, haciendo el sitio E2 más accesible a la proteína (42), o bien interactuando directamente con la proteína E2, activando probablemente la transcripción tardía (12). La peculiar distribución de los sitios NF-1 y E2 en el genoma de los VPH genitales malignos y benignos, donde la ausencia de un sitio E2 en los VPHs malignos y la presencia de un sitio NF-1 extra en el VPH-18, sugieren que E2 podría requerir de factores adicionales para llevar a cabo su función (43).

La asociación de la secuencia NF-1 con el sitio GGCACATATTTT en los VPH genitales malignos, sugiere otra posible relación entre NF-1 y otros factores nucleares. Se demostró la interacción de un factor (PVF) con esta secuencia (44). Las implicaciones de esta relación no son muy claras, pero la conservación evolutiva entre esta secuencia y los VPH de la región CE en general, apoyan la idea de una función transcripcional extremadamente importante de estos factores. Esto da soporte a la idea de la necesidad sinérgica entre los factores de la RLC tales como E2, E6 - E7, así como AP-1 y en este caso para NF-1. Al observarse los resultados en lesiones precursoras sobre los niveles de concentración de estos factores y los cambios e implicaciones en las lesiones invasoras. A continuación se muestra el siguiente modelo para una implicación funcional entre estos factores en la LCR de los VPH que desarrollan el CaCU.



Estos resultados nos manifiestan que en las lesiones precursoras, los niveles de la proteína E2 (flechas azules grandes) son altos comparativamente con los niveles de NF-1 (flecha multicolor) y de los oncogenes virales E6-E7 (Flechas verdes pequeñas). Sin embargo, al llevarse a cabo la integración viral, el fragmento E1/E2 es interrumpido (4-6,9,32,36), provocando una disminución considerable de los niveles de E2 (flechas azules pequeñas), es decir, la integración del ADN del VPH en el CaCU proporciona una ventaja selectiva que lleva a la proliferación descontrolada de las células, debido a la expresión

abundante de los genes E6-E7 (flechas verdes grandes). Por lo tanto, la transcripción de los MLA E6-E7, es promovida por factores celulares, a partir de sus promotores naturales dentro de la RLC, que no son afectados durante la integración (4), este puede ser el caso de NF-1, como se aprecia en el modelo, donde se mantiene estable su nivel de concentración. NF-1, puede jugar un papel muy importante en la transcripción de los VPH genitales, al interactuar probablemente con otros factores tales como AP-1, capaces de activar la transcripción del promotor E6-E7, en presencia o ausencia de E2. De esta manera, la activación del promotor de E6 y E7 por agentes activadores de la vía del diacilglicerol (DGA), como lo es AP-1, puede tener implicaciones considerables en la inducción de la transcripción viral temprana, para los genomas de VPH en carcinomas invasivos, con una actividad complementaria del factor NF-1, dependiente de la presencia de la proteína E2. Por otro lado, la expresión diferencial de citoqueratinas y los MLA virales, aunada a la conservación de la secuencia NF-1 y a la expresión de secuencias virales integradas, parecen apoyar la hipótesis de una regulación común para ambos sistemas. Sin embargo, se requiere de mejores mapeos de la actividad potenciadora epitelio-dependiente del EC para saber si la secuencia de NF-1 resulta indispensable para la actividad transcripcional específica. Otra función posible es que NF-1, forme parte de un complejo de preiniciación de la transcripción tejido específica. Esto es, que forme parte de un conjunto de factores necesarios para dar inicio a la transcripción viral en un momento dado del proceso de diferenciación epitelial (12). Esta función transitoria de NF-1, sería análoga a la del factor transcripcional ATF, el cual facilita la unión de la RNAPolimerasa mediante una interacción específica con el ADN y el factor TFIID en los promotores que contienen la caja TATA (27,43,57).

CONCLUSIONES

- 1) El presente trabajo demostró que existe la formación *in vitro* del complejo NF-1 ADN.
- 2) Se demostró que existe la formación *in vitro* del complejo E2 ADN.
- 3) Se demostró que no existe interacción entre la proteína viral E2 y el factor celular NF-1 separados por 4 nucleótidos, tal vez por un impedimento estérico entre estos dos factores.
- 4) Se determinó que la orientación de unión preferencial es 5'-3', del factor NF-1 a su sitio consenso.
- 5) NF-1 se encuentra enriquecido en células derivadas de epitelios estratificados, en relación con células de epitelios simples ó fibroblastos. Esto denota una función de extrema importancia en la epiteliotropía de los VPH genitales.
- 6) El presente trabajo demostró la inferencia de la interacción *in vitro* del complejo nucleoproteico NF-1/E2 al aumentar la distancia de 28 pb.
- 7) Esta inferencia apoya la idea de la actuación sinérgica de varios factores en la RLC de los VPHs genitales y en particular del VPH-18.

GLOSARIO

Amplificación. Producción de copias adicionales de ADN intra o extracromosomales.

Autorradiografía. Detección de moléculas marcadas radiactivamente por su efecto de crear una imagen sobre la película radiográfica.

CAAT, caja. Secuencia conservada, localizada cerca de 75 pb arriba del sitio de inicio de la transcripción de algunos genes eucarióticos, es reconocida por factores como NF-1/CTF y NF-Y, puede estar involucrada en la unión de la RNA polimerasa II.

Cápside. Estructura de naturaleza proteica que protege a manera de cápsula el material genético del virión.

Cis-activación . Activación transcripcional de genes por elementos de control en la misma molécula de ADN.

DNA-ligasa. Enzima que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un grupo 3'-OH y otro 5'-PO₄ adyacentes

Endonucleasa. Enzima que hidroliza enlaces fosfodiéster internos en un polinucleótido.

Enhancer o Potenciador. Secuencia de ADN intensificadora de la transcripción independientemente de su orientación y distancia en relación al promotor.

Enzima de restricción. Endonucleasa que reconoce secuencias de nucleótidos específicas en el ADN, usualmente no metiladas.

Fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Enzima que posee la actividad 5'-3' polimerasa y la 3'-5' exonucleasa, pero carece de la actividad 5'-3' exonucleasa.

Gen. Segmento de ADN que codifica una cadena polipeptídica .

Marco de Lectura Abierta. Región de ADN comprendida entre un codón de iniciación y otro de terminación, potencialmente traducible, contiene tripletes que codifican para aminoácidos.

Nucleótido. Unidad básica de la estructura del ADN, consta de tres partes: un azúcar (ribosa o desoxirribosa), una base nitrogenada (adenina, citosina, guanina y timina o uracilo) y un grupo fosfato (PO₄).

Oncogen. Versión alterada de un gen cuya expresión anómala contribuye a que una célula normal se transforme en cancerosa

Ori (origen). Secuencia de ADN en la cual se inicia la replicación.

Palíndromo. Secuencia de ADN que es la misma cuando es leída de izquierda a derecha o de derecha a izquierda, consiste de repetidos invertidos adyacentes.

Par de bases. Dos bases nitrogenadas que se complementan por puentes de hidrógeno en ADN o ARN de doble cadena.

Plásmido. Moléculas de ADN bicatenario, circular, extracromosomal, de tamaño pequeño, se replica independientemente de su célula huésped y determina rasgos genéticos accesorios no codificados usualmente por el cromosoma bacterial.

Promotor. Región de ADN que contiene señales de inicio de la transcripción, unión (caja TATA) y orientación (caja CAAT) para las RNA polimerasas.

Represor. Proteína que se une a una secuencia en el ADN, inhibiendo la transcripción de los genes adyacentes.

Secuencia consenso. Es una secuencia idealizada en la cual cada posición representa la base encontrada en un mayor número de veces, cuando se comparan varias secuencias de ADN.

TATA caja. Es un heptámero conservado rico en A-T, cerca de 25 pb arriba del punto de inicio de la transcripción de un gen, puede estar involucrada en la orientación de la RNA polimerasa II para el inicio de la transcripción.

Transactivación. Regulación transcripcional positiva de genes ubicados en secuencias de ADN distintas a la del elemento control.

Transcripción. Transferencia de la información genética codificada en las cadenas de ADN a una secuencia de nucleótidos de ARN.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Dang, Ch. V. & Semenza, G. L. (1999). Oncogenic Alteration of Metabolism. *TIBS* 24 February 68-72.
- 2) Lewin, B. (1997). *Genes VI*. Oxford. University Press. 1239.
- 3) Roman, A., & Fife, K.H. (1989). Human Papillomaviruses : Are Ready to Type?. *Clin Microbiol Review* Vol. 2 No. 2: 166-190.
- 4) Dürst, M., Schwarz, E., Gissman, L. (1986). Integration and persistence of human papillomavirus DNA in genital tumors. En: *Banbury report 21: Viral etiology of cervical cancer*. (Peto, R., Howley, P.M. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory. CSH. N.Y. 273.
- 5) Zur Hausen, H., and Schneider, A. (1987). The role of Papillomavirus in Human Anogenital Cancer. In *The Papovaviridae*, vol 2 245-263. Edited by N. P. Salzman, And, P.M. Howley. New York : Plenum Press.
- 6) Pfister, H. (1987). Human Papillomaviruses and Genital Cancer. *Adv Cancer Res* 48:113-147.
- 7) de Villiers, E.M. (1989). Heterogeneity of the Human Papillomavirus Group. *J Virol* 63 (11): 4898-4903.
- 8) Giri, I. Danos, O. (1986). Papillomaviruses genomes: from sequence data to biological properties. *TIG* 2: 227-232.
- 9) Thierry, F. and Yaniv, M. (1987). The BPV1-E2 Trans-Acting Protein Can Be Either an Activator or a Repressor of the HPV-18 Regulatory Region. *EMBO Journal*. 6 : 3391-3397.
- 10) Barroso, E. (1986) Registro Nacional de Cáncer; Estado Actual y Perspectivas *Revista del InCan* 32: 190-196.
- 11) Gariglio, P., Ocádiz, R., y Saucedo, R (1987) Human Papillomavirus DNA Sequences and c-myc Oncogene Alterations in Uterine Cervix Carcinoma *Cancer Cells* 5:343-348
- 12) García- Carrancá, A , Thierry, F. and Yaniv, M (1988) Interplay of Viral and Cellular Proteins along the Long Control Region of Human Papillomavirus Type 18. *J Virol* 62: - 4321-4330

- 13) Spalholz, B.A., McBride, A., Safari, T., and Quintero, J (1993). Binding of Bovine Papillomavirus E1 to the Origins Is Not Sufficient for DNA Replication. *Virology* 193:201-209.
- 14) Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremmlau, and Zur Hausen, H. (1985). Structure and Transcription of Human Papillomavirus Sequences in Cervical Carcinoma Cell. *Nature London* 314 : 111-114.
- 15) Butz, K., and Hopp-Seyler, T. (1993). Transcriptional control of human papillomavirus (HPV), oncogene expression composition of the HPV type 18 upstream regulatory region *J Virol* 67(11) : 6476-6486.
- 16) Matsukura, T., Iwasaki, T., and Kawashima, M. (1992). Molecular Cloning of a Novel Human Papillomavirus (Type 60) from a Plantar Cyst with Characteristic Pathological Changes. *Virology* 190:561-566.
- 17) Gissman, L. and Schneider, A. (1986). Human Papillomavirus DNA in Preneoplastic and Neoplastic Genital Lesions. In Peto, R. and zur Hausen, H. (eds), "Viral Etiology of Cervical Cancer" Cold Spring Harbor Lab. Banbury Report 21: 217-224.
- 18) Swift, F.V., Bhat, K., Youngusband, H.F., and Hamada, H. (1987). Characterization of a cell type-specific enhancer found in the human papillomavirus type 18 genome. *The EMBO Journal* 6 (5) :1339-1344.
- 19) Elder, G.A., Liang, Z., Li, Ch, and Lazzarini, R.A. (1992). Targeting of Sp1 to a non Sp1 site in the human neurofilament (H) promoter via an intermediary DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* 20 (23) : 6281-6285.
- 20) Lazo, P. A. (1987). Structure, DNase I hypersensitivity and expression of integrated papillomaviruses in the genome of HeLa cells EUR. *Journal of Biochemistry* 165:2365-2375.
- 21) Shirasawa, H., Tomita, Y., Sekiya, S., Takamizawa, H. and Simizu, B. (1987) Integration and Transcription of Human papillomavirus Type 16 and 18 Sequences in Cell Lines Derived from Cervical Carcinomas. *J Gen Virol* 68:583-588.
- 22) Gloss, B., Chong, T., and Bernard, H. V. (1989). Numerous Nuclear Protein Bind the long Control Region of Human Papillomavirus Type 16: A subset of 6 of 23 DNAase I-Protected Segments Coincides with the Location of the Cell-Type-Specific Enhancer. *J Virol* 63 (3) : 1142-1152

- 23) Galehouse, D., Venison, E., and De Lucia, A. (1992). Differences in the Integration Pattern and Episomal Forms of Human Papillomavirus Type 16 DNA Found within an Invasive Cervical Neoplasm and Its Metastasis. *Virology* 186 : 339-341.
- 24) Lungu, O., Crum, C.P., and Silverstein, S. (1991). Biologic Properties and Nucleotide Sequence Analysis of Human Papillomavirus Type 51. *J Virol* 65 (8): 4216-4221.
- 25) Hawley-Nelson, P., Androphy, E. J., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1988). The Specific DNA Recognition Sequence of the Bovine Papillomavirus E2 Protein is an E2-Dependent Enhancer. *EMBO Journal* 7 : 525-530.
- 26) Chow, L. T., Hirochika, H., Nasser, M., Stoler, M. H., Wolinsky, S. M., Chin, M. T., Hirochika, R., Arvan, D. S. and Broker, T. R. (1987). Human Papillomavirus Gene expression. *Cancer Cells* 5 : 55-72.
- 27) Horikoshi, M.; et al. (1988). Transcription Factor ATF interacts with the TATA Factor to Facilitate Establishment of a Preinitiation Complex. *Cell* 54 : 1033-1038.
- 28) Gloss, B., and Hans-Ulrich, B. (1990). The E6/E7 Promoter of Human Papillomavirus Type 16 Is Activated in the Absence of E2 Proteins by a Sequence-Aberrant Sp1 Distal Element. *J Virol* 5 : 577-586.
- 29) Seedorf, K., Krämer, G., Dürst, M., Suhai, S. and Röwekamp, W. G. (1985) Human Papillomavirus Type 16 DNA Sequence. *Virology* 145 : 181-185.
- 30) Chin, M.T., Hirochika, R., Hirochika, H., Broker, T. R., and Chow, L. T., (1988). Regulation of Human Papillomavirus Type 11 Enhancer and E6 Promoter by Activating and Repressing Protein from the E2 Open Reading Frame: Functional and Biochemical studies. *J Virol* 62 (8) : 2994-3002.
- 31) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning : A laboratory manual*. Cold Spring Harbor. Lab Press. N. Y. USA.
- 32) Ham, J., Dostatni, N., Gauthier, J. M., and Yaniv, M. (1991). The papillomavirus E2 protein : a Factor with many talents. *TIBS* 16 : 1-10.
- 33) Pirisi, L. (1988). Continuous Cell Lines With Altered Growth and Differentiation Properties Originate After Transfection of Human Keratinocytes With Human Papillomavirus Type 16 DNA. *Carcinogenesis* 9 : 1573-1577.

- 34) Cripe, T.P., Haugen, T.H., Turk, J.P., Tabatabai, F., Schmid, P.G., Dürst, M., Gissmann, L., Roman, A., and Turek, P.L. (1987). Transcriptional Regulation of the Human Papillomavirus-16 E6-E7 Promoter by a Keratinocyte-Dependent Enhancer, and by Viral E2 Trans-Activator and Repressor Gene Products : Implications for Cervical Carcinogenesis. *EMBO Journal* 6 (12) : 3745-3753.
- 35) Androphy, E. J., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1987). A peptide encoded by the bovine papillomavirus E2 trans-acting gene binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature London* 325 : 70-75.
- 36) Sang, B.Ch., and Barbosa, M. (1992). Increased E6/E7 Transcription in HPV18 Immortalized Human Keratinocytes Results from Inactivation of E2 and Additional Cellular Events. *Virology* 89 : 448-455.
- 37) Guido, M., Zamorano, R., Garrido, E., Gariglio, P., and García-Carranca, A. (1992). Early Promoters of Genital and Cutaneous Human Papillomaviruses are differentially regulated by the Bovine Papillomavirus Type 1 E2 Gene Product. *J Gen Virol* 73 : 1-6.
- 38) Shirasawa, H. (1987). Transcriptional Differences of the Human Papillomavirus Type 16 Genome between Precancerous Lesions and Invasive Carcinomas. *J Virol* 62:1022-1027.
- 39) Marshall, M.S., and Hettich, L. A. (1993). Characterization of Ras effector mutant interactions with the NF1-GAP related domain. *Oncogene* 8 : 423-431.
- 40) Spalholz, B. A., et al. (1987). Bovine Papillomavirus Transcriptional Regulation : Localization of the E2-Responsive Elements of the Long Control Region. *J Virol* 61: 2128-2137
- 41) Sandler, A. B., Baker, C.C., and Spalholz, B. A. (1996). Sp1 is critical for basal and E2-transacted transcription from the bovine papillomavirus type 1 P89 promoter. *J Gen Virol* 77 : 189-194.
- 42) Thery, F., García-Carranca, A. & Yaniv, M. (1987). Elements that control the transcription on genital human papillomavirus type 18. *Cancer Cells* 5, 23-32
- 43) Nikolov, D.B., Hu, S.H., Lin, J., Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Chua, N. H., Roeder, R. G. and Burley, S. K (1992) Crystal structure of TFIID TATA box binding protein. *Nature London* 360 (5) 40-46

- 44) Sowden, M.; (1989). Multiple Cooperative Interactions Constrain BPV-1 E2 Dependent Activation of Transcription. *Nucleic Acids Res* 17: 2959-2965.
- 45) Chan, W.K., et al. (1990). Transcription of the Transforming Genes of the Oncogenic Human Papillomavirus 16 is Stimulated by tumor promoters through AP1 Binding Sites. *Nucleic Acids Res.*, 18 :763-768.
- 46) Nakshatri, H., Pater, M. M., and Pater, A, (1990). Ubiquitous and Cell-Type – Specific Protein Interactions with Human Papillomavirus Type 16 and Type 18 Enhancers. *Virology* 178 : 92-98.
- 47) Hofmann, K. J., Neeper, M. P., Markus, H. Z., Brown, D. R., Müller, M. and Jansen, K. U. (1996) Sequence Conservation within the Major Capsid Protein of Human Papillomavirus (HPV) type 18 and Formation of HPV-18 virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Virol* 77 : 465-468.
- 48) Bayghen, E., Vega, A., Cadena, A., Granados, S., Javel, L. F., Gariglio, P., and Alvarez-Salas, L. M. (1996). Transcriptional Analysis of the 5' Noncoding Region of the Human Involucrin Gene. *J Biol Chem* 271 (1) : 512-520.
- 49) Steger, G., Gorbach, S., (1998) Dose-dependent Regulation of the Early Promoter of Human Papillomavirus Type 18 by the Viral E2 Protein. *J Virol*. 71(1) : 50-58.
- 50) Terry, G, Ho, L, Cuzick, J. (1997). Analysis of E2 aminoacid variants of Human Papillomavirus Type 16 and 18 and their associations with lesion grade and HLA-DR/Type Int J Cancer 73 (5) : 651-655.
- 51) De saintes, C., Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M., Thierry, F. (1997). Expression of the Papillomavirus E2 Protein in HeLa cells lead Apoptosis. *EMBO Journal*. 6 (3) : 504-514.
- 52) Demeret, C, Desaintes, C., Yaniv, M., Thierry, F. (1998). Different mechanisms contribute to the E2 –mediated Transcription Repression of Human Papillomavirus Type 18 Viral Oncogenes. *J Virol* 71 (12) : 9343-9349.
- 53) Medina-Martínez, O., Morales-Peza, N., Yaniv, M., García-Carranca, A., Thierry, F. (1996). A single element mediates glucocorticoid hormone response of H with no functional interactions with AP-1 or hbrm *Virology* 217 (1) : 392-396.
- 54) Phillips, B, Bednarek, P., Gandhi, S, Lee, E. B. (1997). Genomic foot printing of

- the HPV18 enhancer. Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res 38 : 1078-1085.
- 55) Lefebvre, O., Steger, G., and Yaniv, M. (1997). Synergistic Transcriptional-activation by the Papillomavirus E2 Protein Occurs After DNA Binding and Correlates with a change in Chromatin Structure. *J Mol Biol* 266 : 465-478.
- 56) Sjøttem, E., Andersen, C., and Johansen, T. (1997). Structural and Functional Analyses of DNA Binding Induced by SP 1 Family Transcription Factors *J Mol Biol* 267 : 490-504.
- 57) Ham, J., Steger, G., and Yaniv, M. (1994). Cooperativity in vivo between the E2 transactivator and the TATA box binding protein depends on core promoter structure. *EMBO Journal*. 13 :147-153.
- 58) Thierry, F., and Yaniv, M. (1993). Proteins involved in the control of HPV Transcription. *Papillomavirus Report* 4 : 27-34.
- 59) Secretaria de Salud. Principales Resultados de la Estadística sobre Mortalidad en México 1996. *Revista Salud Publica Mex.* (1997). 39 (5) : 486-490.
- 60) Howley, P.M. (1996). Papillomaviridae and their Replication In "Fundamental Virology". (Fields, B. N., Knipe, D. M and Howley, P. M. Eds): 947. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, P. A.
- 61) Gauthier, J.M., Dostatni, N., Lusky, M., and Yaniv, M. (1991). Two DNA bound E2 dimers are required for strong transcriptional activation and for cooperation with Cellular-Factore in most Cell. *New Biol.* 3: 498-509.
- 62) Gronostajsky, R. M. (1987). Site specific DNA Binding of Nuclear Factor 1: Effector the Spacer Region. *Nucleic Acids Res* 15: 5545-5559.
- 63) Cole, S. T. and Strrek, R. E. (1986). Genome Organization and Nucleotide Sequence of Human Papillomavirus Type 33, Wich is Associated with Cervical Cancer. *Journal of Virol* 58 . 991-995.
- 64) Cole, S. T. and Danos, O (1987). Nucleotide Sequence and Comparative Analysis of the Human Papillomavirus Type 18 Genome. Phylogeny of Papillomavirus and Repeated Structure of the E6 and E7 gene Products *J Mol Biol* 193 : 599-608.
- 65) Gius, D, et al (1988) Inducible and Constitutive Enhancer Domains in the Non-Codin Region of Human Papillomavirus Type 18. *J Virol* 62 . 665-672

- 66) Schlegel, R.; Phelps, W. C., Zhang, Y., Barbosa, M. S. (1988). Quantitative Keratinocyte assay identifies Papillomaviruses Types A associated with Human Cervical Carcinoma and Detects Two Distinct Viral Activities. *EMBO Journal*. 7 : 3181-3186.
- 67) Bernard, B. A., Bailly, C., Lenoir, M. C., Darmon, M., Therry, F. & Yaniv, M.(1989).The Human Papillomavirus Type 18 (HPV 18) E2 gene product is a repressor of the HPV-18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 63, 4317-4324.
- 68) Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166 : 557-559.
- 69) Barbosa, M.S., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J. T., Lowy, D. R., and Vousden, K H (1990). The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1 and SV40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO Journal*. 9, 153-160.
- 70) Munger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M., & Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 Genes of the Human Papilloma Virus Type 16 Together are Necessary and Sufficient for Transformation of Primary Human Keratinocytes. *J Virol* 63, 4417-4421
- 71) Kopka, M.L., Fratini, A.V., Drew, H.R., Dickerson, R.E. (1983) Ordered water structure around a B-DNA dodecamer. A quantitative study. *J Mol Biol* 163 (1) 129-146.

FIGURAS

Figura 1. Organización del material genético del VPH-18.

Los Marcos de Lectura Abierta (MLA) corresponden a los genes de la región temprana (E), que se encuentran representados por las cajas amarillas, destacando E2 como una proteína transreguladora de la transcripción, que actúa como un represor en la región promotora de la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7, esto en células normales. Las cajas moradas representan los genes de la región tardía (L), que codifican para las proteínas de la cápside del virus. La RLC es una región no codificadora de aproximadamente 1000 pb (de -1035 a -35) en la que se ha identificado sitios de unión para factores transreguladores tanto celulares como virales.

Figura 2. Región Larga de Control (RLC) del VPH-18.

Una pequeña parte del genoma del virus es la RLC de 1 Kb (representada por la barra horizontal azul), donde se encuentra el origen de la replicación (P-105) y algunos sitios consensos para los factores celulares y virales que juegan un papel importante en la transcripción del VPH-18. Donde apreciamos 4 sitios para la proteína E2 (cuadrados amarillos), 4 sitios NF-1 (hexágonos morados), 1 caja TATA, 1 sitio AP-1, 2 sitios OCTA, 1 sitio GRE-2, 1 sitio GRE-1 y un Potenciador constitutivo que comprende entre el sitio E2 y GRE2.

FIGURA 3. Mapa Funcional de la LCR de VPH-18.

En la RLC de los VPH genitales existen 3 regiones potenciadoras (Elementos Responsivos) que a continuación se describen: a) ER2, regulado por E2 ubicado cerca del origen de la transcripción de E6 y E7. b) EC (Elemento Constitutivo), responsivo en epitelios, cuya similitud de secuencia entre todos los VPH reside en dos secuencias, una de alto potencial oncogénico GGACATATTTT (Pentágono verde) y la otra presente en los VPH genitales TTTGGCTT (elipse azul) que corresponde a NF-1; c) ER6, elemento responsivo a la proteína E6. Se aprecian también los sitios: E2 perfectos (rectángulos amarillos oscuros) e imperfectos (rectángulos blancos), AP-1 (círculos), caja TATA (cuadrado gris) y caja CAAT (triángulo).

Figura 4. Disección Molecular de la Proteína E2.

La proteína viral manifiesta sus 3 divisiones funcionales A) Dominio amino terminal con función activadora de la transcripción, (B) Dominio central que debido a su alto contenido de prolinas, es considerado una especie de bisagra y (C) Dominio carboxilo terminal que reconoce la secuencia blanco ACCGN₄CGGT del ADN.

Figura 5. Esquema de la Organización de los Epitelios Estratificados.

Los epitelios estratificados de los mamíferos, están compuestos principalmente por queratinocitos. Estas células están dispuestas en capas sucesivas con diferentes estadios de diferenciación: el estrato basal o germinativo posee la actividad mitótica del tejido, mientras que en las etapas intermedias (estrato espinoso y granuloso), las células cesan su división e inician un programa de diferenciación (queratinización). Las capas externas que forman el estrato córneo, están constituidas por células muertas totalmente queratinizadas y son eliminadas por descamación. Los VPH son dependientes del ambiente provisto por la diferenciación terminal de los queratinocitos para desarrollar su ciclo lítico. Las lesiones preinvasoras e invasoras del cuello del útero se presentan como una serie de cambios que empiezan generalmente como una Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), es decir, empiezan con una lesión bien diferenciada. La primera en aparecer es la NIC I o displasia leve; la siguiente es NIC II o displasia moderada y por último la NIC III que comprende la clásica displasia severa y el carcinoma *in situ*, para finalmente terminar en el carcinoma invasor. Estos estadios se caracterizan por un incremento progresivo en el número de células indiferenciadas y malignas, con un decremento en la diferenciación celular superficial, paralela al incremento de la severidad de la NIC

Figura 6. Esquema de la Realización de un Ensayo de Retardamiento en Gel.

Metodología empleada para el estudio de interacciones ADN-Proteína, que caracterizan la actividad de reconocimiento y unión de factores nucleares proteicos a secuencias cortas de ADN. Que son visualizadas en geles nativos de poliacrilamida, donde permite separar complejos retardados de ADN-Proteína de fragmentos de ADN libres de factores, basándose en las diferencias de su movilidad electroforética. Para llevar a cabo esta metodología es necesario: 1) contar con líneas celulares 2) obtener de ellas sus extractos nucleares 3) Incubarlos con sondas radiactivas 4) Cargar el gel de poliacrilamida con los

extractos nucleares y las secuencias de ADN marcados y 5) por autoradiografía analizar los resultados.

Figura 7 Polilinker de pGEM 4Z.

El plásmido pGEM 4Z consta de 2746 pb, con sus respectivos promotores (SP6 y T7) y su sitio de clonación múltiple (polilinker) donde tiene sitios únicos de las enzimas de restricción. Siendo de gran importancia sus sitios flanqueantes Eco RI y Hind III que nos fueron útiles para la realización de las clonaciones al igual que el sitio Xba I.

Figura 8 Construcción Plasmídica: pKGEM

pKGEM resultó de clonar la secuencia de 36 pb en el sitio Xba-I del plásmido pGEM 4Z donde está presente el sitio E2 (ACCGN₄CGGT) y NF-1 (TTTGGCTT) separados entre sí por cuatro nucleótidos, como lo está en la secuencia original del VPH-18. Esta construcción es de suma utilidad para la realización de los ensayos de retardamiento así como, de las construcciones plasmídicas sucesivas.

Figura 8A Construcción Plasmídica: pKI 8

pKI 8 resultó de clonar la secuencia de 28 pb en el sitio Xba-I del plásmido pGEM 4Z, donde está presente el sitio NF-1 en el sentido de transcripción 5'-3' (TTTGGCTT). Esta construcción fue imprescindible en la realización de la nueva clonación que tuvo por objetivo aumentar la distancia entre E2 de pKGEM y el sitio NF-1 de pKI 8. Para demostrar la interacción entre estos dos factores mediante ensayos de retardamiento.

Figura 8B Construcción Plasmídica: pKI 12

PKI 12 es el resultado de la clonación del oligonucleótido NF-1 en el sentido de transcripción 3'-5' (AAGCCAAA), en el sitio Xba I del polilinker de pGEM4Z. Con esta clonación se probó mediante ensayos de competencia el sentido de la interacción entre E2 y NF-1.

Figura 9 Construcciones plasmídicas para obtener el fragmento de 160 pb. Estas construcciones se plantearon para clonar a pKGEM + pKI 8 con sitios de unión Hind III y sitios de corte Eco RI para recuperar el fragmento de 160 pb y de igual forma se hizo lo propio con pKGEM + pKI 12 donde se obtuvo el fragmento de 160 pb con sitio NF-1 en dirección 3'-5'

Figura 10 Enzimas de Restricción. Las enzimas de restricción o endonucleasas, reconocen la ausencia de grupos metilos en los sitios apropiados, por lo tanto, actúan en estos sitios. Originando 2 tipos de cortes a) Cohesivos o asimétricos, como en Eco RI y Hind III que dejan en los extremos liberados por el corte, pequeñas prolongaciones ya sea en el extremo 5' o en el 3'; b) Romos o simétricos como en el caso de Hind II.

Figura 11 Selección de candidatos. Mediante la realización de geles de agarosa al 1%, se verificó los candidatos: pKI 8 de 2830 pb en el gel A, carriles A-D, pKI 12 de 2830 pb en el gel B, carriles O y P, pKGEM de 2838 pb en el gel B, carriles Q-S. Tanto los carriles a y b del gel A así como en el gel B, el carril a, corresponde al marcador de peso molecular SAU 3A-1.

Figura 12 Obtención del fragmento de 160 pb. Producto de la clonación (Figura 9) se obtuvo el fragmento de 160 pb, este se puede apreciar en el corrimiento del gel de poliacrilamida al 6%. Carril 1, Marcador de peso molecular λ BstE II, que presenta 14 fragmentos de los cuales nos interesan los fragmentos: 4, de 5686 pb; 13, de 224 pb y 14, de 117 pb; carril 2, Marcador de peso molecular SAU 3A-1; carriles 3 y 5, pKGEM + pKI 8 unidos en el sitio Hind III y cortados con Eco RI donde se observa el fragmento de 160 pb, localizado entre el fragmento 13 y 14 del marcador de peso molecular λ BstE II; carriles 4,6,7 y 9, pKGEM+pKI 8 unidos en sitios Hind III sin restringir con Eco RI, observando que se encuentra en el cuarto fragmento del marcador λ BstE II, carriles 8 y 10; pKGEM + pKI 8 unidos en sitios Hind III y donde se aprecia que Eco RI no restringió adecuadamente.

Figura 13 Marcaje Terminal Radiactivo con el fragmento Klenow. La actividad de la polimerasa 5'-3' de la subunidad mayor del ADN polimerasa (fragmento Klenow), incorpora nucleótidos ante un corte enzimático cohesivo, de tal forma que se rellena sus extremos por los nucleótidos marcados con [α -³²P] dATP representados con círculos de colores)

Figura 14 Posición Relativa de los Sitios NF-1 y E2 en la RLC de los VPH Genitales. Las posiciones de los sitios NF-1 y E2 dentro de la RLC de los VPH genitales manifiestan que éstas se mantienen conservadas, tanto en los VPH genitales

de baja (6b y 11) y alta oncogenicidad (16,18 y 33). Apreciándose los 4 sitios E2 perfectos (rectángulos azules) y 1 sitio NF-1 en los VPH de alta incidencia y de baja oncogenicidad. A diferencia de los de alta oncogenicidad y baja incidencia con 3 sitios E2 perfectos y 1 sitio E2 imperfecto (rectángulo blanco) además, de 2 sitios NF-1 en el VPH-18.

Figura 15 NF-1 interáctua con su sitio consenso. La afinidad de NF-1 con su sitio consenso (TTTGGCTT) se apreció en geles de retardamiento, empleando a los plásmidos pKGEM y pKl 8. Carriles L y d, libres de extracto de células HeLa; carriles (a-c), con 0.5 ng de pKGEM marcado terminalmente con α -³²P-dATP más 3,6 y 9 μ g de extracto nuclear de células HeLa, en presencia de 0.5 μ g de (poli dI-dC) (poli dI-dC). Carriles (e-g), igual que en los carriles (a-c), pero con el empleo de pKl 8 más 2,4 y 6 μ g de extracto nuclear de células HeLa. Se observa el complejo ADN - NF-1.

Figura 15 A Ensayo de competencia para el sitio NF-1. El ensayo de competencia se realizó para determinar la especificidad del sitio NF-1. Carril a, ADN sin extracto nuclear de células HeLa; carriles (b-e), ADN incubado con 7 μ g de extracto nuclear de células HeLa; carriles b y e, con 5 ng de pKGEM marcado terminalmente, en presencia de 0.5 μ g de (poli dI-dC). Carriles c y d, con 20 y 100 ng respectivamente de pKl 8.

Figura 16 E2 interáctua con su sitio consenso. La afinidad de E2 con su sitio consenso (ACCGN₄CGGT) se demostró en geles de retardamiento. Carril a, libre sin extracto de células Cos + pC59; carriles (b y c), con 0.5 ng de nucleótido E2, marcado terminalmente con α -³²P-dATP más 2 y 4 μ g de extracto nuclear de células Cos + pC59, en presencia de 0.5 μ g de (poli dI-dC) (poli dI-dC). Apreciándose el complejo ADN-E2.

Figura 16 A Ensayo de competencia para el sitio E2. El ensayo de competencia se realizó para determinar la especificidad del sitio E2. Carril a, ADN sin extracto nuclear, carriles (b-f), ADN incubado con 4 μ g de extracto nuclear de células Cos + pC59, carriles (b y c), incubados con 0.5 ng de pKGEM marcado terminalmente. Carriles (d-f), incubados con 20, 50 y 100 ng de oligonucleótido E2 frío.

Figura 17A Formación de los complejos CI, CII y CIII. El ensayo de retardamiento en gel se realizó incubando 0.5 ng de pKGEM (Figura 8), marcado terminalmente con α - 32 P-dATP (6000 Ci/ mmol) en las condiciones descritas en Material y Métodos con las excepciones indicadas. Carril a, ADN sin extracto; carriles (b-d), incubación del ADN con cantidades crecientes de extracto nuclear de células HeLa (3,6,9 μ g respectivamente) en presencia de 0.5 μ g de (poli dI-dC) (poli dI-dC); carriles (e-g), igual que en los carriles b-d, pero en presencia de 1 μ g de (poli dI-dC) (poli dI-dC). CI, CII y CIII representan los complejos ADN-Proteína formados.

Figura 17 B Determinación específica del complejo CI y la nula interacción entre NF-1/E2 de la secuencia original del VPH-18. Los ensayos de competencia se realizaron para determinar la especificidad de estos complejos. Carril a, ADN sin extracto nuclear de células HeLa; carril b, ADN incubado con 7 μ g de extracto nuclear de células HeLa; carriles (c-j), igual que b más 20 y 100 ng del oligo competidor: pKGEM (carriles c y d), E2+AP-1 (e y f), rbcS (g y h) y UPE (i e j).

Figura 18 Ubicación de NF-1 en genes expresados en epitelios y en la LCR de los VPH genitales. Se ilustra la posición relativa del factor NF-1 con respecto a la posición de la caja TATA en pb, así como su secuencia y orientación en Queratinocitos Humanos (QH), Involucrina Humana y en los VPH genitales.

Figura 19 Preferencia en la orientación del sitio de unión a NF-1. Los ensayos de competencia se realizaron con la finalidad de probar la orientación (S) o (AS) de NF-1. Carriles (a-i) 0.5 ng de pKGEM marcado terminalmente y 7 μ g de extracto de células HeLa; más 20 y 100 ng del oligo competidor: pKI 8 (carriles a y b); pKI 12 (carriles c y d), 100 ng de competidor: rbc S (carril e); UPE (carril h) y con 50,75 y 90 ng de competidor pKI 8 (carriles f,g,i) apreciándose los complejos CI, CII y CIII (carriles e y h).

Figura 20 Interacción entre NF-1/E2. La interacción de NF-1 con la proteína E2 se probó en ensayos de retardamiento, empleando la clonación entre pKGEM + pKI 8 (Figura 9 y 12) y cantidades limitantes de extractos nucleares de células HeLa (2 μ g) y células Cos transfectadas con el plásmido C59 que expresa E2 constitutivamente (5 y 10 μ g). Carril a, ADN con extracto COSE2; carriles (e-g), ADN incubado con extracto HeLa y

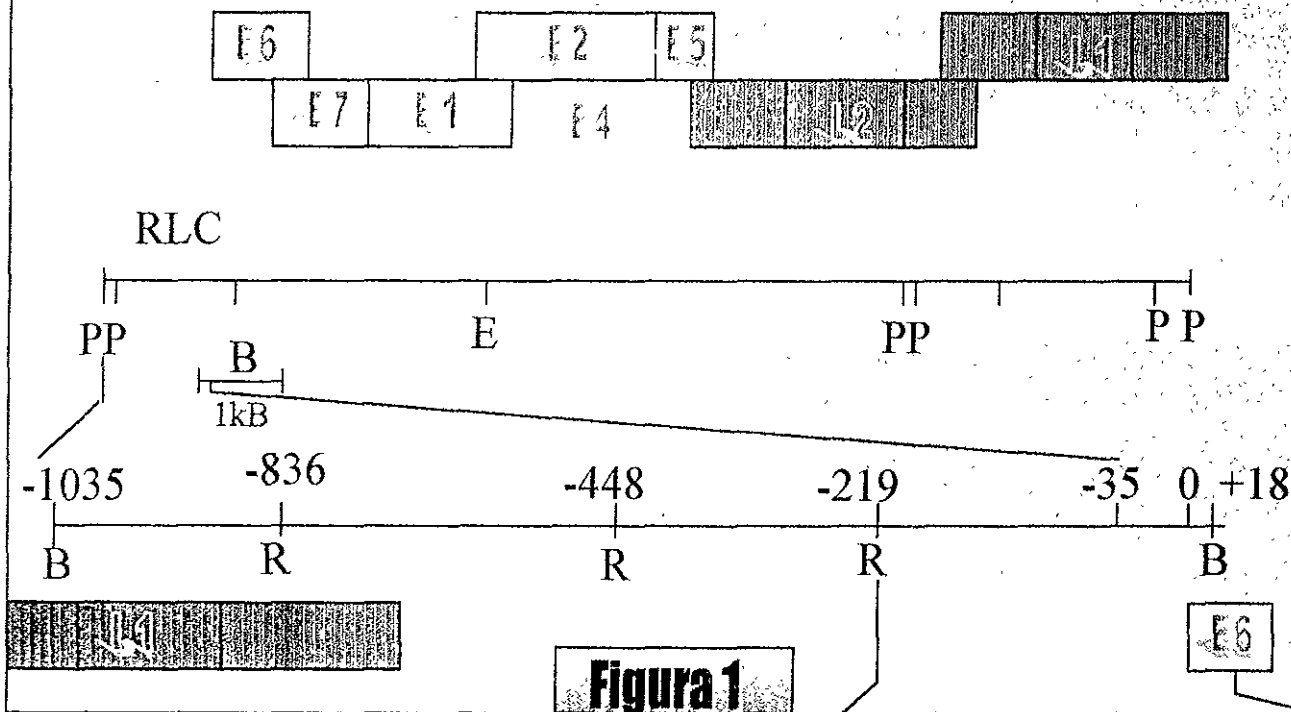
posteriormente con extracto COSE2 (b y c), con la incubación simultánea de los dos extractos (d y e) e incubado con extracto E2 y posteriormente con extracto HeLa (f y g).

CI, complejo específico ADN-NF-1; CE2 complejo ADN-E2.

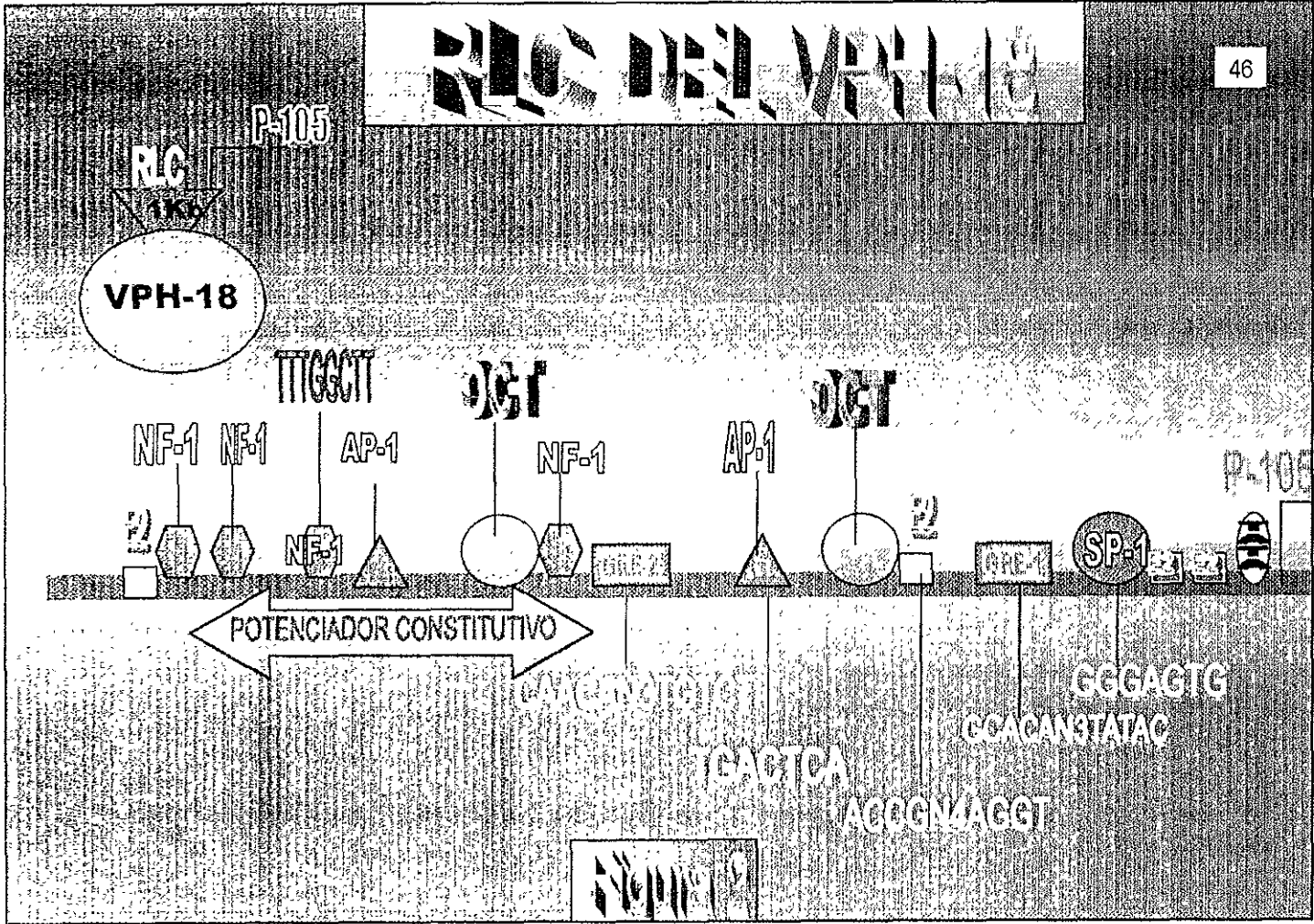
Figura 21 Modelo de la funcionalidad de NF-1. Se muestra las posibles funciones de NF-1 en la replicación, transcripción viral dependiente de epitelios o bien en la asociación sinérgica con otros factores celulares y/o virales.

ORGANIZACION DEL MATERIAL GENETICO DEL VPH-18

45



RIO DEL VENTIL



MAPA FUNCIONAL DE FABRICA DEL VPH-18

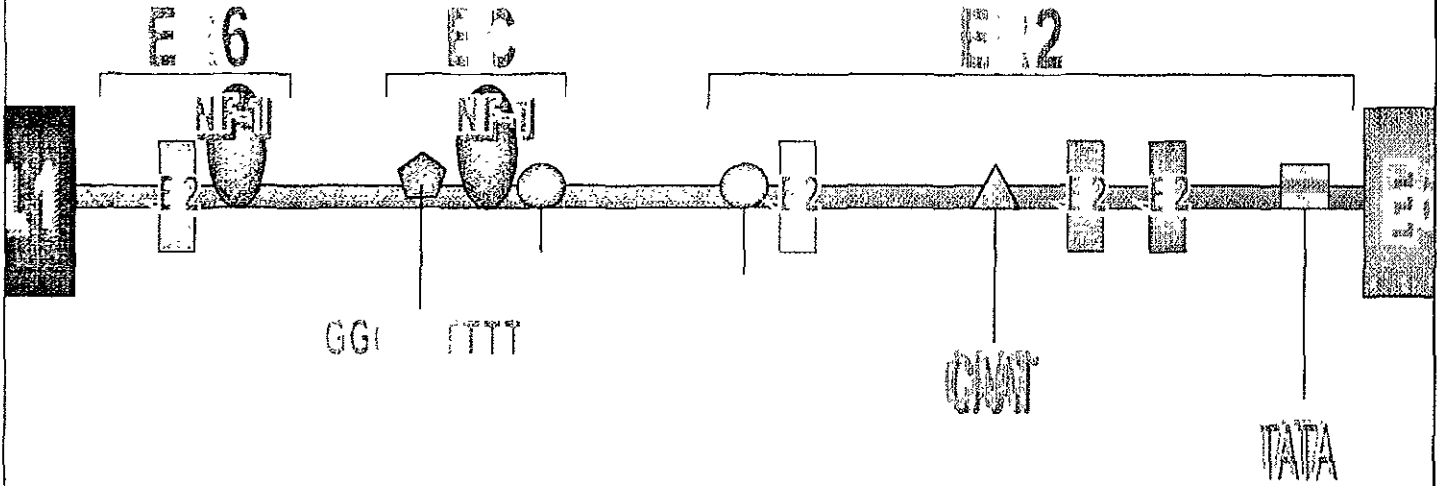
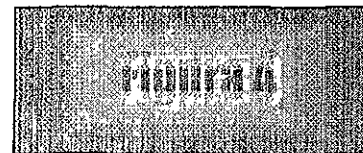
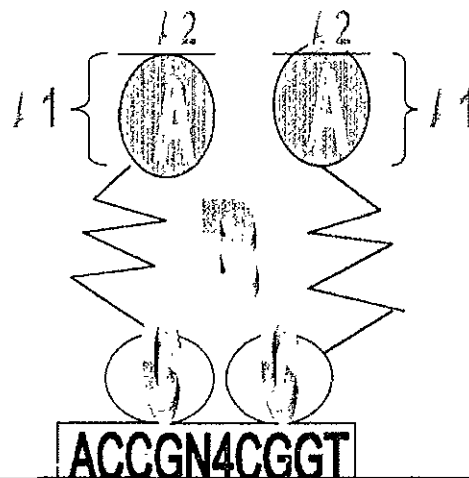
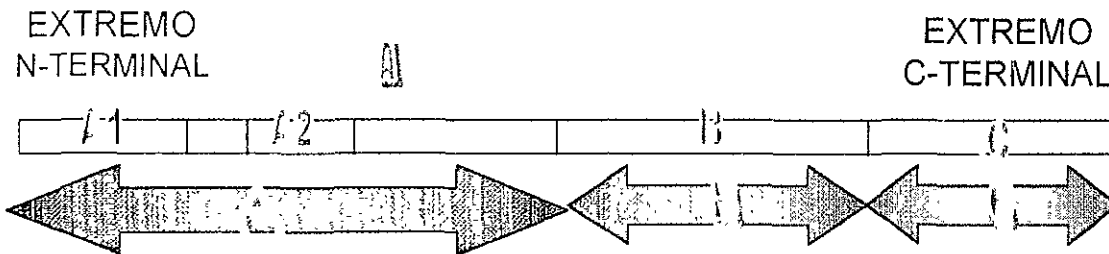
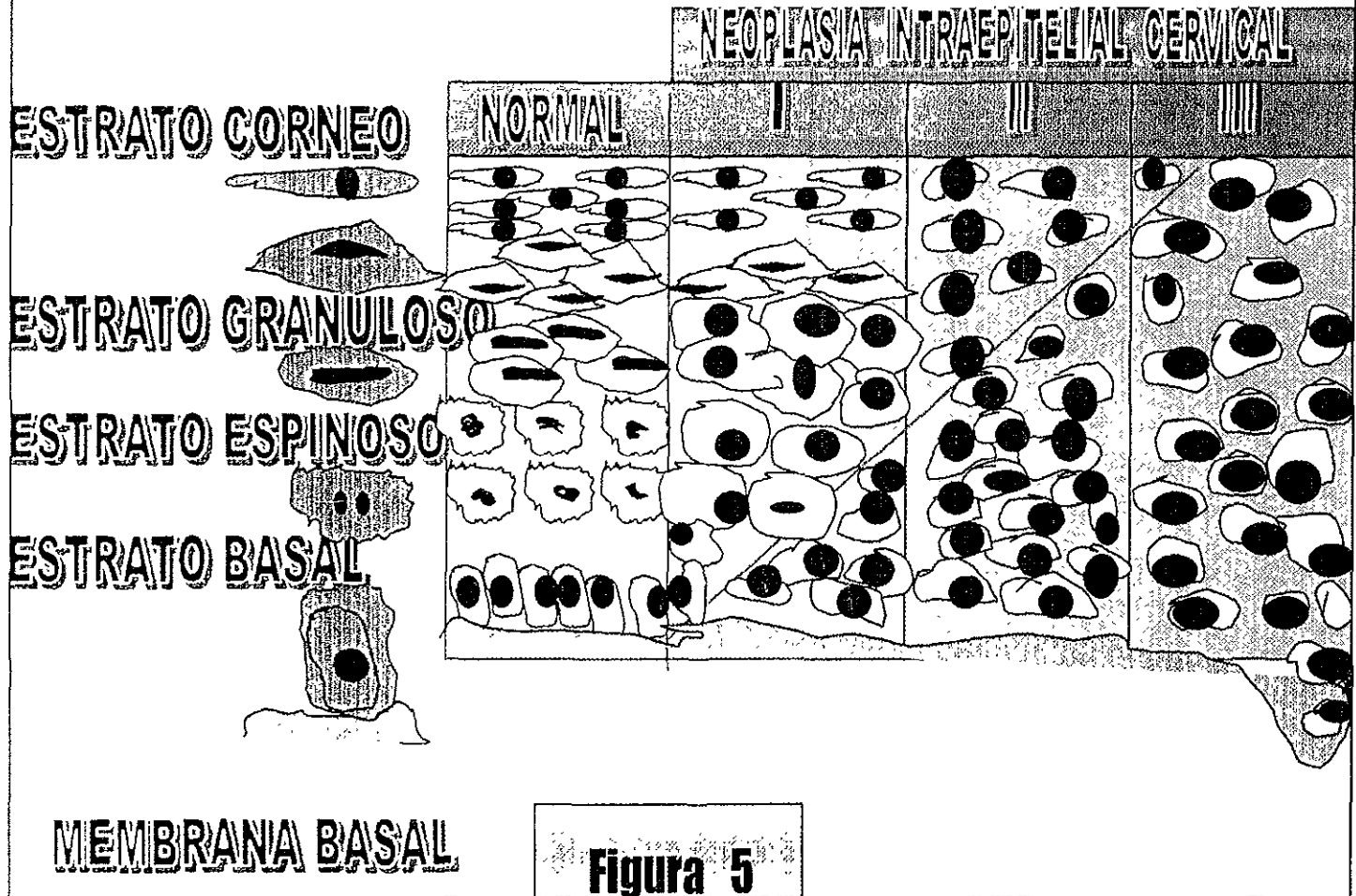


Figura 3

DISECCION MOLECULAR DE LA PROTEINA E2





ENSAYO DE RETARDAMIENTO EN GEL

50

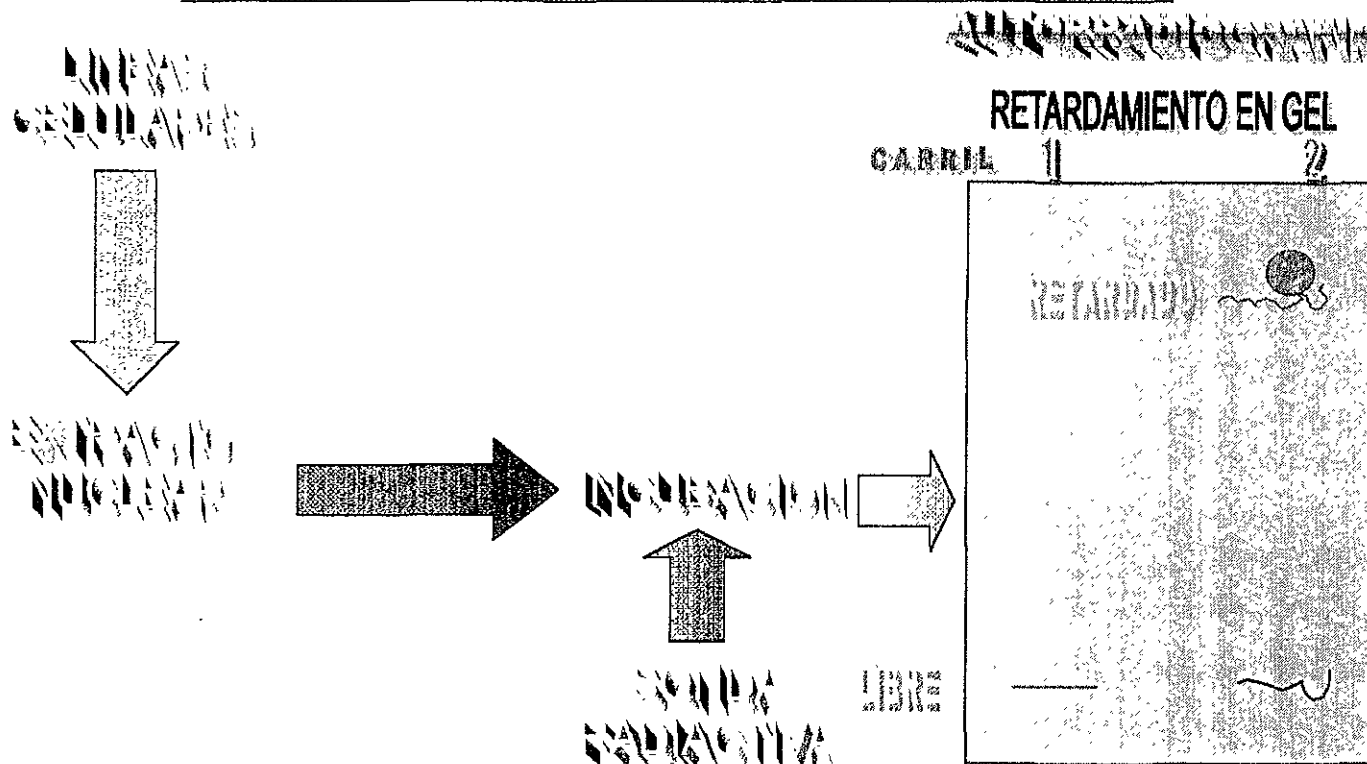
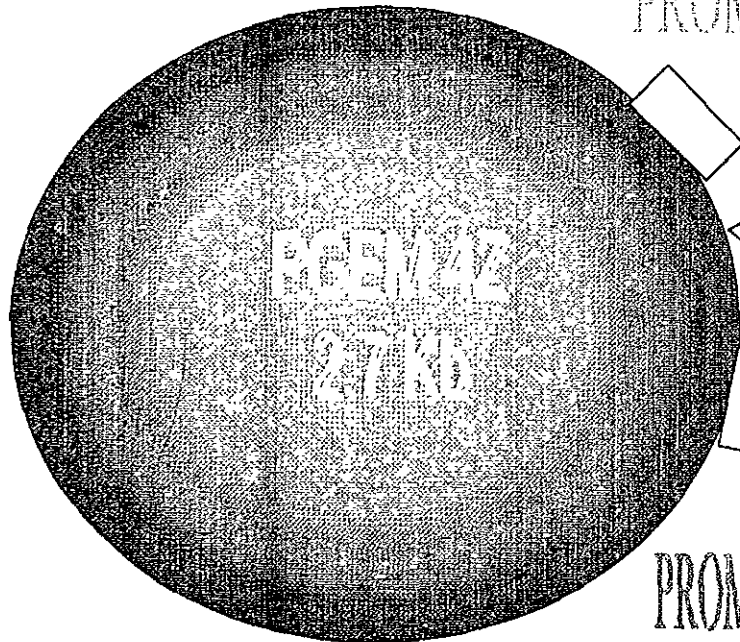


Figura 16

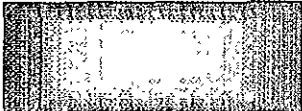
ROLLINKER DE PCGM 42

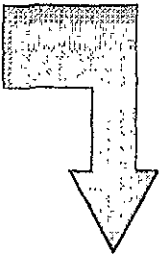
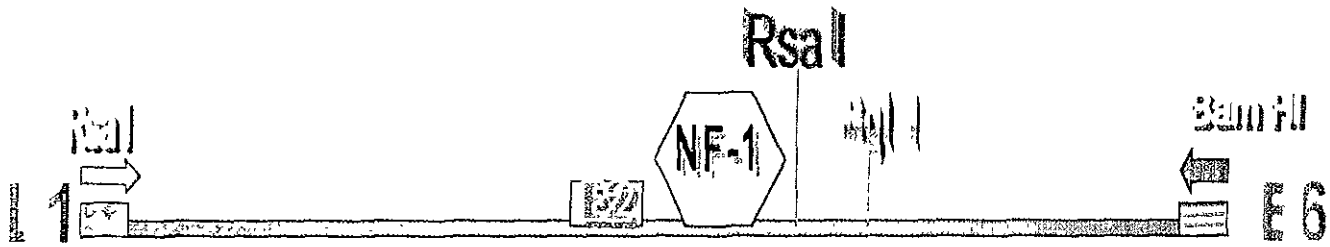
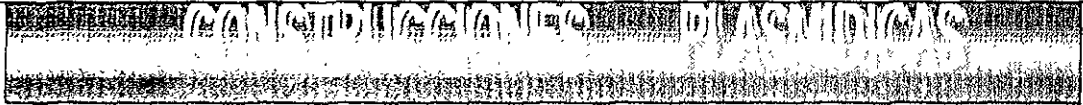


PROMOTOR SP6

PROMOTOR T7

- Eco RI
- Sac II
- ~~Eco RI~~
- Sma II
- Ava I
- Bam HI
- Xba I
- Hinc III
- Acc I
- Sal I
- Pst I
- Sph I
- Hind III





TAGTGCAACCGATTTCGGTTGCCTTTTGGCTTATGT



Figura 8

CONSTRUCCIONES PLASMIDICAS

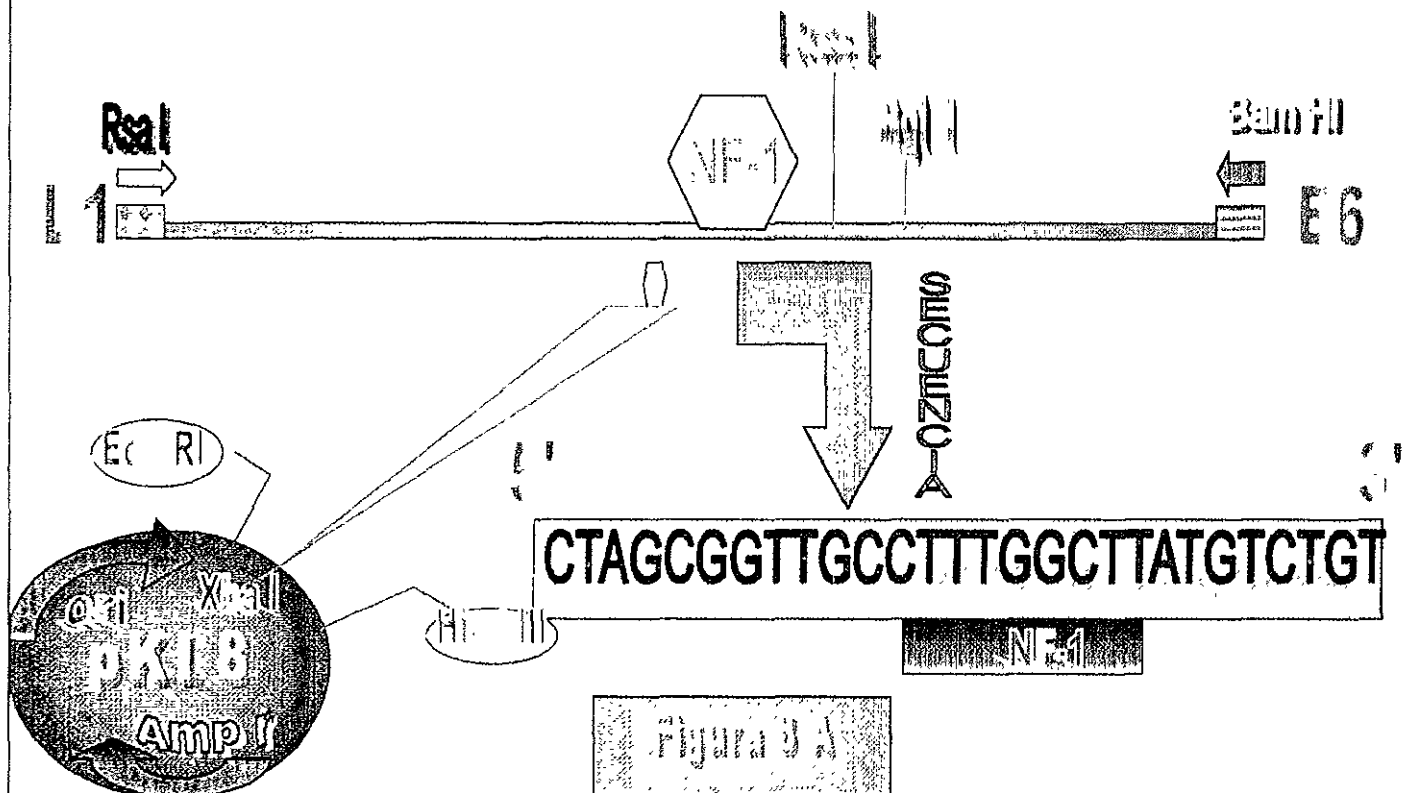
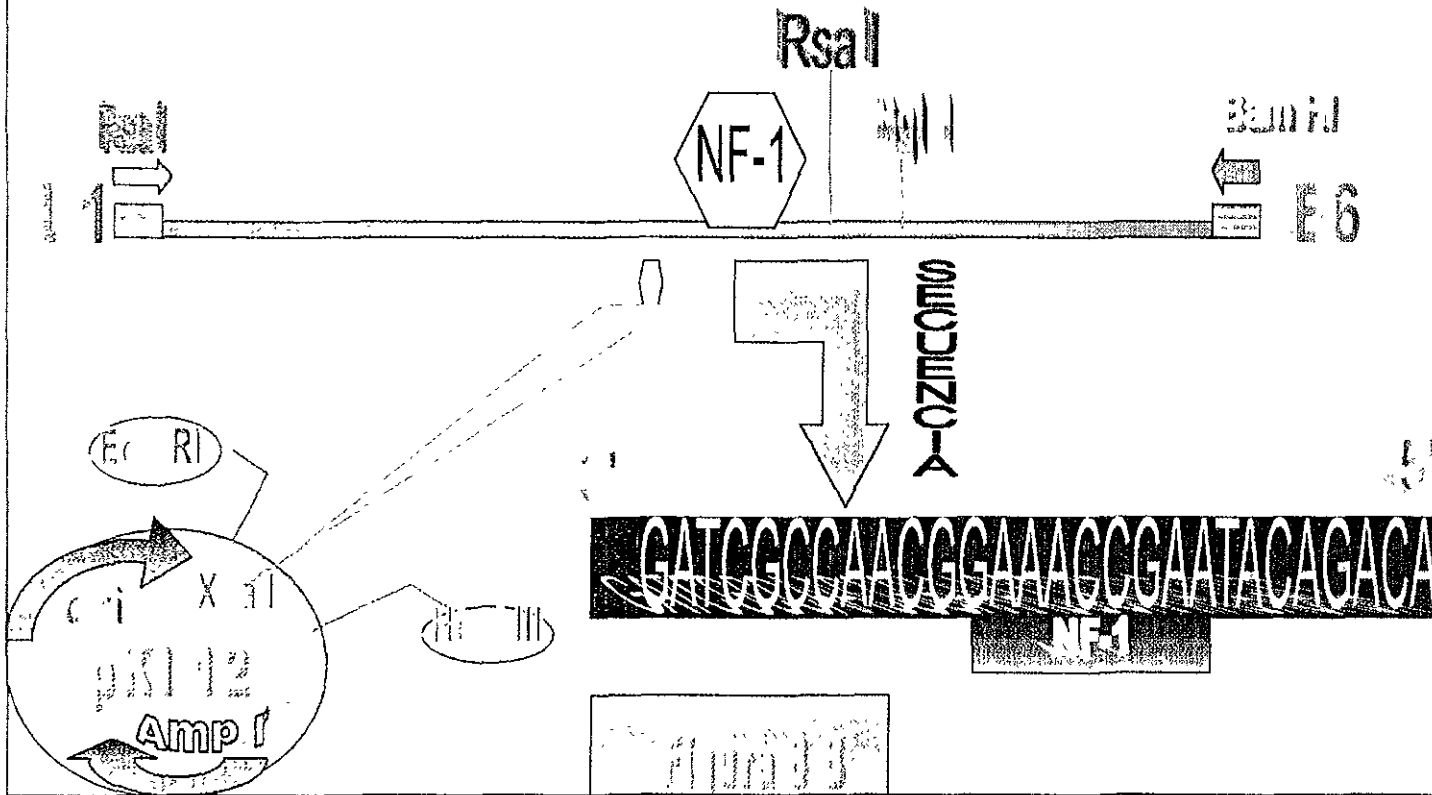
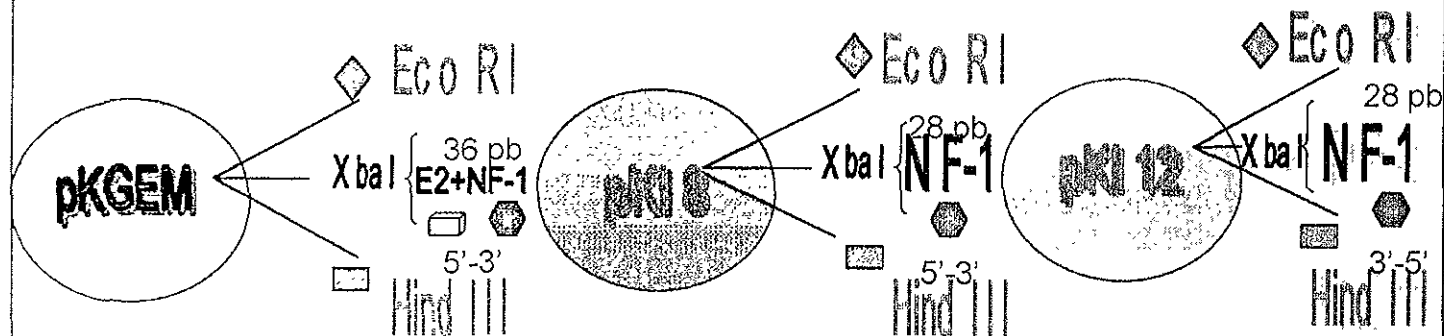


Figura 3 A

CONSTRUCCIONES PLASMIDICAS



CONSTRUCCIONES PLASMIDICAS



pKGEM = pGEM4Z + Polilinker + (E2+NF-1)

pKGEM = 2746 pb + 56 pb + 36 pb

pKGEM = 2838 pb.

pKI 8 = pGEM4Z + Polilinker + NF-1(5'-3')

pKI 8 = 2746 pb + 56 pb + 28 pb

pKI 8 = 2830 pb

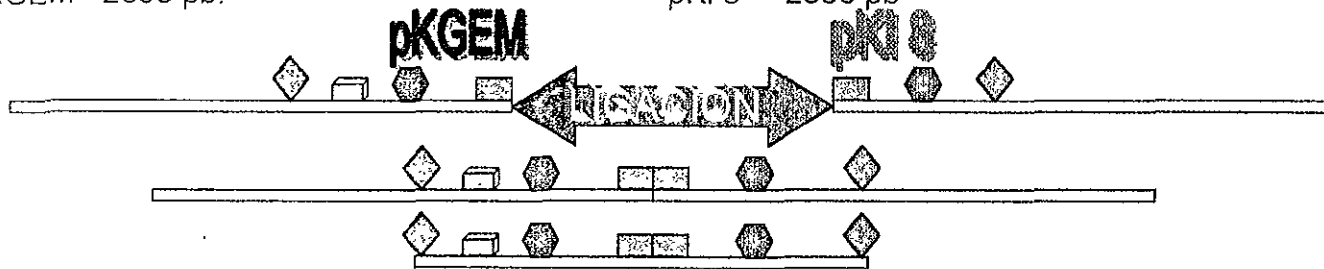
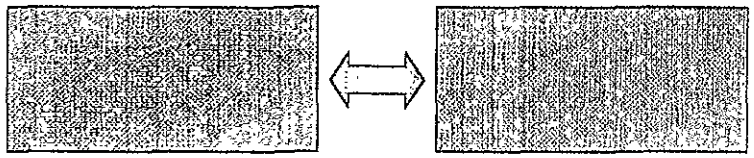


FIGURA 01

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

A) EXTREMOS SIMÉTRICOS O ROMOS



B) EXTREMOS ASIMÉTRICOS O COHESIVOS

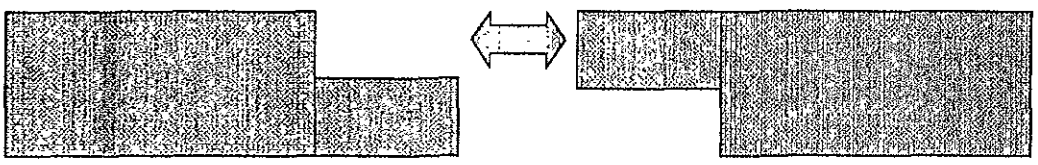
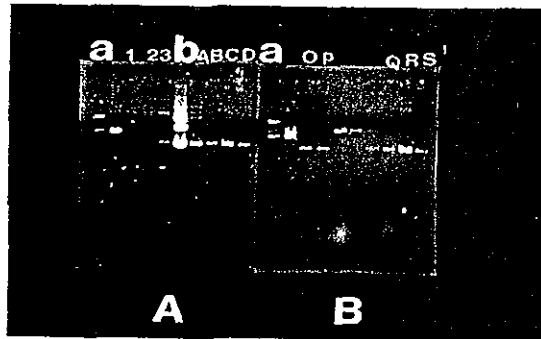


Figura 10



GEL A) CARRILES A B C y D, pK18 (2830 pb), a y b,
SAU 3A-1
GEL B) CARRILES O P Q R y S, pKGEM (2838 pb), a
SAU 3A-1

Figura 11

CARRIL 1

λ -Bst EII

Fragmento (pb)

1	8454
2	7242
3	6369
4	5686
5	4822
6	4324
7	3675
8	2323
9	1929
10	1371
11	1264
12	702
13	224
14	117

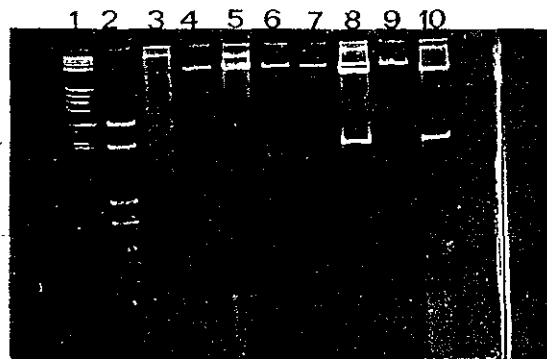


Figura 12

MARCAJE TERMINAL

59

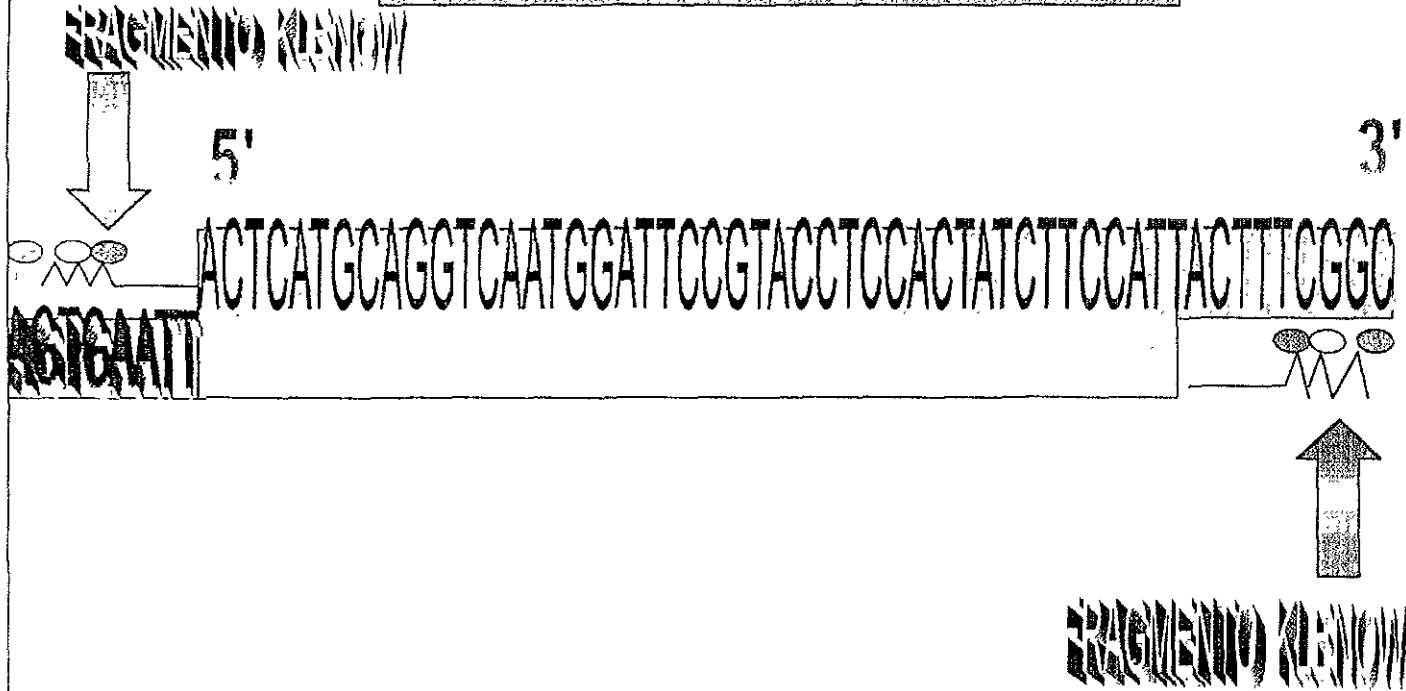
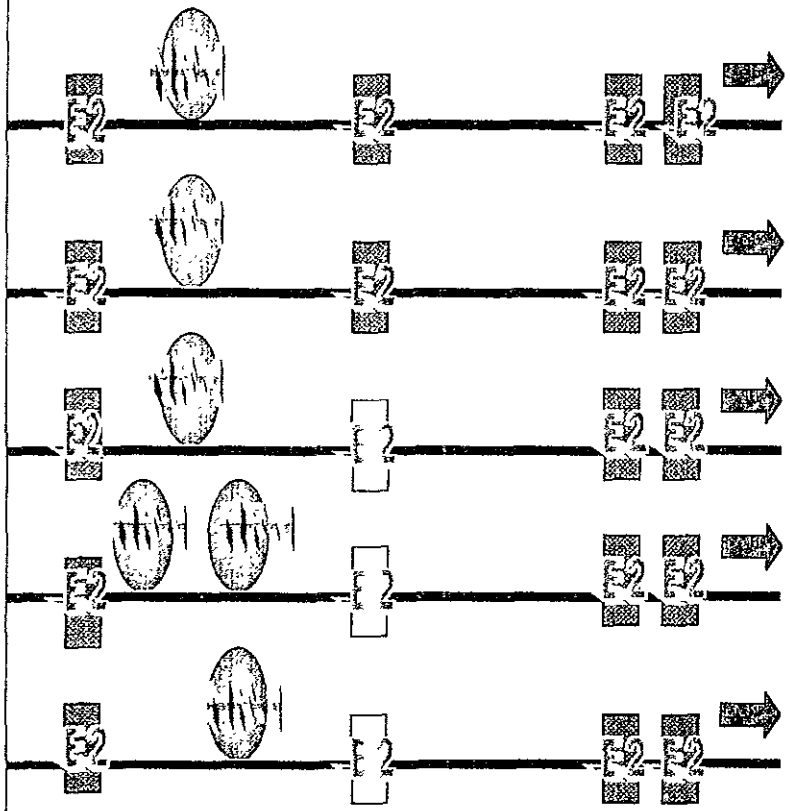


Figura 13

RIODERIVACIONALES



TIPO	ONCOGENECIDAD	INCIDENCIA
50	BAJA	ALTA
11	BAJA	ALTA
13	ALTA	ALTA
18	ALTA	BAJA
29	ALTA	BAJA

Figura 14

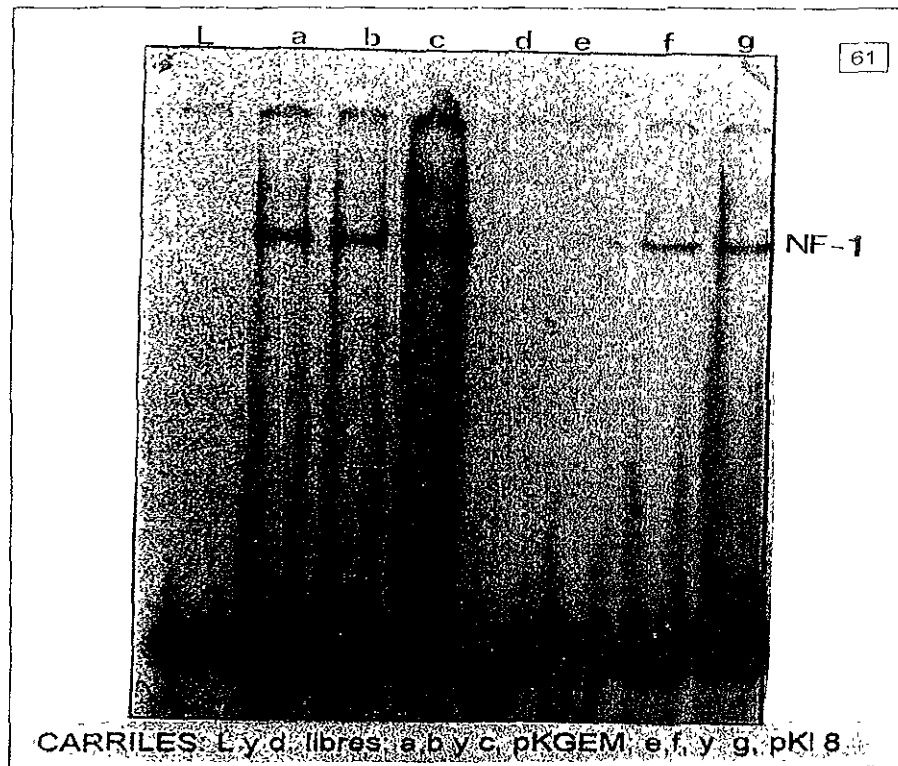
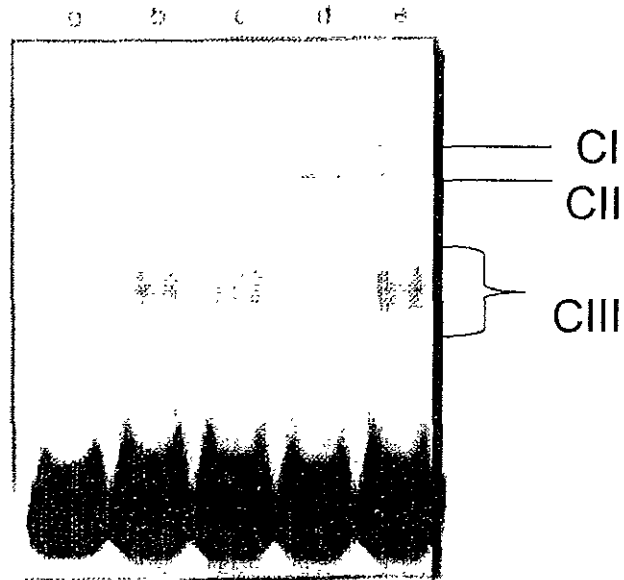


Figura 15

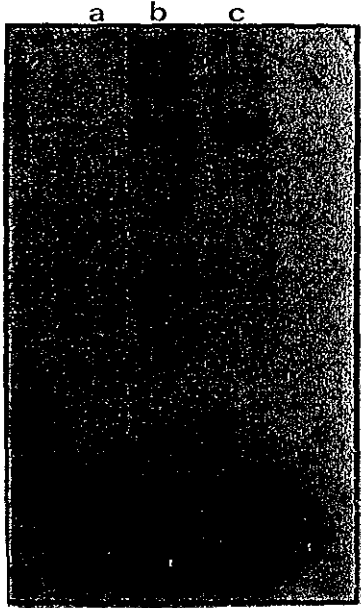
NF- κ B COMPETIDO

62



CARRIL: (a) Libre; (b y e) pKGEN; (c y d) pKI 8

Figura 15A



E2

CARRILES: a, libre; b y c, Cos (pC59) + Oligo E2 (2 y 4 μ l)

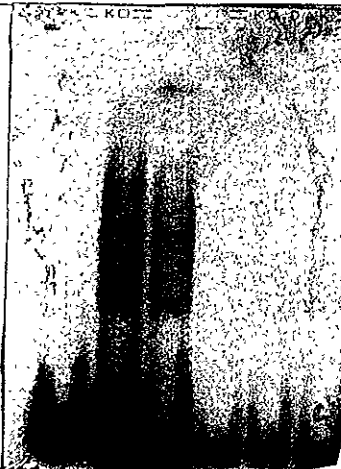
Figura 16

E2 COMPETIDO

CARRIL:

a b c d e f

64



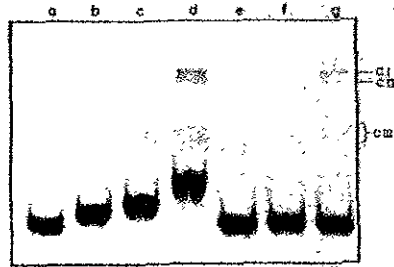
CARRIL: (a) Libre, (b y e) pKGEM, (d-f) Oligo E2 frío.

Figura 16 A

FIGURA 17A

65

A



B

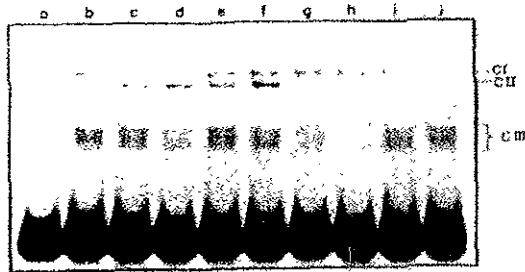
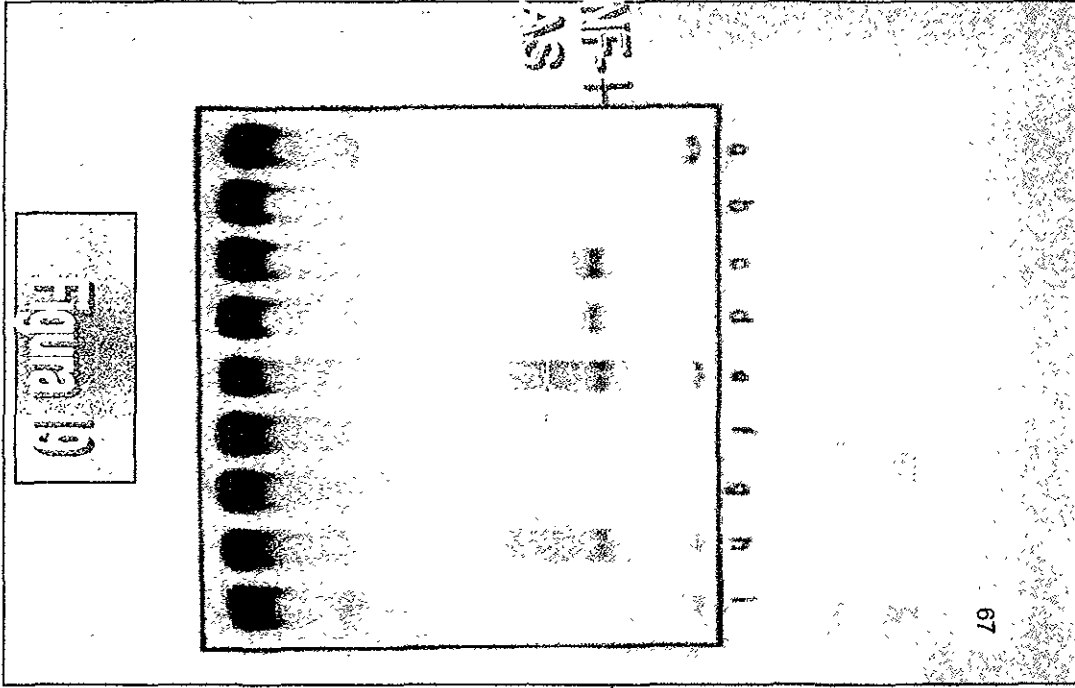


FIGURA 17B

UBICACION DE LOS SITIOS NF1

REF ID/REF	SECUENCIA	ORIENTACION	POSICION (DESDE TATA)
QF3	AAGCCAA	U U U U	- 132
QF1	AAGCCAA		- 37
QF4	AAGCCAA		- 143
AVOLICORNAN	AAGCCAA		- 310
VPH-63	AAGCCAA	A S A S A S A S	- 183
VPH-11	AAGCCAA		- 192
VPH-16	AAGCCAA		- 252
VPH-18	AAGCCAA		- 445
	AAGCCAA		- 189
VPH-18	AAGCCAA		- 188

Figura 18



1/2
1/4

1/2
1/4

67

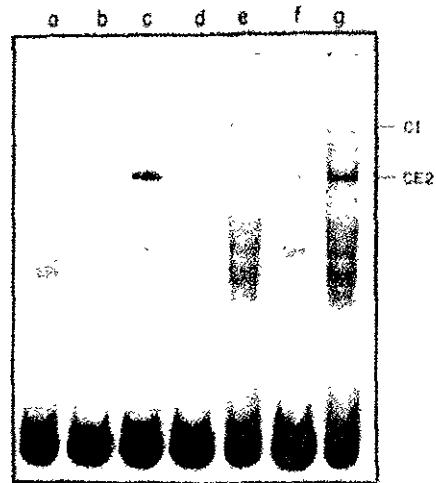


Figura 20

MODELO FUNCIONAL DE NF- κ B

69

